

Universidad Nacional Autónoma de México

Escuela Nacional de Estudios Profesionales

IZTACALA

Estudios Preliminares Sobre la Respuesta
Inmunológica en Conejos con Bacterias
Causantes de Mastitis.

T E S I S

Para Obtener el Título de
Licenciado en Biología

Presenta

Fernando Díaz Otero

Asesor: M.V.Z., Mc.C., Ph.D.

Marcelo E. Pérez Domínguez

México, D.F., 1983



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.

J U R A D O

PRESIDENTE: M. en C. SERGIO VACA P.

VOCAL: Q.F.B. BERTHA HASHIMOTO.

SECRETARIO: MVZ, Mc.C., Ph.D. MARCELO PEREZ DOMINGUEZ.

1^{er} SUPLENTE: Dr. JOSE LUIS STEPHANO H.

2^a SUPLENTE: Dr. MELITON LUNA C.

Dedico este trabajo a mis padres:

Enrique Díaz Caballero

Margarita Otero de Díaz

Por haberme dado su apoyo,
comprensión y la vida.

A mi esposa Laura y mi hija Perla María por su amor y com
prension.

A mis hermanos por sus consejos y estímulos recibidos.

Aunque la profundidad de mi gratitud no pueda expresarse, de todos modos quiero dar las gracias a las personas que me ayudaron a llevar a cabo este trabajo:

MVZ, Ms.C., Ph.D. Marcelo Pérez Domínguez por su valiosa colaboración para la realización de este trabajo.

El autor desea hacer patente su agradecimiento a:
M.V.Z. Elizabeth Murillo Saldaña.

y a todos mis amigos, compañeros y colaboradores.

A mi Alma Mater.

¡Desgraciado del que, en presencia de un libro, queda mudo y absorto; La admiración - extremada achica la personalidad y ofusca el entendimiento, que llega a tomar las hipótesis por demostraciones, las sombras por claridades.

(Santiago Ramón y Cajal).

ESTUDIOS PRELIMINARES SOBRE LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA EN CONEJOS CON BACTERIAS CAUSANTES DE MASTITIS

ESTUDIOS PRELIMINARES SOBRE LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA EN CONEJOS CON BACTERIAS CAUSANTES DE MASTITIS

FERNANDO DIAZ OTERO

ASESOR: MVZ, Mc.C., Ph.D. MARCELO PEREZ DOMINGUEZ.

INDICE

DEDICATORIA.

AGRADECIMIENTO.

RESUMEN.

- I. INTRODUCCION Y OBJETIVOS. - - - - -
- II. REVISION DE LITERATURA. - - - - -
 - II.1. ETIOLOGIA DE LA MASTITIS. - - - - -
 - II.1.a. DEFINICION DE MASTITIS. - - - - -
 - II.1.b. AGENTES PATOGENOS CAUSANTES DE MASTITIS. - - - - -
 - II.2. Streptococcus agalactiae. - - - - -
 - II.2.a. ANTECEDENTES SOBRE ESTREPTOCOCOS. - - - - -
 - II.2.b. CARACTERISTICAS DE Streptococcus agalactiae. - - - - -
 - II.2.c. CAPACIDAD INMUNOGENICA DE Streptococcus agalactiae.
 - II.2.d. RESPUESTA INMUNOLOGICA DE LA GLANDULA MAMARIA A VACUNACION DE Streptococcus agalactiae. - - - - -
 - II.3. Staphylococcus aureus. - - - - -
 - II.3.a. ANTECEDENTES SOBRE Staphylococcus aureus. - - - - -
 - II.3.b. CARACTERISTICAS DE Staphylococcus aureus. - - - - -
 - II.3.c. ESTRUCTURA ANTIGENICA DE Staphylococcus aureus. - - - - -
 - II.3.d. RESISTENCIA INMUNOLOGICA ESPECIFICA A INFECCIONES DE LA GLANDULA MAMARIA POR Staphylococcus aureus. - - - - -
 - II.3.e. VACUNAS VIVAS DE Staphylococcus aureus. - - - - -
 - II.4. INMUNOLOGIA DE LA GLANDULA MAMARIA. - - - - -
 - II.4.a. PROTECCION INMUNOLOGICA DE LA GLANDULA MAMARIA. - - - - -
 - II.4.b. CLASES DE INMUNOGLOBULINAS Y SU TRANSFERENCIA A LA GLANDULA MAMARIA. - - - - -
 - II.4.c. ORIGEN DE LAS CELULAS LINFOIDES DE LA GLANDULA MAMARIA. - - - - -
 - II.5. ADYUVANTES. - - - - -
 - II.5.a. GENERALIDADES SOBRE ADYUVANTES. - - - - -
 - II.5.b. ANTECEDENTES SOBRE DIETHYLAMINOETHYL-DEXTRAN. - - - - -
 - II.5.c. ANTECEDENTES DE Bordetella pertussis. - - - - -
 - II.5.d. ANTECEDENTES DEL ACEITE DE CACAHUATE-LECITINA DE SOYA-GLICEROL. - - - - -
 - II.6. PROCEDIMIENTOS PARA LA EVALUACION DE LA RESPUESTA INMUNE. - - - - -
 - II.6.a. ELECTROFORESIS. - - - - -
 - II.6.b. FIJACION DE COMPLEMENTO. - - - - -
- III. MATERIAL Y METODOS. - - - - -
 - III.1. PROCEDIMIENTOS. - - - - -
 - III.1.a. ANIMALES DE ESTUDIO. - - - - -
 - III.1.b. BACTERIAS ESTUDIADAS. - - - - -
 - III.1.c. PREPARACION DEL ANTIGENO. - - - - -

| | | |
|----------|--|-------|
| III.1.d. | ESTANDARIZACION DEL ANTIGENO. | ----- |
| III.1.e. | COLECCION DE SUEROS. | ----- |
| III.1.f. | ELECTROFORESIS. | ----- |
| III.1.g. | PRUEBA DE FIJACION DE COMPLEMENTO. | ----- |
| III.2. | MATERIAL Y METODO. EXPERIMENTO N°I | ----- |
| III.2.a. | PREPARACION DEL INOCULO Y ESQUEMA DE INMUNIZACION. | ----- |
| III.3. | MATERIAL Y METODO. EXPERIMENTO N°II | ----- |
| III.3.a. | PREPARACION DEL INOCULO CON DEAE-D. | ----- |
| III.3.b. | PREPARACION DE LA MEZCLA DE LECITINA DE SOYA-ACEITE DE CACAHUATE-GLICERINA PURA. | ----- |
| III.3.c. | PREPARACION DEL INOCULO CON <u>Bordetella pertussis</u> . | ----- |
| III.3.d. | ESQUEMAS DE INMUNIZACION. | ----- |
| IV. | RESULTADOS. | |
| IV.1. | RESULTADOS GENERALES. | ----- |
| IV.2. | RESULTADOS: EXPERIMENTO N° I | ----- |
| IV.3. | RESULTADOS: EXPERIMENTO N° II | ----- |
| V. | DISCUSION. | |
| V.1. | PRIMER EXPERIMENTO. | ----- |
| V.2. | SEGUNDO EXPERIMENTO. | ----- |
| VI. | CONCLUSIONES GENERALES. | ----- |
| VII. | REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS. | ----- |

RESUMEN

En el Departamento de Bacteriología I.N.I.P.*-S.A.R.H., se llevó a cabo el presente trabajo, con el fin de realizar los siguientes objetivos:

- 1). Estandarización de una técnica (Electroforesis y Fijación de Complemento) para evaluar la respuesta humoral en conejos, inmunizados con bacterias inactivadas causantes de mastitis (S. aureus, S. agalactiae y Combinadas).
- 2). Valoración de diferentes adyuvantes en la respuesta humoral.
- 3). Evaluación de diferentes dosis con antígenos de S. aureus, S. agalactiae y Combinadas.
- 4). Determinación de respuesta cruzada entre ambos antígenos.

Descripción del Experimento:

Consistió de dos partes: En la primera parte se utilizaron 8 conejos que fueron inmunizados con una suspensión de bacterias de Streptococcus agalactiae inactivada. Se realizaron 4 programas de inmunización, con dos vías de administración, intravenosa (IV) e intramuscular (IM). En la vía IM se usó adyuvante de Freund completo e incompleto en presencia del antígeno (Ag).

Los niveles de inmunoglobulinas fueron medidos por medio de la técnica de Electroforesis y Fijación de Complemento.

La segunda parte de este trabajo se probaron 24 programas, con una sola vía de inoculación (IM). Se utilizaron 3 adyuvantes diferentes; Dietilaminoetil-Dextran (DEAE-D) a una concentración de 5 mg/kg de peso del animal vivo, una emulsión de glicerol, aceite de cacahuete y lecitina de soya (G-C-L) a una relación de 10-10-1 respectivamente y Bordetella pertussis (B.p) a una concentración de 3000×10^6 org/ml.

La respuesta humoral se midió durante los primeros 75 días con intervalos de 15 días cada sangrado. En esta parte se dio una segunda inoculación a los 135 días y se verificó su respuesta 30 días después.

En los resultados se observa que S. aureus tiene una mayor capacidad antigénica (antígenos somáticos de superficie) que S. agalactiae.

Los adyuvantes que mostraron tener una mayor eficacia con estos antígenos fueron B.p. y G-C-L.

*Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias.

No se detectó un efecto claro de la dosis/respuesta de bacterias inoculadas, notándose una pequeña ventaja en los tratamientos que recibieron mayor inóculo bacteriano.

En los animales que recibieron el antígeno combinado, al ser valorados con S. aureus y S. agalactiae, mostraron una menor respuesta que cuando se valoraron con ambos antígenos a la vez.

El comportamiento en la respuesta cruzada entre ambos antígenos - posiblemente tuvo algunas similitudes entre los determinantes antigénicos - por los pocos títulos alcanzados en la respuesta cruzada.

I. INTRODUCCION.

La incidencia de infecciones de la glándula mamaria de las hembras destinadas a la explotación lechera, tuvo un cambio hacia el incremento tan pronto como el animal fue domesticado y utilizado con propósitos lecheros. Varios factores asociados con la interferencia humana en la lactación normal de los ruminantes, pudieron haber tenido este efecto. Por ejemplo, la selección genética para una mayor o más alta producción de leche podría haber dado una selección hacia resistencia natural para la infección (29), o tal vez volviendo más vulnerable a las infecciones bacterianas (31). La retención de grandes cantidades de leche en la glándula mamaria por períodos largos, da condiciones favorables para el establecimiento de numerosos agentes patógenos. La introducción de la máquina ordeñadora, a pesar de sus ventajas, dio nuevos medios para lastimar inadvertidamente a la glándula mamaria y/o predisponer a la infección. Así es bien reconocido que la incidencia de mastitis en hatos que son manejados en forma extensiva en ganado de carne, es más baja que en el caso del ganado lechero.

La mastitis bovina es una de las enfermedades que más afectan a la industria lechera, al grado que ocasionan pérdidas anuales calculadas en más de siete mil millones de pesos. Tal cifra comprende la pérdida ocasionada por animales muertos, enfermos, desechados prematuramente y por el lacteo eliminado o decomisado por no resultar apto para el consumo humano.

Se ha estimado en U.S.A. los daños por mastitis ocasionan pérdidas por 400 millones dolares anuales y cada productortiene que destinar mil dolares de sus ganancias para controlar esta enfermedad (46).

En vista de la alta incidencia de mastitis en ganado lechero, sus enormes costos y problemas intrínsecos asociados con la terapia de antibióticos y profilaxis, se ha dado considerable atención a la INMUNIZACION EN CONTRA DE MASTITIS de etiología bacteriana. Desafortunadamente los avances en la inmunización convencional que han probado ser exitosos en profilaxis de otras enfermedades, han dado resultados desalentadores cuando se aplican para inmunizar contra patógenos de la glándula mamaria. En el caso de mastitis por estafilococos, por ejemplo, la literatura menciona estudios que describen experimentos en los que la administración sistémica de vacunas -- muertas y/o toxoides, con o sin adyuvante, han inducido poca protección inmunológica durante la lactación (12, 22, 35, 41, 48, 53).

Sin embargo, existe un período dentro del estadio productivo de la vaca lechera que potencialmente puede ser adecuado para la estimulación

del sistema inmunológico y usarse como preventivo (30). Este período es el tiempo en que la vaca lechera no esta en producción.

Por otro lado, no es suficiente la información que se tiene sobre las características inmunogénicas de las dos especies de bacterias que más frecuentemente causan mastitis sobre la respuesta humoral al desafío, bajo diferentes circunstancias. Por lo que se considera necesario obtener más información sobre la capacidad inmunogénica de las bacterias causantes de mastitis utilizando el conejo como unidad experimental y evaluar la respuesta humoral en ellos.

Por lo tanto los OBJETIVOS de este trabajo fueron:

- 1). Estandarización de una técnica (Electroforesis y Fijación de Complemento) para evaluar la respuesta humoral en conejos inmunizados con bacterias inactivadas causantes de mastitis (S. aureus, S. agalactiae y Combinadas).
- 2). Valoración de diferentes adyuvantes en la respuesta humoral.
- 3). Evaluación de diferentes dosis con antígeno de Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae y Combinadas.
- 4). Y la determinación de respuesta cruzada entre ambos antígenos.

II. REVISION DE LITERATURA.

II.1. ETIOLOGIA DE LA MASTITIS.

II.1.a. DEFINICION DE MASTITIS.

El término mastitis se refiere a la inflamación de la glándula mamaria, sea cualquiera su etiología y se caracteriza por alteraciones patológicas del tejido glandular y por modificaciones físico-químicas de la leche. En algunas anomalías de la leche cabe mencionar cambios de color, presencia de grumos y gran número de leucocitos. Debido al elevado número de casos - subclínicos, el diagnóstico de mastitis depende de pruebas basadas en el conteo de células somáticas en la leche (38). Son muy diferentes los organismos que pueden infectar la glándula mamaria (10). A pesar de los programas de higiene y terapia, el número de infecciones no parece disminuir en nuestro territorio nacional (46). Siendo la frecuencia de los diferentes agentes patógenos la que cambia como consecuencia de la aplicación y uso indiscriminado de antibióticos. La importancia de cada uno de los microorganismos causantes de mastitis no es la misma en las diferentes épocas del año - y de la lactación (5).

Aunque la mastitis ocurre esporádicamente en todas las especies, adquiere mayor importancia en las vacas lecheras. En relación con pérdidas económicas, es sin duda la enfermedad más importante con la cual debe enfrentarse la industria lechera (46).

II.1.b. AGENTES PATOGENOS CAUSANTES DE MASTITIS.

Los agentes infecciosos causantes de mastitis encuentran un habitat normal en el medio ambiente en que se desarrollan las vacas lecheras, y teóricamente es posible aislar cualquiera de los agentes infecciosos. En el Cuadro No.I se presentan los organismos que son reconocidos como causantes de mastitis.

Se han encontrado muchos agentes infecciosos como productores de mastitis, siendo las bacterias el principal causante etiológico de la enfermedad.

Además de estos agentes infecciosos hay algunos virus y micoplasmas que pueden encontrarse o aislarse en un momento dado, aunque no en la misma frecuencia y número que las bacterias (16).

Asimismo, no todos los agentes patógenos poseen la misma capacidad para establecerse en la glándula mamaria. Por ejemplo, como en el caso de E. coli, esta bacteria a pesar de que se encuentra en grandes cantidades

CUADRO No. I.- MICROORGANISMOS RECONOCIDOS POR LA NATIONAL MASTITIS COUNCIL
DE LOS E.E. U.U. COMO CAUSANTES DE MASTITIS*.

| | |
|------------------------------------|---|
| <i>Streptococcus agalactiae</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| <i>Streptococcus dysgalactiae</i> | <i>Staphylococcus epidermidis</i> |
| <i>Streptococcus uberis</i> | |
| <i>Streptococcus zooepidemicus</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| <i>Streptococcus bovis</i> | <i>Enterobacter aerogenes</i> |
| | <i>Klebsiella pneumoniae</i> |
| <i>Proteus spp</i> | |
| <i>Clostridium perfringens</i> | <i>Candida pseudotropicalis</i> |
| <i>Corynebacterium pyogenes</i> | <i>Candida tropicalis</i> |
| <i>Corynebacterium bovis</i> | <i>Cryptococcus neoformans</i> |
| <i>Nocardia asteroides</i> | <i>Pichia farinosa</i> |
| <i>Pasteurella multocida</i> | <i>Trichosporon cutaneum</i> |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | |
| | <i>Mycoplasma bovis</i> |
| <i>Candida albicans</i> | <i>Mycoplasma bovigenitalium</i> (serotipo 2)** |
| | <i>Mycoplasma alkalescens</i> |
| | Leach's Grupo 7 |
| | <i>Mycoplasma canadensis</i> |

*) Colloquium on bovine mastitis. J.A.V.M.A. 170 (10). 1977

***) Micoplasmosis de los animales. C. Eichwald. (1973).

produce relativamente pocos problemas de mastitis y por otro lado, Streptococcus agalactiae es una bacteria que más frecuentemente produce daño (31).

El 80% de los casos de mastitis son originados por la invasión de gérmenes patógenos a la ubre (31). La mastitis ocurre frecuentemente durante el período seco y las primeras semanas después de iniciarse la lactación (10). La mastitis puede ser la expresión clínica de las infecciones que podrían haber existido desde el momento del secado, o bien deberse a infecciones nuevamente establecidas. Las bacterias patógenas de los géneros Staphylococcus y Streptococcus principalmente, invaden con mayor frecuencia a la glándula mamaria durante las primeras semanas posteriormente al secado (ver Cuadro No.II).

CUADRO No.II.- PORCENTAJE DE VACAS CON GLANDULA MAMARIA INFECTADA POR DIFERENTES PATOGENOS*.

| | | |
|---------------------------------|-------|-----|
| Vacas no infectadas. | ----- | 50% |
| <u>Streptococcus agalactiae</u> | ----- | 23% |
| Otros Estreptococos | ----- | 13% |
| <u>Staphylococcus aureus</u> | ----- | 13% |
| Otras bacterias | ----- | 1% |

* Pérez D. M. 1978. Manual S. G. L., Palo Alto.

La posición predominante de Streptococcus agalactiae como causa de mastitis bovina ha sido substituida a este germen en los últimos años por Staphylococcus aureus, especialmente en regiones en donde el tratamiento de la mastitis con penicilina se ha practicado intensamente y en donde han reemplazado el ordeño de mano por máquinas de ordeño (16).

II.2. Streptococcus agalactiae.

II.2.a. ANTECEDENTES SOBRE ESTREPTOCOCOS.

El género Streptococcus comprende un grupo heterogéneo de microorganismos con una amplia gama de huéspedes animales.

Desde el año de 1880 Rosenbach observó estos organismos en los estados inflamatorios supurativos. Aparte de las formas virulentas, se sabe ahora que a menudo existen en la garganta y el tubo intestinal de los animales. Las ciertas variedades de estreptococos, bacterias relativamente inocuas.

Streptococcus agalactiae fue aislado inicialmente por Lehman y Neuman en 1886 como causante de mastitis (5).

Las bacterias reconocidas como causantes de mastitis infecciosa - de amplia distribución mundial son tres: Streptococcus agalactiae, Streptococcus uberis y Streptococcus dysgalactiae; se identificaron como los principales estreptococos involucrados en mastitis, siendo el más prevalente -- Streptococcus agalactiae. Bajo circunstancias especiales otras especies de estreptococos no son ampliamente distribuidas. Muchos de los anteriores -- fueron clasificados alfabéticamente en secuencia de su descubrimiento. Los designados desde la letra A hasta la P, se han referido para especificidad serológica por medio del método desarrollado por Lancefield. Streptococcus agalactiae pertenece al grupo B por el hecho de que los estreptococos poseen componentes antigénicos estables y específicos (polisacáridos, proteínas y nucleoproteínas presentes en su pared celular) (38).

Hasta el momento se diferencian 13 grupos de streptococos por el polisacárido de grupo específico de la pared celular que se designa como -- substancia C. En el Cuadro No.III se presentan las especies más conocidas y algunas características generales.

Se encuentran muchos tipos y subtipos que se diferencian, además de los antígenos polisacáridos de tipo específico, por la substancia S, en el caso de los Streptococcus del grupo B y las proteínas M y T específicas de los Streptococcus del grupo A (20).

Reportes hechos sobre la incidencia de infecciones por el género de Streptococcus muestran a Streptococcus agalactiae en un porcentaje que -- va de un 70-80%, Streptococcus uberis de un 10-12%, Streptococcus dysgalactiae de 1.3-7.0% y otros estreptococos en 1.2% (38).

En el transcurso de la última década, se ha identificado a Streptococcus agalactiae (estreptococo del grupo B) como causante mayor de infecciones en recién nacidos. Las manifestaciones de enfermedad incluyen bacteremia, meningitis y neumonía. Los estreptococos del grupo B aislados del humano y bovinos se han clasificado en 5 serotipos (Ia. Ib. Ic. II y III). La inmunidad en el humano y en los animales de experimentación parece ser -- específica de tipo (53).

II.2.b. CARACTERISTICAS DE Streptococcus agalactiae.

Morfología y Reacciones Tintoreales.- Presenta generalmente la forma de cadenas largas cuando se le encuentra en las secreciones de ubres in-

CUADRO No. III.- CARACTERISTICAS DIFERENCIALES DE STREPTOCOCOS IMPORTANTES DE LOS ANIMALES⁶

| Especie | Grupo | Hemólisis. | Trehalosa. | Sorvitol. | Manitol. | Fermentación: salicín | Acido láctico. | Rafinosa. | Inulina. | Esculina. | Hipurato de sodio* | Leche Torna-solada. |
|---------------------|-------|------------|------------|-----------|----------|-----------------------|----------------|-----------|----------|-----------|--------------------|---------------------|
| Str. pyogenes | A | β | + | - | v | +(v) | + | - | - | - | - | A |
| Str. zooepidermicus | C | β | - | + | - | + | + | - | - | - | - | A sl +-R |
| Str. equisimilis | C | β | + | - | - | +(v) | v | - | - | - | - | A sl -R |
| Str. equi | C | β | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| Str. agalactiae | B | α, β, γ | + | - | - | +(v) | + | - | - | - | + | Ac sl -R |
| Str. dysgalactiae | C | α, β, γ | + | - | - | - | + | - | - | - | - | AR |
| Str. uberis | | α, β, γ | + | + | + | + | + | - | + | + | + | AR sl -C |
| Str. canis | G | β | - | - | + | + | + | - | - | v | + | AR |
| Str. fecalis | D | α, γ | + | + | + | + | + | - | - | + | v | ARC |
| Str. bovis | D | α | v | - | v | + | + | - | + | + | - | A |

v = variable.

ACR = Acido-Coagulación-Reducción

A = Acidifica.

* Hidrólisis

+ sl + ligero

⁶ Carter G. R. Diagnostic Procedures in Veterinary Microbiology (1978).

fectadas. El microorganismo es gram positivo y se tiñe con facilidad con todos los colorantes ordinarios. Los cocos individuales son esféricos, ovoides y se disponen en cadenas. Los miembros de las cadenas a menudo presentan una notable apariencia de diplococos y ocasionalmente se observan individuos cuya longitud los hace semejantes a los bacilos cortos (11).

Caracteres de Cultivo.- En medios sólidos, primordialmente en Agar Sangre, los estreptococos crecen en colonias pequeñas, suaves, translúcidas y convexas (11). El desarrollo en caldo-suero es granular o en copos y se localiza en el fondo de los tubos mientras el resto del caldo permanece limpio. La leche tornasolada incubada a 37C es acidificada y coagulada a las 48 horas. La leche con azul de metileno no es reducida. En caldo dextrosa, la concentración final de hidrogéniones varía de pH 4.4 a 4.7 Hidroliza el hipurato de sodio. La dextrosa, lactosa, sacarosa y maltosa son regularmente fermentadas, la salicina, lo es a veces.

Según Gochnaver y Wilson, alrededor del 90% de las cepas estudiadas de Streptococcus agalactiae producen hialuronidasa y al parecer la enzima formada por este microorganismo es serológicamente distinta de la liberada por el grupo A de estreptococos (20).

Las cepas de Streptococcus agalactiae tanto de origen humano como animal, producen una sustancia que puede lisar a glóbulos rojos de ovino y bovino (pero no los del hombre, caballo, conejo y cobayo) cuando se ponen en contacto con la toxina α de Staphylococcus aureus. El fenómeno conocido como prueba de CAMP es casi específico para los Streptococcus del grupo B (34).

CUADRO No.IV.- DIFERENCIAS BIOQUIMICAS DEL GENERO STREPTOCOCCUS.

| ORGANISMO | CAMP | ESCOLINA | HEMOLISIS | HIDRO. DE HIPURATO DE Na. |
|--------------------------|------|----------|-------------------------------|---------------------------|
| <u>Str. agalactiae</u> | + | - | $\alpha, \beta \delta \gamma$ | + |
| <u>Str. dysgalactiae</u> | - | - | $\alpha \delta \gamma$ | - |
| <u>Str. uberis</u> | - | + | $\alpha \delta \gamma$ | + |

* Puede encontrarse cepas de Str. agalactiae negativa a CAMP
 ** Puede encontrarse cepas de Str. uberis positiva a CAMP

II.2.c. CAPACIDAD INMUNOGENICA DE Streptococcus agalactiae.

Streptococcus agalactiae no es un invasor activo de tejido. Se multiplica en la leche, en la superficie de la cisterna y en los ductos. Produce un irritante que es causa de la reacción inflamatoria, la que es principalmente subclínica con períodos agudos de nuevos brotes. Los productos de inflamación pueden bloquear los canales de la leche y de este modo impiden el drenaje de los alveolos asociados, resultando en la involución. Los irritantes acumulados conducen a la intensificación de la reacción inflamatoria originando una marcada pérdida en la producción de leche.

El bajo grado de virulencia de Streptococcus agalactiae en animales de laboratorio ha sido un obstáculo en los estudios inmunológicos. -- Streptococcus agalactiae es un patógeno para el embrión de pollo y el pase a través de este puede incrementar su virulencia para el ratón (13).

El ratón y el cuyé pueden inmunizarse contra una dosis prueba de Streptococcus agalactiae, aunque a través de investigaciones han sido incapaces de inducir inmunidad en el ratón. El suero de cabras que han sido inoculadas intravenosamente o intraperitonealmente con Streptococcus agalactiae, confiere protección pasiva al ratón. La prueba de protección pasiva ha sido usada para valorar cuantitativamente los anticuerpos contra Streptococcus agalactiae del suero y leche en las vacas (13).

En estudios posteriores se han empleado técnicas para la extracción de proteína M, el polisacárido S, el polisacárido C y productos extracelulares (también polisacáridos) de Streptococcus agalactiae (referidos como 1,2, 3 y 4); usando la prueba de Fijación de Complemento con estas sustancias como antígeno; se demostraron anticuerpos fijadores de complemento en conejos inoculados con Streptococcus agalactiae para los cuatro antígenos. No se han detectado anticuerpos en vacas sin historia de infección por Streptococcus agalactiae, mientras que todas las vacas con historia de infecciones reaccionaron al cuarto antígeno pero no a los números 1, 2 y 3. A su vez en calostro se detectaron anticuerpos contra el antígeno N° 1 en todas las vacas con historia de infección por Streptococcus agalactiae, pero sin una explicación se encontraron anticuerpos contra el antígeno N°4 en todas las vacas, incluyendo aquellas sin una previa historia de infección por Streptococcus agalactiae (38).

II.2.d. RESPUESTA INMUNOLOGICA DE LA GLANDULA MAMARIA A VACUNACION DE Streptococcus agalactiae.

Se han usado vacunas de diferentes tipos en el tratamiento de mas titis estreptococica bovina, pero los resultados obtenidos han sido dudosos (13).

Se han realizado experimentos por Yuichi Yokomizo para producir anticuerpos contra Streptococcus agalactiae, de tipo Ia. con inmunizaciones sistémicas e intramamarias en vacas preñadas. Se demostró que el contenido de inmunoglobulinas, IgG₁, IgG₂ e IgM en el calostro de la glándula que fue ron vacunadas no mostró diferencia substancial con las glándulas no vacunadas, el contenido de IgA fue considerablemente mayor en las glándulas que fueron inmunizadas. Sin embargo, estos anticuerpos no han mostrado contribuir a la defensa contra las infecciones de la glándula mamaria. Recientemente se ha prestado mayor atención a las vacunas por ruta intramamaria que han mostrado ser capaces de responder con un incremento en la producción de IgA (53).

La protección contra la invasión por patógenos en la glándula mamaria se puede lograr por la inducción de una respuesta inmune local en este tejido. Se han hecho numerosos intentos para obtener una vacuna contra la mastitis por estreptococos, y cualquier conocimiento sobre la inmunidad local es provechoso, ya que el acercamiento al problema fue por mucho tiempo empírico, con resultados completamente variados. Las rutas de administración varían, con la naturaleza y composición de la vacuna. La respuesta inmune en la ubre puede inducirse por la administración de la vacuna en la glándula o en los nódulos linfáticos regionales. Esta última ruta unida a una administración sistémica se ha empleado para vacunar contra mastitis de bida a Streptococcus agalactiae. Este procedimiento resulta en la estimulación de anticuerpos protectores en el suero y en la leche, presumiblemente de origen sistémico. La aplicación limitada en el campo de la vacunación sugiere que puede ser efectiva en el control de la mastitis por Streptococcus agalactiae (29).

II.3. Staphylococcus aureus.

II.3.a. ANTECEDENTES SOBRE Staphylococcus aureus.

La apariencia de estas bacterias hizo a Ogsten adoptar el nombre gérico para el grupo Staphylococcus que en griego significa "racimo de uvas".

Probablemente no exista ningún otro patógeno que produzca tantos factores virulentos ("agresinas") como Staphylococcus aureus, entre las sustancias mejor caracterizadas están; la toxina alfa, (una de las 4 hemolisinas conocidas) coagulasa, lipasa, leucocidina, enterotoxina, exfoliatina y proteína A. La producción de coagulasa y la virulencia están tan íntimamente ligadas que la producción de coagulasa es considerada a menudo como sinónimo de la virulencia del estafilococo. La proteína A tiene la capacidad de ligarse a la porción Fc de la IgG opsoninas, actuando por lo tanto en -- presencia, como un factor antifagocítico de superficie. Algunas cepas estafilocócicas especiales muestran la formación de cápsula en condiciones muy de finidas in vitro. Los estafilococos, por lo general, no son considerados -- como poseedores de cápsulas antifagocíticas.

Las infecciones por estafilococos son altamente destructivas y -- producen abscesos prominentes. La mayor parte de los estafilococos son destruidos una vez que son ingeridos por los polimorfonucleares (PMNs), aunque algunos pueden sobrevivir en condiciones experimentales. Hay evidencias -- que la inmunidad mediada por células puede desempeñar algún papel en la defensa del huésped contra las infecciones estafilocócicas aunque la formación de granulomas es bastante rara en estas enfermedades. El hallazgo de anticuerpos contra el ácido teicoico en la sangre puede ser ocasionalmente de utilidad en el diagnóstico de infecciones estafilocócicas generales (20)

Parece que en el pasado la mastitis estafilocócica era tan frecuente como ahora, pero sólo los casos más graves eran diagnosticados. Actualmente la frecuencia es probablemente igual que antes, pero en algunas -- zonas ha cambiado.

Edwards y Rippon estudiaron 395 cepas de Staphylococcus patógenos para la glándula mamaria por medio de tipificación de estas cepas, las cuales cayeron dentro de 5 grupos principales, mostrando reacción positiva a -- la coagulasa y muchos resistentes a la penicilina (5).

II.3.b. CARACTERISTICAS DE Staphylococcus aureus.

Son organismos esféricos de alrededor de 1 μ m de diámetro, dispuestos en racimos irregulares: en cultivos líquidos se observan además cocos -- aislados en pares, tetrados y formando cadenas. Los estafilococos jóvenes son gram-positivos; sin embargo, al envejecer muchas células se vuelven -- gram-negativas. Los estafilococos son inmóviles y no forman esporas, bajo la influencia de algunos agentes químicos (por ejemplo, la penicilina) se

lisan o cambian a formas L, pero no son afectadas por las sales biliares ni por las optoquinas*.

Crece con facilidad en la mayoría de los medios bacteriológicos en condiciones de aerobiosis. Se desarrollan más rápidamente a 37C, pero forman mejor su pigmento a la temperatura ambiente (20C). Las colonias en medios sólidos son redondas, lisas, elevadas, brillantes y forman un pigmento amarillo dorado intenso. No se tiñen con colorantes ácido resistentes, la gelatina es rápidamente licuada por cepas recientemente aisladas, pero esta propiedad se pierde con cultivo continuo (7)

Son anaerobios facultativos que provocan una fermentación acidificante de la glucosa con un descenso acusado de pH (4.3 y 4.5): producen acetoina, contrariamente a los micrococcos. Estos gérmenes elaboran una coagulasa y diferentes toxinas α , β y γ , fermentan diversos azúcares, especialmente el manitol, que sirve para identificarlos mediante cultivos en un medio fuertemente salado; fermentan la lactosa, pero no acidifica mas que moderadamente la leche; no sobreviven a 60C durante 30 minutos y frecuentemente tienen actividad proteolítica (16). En el cuadro V se presentan algunas de las características más comunes de los estafilococos.

Los estafilococos figuran entre los microorganismos más resistentes. La mayoría de las cepas son capaces de resistir la deshidratación por largos períodos.

Los estafilococos pueden producir enfermedades tanto por su capacidad de multiplicarse y diseminarse ampliamente en los tejidos, como por la producción de diversas sustancias extracelulares, como son:

Las exotoxinas que son un material filtrable, termolábil, letal para los animales de laboratorio por inoculación parenteral. Contiene diversas hemolisinas solubles que pueden ser separadas por electroforesis. Existen 3 hemolisinas, siendo alfa, gama y delta que son antigénicamente diferentes y no tienen relación alguna con las lisinas de los estreptococos. La exotoxina tratada con formol da un toxoide atóxico pero antigénico, que se ha utilizado para estimular la inmunidad antitóxica contra los estafilococos.

La leucocidina es un material soluble que mata a los leucocitos de diversas especies animales; es antigénica y más termolábil que la exotoxina, siendo incierto su papel en la patogenia. Los anticuerpos contra la

* Un inhibidor de los neumococos (clorhidrato de etilhidrocupreína).

leucocidina pueden desempeñar un papel importante en la resistencia a las infecciones estafilococcicas recurrentes.

CUADRO No.V.- DIFERENCIAS BIOQUIMICAS DE STAPHYLOCOCCUS Y MICROCOCCUS*.

| | <u>Staphy.aureus</u> | <u>Staphy.epidermidis</u> | <u>Micrococcus s.p.</u> |
|-----------------------|----------------------|---------------------------|-------------------------|
| CATALASA | + | + | + |
| REDUCCION DE NITRATOS | + | +(v) | V |
| PRUEBAS DE O/F | F | F | O ó - |
| HEMOLISIS | +(v) | -(v) | - |
| COAGULASA | +& (+) | - | - |
| LICUEF.DE GELATINA | + | - | V |
| LECHE TORNASOLADA | ACR | A | V |
| MANITOL | (+)U | -(v) | V |

v = variable

ACR = Acido-Coagulación-Reducción.

A = Acidifica.

* Carter G.R. (1978). Diagnostic Procedures in Veterinary Microbiology.

La enterotoxina es una proteína soluble producido por algunas cepas de estafilococos, particularmente cuando se cultivan en medios semisólidos y con altas concentraciones de anhídrido carbónico (30%). Es una proteína termostábil* con un P.M. de 3.5×10^4 que resiste la ebullición durante 30 minutos y a la acción de las enzimas intestinales y que pertenece a uno de los 4 tipos antigénicos (A-D) (20).

El Staphylococcus forma una toxina, cuando es incubado en leche. Bell y Velíz demostraron que un porcentaje elevado de los aislamientos de la glándula mamaria producen enterotoxinas; por ello es posible que algunas de las intoxicaciones en humanos por alimento se deba al consumo de leche de vacas con mastitis por Staphylococcus aureus (47).

La importancia de las toxinas de Staphylococcus en las infecciones no esta completamente aclarada. Las cepas de focos supurativos ofrecen a menudo toxinas de menor potencia que las cepas aisladas de piel o de otros órganos donde no hay signos de patogenicidad (20)

II.3.c. ESTRUCTURA ANTIGENICA DE Staphylococcus aureus.

La membrana de esta bacteria contiene tanto polisacáridos como -- proteínas antigénicas que permiten, hasta cierto punto, un agrupamiento de las células. Los ácidos teicoicos (polímeros del glicerol o del fosfato de

* Termoresistente.

ribitol) se encuentran unidos al peptidoglucano de la pared celular y son antigénicos. Las proteínas superficiales pueden interferir con la fagocitosis. La proteína A, un componente de la pared celular, está intensamente ligado a la porción de la fracción constante (fc) de las moléculas IgG. Esto hace que la porción de fracción variable (fab) de cualquier molécula de anticuerpo esté afuera, de manera que esté libre para combinarse con un antígeno específico(35).

La mayoría de las sustancias extracelulares producidas por Staphylococcus aureus son igualmente antigénicas y ya han sido descritas anteriormente.

II.3.d. RESISTENCIA INMUNOLOGICA ESPECIFICA A INFECCIONES DE LA GLANDULA MAMARIA DE BOVINOS POR Staphylococcus aureus.

Hay por lo menos dos obstáculos mayores para la exitosa inmunización en contra de la mastitis por Staphylococcus, utilizando la vacunación sistemática convencional. El primero de éstos tiene que ver con la naturaleza de Staphylococcus aureus como patógeno. Es un organismo que posee una variedad impresionante de mecanismos de virulencia asociados a la célula, - así como toxinas extracelulares y no está claro aún cuál de éstos debe ser incorporado a una vacuna (48).

El otro obstáculo está relacionado con la escasa transferencia de inmunoglobulinas llevadas de la sangre a la leche (29). Durante el período de formación de calostro hay un activo mecanismo de selección que está operando en la glándula mamaria y da por resultado en el transporte de grandes cantidades de IgG₁ de la sangre a la leche (6). Esta transferencia selectiva de IgG₁, continúa durante la lactación pero en un grado muy reducido -- (47), por lo que los niveles de inmunoglobulinas derivadas de la sangre a la leche del bovino son sumamente bajos (22).

También ha sido estudiada la inmunidad local, estas investigaciones demuestran que la infusión preparto de antígeno estimula una producción local de IgA en la glándula mamaria y que se encuentran niveles significativos de IgA en la leche durante las subsecuentes lactaciones (29).

La inmunización local de la glándula mamaria ha tenido serias desventajas. Primeramente, el estado lactacional en el que se lleva a cabo la infusión es crítico. Segundo, el procedimiento requiere una rigurosa asepsia para evitar una infección inadvertida por otros patógenos. Tercero, recientes datos indican que cuando la dosis de una vacuna de Staphylococcus -

aureus estéril es incrementada a un nivel al cual la respuesta inmune local específica es maximizada, hay una reducción concomitante en la producción de leche.

CUADRO No.VI.- PRODUCCION DE LECHE (mls) DE BORREGAS INMUNIZADAS 5 SEMANAS Y 3 SEMANAS PREPARTO CON 10^{10} ORGANISMOS DE Staphylococcus aureus MUERTO.

| | PRODUCCION | t test. |
|--------------------|-------------|---------|
| Glándula Izquierda | 36 \pm 6 | |
| Glándula Derecha | 84 \pm 14 | P 0.05 |

En un estudio realizado en borregas, las cuales fueron inoculadas en la glándula izquierda, se midió la producción de leche a las 4 semanas post-parto. Los valores son las medidas \pm del valor estandard de 6 hrs de producción para 6 borregas (ver cuadro No.VI) (29).

D. Skean y W. W. Overcast han probado 5 vacunas de Staphylococcus aureus, conteniendo bacterias estandarizadas y toxoides con diferentes adyuvantes para determinar la eficacia de la antihemolisina en vacas lecheras. La vacuna conteniendo adyuvante completo de Freund, fue claramente la más eficaz, no encontrando diferencias significativas entre las vacunas conteniendo otros adyuvantes como alumbre, adyuvante incompleto de Freund y -arginato de Sodio (45).

II.3.e. VACUNAS VIVAS DE Staphylococcus aureus.

La vacunación presenta interés en los casos de mastitis por Staphylococcus aureus, dado que estos gérmenes son difíciles de eliminar de la glándula mamaria mediante tratamientos con antibióticos (29).

La inmunización sistémica convencional con vacunas de Staphylococcus aureus es poco exitosa. Otro medio para la inmunización sistémica es el uso de inyecciones subcutáneas de Staphylococcus aureus vivos. Esta inmunización resulta en un absceso subcutáneo en el sitio de inyección y obviamente tiene sus peligros inherentes. En dos experimentos en los que se uso este tipo de inmunización se observó una protección significativa en la glándula mamaria de borregas y cabras, cuando estos animales fueron sujetos a un subsecuente reto con Staphylococcus aureus virulento (48).

Se ha demostrado que los neutrófilos de la glándula mamaria de las

borregas inmunizadas con S. aureus vivo (por inoculación subcutánea) presentan una mayor actividad para fagocitar Staphylococcus. Se mostró por lo menos que un mediador en el incremento de la capacidad fagocítica se debía a un anticuerpo antistaphylococcus IgG₂ citofílico presente en la membrana celular de los neutrófilos de las borregas infectadas. Aunque aproximadamente el 25% de los neutrófilos de borregas (inmunizadas o no inmunizadas) llevan IgG₂ citofílica, fue solo en las borregas infectadas con Staphylococcus viables que la IgG₂ citofílica confiere un incremento en la capacidad fagocítica a los neutrófilos (48).

II.4. INMUNOLOGIA DE LA GLANDULA MAMARIA.

II.4.a. PROTECCION INMUNOLOGICA DE LA GLANDULA MAMARIA.

Las inmunoglobulinas en las secreciones mamarias son de origen tanto humoral como local (producidas por los plasmocitos de la glándula mamaria). En los rumiantes, la transferencia de inmunoglobulinas maternas al neonato se lleva a cabo exclusivamente a través del calostro.

Las inmunoglobulinas transferidas en mayor cantidad a través de la placenta o vía del calostro son principalmente de la clase IgG. Las inmunoglobulinas producidas localmente por los plasmocitos localizados en el epitelio secretor y en las secreciones mamarias son principalmente de las clases IgA e IgM.

La transferencia en el bovino de grandes cantidades de IgG e IgG₁ en particular se lleva a cabo del torrente sanguíneo atravesando la barrera mamaria hacia el calostro (y leche) por un mecanismo de transporte específico.

El calostro y la leche bovina contiene pequeñas cantidades de la IgA e IgM producidas localmente (22).

En el calostro las inmunoglobulinas pueden ser transferidas a las secreciones lácteas a partir del suero materno o ser sintetizadas localmente por los plasmocitos adyacentes al epitelio secretor.

II.4.b. CLASES DE INMUNOGLOBULINAS Y SU TRANSFERENCIA A LA GLANDULA MAMARIA.

La principal clase de inmunoglobulinas en el bovino es la IgG. Las inmunoglobulinas IgG bovinas se distribuyen en 2 subclases, difieren ligeramente en sus cadenas pesadas y están casi en igual concentración en la sangre. La principal inmunoglobulina del calostro bovino es la IgG₁. La

principal clase de inmunoglobulinas en muchas exosecreciones de mamíferos - excepto en el calostro o leche de rumiantes es la IgA. La IgM esta presente en pequeñas cantidades en las secreciones lácteas de todas las especies. Otras clases de inmunoglobulinas como la IgD e IgE no están presentes o implicadas como importantes en las secreciones mamarias.

La transferencia de inmunoglobulinas al recién nacido está altamente especializada en los rumiantes. El suero materno del bovino, por ejemplo contiene diferentes proteínas y clases de inmunoglobulinas pero solo la clase IgG e IgG₁ en particular es transferida selectivamente en cantidades abundantes al calostro. Pequeñas cantidades de otras inmunoglobulinas como IgA e IgM están presente. Estas se derivan principalmente de la síntesis local en la glándula mamaria (21).

El calostro bovino contiene normalmente de 50-150 mg/ml de inmunoglobulinas de las cuales la IgG representa el — 85 - 90%, IgM cerca del 7% e IgA cerca del 5%. La IgG₁ se estima cerca del 80-90% de las IgG (21).

En contraste a la alta selectividad del transporte mamario de inmunoglobulinas en el rumiante, la fase de absorción intestinal en el becerro no específica para las clases de inmunoglobulinas opera solo 24 horas después del nacimiento en condiciones normales. El retardo de la toma de calostro en el becerro por 6 horas conduce a una baja absorción y a una susceptibilidad a las infecciones.

El calostro y la leche contienen una variedad de constituyentes celulares que pueden aumentar la inmunidad pasiva del recién nacido. Además de cuerpos celulares totales y parciales que tienen las características de las células epiteliales secretoras, leucocitos incluyendo macrófagos, linfocitos y plasmocitos.

El tipo de células más abundantes en el calostro y leche normal es más comúnmente el macrófago. El macrófago de las secreciones lácteas -- mantiene su integridad funcional, como se demuestra por movimientos amiboides, por su capacidad para fagocitar bacterias y hongos, y también por la interacción con los linfocitos.

Los estudios son amplios sobre estas células en la leche bovina, relacionados principalmente al papel fagocítico de los macrófagos y polimorfonucleares en la defensa contra las infecciones bacterianas de la glándula mamaria. Los linfocitos B y T del calostro y de la leche son capaces de -- producir respuestas inmunes humorales y celulares, respectivamente. Estos linfocitos representan una población selectiva de células inmunocompetentes

únicas, no demostrables en la circulación periférica. Los linfocitos B en la glándula mamaria son capaces de diferenciarse en plasmocitos que sintetizan anticuerpos localmente dentro de la glándula, y en sus secreciones pueden continuar este proceso como células funcionales si se absorben del calostro por el recién nacido. Los anticuerpos sintetizados por los plasmocitos en la glándula mamaria son de las clases IgA e IgM; sin embargo, células específicas de IgG pueden estar presentes. Los plasmocitos predominan en la glándula mamaria, con solo células leucocíticas ocasionales en secreciones de tejido mamario durante la lactación. La infusión de antígeno en la glándula mamaria lactante del rumiante ha sido una amplia área de investigación pero con éxito relativo o variable. La infusión de antígeno frecuentemente falla para provocar una respuesta de anticuerpos locales mientras que la infusión en la glándula mamaria puede provocar una respuesta local de IgA, que puede persistir en la siguiente lactación. Se ha mencionado que esta respuesta puede aumentarse por estimulaciones simultáneas en el intestino. La razón para la insensibilidad relativa de la glándula mamaria de bovinos a este sistema no se conoce, pero un factor es la carencia de plasmocitos. Se ha especulado que la selección de animales para producir grandes cantidades de leche por muchos años puede producir alteraciones en la histología de la glándula que puede interferir con el establecimiento de las células productoras de IgA (21).

La identificación de inmunoglobulinas específicas de origen sanguíneo en las secreciones lácteas ha sido de gran especulación sobre los mecanismos por los cuales ocurre la transferencia.

El transporte de constituyentes sanguíneos puede ocurrir a través de la barrera mamaria en la glándula no lactante y en situaciones anormales como stress o infecciones en mastitis severas. En mastitis severas, la ruptura de la barrera mamaria puede ocurrir permitiendo la entrada de constituyentes sanguíneos a las secreciones lácteas. Lo contrario puede suceder en involuciones inducidas con elevada presión intramamaria originada por la leche acumulada, forzando que los constituyentes de la leche regresen al torrente sanguíneo. Se ha sugerido que la transferencia de las inmunoglobulinas IgG del calostro de los ruminantes ocurre a través de un sistema de transporte altamente específico dentro de las células secretoras (21).

Las células mamarias bovinas contienen sitios receptores superficiales para las inmunoglobulinas de la IgG que corresponden, en número y afinidad de enlace, a la cantidad de IgG₁ e IgG₂ en el calostro y la leche. -

La presencia de tales receptores superficiales con extremada afinidad de enlace sugiere una fuerte evidencia para un mecanismo de transporte intracelular.

La importancia de componentes no específicos también ha sido estudiada. Actualmente se están haciendo esfuerzos para incrementar las concentraciones de lactoferrinas en las secreciones mamarias durante las primeras etapas de la involución, cuando las nuevas infecciones ocurren más comúnmente. Este tipo de investigaciones da esperanzas en el control de la mastitis en el futuro ya que se requeriría un mínimo uso de antibiótico (drogas).

Se ha estimado que medio kilogramo de IgG₁ es transferido del torrente sanguíneo a la glándula cada semana durante la formación activa del calostro, resultando en una baja substancial en la concentración de IgG₁ de la sangre (21).

En el cuadro No.VII se muestran los niveles normales de inmunoglobulinas en suero, calostro y leche de bovinos.

CUADRO No.VII.- INMUNOGLOBULINAS EN BOVINOS*

| | IgG ₁ mg/100 ml | IgG ₂ ml | IgM | IgA mg/ml |
|----------|-------------------------------|------------------------|-----|--------------|
| Suero | 1 100 | 790 | 260 | 50 |
| Calostro | 4 760 | 290 | 420 | 390 |
| Leche | 59 | 2 | 5 | 14 |

* Butler. J. E. (1973). J. Amer. Vet. Med. Ass. 163:796

II.4.c. ORIGEN DE LAS CELULAS LINFOIDES DE LA GLANDULA MAMARIA.

El origen de las células en la glándula mamaria y otros sitios mucosos responsables para la producción de anticuerpos locales, ha sido tomada en consideración por casi 20 años. Diferentes estudios han demostrado que las placas de Peyer en el conejo son una fuente enriquecida de producción potencial de células productoras de IgA (48).

Recientemente estudios experimentales con ratas sensibilizadas han mostrado también que los antígenos al penetrar a las placas de Peyer estimulan la aparición en las células que contienen anticuerpos de la clase -- IgA en los linfáticos del ducto torácico (47).

Hay evidencia convincente de una conexión entre el tejido linfoide del tracto gastrointestinal y el sistema secretor IgA de la glándula mamaria en algunas especies monogástricas. Por esto, la inmunización local o infección natural del intestino se ha reportado estar asociada con la elaboración

de anticuerpos de la clase IgA, que pasan hacia secreción mamaria con aparición de células formadoras de anticuerpos. Mas aún ha sido reportado que las células linfoides colectadas de las placas de Peyer sintetizan IgA al colonizar a la glándula mamaria de ratones durante el embarazo y la lactación (35).

II.5. ADYUVANTES.

II.5.a. GENERALIDADES SOBRE ADYUVANTES.

Por razones prácticas y económicas la inmunización profiláctica tendrá que implicar un número mínimo de inyecciones con poca cantidad de antígeno. Ya se ha visto las innumerables ventajas de los organismos de replicación atenuada en este respecto, pero los organismos muertos frecuentemente requieren un ADYUVANTE, que por definición es una substancia incorporada al antígeno o inyectada simultáneamente, la cual potencia la respuesta inmune. Existen varios factores que explican el modo de acción de los adyuvantes:

1. El efecto de depósito.- El antígeno normalmente difunde muy rápidamente desde los tejidos locales que rodean el sitio de inyección y una importante función de algunos adyuvantes es contrarrestar esto, provocando un reservorio de antígeno de larga vida, ya sea extracelular o dentro de los macrófagos. Los adyuvantes más corrientes de este tipo utilizados en el hombre son los compuestos de aluminio (Fosfato e hidróxido) y el adyuvante incompleto de Freund (en el cual el antígeno se incorpora a la fase acuosa de una emulsión de agua en aceite de parafina). A costa de la larga persistencia del aceite en los tejidos y a la producción ocasional de abscesos estériles, se ha intentado reemplazar el adyuvante incompleto de Freund por una fórmula nueva biodegradable, el llamado adyuvante 65, que contiene aceite de cacahuete muy purificado y un emulsificador y estabilizador adicional (43).
2. La activación de los macrófagos.- Tras la inyección con estos adyuvantes, los macrófagos forman granulomas que constituyen lugares de interacción del antígeno con las células formadoras de anticuerpos. Virtualmente, todos los adyuvantes estimulan los macrófagos, la mayoría por una acción directa, pero el adyuvante de Freund parece actuar sobre los macrófagos por mediación de las células T. Se cree que los macrófagos activados actúan mejorando la inmunogenicidad por un incremento de la cantidad de antígeno de superficie y de la eficiencia de su pre-

sentación a los linfocitos. También mandando señales accesorias a linfocitos, provocando una respuesta en vez de una tolerancia. El macrófago también segrega factores solubles estimulantes que amplifican la proliferación de linfocitos.

Se ha centrado interés en el uso de pequeñas vesículas lípidas o membranas (liposomas) como agente de presentación del antígeno al sistema inmune. Puede ocurrir que los liposomas actúan como unas vacuolas de almacenamiento dentro de los macrófagos o quizás funcionen con la membrana del macrófago originando un complejo inmunogénico adecuado. Se puede predecir la posibilidad de seleccionar el tipo de linfocito que se active, incorporando agente selectivo en la membrana del liposoma, por ejemplo adyuvante de micobacteria, polianiones a levamisol para estimular a las células T, componentes de ascarias o de Bordetella pertussis para incrementar la producción de Inmunoglobulinas (25).

II.5.b. ANTECEDENTES SOBRE Dietilaminoetil-Dextran (DEAE-D)

Dietilaminoetil-Dextran es un derivado policationico del Dextran que contiene grupos Dietilaminoetilo unidos a los residuos de glucosa por enlaces éter. El peso molecular del DEAE-D es de aproximadamente 2×10^6 (36)

DEAE-D muestra un efecto de adyuvante significativo en la respuesta primaria inmune en los monos rhesus a la vacuna del virus de encefalomyelitis equina (IVEE) inactivado con formol. Los anticuerpos formados contra IVEE con adyuvante sigue un patrón clásico de IgM e IgG; sin embargo, comparado con la vacuna sola, el uso de este adyuvante con IVEE reduce el tiempo requerido para comenzar la síntesis de IgG (19). La primera etapa de la interacción de anticuerpos después de estímulo antigénico para involucrar la generación de células T ayudadoras en la síntesis de IgG. Se ha visto que las vacunas vivas atenuadas con formol reducen su capacidad antigénica y es por eso que se han realizado estudios con el DEAE-D que aumenta significativamente la respuesta inmune humoral (50). La primera etapa para la síntesis de anticuerpos es la interacción del antígeno con los receptores de las células.

II.5.c ANTECEDENTES DE Bordetella pertussis.

Estas bacterias son bacilos cortos, ovoides, gram negativos, parecidos a Haemophilus influenzae, aunque menos pleomórficos: mediante tinciones con azul de toluidina puede demostrarse gránulos metacromáticos bipola-

res y presentan cápsula.

Este microorganismo no es muy activo metabólicamente y forma ácido pero no gas a partir de glucosa y de lactosa. No requiere de los factores X y V en las resiembras.

Las células de Bordetella pertussis poseen muchos antígenos. Los más externos son un aglutinógeno y una hemaglutinina. La pared celular contiene una toxina termo-estable, el antígeno protector y un factor sensibilizante a la histamina (los dos pueden ser idénticos). Después de la ruptura de la célula, el protoplasma contiene una endotoxina termolábil, que es destruida a 56C durante 30 minutos. Las variantes de la fase I contienen mayor cantidad de antígeno de otro tipo que otras fases virulentas. Bordetella pertussis contiene peptidos que promueven linfocitosis intensa en el huésped. Esto se observa en las infecciones en el humano y en la administración a animales de experimentación (20).

Se ha estudiado el efecto de adyuvante de Bordetella pertussis sobre la inmunidad celular mediada a eritrocitos de carnero en ratones, evaluadas con pruebas sensibles. Se ha establecido que Bordetella pertussis por si mismo, libera en el medio en suspensión componentes celulares (sobrenadante de Bordetella pertussis) que contribuyen significativamente a la adyuvancia (3).

La vacuna de Bordetella pertussis o componentes derivados de la fase I del organismo, cuando se inyecta a animales de experimentación, induce una variedad de alteraciones funcionales profundas y cambios morfológicos en las células y tejidos comprendidos dentro de los complejos linfomieloides (28).

II.5.b. ANTECEDENTES DEL ADYUVANTE ACEITE DE CACAHUATE-LECITINA DE SOYA-GLICEROL.

Los adyuvantes incompletos (H₂O-aceite mineral) y completos (H₂O-aceite mineral-Mycobacterium tuberculosis) de Freund, son eficientes adyuvantes. Pero tienen la desventaja de formar granulomas y abscesos en el sitio de inoculación.

Reynolds y Harrington (1980) demostraron la actividad adyuvante de una emulsión aceite de cacahuate, glicerol y lecitina de soya con vacuna, encontrando títulos de anticuerpos significativamente elevados.

La formulación anterior tiene ventajas sobre los adyuvantes de agua-aceite, ya que sus componentes son, fácilmente metabolizables en el re

ceptor y son relativamente no reactogénicos.

El mecanismo de acción para este tipo de adyuvante no se comprende aún. Se cree sea el mismo estipulado para los adyuvantes de aceites minerales o vegetales, en el que hay una lenta y sostenida liberación del antígeno, ocasionando una respuesta inflamatoria localizada en el sitio de depósito, que trae consigo células inmunocompetentes necesarias para inducir y ampliar la respuesta inmune.

Por otra parte, existe la teoría de que al formarse pequeñas micelas, éstas semejan lipoproteínas que son fácilmente integradas hacia los tejidos linfáticos y fagocitadas por las células mononucleares facilitando la presentación y captación del antígeno a las células linfoides (49).

Sin embargo, se cree que el factor más importante en el que reside la adyuvancia de esta formulación, está en los fosfolípidos de la lecitina de soya, pues se ha demostrado una estrecha correlación entre los fosfolípidos específicos en modelos de membranas y su subsecuente inmunogenicidad (37).

II.6. PROCEDIMIENTOS PARA LA EVALUACION DE LA RESPUESTA INMUNE.

Existen pruebas para la detección y cuantificación de las inmunoglobulinas. En general, tales pruebas se basan en el hecho de que después de combinarse con el antígeno, los anticuerpos pueden aglutinar a eritrocitos o partículas revestidas con antígeno, que hacen posible reacciones biológicamente mesurables o forman precipitados que pueden visualizarse en solución o en gel.

Hay una amplia variación en la sensibilidad de estas pruebas dependiendo de las propiedades particulares de los anticuerpos que se detecten y utilicen. Algunos de estos métodos se muestran en el cuadro No.VIII.

Muchos laboratorios de diagnóstico veterinario ofrecen pruebas serológicas para ayudar en el diagnóstico de enfermedades microbianas.

Las propiedades de las clases de inmunoglobulinas ayudan a explicar la aplicación y utilidad de las pruebas serológicas en el diagnóstico. Por ejemplo, una temprana caída de IgM explica la correspondiente caída en el nivel de agutininas (ver cuadro No.IX).

CUADRO No.VIII.- SENSIBILIDAD RELATIVA DE LAS PRUEBAS PARA MEDIR ANTICUER--
POS.

| PRUEBAS | NIVELES APROXIMADOS A LOS QUE EL ANTICUERPO ES DETECTADO. | ($\mu\text{g/ml}$) |
|------------------------------------|--|----------------------|
| Precipitación | 20 | |
| Inmuno-electroforesis. | 20 | |
| Doble difusión en Agar-Gel. | 1 | |
| Fijación de Complemento. - - - - - | 0.5 | |
| Inmunodifusión Radial. | 0.05 | |
| Aglutinación Bacteriana. | 0.01 | |
| Hemólisis. | 0.01 | |
| Hemaglutinación Pasiva. | 0.01 | |
| Neutralización Anti-toxina. | 0.01 | |
| Radioinmuno ensayo ELISA | 0.0005 | |
| Neutralización de Virus. | 0.00005 | |

Hyde R. M. and Patnode R. A. (1978) Immunology.

CUADRO No.IX.- ALGUNAS CARACTERISTICAS DE IMPORTANTES CLASES DE INMUNOGLOBU
LINAS.

| Características | IgG | IgM | IgA |
|----------------------------------|--------|-----------------|----------|
| Apariencia | Tardia | Más Temprana | Temprana |
| Vida Media en días (humanos). | 18-23 | 5 | 5 - 7 |
| Aglutininas | + | +++ | + |
| Fija al Complemento | + | +++ | - |
| Precipitinas | +++ | + | + |
| Antitoxinas | ++ | + | + |
| Neutralización (virus) | + | - | +++ |
| Protección de superficie | - | - | +++ |

Hay considerables variaciones entre especies animales.

Carter G R. (1971) Veterinary Medicine/Small Animal Clinician.

II.6.a. ELECTROFORESIS.

La electroforesis fue utilizada por primera vez por Tiselius, en 1940, en la Universidad de Uppsala. Aunque esta técnica se utiliza comúnmente como un método analítico de alta resolución, puede ser también utilizada en los últimos pasos de una etapa preparativa.

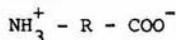
En la electroforesis convencional la corriente eléctrica es conducida por medio del amortiguador a través de un medio de soporte tal como la

poliacrilamida. La separación tiene lugar a un pH y fuerza iónica constante. Los iones de la muestra se desplazan dependiendo de su carga neta hacia el ánodo o cátodo.

La electroforesis es simplemente el movimiento de partículas cargadas en un campo eléctrico: Tres factores son necesarios.

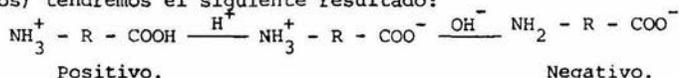
1. Un campo eléctrico.
2. Partículas cargadas.
3. Un medio en el cual ocurra el movimiento.

El primer paso es inducir a nuestra muestra a que tenga una carga eléctrica. Las proteínas son anfotéricas y pueden tener carga positiva o negativa, dependiendo del pH de la solución en que se encuentra. Se considera a una proteína como una cadena larga de aminoácidos, la carga neta de la proteína es más fácilmente descrita:



La ecuación representa un aminoácido neutro o el pH en el cual -- las cargas negativas o positivas son iguales, a esto se le conoce como punto isoeléctrico (PI).

Si en estas condiciones es sometido a distintos pH (ácido y alcalinos) tendremos el siguiente resultado:



Un exceso de iones positivos (H^+) neutralizan las cargas negativas quedando una carga positiva. Igualmente un exceso de iones negativos (OH^-) daran una carga neta negativa.

Sobre el acetato de celulosa la carga neta de las proteínas es el factor responsable para la separación, el peso molecular y la forma son de menos importancia.

Las proteínas separadas en la electroforesis de zona casi son exclusivamente en base a su carga eléctrica superficial. El medio de sostén es, en teoría, inerte y no impide ni estimula el flujo de las moléculas en el campo eléctrico. Por lo general, se emplean tiras de papel o acetato de celulosa como medio de sostén. Una mayor ventaja del acetato de celulosa es la rapidez con que se logra la migración electroforética. De manera adicional el acetato de celulosa es ópticamente transparente. Por estas razones, el acetato de celulosa es casi universalmente empleado como el medio de sostén para la electroforesis de zona.

En la técnica en si, muestras de suero o de otro líquido biológico-

co son colocados en el origen y separadas por electroforesis durante aproximadamente 90 minutos, empleando soluciones amortiguadoras alcalinas. Entonces se tiñen las tiras para la búsqueda de proteínas y se separan en un densitómetro, la tira teñida se pasa a través de un haz de luz. La absorción varía debido a las diferentes concentraciones proteicas que son descubiertas por una celdilla fotoeléctrica y reproducida por un registrador análogo como un trazo. La separación convierte la configuración de la banda proteica en picos y permite la determinación cuantitativa de las principales fracciones proteicas (8,14,25).

II.6.b. FIJACION DE COMPLEMENTO.

El sistema del complemento es uno de los sistemas disparadoras de la sangre; su acción comienza por la combinación de anticuerpos-antígeno. - Es altamente complejo y compuesto por lo menos de 16 proteínas. La reacción principal del sistema del complemento puede considerarse como la unión de C_3 a C_3a , un fragmento anafilotóxico de un P.M. de 6 800 y C_3b es el fragmento más largo que tiene un sitio de enlace por el que llega a unirse al lugar de la reacción. C_3 es el mayor componente del sistema y todas las reacciones del sistema pueden estar relacionadas con su activación y la subsecuente participación en la lesión lítica y otros fenómenos biológicos (Adherencia y fagocitosis).

El camino clásico de la fijación de complemento está mediado por complejos antígeno - anticuerpo que se enlaza a C_1 vía su componente C_{1q} . La reacción de activación de C_1 requiere de iones de calcio en la que C_{1r} es convertido a una enzima activa por un mecanismo desconocido. C_{1s} se rompe para producir la enzima activa \bar{C}_1 . Esto tiene dos substratos: C_4 y C_2 . C_4 una molécula de 3 cadenas largas que se unen a C_1 en presencia de iones de Mg^{++} . El C_2 esta sujeto también al ataque por C_{1s} que conduce a formación de complejos de enzimas C_4_2 . Esto es la "C3 convertasa" del camino clásico.

El complejo C_4_2 se fija al lugar de acción del complemento por una unión sobre C_4b , similar al de C_{3b} . La enzima tiene una vida media corta - de aproximadamente de 5 minutos a 37C (49).

El mecanismo de ataque del complemento es iniciado con el desdoblamiento de C_5 por C_4_2 , C_3b , B o por ciertas enzimas como la plasmina. - La reacción de activación da por resultado la generación de un pequeño péptido biológicamente activo, el C_5a (PM 17.000) y un fragmento mayor, el C_5b (PM 163.000). Uno de estos capacita a C_5b para que se fije a las células -

de las membranas biológicas por un breve período después de la activación, mientras que otros sitios sirven como aceptores para los 2 factores reaccionantes siguientes, C6 y C7. El firme complejo trimolecular C567 proporciona un sitio de enlace para una sola molécula de C8. El complejo tetramolecular C567.8 proporciona sitios de enlace para C9. Todo el complejo ensamblado que contiene una molécula de C5, C6, C7, S (una proteína no identificada de función desconocida) y 8 más hasta 6 moléculas de C9, tiene un peso molecular acumulativo de aproximadamente un millón. El complejo es capaz de causar daño estructural a las membranas, produciendo citotoxicidad y lisis cuando se fija a la superficie de las células (49).

En la reacción de la prueba de laboratorio se determina si están presentes en el suero del organismo (conejo), anticuerpos frente a Streptococcus agalactiae y Staphylococcus aureus. Primero como en todas las reacciones de Fijación de Complemento, el suero es inactivado (30 minutos a 56C), ya que es necesario eliminar el complemento del suero mismo debido a que el resultado de la prueba depende de la cantidad del Complemento libre. Si los anticuerpos están presentes en el suero problema, reaccionarán con el antígeno, consumiendo el complemento que se adicionó. Por otra parte, el sistema hemolítico depende de la presencia del complemento y por lo tanto no habrá hemólisis.

Pero si no hay anticuerpos frente al antígeno en el suero problema, el complemento estará disponible para la reacción entre la hemolisina y los eritrocitos de borrego y en este caso resulta hemólisis.

III. MATERIAL Y METODOS.

III.1. PROCEDIMIENTOS GENERALES.

III.1.a. ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

Los animales fueron Lupus cuniculus raza Nueva Zelandia. En el primer experimento se utilizaron 8 conejos y en el segundo 48 animales hembras en ambas partes. El peso promedio fue de 2.700 gr y la edad de 3 meses.

III.1.b. BACTERIAS ESTUDIADAS.

Se usó una cepa de Streptococcus agalactiae y una de Staphylococcus aureus cuyos aislamientos fueron de casos de mastitis en diferentes ranchos. A partir de las bacterias aisladas se mantuvieron en medio de Infusión-Cerebro-Corazón con 1% de glucosa a -70C (27). Se resembró en medio sólido de Agar-Sangre. Posteriormente se les realizó las pruebas bioquímicas basadas en Cowan (11) y Mac. Faddin (24).

III.1.c. PREPARACION DEL ANTIGENO.

Streptococcus agalactiae fue cultivado en Infusión-Cerebro-Corazón por 24 hrs a 37C. Se lavó 3 veces con solución amortiguadora Salina Fosfatada (PBS 0.01M. pH 7.0) a 3700 rpm por 15 minutos. Finalmente se suspendió en una solución de formaldehído al 2% en PBS y se mantuvo a 65C, por 30 minutos en baño maría con el objeto de inactivar a las bacterias. El formaldehído se eliminó por medio de 3 lavados con PBS, haciendo la suspensión final de los microorganismos en este mismo. La preparación del antígeno de Staphylococcus aureus se realizó de la misma manera. (8,23,27,39,48,53).

III.1.d. ESTANDARIZACION DEL ANTIGENO.

Para la estandarización de las dosis bacterianas se utilizó el método de Nefelómetro de Mac Farland (26). Como patrón se prepararon diferentes concentraciones de $Ba SO_4$ para ser comparadas con la suspensión de bacterias inactivadas. En el cuadro No.X se presentan los tubos usados así como su equivalencia en número de bacterias por ml. La longitud de onda seleccionada fue 546 nm. El espectrofotometro se ajusta a 0.000 de Absorbancia -- con PBS.

La suspensión de 900×10^6 bact/ml se almacenó a una temperatura de 4C hasta su utilización. Las suspensiones bacterianas con concentraciones de 1500×10^6 y 3000×10^6 bact/ml, se liofilizaron con un soporte de sa

carosa peptona a una concentración de 2:1. La esterilidad de todas las suspensiones fue verificada por medio de su cultivo (8,12,22,27).

CUADRO No.X.- RELACION ENTRE CONCENTRACION DE BaSO_4 Y NUMERO DE BACTERIAS - POR ml (METODO DE Mac. Farland).

| Tubo N ^o | 1% BaCl(ml) | 1% H ₂ SO ₄ | N ^o bact/ml | Absorbancia (D.O)* |
|---------------------|-------------|-----------------------------------|--------------------------|--------------------|
| 1 | 0.1 | 9.9 | 300 x 10 ⁶ | 0.289 |
| 2 | 0.2 | 9.8 | 600 x 10 ⁶ | 0.666 |
| 3 | 0.3 | 9.7 | 900 x 10 ⁶ ∅ | 0.985 |
| 4 | 0.4 | 9.6 | 1200 x 10 ⁶ | 1.255 |
| 5 | 0.5 | 9.5 | 1500 x 10 ⁶ ∅ | 1.510 |
| 6 | 0.6 | 9.4 | 1800 x 10 ⁶ | 1.843 |
| 7 | 0.7 | 9.3 | 2100 x 10 ⁶ | 1.900 |
| 8 | 0.8 | 9.2 | 2400 x 10 ⁶ | 1.372x2 ✓ |
| 9 | 0.9 | 9.1 | 2700 x 10 ⁶ | 1.598x2 ✓ |
| 10 | 1.0 | 9.0 | 3000 x 10 ⁶ ∅ | 1.730x2 ✓ |

* La longitud de onda seleccionada fue de 546 nm.

∅ Concentración de bacterias empleadas.

✓ Concentraciones diluidas 1:2.

III.1.e. COLECCION DE SUEROS.

El suero fue el material biológico sujeto a análisis. Los conejos fueron sangrados antes de la inoculación y cada 15 días después de iniciado el programa. El suero fue separado en alícuotas y almacenado a -70C hasta el momento de su análisis. El sangrado fue a través de la vena marginal de la oreja y succión por vacío.

III.1.f. ELECTROFORESIS.

La separación electroforética del suero se llevó a cabo de la siguiente manera: Primero el acetato de celulosa se saturó con una solución reguladora de barbitales a un pH 8.8 durante 15 minutos. Posteriormente la membrana se colocó en una fuente de poder a 180 volts durante 16 minutos. El colorante fue rojo de Ponceau. La lectura de la membrana clarificada se realizó en un densitómetro Quick Scan. La valoración de las fracciones proteicas del suero se hizo mediante integración de las superficies limitadas por los máximos del trazo densitométrico.

La valoración de las proteínas séricas se realizó por el método de Biuret. Esta técnica proporciona concentración de proteínas en unidades que pueden compararse (8,14,49).

III.1.e. PRUEBA DE FIJACION DE COMPLEMENTO.

La determinación de anticuerpos contra Streptococcus agalactiae y Staphylococcus aureus se llevó a cabo por la prueba de Fijación de Complemento Estandarizada, siendo las condiciones siguientes:

1. Antígeno. Se determinó el título de las suspensiones de Streptococcus agalactiae y Staphylococcus aureus a las dosis de 900×10^6 , 1500×10^6 y 3000×10^6 bact/ml.
2. Suero Control Positivo. Consistió en la mezcla de los sueros de todos los conejos, 30 días después de la inmunización. Se almacenó a -70°C .
3. Suero Control Negativo. Consistió en una mezcla de sueros de los conejos antes de la inoculación.
4. Complemento. La fuente de complemento fue de suero fresco de cuyes que se colocó en alícuotas de 0.5 ml y se almacenó a -70°C . Este suero fue titulado siguiendo los métodos establecidos (1).
5. Eritrocitos de Borrego. Se lavaron con PBS 3 veces, por centrifugación. La suspensión final de eritrocitos se estandarizó a 2% espectrofotométricamente. La suspensión se conservó en refrigeración hasta antes de su empleo.
6. Hemolisina* (Amboceptor). Los anticuerpos anti-eritrocito de borrego se obtuvieron comercialmente. Antes de usarse, el antisuero se diluyó 1:100 y posteriormente se tituló (1,49).
7. Para la realización de esta prueba se llevó un sistema de controles -- que comprenden cada uno de los elementos reaccionantes. Para cada suero problema se hizo una dilución 1:5 inactivándolo en baño maria a 56°C por 30 minutos. La técnica se realizó en microplaca, haciendo diluciones dobles hasta 1:1280.
El pozo N°10 se estableció como control de anticomplementaridad del suero problema. El protocolo de la prueba se muestra en el Cuadro No. XI.
8. Interpretación de Resultados. El pozo N°10 del suero probado que no recibió antígeno (Ag) debe presentar hemólisis completa. Cuando no -- fue así se reportó ese suero como anticomplementario. Los pozos que contienen la dilución del suero más antígeno pueden mostrar diferentes reacciones que irán desde completa hemólisis (reacción negativa) a completa fijación, mostrada por la sedimentación de los glóbulos rojos.

* Difco Laboratories Detroit, Michigan.

CUADRO No.XI.- EJEMPLIFICACION DE LA PRUEBA DE FIJACION DE COMPLEMENTO ESTANDARIZADA.

| 1:5 | 1:10 | 1:20 | 1:40 | 1:80 | 1:160 | 1:320 | 1:640 | 1:1280 | 1:5 | CONTROLES* | | |
|--|------|-----------|----------|----------|-----------|----------|------------|--------|-----|------------|----------|--|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | |
| | | | | | | | | | | 1 | | |
| REACTIVOS | | POZOS 1-9 | | | POZO N°10 | | INCUBACION | | | | 2 | |
| Suero Problema | | | 0.025 ml | | 0.025 ml | | 30 minutos | | | | 3 | |
| Antígeno 1/2 | | | 0.025 ml | | --- | | baño ma | | | | | |
| Complemento 4 UH 50% | | | 0.025 ml | | 0.025 ml | | ría 37C | | | | 4 | |
| Sol. Amort. de Barbit | | | --- | | 0.025 ml | | | | | | 6 | |
| Mezcla de Hemolisina 1/3000 con eritrocitos al 2% | | | 0.050 ml | | 0.050 ml | | 45 minutos | | | | 5 | |
| | | | | | | | baño ma | | | | | |
| | | | | | | | ría 37C | | | | | |
| POZOS CONTROLES* SUERO(+) SUERO(-) Ag C' Sist.Hemoli. Barbitol | | | | | | | | | | | | |
| 1 | | --- | --- | 0.025 ml | 0.025 ml | 0.050 ml | 0.025 ml | | | | 0.025 ml | |
| 2 | | --- | --- | --- | 0.025 ml | 0.050 ml | 0.025 ml | | | | 0.050 ml | |
| 3 | | --- | --- | --- | --- | 0.050 ml | --- | | | | 0.075 ml | |
| 4 | | 0.025 ml | --- | 0.025 ml | 0.025 ml | 0.050 ml | 0.025 ml | | | | --- | |
| 5 | | --- | 0.025 ml | 0.025 ml | 0.025 ml | 0.050 ml | 0.025 ml | | | | --- | |
| 6 | | 0.025 ml | --- | --- | 0.025 ml | 0.050 ml | 0.025 ml | | | | 0.025 ml | |
| 7 | | --- | 0.025 ml | --- | 0.025 ml | 0.050 ml | 0.025 ml | | | | 0.025 ml | |

*Control del Antígeno si es Anticomplementario (Pozo 1). Control del Complemento (Pozo 2). Control del Sistema Hemolítico (Pozo 3). Control del Suero Positivo (Pozo 4). Control del Suero Negativo (Pozo 5). Control del Suero Positivo si es Anticomplementario (Pozo 6).

Interpretación de Resultados.

4 + = No hemólisis = Positivo.

3 + = 25% hemólisis = Positivo.

2 + = 50% hemólisis = Sospechoso.

1 + = 75% hemólisis = Sospechoso.

Trazas = Pocas células = Negativo.

Hemólisis = Completa = Negativo.

III.2. MATERIAL Y METODO EXPERIMENTO N^o I (Estudios Preliminares Sobre la Respuesta Humoral al Desafío de Streptococcus agalactiae).

III.2.a. PREPARACION DEL INOCULO Y ESQUEMA DE INMUNIZACION.

El inóculo con adyuvante fue preparado mezclando 1.5 ml de adyuvante completo o incompleto de Freund con 0.5 ml de antígeno (PROGRAMA N^o III y IV) y fue administrado otro tratamiento con el antígeno solo (PROGRAMA N^o I y II). En el Cuadro No.XII se presenta el esquema de inmunización y las dosis inoculadas. La evaluación de la respuesta humoral fue por medio de electroforesis (solo en los tres primeros sangrados) y Fijación de Complemento.

CUADRO No.XII.- PROGRAMA DE INOCULACION A CONEJOS CON Streptococcus agalactiae FECHAS, DOSIS Y VIAS (EXPERIMENTO I).

| PROGRAMA | DIA | DOSIS | VIA |
|--------------------|-----|---------------------|---------------|
| N ^o I | 1 | 0.5 ml | INTRAVENOSA |
| | 2 | 1.0 ml | |
| | 3 | 2.0 ml | |
| | 4 | 3.0 ml | |
| N ^o II | 1 | 1.0 ml | INTRAVENOSA |
| | 7 | 1.0 ml | |
| | 14 | 1.0 ml | |
| | 21 | 1.0 ml | |
| N ^o III | 1 | 0.5 ml [#] | INTRAMUSCULAR |
| | 15 | 1.0 ml* | |
| | 30 | 2.0 ml | |
| | 45 | 4.0 ml | |
| N ^o IV | 1 | 4.0 ml [#] | INTRAMUSCULAR |
| | 15 | 2.0 ml* | |
| | 30 | 1.0 ml | |
| | 45 | 0.5 ml | |

NOTA: Concentración del antígeno 9×10^8 bact/ml.

Adyuvante Completo.

* Adyuvante Incompleto.

III.3. MATERIAL Y METODOS EXPERIMENTO N^oII (Efecto de Diferentes Adyuvantes y Número de Bacterias sobre la Respuesta Inmunológica en conejos al Desafío con Bacterias Causantes de Mastitis).

Preparación de los Inóculos.- Se estudiaron tres tipos de adyuvantes en este experimento. Estos fueron Dietilaminoetil -Dextran (DEAE-D), una mezcla de Lecitina de Soya-Aceite de Cacahuete con Glicerina Pura (G-C-L) y Bordetella pertussis (B.p.).

III.3.a. PREPARACION DEL INOCULO CON DEAE-D.

Este inóculo fue preparado primeramente suspendiendo el policatió en una solución amortiguadora salina fosfatada a pH 7.3 en una concentración de 20 mg/ml (peso/vol). El inóculo final fue preparado mezclando 1 ml de - antígeno (combinado en el momento de la inmunización) con una cantidad apropiada de la solución de DEAE-D de modo que se administrarán 5 mg de DEAE-D por kg de peso vivo. El volumen final se completó a 2 ml con solución salina estéril. La inoculación fue por vía intramuscular.

III.3.b. PREPARACION DE LA MEZCLA DE LECITINA DE SOYA-ACEITE DE CACAHUATE Y GLICERINA PURA.

La glicerina fue pasada por un filtro de 0.2 μ m. Una parte de lecitina de soya fue disuelta en 10 partes de glicerina con calentamiento y - agitación magnética. Posteriormente 10 partes de aceite de cacahuate fueron agregadas lentamente. Tanto la lecitina de Soya como el aceite de cacahuate se esterilizaron por autoclave a 121C por 15 minutos. El inóculo final fue preparado en todas inoculaciones agregando 0.4 ml de adyuvante más 1 ml de antígeno y 0.6 ml de solución salina estéril. La vía de inoculación fue intramuscular.

III.3.c. PREPARACION DE INOCULO CON Bordetella pertussis.

Se emplearon ampolletas vacunales que contenían el toxoide diftérico, tetánico así como Bordetella pertussis fase I a una dosis de 10×10^6 - org/ml en cada ampollita.

La dosis vacunal por animal fue mezclado 3 ampolletas en un tubo de centrifuga conteniendo 1.5 ml de P.B.S. pH 7.3. Esta suspensión fue centrifugada a 5000 rpm/15 minutos a una temperatura a 4C. La operación se repitió dos veces más eliminando así los toxoides. Finalmente el paquete de bacterias se suspendió en 1 ml de solución salina fisiológica en condiciones estériles.

Este adyuvante no fue mezclado con el antígeno. Se inóculo primero 1 ml de antígeno y después 1 ml de la suspensión de adyuvante en el mismo sitio de inoculación. Todas las inmunizaciones fueron por vía intramuscular.

III.3.d. ESQUEMAS DE INMUNIZACION.

Se valoraron 24 programas de inmunización (Cuadro No. XIII). La dosis tanto del antígeno como del adyuvante se encuentran mencionadas en los programas. Se utilizaron 2 animales por programa. Recibieron 2 inoculaciones; la primera en el día cero (período de preinmunización) con el adyuvante a valorar y 135 días después (período postinmunización).

Los programas controles recibieron únicamente el antígeno con solución fisiológica estéril.

Todos los programas fueron valorados únicamente por medio de fijación de complemento en el experimento N°II

CUADRO No.XIII.- PROGRAMAS DE INOCULACION A CONEJOS CON Streptococcus agalactiae, Staphylococcus aureus Y COMBINADO MOSTRANDO DOSIS, ANTIGENO Y ADYUVANTE (EXPERIMENTO II).

| PROGRAMA | <u>S.aureus</u> | <u>S.agalactiae.</u> | Combinado | DEAE-D | Lec.Gli. Cac. | <u>B.pertussis</u> | Sol.Fis. Est. |
|----------|---------------------|----------------------|---------------------|--------|---------------|--------------------|---------------|
| 1 | 1.5x10 ⁹ | | | X | | | |
| 2 | 3.0x10 ⁹ | | | X | | | |
| 3 | | 1.5x10 ⁹ | | X | | | |
| 4 | | 3.0x10 ⁹ | | X | | | |
| 5 | | | 1.5x10 ⁹ | X | | | |
| 6 | | | 3.0x10 ⁹ | X | | | |
| 7 | 1.5x10 ⁹ | | | | X | | |
| 8 | 3.0x10 ⁹ | | | | X | | |
| 9 | | 1.5x10 ⁹ | | | X | | |
| 10 | | 3.0x10 ⁹ | | | X | | |
| 11 | | | 1.5x10 ⁹ | | X | | |
| 12 | | | 3.0x10 ⁹ | | X | | |
| 13 | 1.5x10 ⁹ | | | | | X | |
| 14 | 3.0x10 ⁹ | | | | | X | |
| 15 | | 1.5x10 ⁹ | | | | X | |
| 16 | | 3.0x10 ⁹ | | | | X | |
| 17 | | | 1.5x10 ⁹ | | | X | |
| 18 | | | 3.0x10 ⁹ | | | X | |
| 19 | 1.5x10 ⁹ | | | | | | X |
| 20 | 3.0x10 ⁹ | | | | | | X |
| 21 | | 1.5x10 ⁹ | | | | | X |
| 22 | | 3.0x10 ⁹ | | | | | X |
| 23 | | | 1.5x10 ⁹ | | | | X |
| 24 | | | 3.0x10 ⁹ | | | | X |

NOTA:

ADYUVANTES:

DEAE-D = 5 mg/peso del animal

Lec.Gli.Cac. = 1 ml

B. pertussis = 30x10⁶ bact/ml

IV. RESULTADOS.

IV.1. RESULTADOS GENERALES (Evaluación de la Prueba de Fijación de Complemento).

Se estableció la sensibilidad y especificidad en la prueba de Fijación de Complemento para Staphylococcus aureus y Streptococcus agalactiae.

La sensibilidad se determinó a una dilución 1:5 a partir de los sueros de los conejos inmunizados con S. aureus y S. agalactiae por separado a los 15, 30, 45, 60 y 75 días postinmunización, para la especificidad, 48 sueros no inmunizados (período de preinmunización) fueron valorados, obteniéndose el porcentaje de resultados negativos en estos sueros.

En el cuadro No.XIV se muestran los índices de confiabilidad de la prueba de Fijación de Complemento para S. aureus y S. agalactiae.

CUADRO No.XIV.- SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA PRUEBA DE FIJACION DE COMPLEMENTO CON AMBOS ANTIGENOS.

| | SENSIBILIDAD | ESPECIFICIDAD |
|---------------------------------|--------------|---------------|
| <u>Staphylococcus aureus</u> | 85% | 85% |
| <u>Streptococcus agalactiae</u> | 98% | 87% |

IV.2. RESULTADOS: EXPERIMENTO N°I.

En el cuadro No.XV se presentan los resultados promedio en los niveles de las globulinas totales determinadas por electroforesis para cada programa.

Los resultados son expresados en g/100 ml, y corresponden al período de preinmunización (valores Basales) y a los 15 y 30 días postinmunización.

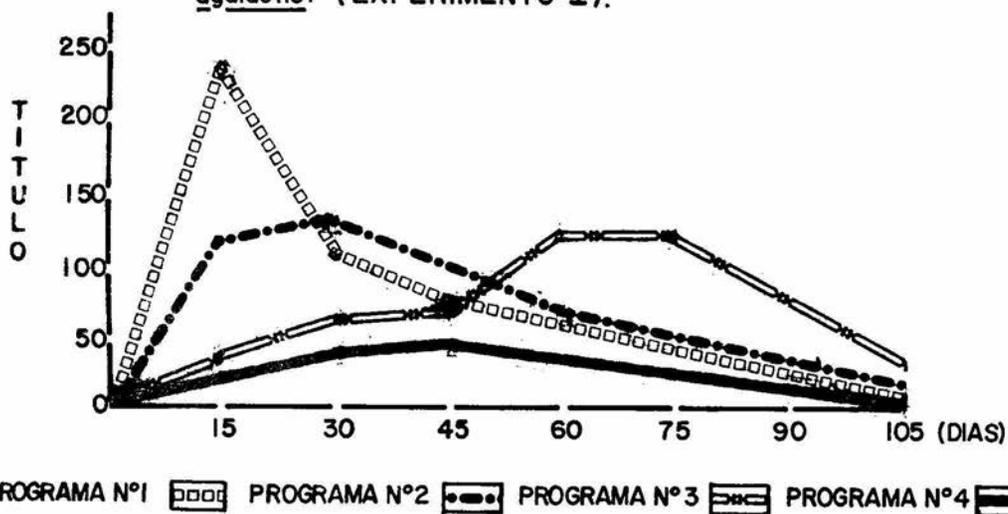
Esta técnica nos proporcionó una información semicuantitativa respecto a concentraciones de inmunoglobulinas.

CUADRO No.XV.- PROMEDIO DE NIVELES DE INMUNOGLOBULINAS EN g/100 ml

| Programa | Preinmunización | 15 días Post. | 30 días Post. |
|----------|-----------------|---------------|---------------|
| I | 0.4282 | 0.8287 | 1.0410 |
| II | 0.7473 | 1.1345 | 0.9716 |
| III | 0.7308 | 0.4729 | 0.7113 |
| IV | 1.8929 | 1.4097 | 1.3744 |

En la gráfica N^o1 se ilustran los resultados promedio de los títulos con la prueba de Fijación de Complemento en conejos inoculados con Streptococcus agalactiae de acuerdo a los cuatro programas evaluados.

GRAFICA I. TITULOS OBTENIDOS CON FIJACION DE COMPLEMENTO EN SUEROS DE CONEJOS INOCULADOS CON Streptococcus agalactiae. (EXPERIMENTO I).



IV.3. RESULTADOS: EXPERIMENTO II.

La gráfica Ia corresponde al promedio de ambos animales que fueron inmunizados con S. aureus a una dosis de 1500×10^6 bact/ml, con los diferentes adyuvantes probados. Los títulos máximos se presentaron a los 30 y 45 días tanto con B.p. y G.C.L. siendo títulos de 1:160. En la reinmunización se obtuvo una mayor respuesta con DEAE-D, 30 días después con títulos 1:160.

La gráfica Ib se presenta la respuesta a S. aureus a una dosis de 3000×10^6 bact/ml, con sus adyuvantes respectivos. El mayor título alcanzado fue 1:160 con el adyuvante B.p. manteniéndose a los 15 y 30 días postinmuni

zación. La respuesta con DEAE-D fue similar en cuanto a títulos pero respondiendo con este adyuvante a los 60 días.

La respuesta con S. agalactiae a una dosis de 1500×10^6 bact/ml se muestra en la gráfica IIA. En el período de preinmunización en todos los animales se encontraron títulos entre 1:5 a 1:50 sin haber tenido antecedentes de un previo contacto con el antígeno. Los mayores títulos alcanzados postinmunización fueron con DEAE-D de 1:50 a los 45 días. A los 165 días - en la respuesta secundaria con el adyuvante G-C-L los títulos fueron de 1:80 siendo la mejor en este programa.

La gráfica IIb representa la respuesta obtenida con S. agalactiae a una dosis de 3000×10^6 bact/ml. Como en el período de inmunización a la dosis de 1500×10^6 bact/ml aquí también se encontraron títulos de 1:7 a 1:30. En el período de postinmunización a los 45 días con el adyuvante de B.p. se obtuvo títulos de 1:85, siendo el que mejor respondió.

Los resultados observados en los grupos inmunizados con la mezcla de S. aureus y S. agalactiae a la dosis de 1500×10^6 y 3000×10^6 bact/ml y -- que fueron valorados con S. agalactiae son representados en las gráficas -- IIIa y IIIb.

El título más alto observado, en la gráfica IIIa, se obtuvo al inmunizar con el adyuvante de G-C-L (1:50). La respuesta obtenida a las inmunizaciones con los otros adyuvantes a probar no fue significativa.

La gráfica IIIb corresponde a la respuesta observada con el antígeno combinado a la dosis de 3000×10^6 bact/ml. Los títulos no mostraron un incremento significativo en relación con su control. El título máximo alcanzado fue 1:30 con DEAE-D a los 30 días postinmunización.

La fig. IV corresponde a los mismos grupos de animales que recibieron antígeno combinado a las dosis de 1500×10^6 y 3000×10^6 bact/ml, pero valorados con S. aureus.

La respuesta obtenida al inmunizar con el antígeno combinado de S. aureus y S. agalactiae a la dosis de 1500×10^6 fue ligeramente superior, que la observada para el grupo control, como se puede apreciar en la gráfica IVa con cualquier adyuvante probado.

El comportamiento fue muy similar con una dosis de 3000×10^6 bact/ml de este antígeno. Como lo muestra la gráfica IVb. La diferencia fue -- con el adyuvante de B.p. que dió títulos de 1:70 a los 30 días postinmunización.

Los resultados obtenidos con estos grupos de animales, al ser va-

lorados con el antígeno combinado están representados en la fig. V.

Se observaron títulos más elevados cuando los sueros fueron valorados con la preparación de S. agalactiae y de S. aureus (antígeno combinado).

En la gráfica Va se presenta la respuesta obtenida al haber inmunizado a la dosis de 1500×10^6 bact/ml, con antígeno combinado y al efectuar la valoración con este mismo antígeno. Los títulos más elevados se presentaron a los 60 días postinmunización tanto con G-C-L como con B.p., pero con títulos de 1:200 y 1:140, respectivamente.

Los resultados a una dosis de 3000×10^6 bact/ml se esquematizan en la gráfica Vb.

La respuesta más elevada se obtuvo con G-C-L a los 45 y 60 días postinmunización así como con DEAE-D a los 60 días con títulos de 1:80 para ambos.

El comportamiento con la dosis de 3000×10^6 bact/ml con antígeno combinado no mostró ninguna similitud con la respuesta observada a la dosis de 1500×10^6 bact/ml.

Los sueros inmunizados contra S. agalctiae fueron valorados con antígeno de S. aureus y a la inversa, es decir, los sueros inmunizados contra S. aureus se valoraron con antígeno de S. agalactiae para ver si existía respuesta cruzada entre estas dos bacterias. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras VI y VII.

Las gráficas VIa y VIB corresponden a los resultados obtenidos al valorar los sueros inmunizados contra S. agalactiae a la dosis de 1500×10^6 - y 3000×10^6 bact/ml, respectivamente, con el antígeno de S. aureus. No se observaron títulos significativos con ninguna de las dosis ni con los diferentes adyuvantes probados.

Los resultados obtenidos al valorar con S. agalactiae los sueros inmunizados contra S. aureus a las dosis de 1500×10^6 y 3000×10^6 bact/ml se esquematizan en las gráficas VIIa y VIIb. Al igual que en el caso anterior no se observan títulos significativos.

FIG. I.- TITULOS DE ANTICUERPOS EN CONEJOS INMUNIZADOS CON DIFERENTE NUMERO DE Staphylococcus aureus
 Ia- 1500×10^6 bact/ml.

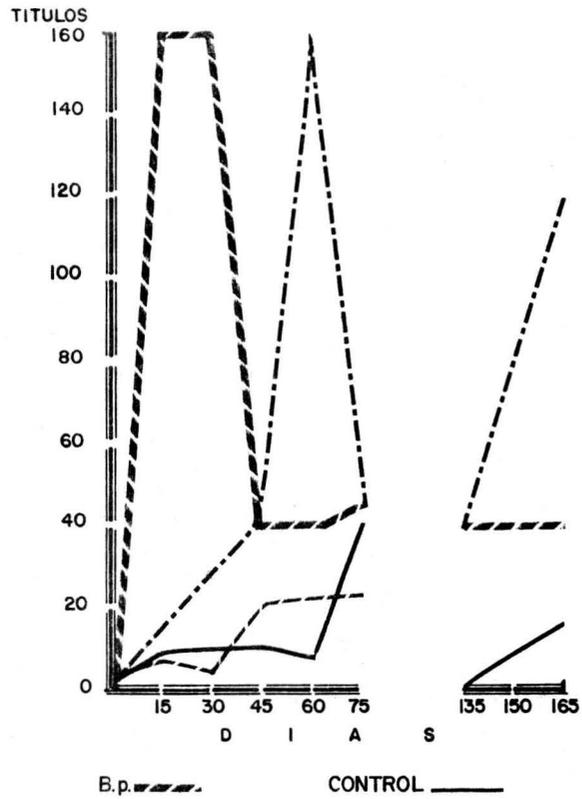
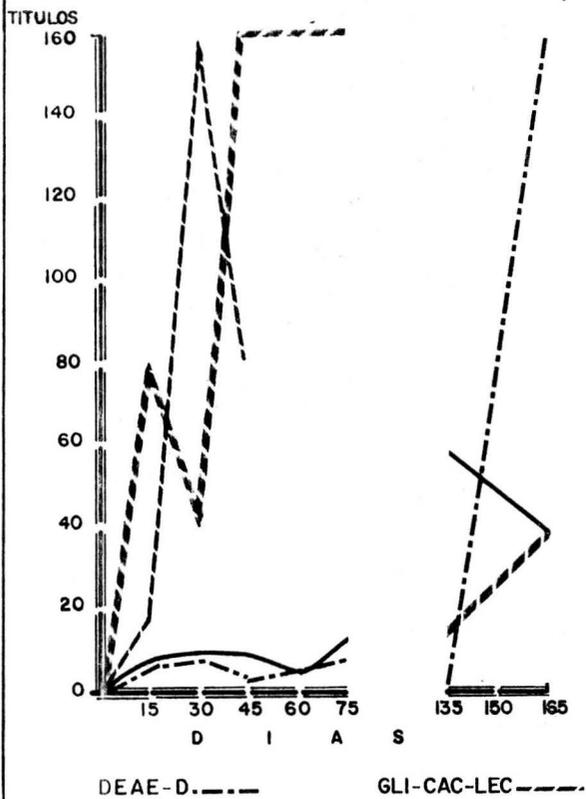


FIG. II.- TITULOS DE ANTICUERPOS EN CONEJOS INMUNIZADOS CON DIFERENTE NUMERO DE Streptococcus agalactiae

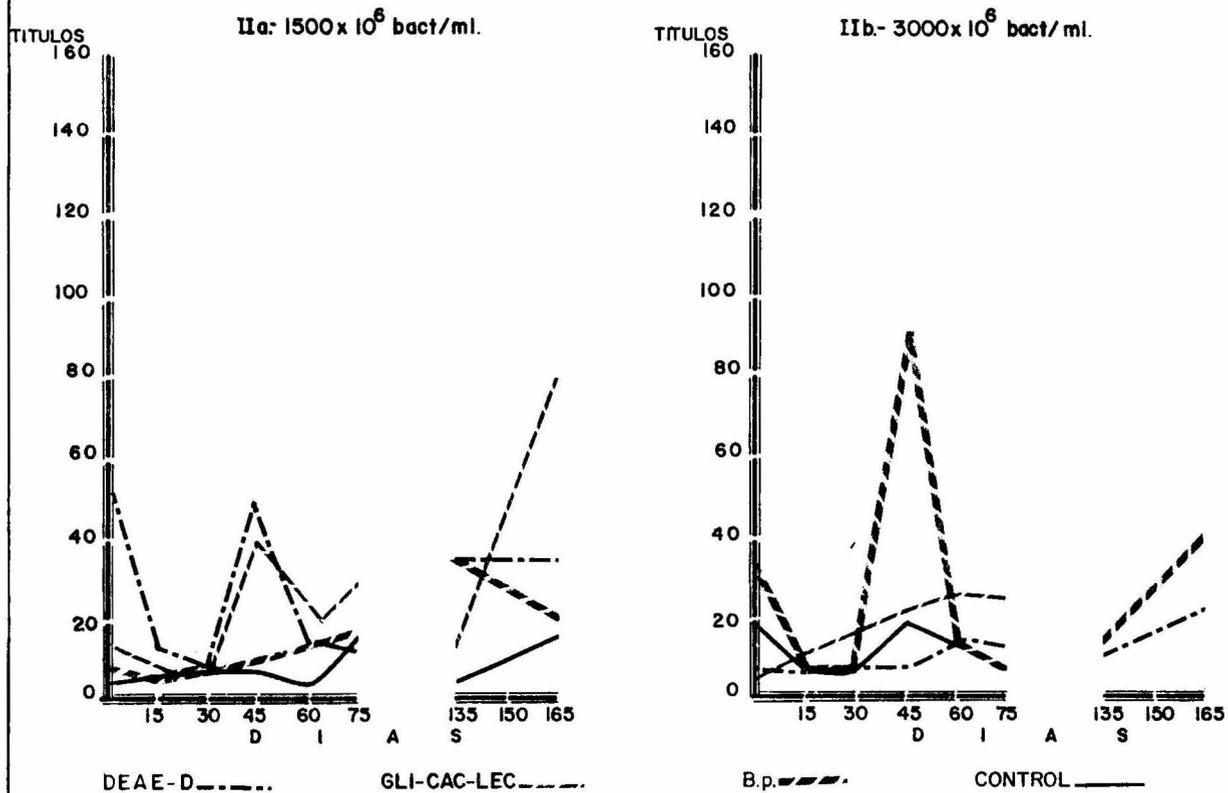


FIG.III.- TITULOS DE ANTICUERPOS CONTRA *Streptococcus agalactiae* EN CONEJOS INOCULADOS CON *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*

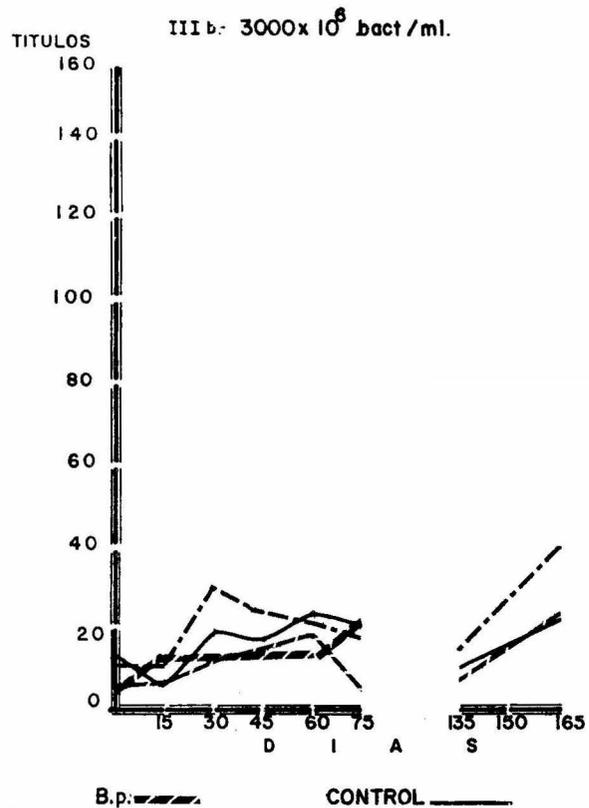
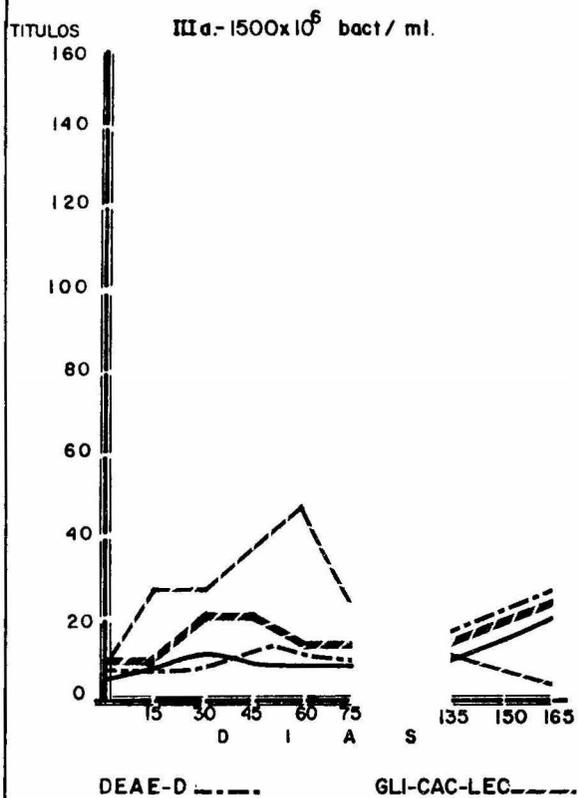


FIG. V.- TITULOS DE ANTICUERPOS CONTRA ANTIGENO COMBINADO EN CONEJOS INOCULADOS CON *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*

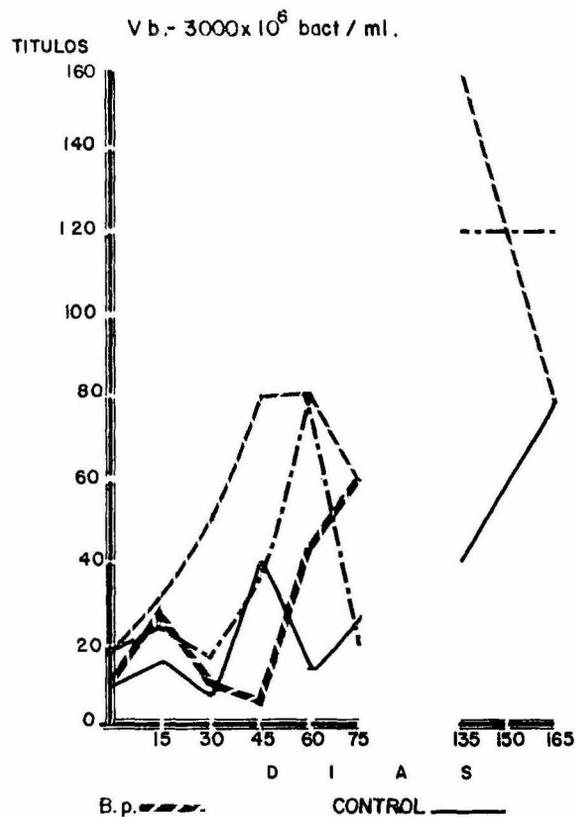
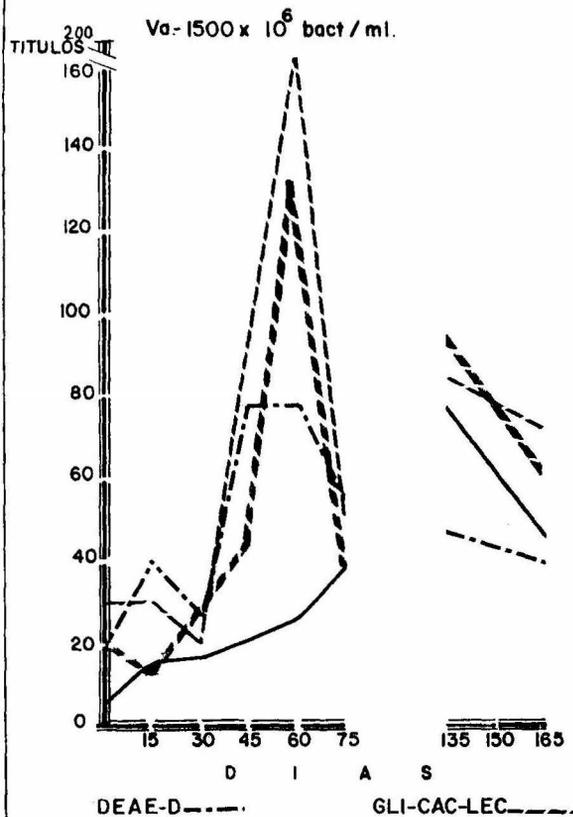


FIG. VI.- TITULOS DE ANTICUERPOS CONTRA *Staphylococcus aureus* EN CONEJOS INOCULADOS CON *Streptococcus agalactiae* (RESPUESTA CRUZADA)

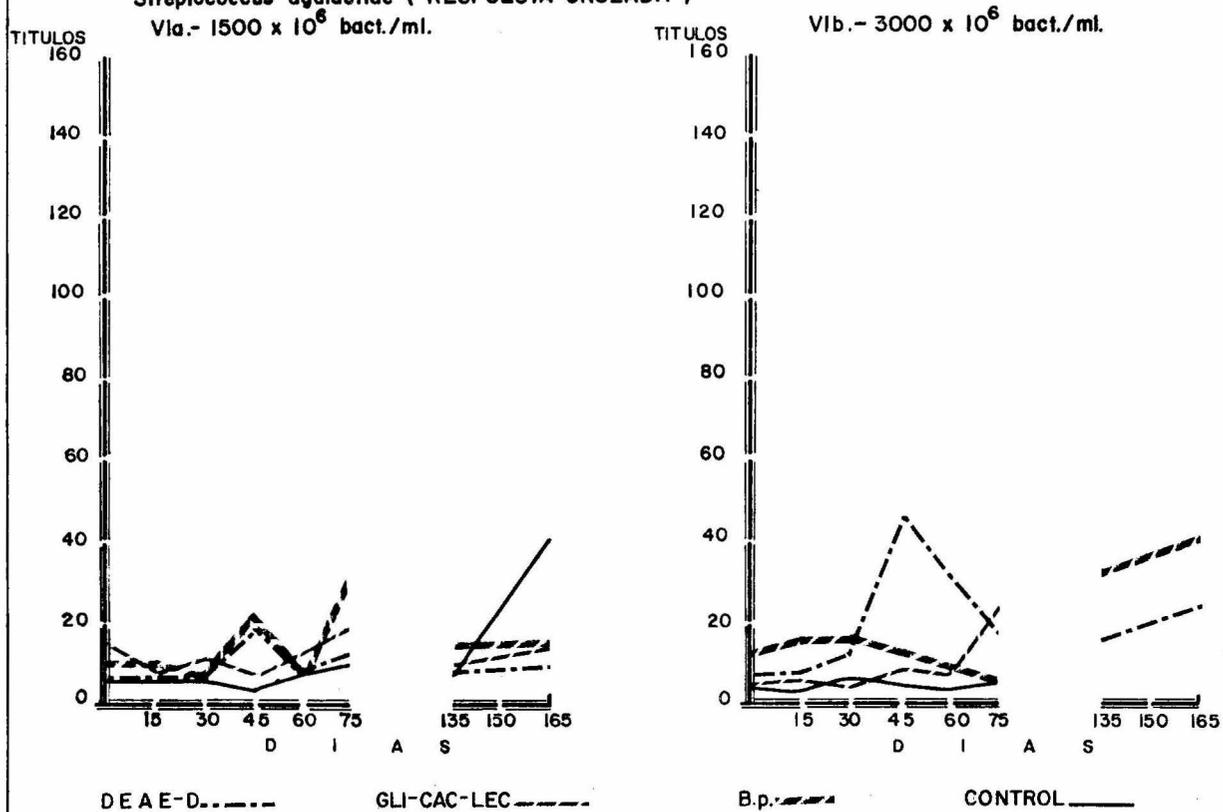
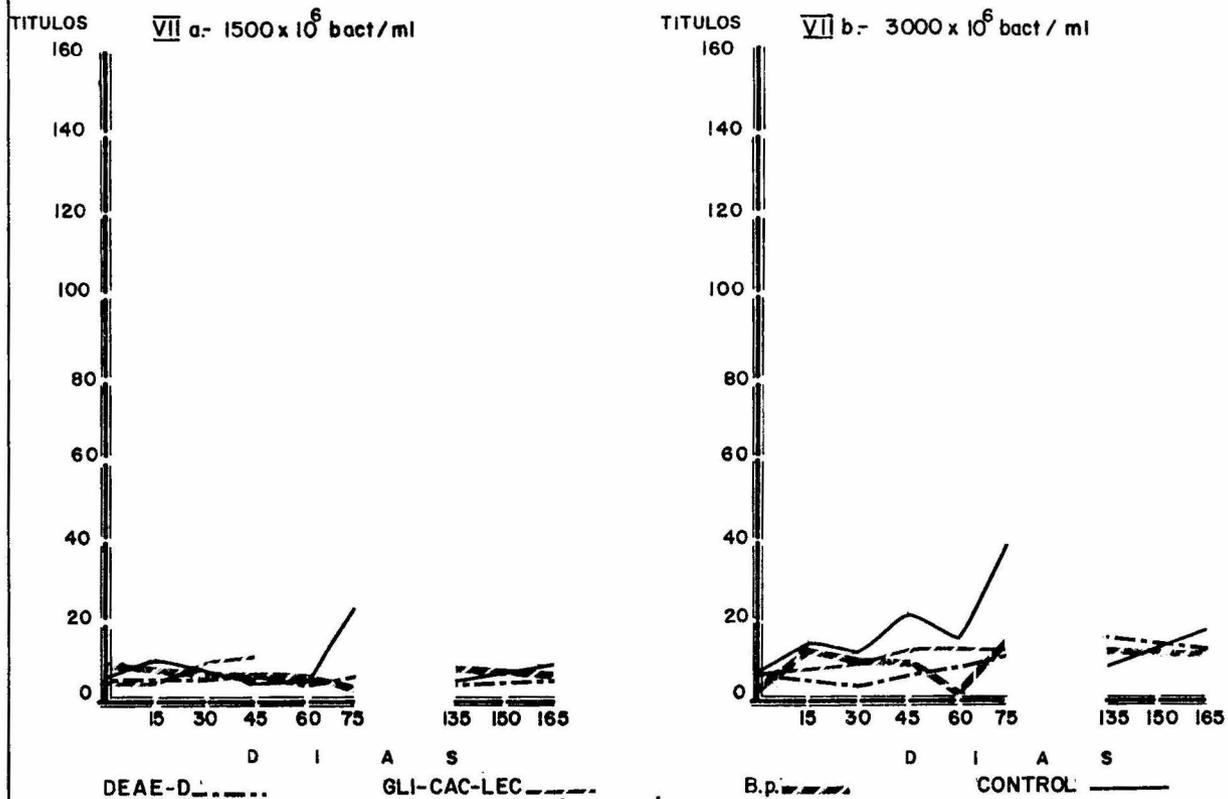


FIG.VII.- TITULOS DE ANTICUERPOS CONTRA *Streptococcus agalactiae* EN CONEJOS INOCULADOS CON *Staphilococcus aureus* (RESPUESTA CRUZADA)



V. DISCUSION.

V.1. PRIMER EXPERIMENTO.

Como puede verse en el cuadro No. XIV no se detectó una sensibilidad suficiente en la respuesta humoral usando la prueba de electroforesis. La literatura indica que el límite de detección de la prueba de electroforesis se encuentra a nivel de mg por ml de inmunoglobulinas totales (49), por lo que seguramente la respuesta inmunológica de los conejos no estuvo mayor a estos niveles. Solamente en los programas I y II se detectó un incremento en el contenido de inmunoglobulinas no siendo significativo a los valores de preinmunización. En lo que respecta al programa III y IV, mostraron un decremento a la concentración de inmunoglobulinas 15 días después de iniciado el programa de inoculación.

Debido a que en nuestros programas sobre el estudio inmunológico en bovinos lecheros se requiere de pruebas con mayor sensibilidad se considera que el método de electroforesis no llena nuestros requisitos.

La baja eficiencia de electroforesis en este estudio nos encaminó a estandarizar la técnica de Fijación de Complemento, que tiene una sensibilidad de 0.05 ug/ml de anticuerpos específicos en esta prueba (8). Los rangos de confiabilidad que se establecieron al inicio, fueron la sensibilidad y especificidad a los mismos sueros que se les corrieron electroforesis.

Las pruebas serológicas empleadas en el laboratorio para diagnosticar comúnmente presentan porcentajes no menores del 75% tanto de especificidad como de sensibilidad y no mayores de un 98%. Así nuestra técnica establecida se encuentra dentro de un margen de error aceptable en una prueba de laboratorio convencional (Cuadro No.XIV).

En la gráfica N^oI se ilustran los resultados promedio de los títulos de anticuerpos obtenidos con la prueba de Fijación de Complemento.

El programa N^oI fue el que obtuvo mayor título de inmunoglobulinas en corto tiempo 1:240, pero la concentración de inmunoglobulinas decreció hacia el día 45 postinmunización moderadamente. Esto puede deberse a la vía de inmunización y a la rápida eliminación del antígeno inoculado (Stewart, 1975).

El programa N^oII a los 15 días postinmunización alcanzó títulos de 1:145. La respuesta humoral decreció también del día 45 en adelante.

En el programa N^oIII el incremento de la respuesta fue menos notable al inicio de la inoculación, los mayores títulos alcanzados 60 días después de iniciado el programa fue de 1:120, manteniendo los niveles de anti-

cuerpos entre los días 60 y 75. Esta respuesta esta basada en el uso del - adyuvante y a la vía de inmunización.

El programa N^oIV tuvo un comportamiento similar al programa N^oIII hasta el día 45 y a partir de ese momento decreció gradualmente el título - de anticuerpos hasta 1:23, 90 días después de la inmunización.

Los factores relacionados al antígeno (Ag), que pueden modificar su capacidad para promover la síntesis de Ab son múltiples. La susceptibilidad del Ag a las enzimas del receptor pueden ser importantes en cuanto a la capacidad de responder al estudio inmunológico. La vía de administración del Ag influye en la magnitud y tipo de respuesta inmune porque en cierta - forma, selecciona el órgano u órganos inmunocompetentes que entrarán en con- tacto con el Ag. La inyección intravenosa del Ag estimula al tejido linfoid de del bazo, pulmones, hígado y médula ósea, mientras que la inoculación por otras vías (intraperitoneal, intramuscular, intradérmica, etc) expone prime- ro a los ganglios linfáticos.

Por lo tanto se puede mencionar que el mejor programa de inocula- ción fue el N^oIII, ya que su respuesta humoral se mantuvo por mayor tiempo y presentó títulos altos 90 días después de la inmunización; los conejos -- responden somáticamente al estímulo antigénico por esta bacteria de una ma- nera normal; la prueba de Fijación de Complemento es conveniente para medir la respuesta inmunológica.

V.2. SEGUNDO EXPERIMENTO.

Es muy difícil establecer una dosis única óptima capaz de inducir la mejor respuesta inmune. No obstante, es posible determinar una dosis mⁱ- nima y otra máxima, abajo y arriba de las cuales no se induce respuesta in- mune.

Así también se ha observado que las dosis pequeñas y las muy ele- vadas de antígeno no producen títulos apreciables de Ab, si no que más bien inducen un estado refractario llamado de tolerancia inmunológica.

Con las dosis valoradas no se pudo establecer exactamente la dosis única óptima, debido posiblemente que las dosis de 3000×10^6 y 6000×10^6 org/ ml se encontraba en un intervalo medio en el que la intensidad de la respues- ta inmune sigue laxamente un efecto dosis respuesta.

En las gráficas presentadas en la figura N^oI se representan los - títulos de anticuerpos en los conejos inmunizados con diferentes concentra- ciones de S. aureus y en la figura N^oII las gráficas obtenidas con S. aga--

lactiae. El efecto de adyuvante de B. p. primordialmente puede observarse en la gráfica Ia, Ib y IIb. Se ha mencionado que el efecto se encuentra dado por péptidos de Bordetella pertussis que promueven tanto una respuesta celular como humoral. Así por tal motivo se valoró la inmunidad humoral con las bacterias más implicadas con mastitis y que muestran poca capacidad inmunogénica al ser inoculadas libres del adyuvante.

En la gráfica IIa el efecto de B. p. como el DEAE-D tuvieron un comportamiento muy similar en la respuesta. Como puede observarse en la figura II en ambas gráficas, en el período de preinmunización todos los animales mostraron títulos, esto se pudo haber manifestado por un contacto con la bacteria antes de iniciado los programas de inoculación y por otro lado que el contacto de otra bacteria presentara similitud con determinantes antigénicos a S. agalactiae.

La figura N^oIII, IV y V corresponden a los conejos inmunizados con ambos antígenos valorados con S. agalactiae y S. aureus independientemente.

Los títulos alcanzados con S. agalactiae en la gráfica IIIa respondieron únicamente al adyuvante de G-C-L 1:50. En relación a la gráfica IIIb el efecto de los adyuvantes no fue mayor que del control.

En la figura IV se muestran los títulos de S. aureus. El efecto de adyuvante únicamente pudo ser observado en la gráfica IVb a los 30 días postinmunización con B. p. a títulos de 1:75

Se ha mencionado que la administración simultánea de dos antígenos puede resultar en una respuesta humoral deficiente para uno de ellos, lo que posiblemente se pudo observar en estos programas comparando las gráficas I, II entre las III y IV respectivamente.

El fenómeno que posiblemente sucedió es que al ser valorados los sueros independientemente con un solo antígeno, se detectan la mitad de las inmunoglobulinas presentes en el suero y así cuando ambos antígenos se utilizaron para valorar la respuesta hubo una sumatoria de títulos hacia ambos antígenos, lo cual demostró que la combinación de esas bacterias potencializa la sensibilidad de la prueba de Fijación de Complemento.

Una de las desventajas en este estudio, es que no se pudo establecer con exactitud una dosis/respuesta. No se detectó un efecto de la dosis bacteriana inoculada, pero se pudo notar una pequeña ventaja en los tratamientos que recibieron mayor inóculo bacteriano.

En la figura VI y VII se muestran las reacciones cruzadas entre ambas bacterias. Se ha establecido que los anticuerpos reaccionan en gene

ral solo con el antígeno usado en la inmunización (antígenos homólogos) y se han observado ciertas excepciones, denominadas reacciones cruzadas, en la que la reacción se lleva a cabo con un antígeno diferente del antígeno homólogo.

Se observó poca reacción cruzada con suero heterólogos a la dosis de 1500×10^6 bact/ml y un ligero incremento con la dosis de 3000×10^6 bact/ml, notándose una mayor respuesta cuando los sueros inmunizados con S. agalactiae fueron valorados con S. aureus.

Es posible, sin embargo que los títulos obtenidos no sean suficientes para establecer el criterio de respuesta cruzada entre S. aureus y S. agalactiae.

No obstante hay escasa información disponible en la distribución de los polisacáridos como proteínas antigénicas superficiales en S. aureus que demuestren reacción cruzada con S. agalactiae. Pero se ha mencionado que existen dos polisacáridos antígenos específicos de grupo para S. aureus que reaccionan con S. epidermidis y ciertos microorganismos.

La comparación con S. agalactiae entre el adyuvante de Freund y B. pertussis se puede establecer unicamente dentro los primeros 30 días, debido a que en la parte que se utilizó adyuvante, los animales recibieron 4 inmunizaciones con dosis crecientes y a intervalos de 15 días, en cambio con B. pertussis se inmunizó una sola vez a una dosis de antígeno. Mencionando estas variantes los mayores títulos obtenidos con adyuvante de Freund fueron entre 1:40 a 1:50 y en cambio con B. pertussis sus títulos se encontraron - 1:90, recordando así que el efecto pudo deberse a la concentración de antígeno y no al adyuvante utilizado.

En Francia se han realizado vacunas formalizadas con E. coli, S. agalactiae y toxoides de S. aureus, alfa y beta y se administraron por vía subcutanea. La eficacia de esta vacuna no ha sido contundente, no mostrarán ninguna reducción en el aislamiento de S. agalactiae, pero el número de animales de los cuales se aisló S. aureus se redujo a 14 vacas y referente a E. coli no se aisló. Se tiene información primordialmente en bovinos y no en conejos, que se estableció como animal experimental y así poder extraer los datos a bovinos.

Las experiencias obtenidas con los adyuvantes valorados dosis probadas en conejos podrán posiblemente vislumbrar la posibilidad de elaborar una vacuna que proteja a la glándula mamaria contra infecciones con estas bacterias estudiadas. Esto sería una gran contribución a la industria lechera.

VI. CONCLUSIONES GENERALES.

LA TECNICA DE ELECTROFORESIS NO PONE EN EVIDENCIA, CONCENTRACIONES MINIMAS DE IMMUNOGLOBULINAS EN LOS PROGRAMAS QUE FUERON PROBADOS.

LA PRUEBA DE FIJACION DE COMPLEMENTO DETECTO TITULOS DE ANTICUERPOS ESPECIFICOS CONTRA LAS BACTERIAS INOCULADAS DE UNA MANERA ACEPTABLE.

LA RESPUESTA HUMORAL AL DESAFIO CON S. aureus Y S. agalactiae DEMOSTRO UNA TENDENCIA SIMILAR A LA REPORTADA CON OTRAS BACTERIAS.

EXISTEN DIFERENCIAS MARCADAS EN LA RESPUESTA HUMORAL DEPENDIENDO DE LA RUTA DE ADMINISTRACION Y DOSIS.

EL EFECTO DE ADYUVANTE PUDO SER EVIDENCIADO MAS CLARAMENTE CON -- Bordetella pertussis Y LA MEZCLA DE GLICERINA-ACEITE DE CACAHUATE-LECITINA DE SOYA.

LAS DOSIS UTILIZADAS NO MANIFESTARON LA CURVA DE DOSIS/RESPUESTA.

LOS RESULTADOS NOS CONFIRMAN QUE S. aureus TIENE UNA MAYOR CAPACIDAD ANTIGENICA (ANTIGENOS EXTRACELULARES) QUE S. agalactiae.

LA POTENCIALIZACION DE LA RESPUESTA HUMORAL CON INMUNIZACION CON ANTIGENO COMBINADO Y VALORADOS A SU VEZ CON EL MISMO ANTIGENO COMBINADO, FUE MAS EFECTIVA, DETECTANDO MAYOR NIVEL DE ANTICUERPOS.

LA MAXIMA RESPUESTA EN UN CORTO TIEMPO SE OBSERVO CON S. aureus.

REFECENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- 1.- A Manual for Conducting (1958). The Complement fixation Test for Anaplasmosis. For use by laboratories engaged in the serological diagnosis of Anaplasmosis. United States Department of Agriculture.
- 2.- Alais Ch. (1970) Ciencia de la Leche. Principios de Técnica Lechera. EDT C.E.C.S.A. 1ª edición en Español. pp 304-319.
- 3.- Athanossiades T.J. (1977). Adjuvant Effect of Bordetella pertussis vaccine to Sheep Erythrocytes in Mice: Enhancement of Cell-Mediated Immunity by Subcutaneous Administration of Adjuvant and Antigen. Infection and Immunity. Nov. Vol. 18 No.2 pp. 416-423.
- 4.- Baker F.J. (1970). Manual de Técnica Bacteriológica. EDT. Acribia. Zaragoza-España 2ª edición.
- 5.- Blood. D.C. y Herderson J.A. (1976) Medicina Veterinaria. EDT. Intera americana. 4 edición México D.F.
- 6.- Buther, J.D (1973). Synthesis and Distribution of Bovine Immunoglobulins J.A.M.V.A., 163-195.
- 7.- Burdon and Williams (1978). Microbiología EDT Publicaciones Culturales S.A. pp. 430-431.
- 8.- Cambell D.H. (1970) Methods in Immunology 2 edition. W.A. Benjamin Inc N.Y. pp 183-224.
- 9.- Carter G.R. (1978) Diagnostic Procedures in Veterinary Microbiology. - EDT. Charles C. Thomas Publisher. Second edition. Springfield Illinois USA pp 102-285.
- 10.- Campos R.V.M. (1981) Incidencia de Infecciones de la Glándula Mamaria en Ganado Lechero Durante el Período Seco. U.N.A.M. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- 11.- Cowan y Steel's (1979). Manual Para la Identificación de Importancia Medica EDT C.E.C.S.A. 2 edición México, D.F.
- 12.- Derbyshire J.B. (1961). The Immunization of Goats Against Staphylococcal Mastitis by Means of Experimental Infections of the Skin and Udder. Res. Vet. Sci. 2: 112-116.
- 13.- Francis J. and Peters J. M. (1947). Studies on Streptococcus agalactiae Infection of the Chick Embryo and Mouse. J. Comp. Path. Therap 57:144
- 14.- Fudenberg and Stiles D.P. (1980). Manual de Inmunología Clínica EDT. El Manual Moderno S.A. 2ª Edición México 11 D.F.
- 15.- Gill T.J.I. (1970) Immunochemistry 7.99.

16. Hagan, Douser y Broner W. (1970) Enfermedades Infecciosas de los Animales Domésticos. La Prensa Médica Mexicana. 3 edición México D.F.
17. Herber W.J. (1972). Inmología Veterinaria. Acribia. Zaragoza. España.
18. Hinsdil R.D. and Berman D.T. (1973) Laboratory Manual. Infection and Immunity. Bact. Vet. Sci. 329. University of Wisconsin. Madison pp 46 46a 47 and 48.
19. Houston. W.E. Carroll L et al (1976) Adjuvant Effects of Diethylaminoethyl-Dextran. Infection and Immunity. June vol. 13 No.6 pp 1559-1562.
20. Jawest E., J.L. Melnick, et al (1979) Manual de Microbiología. El Manual Moderno S.A. 8 edición México 11 D.F.
21. Larson B.L., Heay H.L. Jr. et al (1979). Immunoglobulin Production and Transport by the Mammary Gland. J. Dairy Sci 63:665-671.
22. Lascelles A.K. (1979). The Immune System of the Ruminant Mammary Gland and its Role in the Control of Mastitis. J. Dairy Sci. 62: 154-160.
23. Logan E.F., Meneclly D.J. (1982). Enzyme-linked immunosorbent assay for Streptococcus agalactiae antibodies in bovine milk. The Veterinary Record. March 13 pp 247-249.
24. Mac Faddin J.F. (1980). Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. Panamericana Viamonte 2164. Buenos Aires.
25. Mayus R.M. William (1976). Inmunología. Fondo Educativo Interamericano S. A. Columbia 2a. Edición 262-271.
26. Mc. Farland J. (1957). The Nephelometer: An Instrument for Estimating the Number of bacteria in Suspension Used for Calculating the Opsonic Index and for Vaccines. J. Ame. Med. Assoc. 49 1176.
27. Meynell G.G., Meynell E. (1979). Bacteriología Experimental. Teoría y Práctica Omega S. A. Casanova 220. Barcelona España.
28. Morse. S. I. (1976). Biologically active components and properties of Bordetella pertussis. Adv. Appl. Microbiol. 20. 9-26.
29. Norcross N.L. (1971). Immune Response in the Mammary Gland. Symposium: Mastitis. Presented at the Sixty-sixth. Annual Meeting of the American Dairy Science Association. Michigan University.
30. Pérez D.M. (1980) Comunicación Personal.
31. Pérez D.M. (1980). Aspectos Generales Sobre Mastitis. Manual Sobre Gando Lechero. México D.F. pp 689-708.
32. Pérez D.M. (1978). Factores de Resistencia en la Glándula Mamaria de Bovinos. Curso de Actualización sobre Mastitis Bovina. U.N.A.M. pp.

- 114-125.
33. Pérez R.T., Larralde C. (1968). Inmunopatología. La Prensa Médica Mexicana. México 20, D.F.
 34. Plommet M. (1970). Diagnóstico Bacteriológico de las Infecciones de la Mama de Vaca. Patología de la Producción Lactea. Centre National de la Recherche Scientifique de Francia. Academia León (España). pp 9-57.
 35. Postle D.S. (1978). Induced Staphylococcal Infection in the Bovine Mammary Gland. The Amer. Journal of Veterinary Research 39-1 29.
 36. Pharmacia Fine Chemicals (1974). Dextran Fractions Dextran Sulphate. DEAE-Dextran. Sweden by Uppland.
 37. Reynolds J.A. Harrington D.G. et al (1980) Adjuvant Activity of a Novel Metabolizable Lipid Emulsion with Inactivated Viral Vaccines. Infection and Immunity. June Vol. 28 No.3 pp 937-943.
 38. Schalm O.W. (1971) Bovine Mastitis. Lea & Febiger. Philadelphia pp. - 182-349.
 39. Schmidt G.H. (1971). Udder Abnormalities. Biology of Lactation. Cornell University pp 264-294.
 40. Schultz L.H. (1977). Somatic cells in milk-physiological aspects and relationship to amount and composition of milk. Journal of Food Protection. Vol. 40. No.2 pp 125-131.
 41. Shwan O. (1979) IgG Antibody Responses to *Corynebacterium pyogenes*, *Pseudomonas indolicus* and microaerophilic cocci in Natural and Experimental mastitis. Depart. of Bact. and Epizootiology Uppsala (Sweden).
 42. Schweinsberg H. (1975). Hojas de Laboratorio para el diagnóstico Médico. Hoechst. Aktiengesellschaft Departamento Behring. Frankfurt. W. Germany.
 43. Stewart Sell 1975 Immunology, Immunopatology and Immunity Second Edition. Harper Row. Publishers Inc. N.Y. 6-7.
 44. Steward N.W. (1979). Inmunoquímica Cuadernos de Biología. Omega Casanova 220. Barcelona.
 45. Slean J.D. and Overcast W.W. (1967). Efficacy of Staphylococcal Vaccines to elicit Antistaphylococcal Alfa-hemolysin in Dairy Cows. Department of Dairying Tennessee Agricultural Experiment. Station Knoxville.
 46. Trejo J.R. (1978). Consideraciones Económicas de los Efectos de la Mastitis Sobre la Producción de Leche. Curso de Actualización Sobre Mastitis Bovina U.N.A.M. pp 27-40.
 47. Timothy J.N. and John Bourne (1977). The Natural of the local immune

- System of the Bovine Mammary Gland. The Journal of Immunology vol. -
118 No.2
48. Watson D.L. (1981).. Immunologically-Specific Resistance to Infections -
with Particular Reference to Staphylococcal Mastitis CSIRO. Division
of Animal. Armidale. New South Wales 2350: Australia.
 49. Weir D.M. (1977). Handbook of Experimental Immunology. Blackwell --
Scientific Publications Oxford and Wdinburgh. First Published. Vol.I.
 - 50.. Wiltman G.K. Baver and Mussgar M. (1972). Experiments of Vaccination
of pigs with ethylothyleneimine (EEI) diethyl-aminoethyl dextran (DE-
AE-D) food-and-mouth disease vaccines. Influence of route of inocula-
tion and dose of antigen on the duration of Immunity. Arc. Gesamte Vi-
rusforsch 36: 251-264.
 51. Wiltman G.B. et al (1975). Some Investigations on the Adjuvant Meca-
nism of DEAE-Dextran. Arch Virol 47:225-235.
 52. Woolcock J.B. (1979). Bacterial Infection and Immunity in Domestic -
Animals. Elsevier Scientific Publishing Company. New York p 201.
 53. Yuichi Yokomizo and Norcross N.L. (1978). Bovine Antibody Against -
Streptococcus agalactiae, Type Ia. Produced by Preparturient Intramma-
ry and Systemic Vaccination. Am. J. Vet. Res. Vol. 39 No.3 pp 511-516.