

4
201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

“EVALUACION DE DIFERENTES VIAS DE INMUNIZACION
CONTRA Staphylococcus aureus QUE INDUZCAN
RESPUESTA INMUNE CELULAR A NIVEL SISTEMICO
E INTESTINAL EN UN MODELO BIOLÓGICO”

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
PRESENTAN

Martina Guadalupe Patricia Alvarez Cabrera
Rodolfo Rojas Cruz

Directores de Tesis:

BIOL. M.C. Fernando Díaz Otero

M.V.Z. PhD. Juan Antonio Montaraz Crespo



V N A M

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx.

1990



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 está 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.

INDICE

LISTA DE ABBREVIATURAS.
RESUMEN.

1. INTRODUCCION

- 1.1 GENERALIDADES DE Staphylococcus aureus.
- 1.1.1 INMUNIDAD CON RESPECTO A S. aureus.
- 1.2 EVALUACION DE LA INMUNIDAD CELULAR.
- 1.3 UTILIZACION DE MODELOS EXPERIMENTALES.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS.

2. MATERIAL Y METODOS

- 2.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE S. aureus.
- 2.2 OBTENCION DE ANTIGENO.
- 2.2.1 COSECHA DE S. aureus.
- 2.2.2 INACTIVACION DE S. aureus.
- 2.2.3 OBTENCION DE PARED CELULAR DE S. aureus.
- 2.2.4 OBTENCION DE ACIDO TEICOICO A PARTIR DE LA PARED CELULAR DEL S. aureus.
- 2.3 CARACTERIZACION DEL ANTIGENO.
- 2.3.1 OBTENCION DE SUERO HIPERINMUNE.
- 2.3.2 REALIZACION DE LA PRUEBA DE INMUNIZACION DOBLE EN AGAR.
- 2.4 PROGRAMAS DE INMUNIZACION.
- 2.4.1 CONDICIONES DE LOS ANIMALES.
- 2.4.2 ESTANDARIZACION DE LA DOSIS DEL INMUNOGENO (S. aureus).
- 2.4.3 DESCRIPCION DE LOS PROGRAMAS DE INMUNIZACION.
- 2.4.4 MANEJO DE LOS ANIMALES DURANTE LA INOCULACION.
- 2.5 PRUEBA DE TRANSFORMACION BLASTOIDE CON INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA.
- 2.5.1 PREPARACION DE LINFOCITOS.
- 2.5.2 ESTIMULACION DE LA PROLIFERACION DE LINFOCITOS CON UN MITOGENO (Con A).
- 2.5.3 ESTIMULACION DE LA PROLIFERACION DE LINFOCITOS CON ANTIGENO.
- 2.5.4 COSECHA DE LINFOCITOS MARCADOS CON TIMIDINA TRITIADA.
- 2.6 ANALISIS ESTADISTICO.

3. RESULTADOS.

- 3.1 CARACTERIZACION DEL ACIDO TEICOICO.
- 3.2 ESTANDARIZACION DE LA PRUEBA DE TRANSFORMACION BLASTOIDE.
- 3.2.1 ESTABLECIMIENTO DE DOSIS OPTIMAS DE Con A.
- 3.2.2 ESTABLECIMIENTO DE LAS DOSIS OPTIMAS DEL ANTIGENO.
- 3.3 EFECTO DEL ACIDO TEICOICO DE S. aureus SOBRE LINFOCITOS DE BAZO Y GLMs.
- 3.3.1 OBSERVACIONES GENERALES.
- 3.3.2 BAZO
- 3.3.3 GLMs.

ABREVIATURAS

TCA	Acido tricloroacético
ASB	Albumina sérica bovina
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
CD-1	Cepa del ratón
Con A	Concanavalina A
CPM	Cuentas por minuto
Ci	Curie
g	Fuerza de centrifugación
GLMs	Ganglios linfáticos mesentéricos
°C	Grados centígrados
gr	Gramos
HEPES	N-2-Hidroxietil piperacina-etano ácido sulfónico
IE	Indice de Estimulación
IMC	Inmunidad Mediada por Células
Ig	Inmunoglobulina
Kg	Kilogramo
Lbs	Libras
uCi	Microcuries
ug	Microgramos
ul	Microlitros
mg	Miligramos
ml	Mililitros
mMol	Milimol
min	Minutos
M	Molar
nm	Nanómetros
N	Normal
PC	Pared celular
p/v	peso-volumen
PPO	2,5 difeniloxazol
POPOP	p-bis(2-(5-feniloxazolil))benzeno
\bar{x}	Promedio
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SSI	Solución salina isotónica
SFB	Suero fetal bovino
³ H-Tdh	Timidina tritiada
UFC	Unidades formadoras de colonias
UI	Unidades Internacionales

3.3.4 COMPARACION ENTRE LOS EFECTOS DE ACIDO TEICOICO
Y Con A SOBRE LINFOCITOS DE BAZO Y GLMs.

4. DISCUSION.

5. CONCLUSIONES

6. APENDICE.

7. BIBLIOGRAFIA.

RESUMEN

Staphylococcus aureus es identificado como uno de los microorganismos más importantes causantes de mastitis bovina, contra el cual los intentos por dar una protección inmunológica adecuada a la glándula mamaria han tenido poco éxito, debido a que los mecanismos inmunológicos involucrados en el establecimiento y desarrollo de la enfermedad aun no se determinan completamente.

Este trabajo tuvo como objetivo el estudiar por un lado, el efecto estimulante del ácido teicoico de la pared celular de S.aureus sobre linfocitos obtenidos de bazo y ganglios linfáticos mesentéricos de un modelo experimental (ratón), y por otro lado evaluar la inmunidad celular inducida por diversas vías de inmunización, para lo cual se inmunizaron grupos de 5 ratonas gestantes Mus musculus CO-1 con una suspensión de S. aureus inactivado con formol aislado de un caso de mastitis bovina, con una concentración de 150×10^6 UFC/0.1ml de la siguiente manera :

Grupo A, testigo; Grupo B, 2 inmunizaciones intramusculares; Grupo C, una intramuscular y una oral; Grupo D, una intramuscular y una intraperitoneal; Grupo E, una intramuscular y una intracecal; Grupo F, una oral y una intracecal.

Después de 30 días de finalizar los programas de inmunización, se realizó la prueba de transformación blastoide con los linfocitos de los ratones pertenecientes a cada grupo, utilizándose el ácido teicoico como antígeno y concanavalina A como mitógeno, esta última como testigo positivo de proliferación linfocitaria.

Los resultados obtenidos con la prueba de transformación blastoide demuestran que únicamente el grupo B (intramuscular-intramuscular) mostró diferencias significativas. Se concluyó con ello que la mejor vía de inducción de inmunidad celular en este modelo experimental es la vía exclusivamente intramuscular.

1. INTRODUCCION.

La mastitis en relación a pérdidas económicas, es sin duda la enfermedad más importante a la cual se enfrenta la industria lechera desde hace varios años. Los factores relacionados con la presencia de esta enfermedad son bastante complejos, incluyendo etiologías tanto físicas, químicas como biológicas. Dentro de las causas biológicas de mastitis se han encontrado diversos agentes etiológicos, entre los cuales destaca Staphylococcus aureus, bacteria que ocupa un sitio importante debido a su alta incidencia y a su difícil control (15,47).

S. aureus es un agente que se encuentra como habitante natural en el medio en el que se desarrolla el hato lechero; presenta gran resistencia a los factores adversos y a diferencia de otros patógenos de la glándula mamaria, posee una gran variedad de mecanismos de patogenia, por lo que es capaz de invadir diversos tejidos y órganos, y dañarlos (64).

Con la idea de controlar la presencia de S. aureus en los hatos lecheros, los ganaderos han preferido el uso de numerosas dosis de antibióticos; sin embargo, esta opción tiene sus problemas intrínsecos: provoca resistencia de este microorganismo e incrementa peligrosamente la cantidad de residuos de antibióticos en la leche, lo cual a su vez puede inducir hipersensibilidad en los consumidores (47,64).

En vista de que la mastitis ha alcanzado una alta frecuencia dentro del ganado lechero, se ha puesto especial atención a la inmunización contra patógenos causantes de esta enfermedad.

A pesar de la considerable investigación de las defensas naturales como mecanismos de prevención contra la mastitis, poca importancia se ha concedido a la inducción de inmunidad celular en esta enfermedad.

1.1 GENERALIDADES DE Staphylococcus aureus

S. aureus es un microorganismo capaz de infectar diversas especies incluyendo al hombre, debido a la producción de diferentes factores, aunque las cepas varíen considerablemente en cuanto a estos y a su cantidad (72).

Los factores que intervienen en la patogenia de este microorganismo se engloban en tres grandes grupos:

I.- Factores extracelulares (exotoxinas)

- a) Alfatoxina
- b) Betatoxina
- c) Leucocidina

II.- Factores somáticos (componentes celulares)

- a) Proteína A
- b) Polisacárido ácido
- c) Acido teicoico

III.- Factores de invasividad

- a) Enzimas (catalasa, hialuronidasa, fibrinolisisina, lipasa, estearasa, coagulasa).
- b) Impedinina

La estructura antigénica de S. aureus se basa principalmente en las estructuras externas de esta bacteria (cápsula, pared celular y membrana citoplasmática) (68).

La proteína A es un constituyente de la pared celular (PC) de los estafilococos cuya particularidad es que se une a la fracción cristalizable (Fc) de las inmunoglobulinas (Ig) que fija el

complemento en lugar de combinarse con la fracción variable (Fab) como en una reacción antígeno-anticuerpo normal (49), limitando su utilidad en una preparación vacunal; además se ha reportado que este antígeno presenta actividad mitogénica (55). Existe otro componente importante de la PC de S. aureus, el ácido teicoico (polímero del glicerol o del fosfato del ribitol) unido a peptidoglycano, con capacidad antigénica (68), aunque en una revisión hecha en diez años no se ha establecido si presenta actividad mitogénica sobre linfocitos.

Se ha intentado incorporar diversos antígenos de S. aureus en una vacuna, por ejemplo el propio ácido teicoico (extraído de la PC con TCA), la PC y la bacteria completa viva o muerta por calor o formalina. La eficacia de estas preparaciones tiene una gran variación de resultados en cuanto al factor escogido que se agrega a la vacuna, además de las dosis usadas, intervalo entre la inmunización y el desafío, método y ruta de vacunación (18).

Los preparados convencionales de vacunas de S. aureus que incluyen bacterias muertas con o sin adyuvantes o toxoides, generalmente han sido poco útiles en la prevención de la enfermedad (5,29,32,39,72).

La utilización de una bacteria viva como vacuna ha demostrado mayor protección a desafíos posteriores con S. aureus principalmente en ganado bovino (29,53) aunque un inconveniente de su utilización es la formación de abscesos en el sitio de inoculación (65). Ello implica que en un modelo experimental, por ejemplo el ratón, resulta peligrosa la aplicación de este tipo de vacunas, puesto que la formación de diversos abscesos podría conducir a la muerte del modelo experimental, deteniendo el curso de la investigación.

1.1.1 INMUNIDAD CON RESPECTO A Staphylococcus aureus.

El tratamiento de la mastitis estafilocócica de ganado vacuno mediante antibióticos es costoso y de resultados variables por lo que se ha intentado crear una vacuna que prevenga la infección (67). Se vacuna con el objeto de incrementar el título de anticuerpos y linfocitos T sensibilizados en la sangre y la leche contra S. aureus y de este modo se intenta proteger al organismo (39); además se sugiere que para la efectividad de una preparación vacunal, esta debe inhibir el crecimiento del microorganismo y la producción de toxinas (72).

En estudios sobre la patogénesis e inmunidad en infecciones experimentales con S. aureus, los investigadores han dirigido su atención a los antígenos de superficie, en especial al ácido teicoico y a la PC (25). Diversos investigadores han utilizado la cuantificación de anticuerpos como herramienta de diagnóstico para esta infección (27,56,61), e incluso se ha relacionado el título de anticuerpos contra el ácido teicoico con la severidad de la infección causada por la bacteria (52). En investigaciones realizadas por Ekstedt (1966) se identifica al ácido teicoico como un antígeno que se relaciona constantemente con la inmunidad generada por infección estafilocócica experimental en ratón (18).

Se ha comprobado que la inmunidad sistémica resulta en altos niveles de anticuerpos de la clase IgG en sangre, mientras que la inmunización local se relaciona con la presencia de anticuerpos de la clase IgA, específica en la defensa de mucosas; sin embargo ambas rutas no confieren una protección total a la glándula mamaria contra S. aureus (53) y no evitan la recurrencia de las infecciones por este microorganismo.

A este respecto diversos investigadores han encontrado que la administración de vacunas con preparados de estafilococos solo han podido disminuir el aspecto clínico de la enfermedad después de un desafío (45,54,67).

En la vacunación sistémica convencional con respecto a la producción de Ac sobresalen por lo menos dos grandes obstáculos para la exitosa inmunización contra la mastitis estafilocócica.

Uno de ellos es que S. aureus es un microorganismo que posee una gran variedad de mecanismos de patogenicidad y entre estos, toxinas extracelulares, sin embargo no queda claro cual de estos factores se debe incorporar a una vacuna (65). Otro aspecto importante es la transferencia de Ig de la sangre a la leche (42): se ha observado que la transferencia de Ig es relevante principalmente durante la etapa de producción de calostro, pero durante la lactación los niveles disminuyen considerablemente (29,60).

Por otro lado se ha intentado estimular la inmunidad local mediante inyecciones de S. aureus en la glándula mamaria, las cuales inducen una importante producción de IgA (32,39,42). Sin embargo la inmunización local en la glándula mamaria presenta algunas importantes desventajas: requiere una rigurosa asepsia en el sitio de inyección para evitar infección inadvertida por otros patógenos y, lo que es muy importante desde el punto de vista económico, puede disminuir considerablemente el nivel de producción láctea en la glándula mamaria.

El estudio de la inducción de inmunidad celular (IC) por vacunación contra S. aureus es un tema cuya información resulta escasa. Un dato aislado demuestra que después de una inyección intramamaria con S. aureus muerto por calor, existe un contacto de la PC de la bacteria con células linfoides inmunocompetentes a las cuales sensibiliza, y que una subsecuente exposición estimula una respuesta inmune mediada por células, lo que incluye la producción de linfocinas que a su vez provoca el reclutamiento, activación e inmovilización de células fagocíticas (macrófagos y neutrófilos) (57).

Otros investigadores han relacionado la importancia que existe entre la estimulación antigénica por S. aureus y la producción de linfocinas (3,44,58). Con respecto a ello se sabe que las linfocinas son proteínas con funciones biológicas determinadas, liberadas por una subpoblación especializada de linfocitos T después del contacto con un antígeno (30). Desde el punto de vista de mecanismos inmunológicos en procesos infecciosos, las linfocinas y los linfocitos que las producen son de gran importancia en los casos de infecciones causadas por microorganismos patógenos facultativos intracelulares, generando

la activación subsecuente de macrófagos, siendo esto un proceso característico de inmunidad mediada por células (IMC) (3,35,36).

Aunque S. aureus no es un verdadero parásito facultativo, se ha demostrado que es capaz de sobrevivir dentro de ciertas células tales como los macrófagos, aunque no logre reproducirse en ellos (3). Sin embargo la idea de que esta bacteria es capaz de inducir la producción de linfocinas en una clásica respuesta IMC, ha sido confirmada por otros investigadores (58,72). Los resultados de Baughn (1975) apoyan aun más esta idea, pues encontró un aumento del potencial antibacteriano de los macrófagos causado por fluidos de cultivos de linfocitos que contenían linfocinas, provenientes de animales infectados con S. aureus (3).

Dado los escasos datos que se tienen sobre la cuantificación de la inmunidad celular, se consideró oportuno evaluar esta actividad después de un esquema de inmunización. En la siguiente sección se revisan los procedimientos generales usados para tal fin.

1.2 EVALUACION DE LA INMUNIDAD CELULAR

Las pruebas para medir IMC pueden dividirse en dos tipos:

- a) In vivo -Intradermoreacción
-Rechazo de injertos
-Reacción de injertos contra huésped (43)

- b) In vitro -Factor de Inhibición de la migración de Macrófagos (MIF)
-Factor de Inhibición de la migración de Leucocitos (LIF)
-Transformación Blastoide (TB)

Dentro de las pruebas in vivo la más utilizada es la intradermoreacción, cuyo ejemplo clásico es la prueba de la tuberculina, usada con frecuencia para detectar la presencia de Mycobacterium bovis en el ganado.

Las pruebas in vitro incluyen a las pruebas de MIF y LIF cuyo principio es detectar el factor de inhibición de macrófagos y el de leucocitos respectivamente (35), y la TB, la cual ha incrementado su importancia en el campo de la inmunología veterinaria.

La TB puede evaluar la respuesta desarrollada por una vacuna (41), tanto en el humano como en animales domésticos y de laboratorio (26). Este ensayo puede utilizarse para demostrar la interacción entre los linfocitos, observar si las células T y B son específicamente sensibilizadas y estudiar el papel de los dos tipos de células en la respuesta inmune.

La prueba de TB se fundamenta en que cuando un linfocito es estimulado por un antígeno o un mitógeno, su metabolismo se activa, sintetiza DNA y comienza a dividirse, transformándose en linfoblasto; la síntesis de DNA se mide agregando un precursor de ácidos nucleicos con una marca radiactiva (por lo general se utiliza timidina tritiada, $^3\text{H-Tdh}$) (8,63). Después, del cultivo se obtienen las células para cuantificar la timidina tritiada incorporada al DNA. Comparando la incorporación de la marca en cultivos testigo (sin estímulo) con la de cultivos que se estimularon, se puede determinar de manera cuantitativa el grado de proliferación (34,35,43).

La prueba de estimulación linfocitaria o TB ha sido usada cada vez con más frecuencia para detectar linfocitos sensibilizados, y sus principales aplicaciones son:

- Reconocimiento de una IMC en algunas enfermedades infecciosas.
- Evaluación de la eficiencia de programas de vacunación por medio del desarrollo de sensibilidad hacia antígenos.
- Demostración de competencia inmunológica.
- Determinación del papel de las interacciones celulares relacionadas con el antígeno (26).

Por otro lado los linfocitos a diferencia de otras células especializadas, son capaces de proliferar ante diversos estímulos como se mencionó anteriormente; entre estos, los que se pueden destacar son las sustancias mitogénicas, las cuales pueden ser muy diversas. En inmunología se utilizan con mayor frecuencia moléculas extraídas de plantas, capaces de inducir mitosis en los linfocitos.

La distinta capacidad de responder a sustancias mitogénicas es una característica que permite diferenciar las poblaciones de linfocitos.

Los linfocitos T responden a fitohemaglutinina (PHA) y concanavalina A (Con A); los linfocitos B son estimulados por lipopolisacáridos, derivados de la endotoxina de varias bacterias, fundamentalmente de Escherichia coli. Existe otra sustancia mitogénica denominada fitolaca (PKW) que requiere de la colaboración de linfocitos T, B y células accesorias para producir proliferación linfocitaria (62).

Los linfocitos pueden ser estimulados por mitógenos y la magnitud de respuesta de la transformación linfocitaria depende de una gran cantidad de variables, incluyendo la concentración de este mitógeno. Además, las características funcionales de las células inducidas a transformación varía de acuerdo al tipo y dosis de mitógeno (23). En este sentido se ha observado que el mitógeno que alcanza un mayor pico de respuesta realizando una curva dosis-respuesta de la estimulación de linfocitos, es la Con A (8), el cual es un activador policlonal de células T (51); también se ha observado que es ampliamente utilizada en las técnicas para examinar la blastogénesis linfocítica en diversas especies (12, 71), así como en enfermedades causadas por S. aureus en ganado lechero (10,14,41). De manera que se considera que la Con A es el mitógeno adecuado para esta clase de estudios.

1.3 UTILIZACION DE MODELOS EXPERIMENTALES.

S. aureus es capaz de infectar al hombre y a distintas especies animales, produciendo diversas enfermedades

(cardiopatías, osteomielitis, piodermas, etc.) (27,52,61,70), por lo que se considera importante encontrar un modelo experimental para estudiar la actividad de este agente infeccioso.

Los antecedentes sobre el uso de modelos experimentales de laboratorio en relación a infecciones causadas por S. aureus han incluido especies como el cuyo (2), conejo (15), rata (28) y ratón (2,3,10,21,59).

En el estudio de la mastitis estafilocócica bovina se han utilizado distintas especies animales como sustitutos del ganado bovino; en vista de los elevados costos de mantenimiento y el extenso manejo que requieren estos rumiantes, caprinos, ovinos y cerdos se han utilizado para continuar los estudios. Aunque han disminuido las dificultades mencionadas, los problemas continúan siendo básicamente los mismos (10).

El ratón es otra de las especies animales que se encuentra dentro del espectro de infección de S. aureus. Investigaciones anteriores han demostrado la susceptibilidad de los ratones a infecciones causadas por esta bacteria, lo cual indica que es posible reproducir dicha infección en esta especie con la bacteria aislada de un caso de mastitis bovina estafilocócica (1,2).

En adición a lo anteriormente mencionado, se deben considerar otras ventajas para el investigador con respecto al uso del ratón, como son su fácil obtención, la adaptación a las condiciones de cualquier laboratorio, y a diferencia de otros modelos experimentales de laboratorio, ocupan menor espacio, representa mayor facilidad su manejo, y principalmente requieren una menor cantidad de reactivos durante las investigaciones.

Dadas las ventajas mencionadas en el uso del ratón como modelo de laboratorio, la infección estafilocócica experimental en este animal provee un modelo ideal para estudios básicos y experimentales que se puedan aplicar después en ganado bovino, sobre todo considerando el número de experimentos necesarios para cada tema de investigación con respecto a S. aureus (10).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La vacunación como medida de prevención de mastitis estafilocócica bovina ha tenido poco éxito con la utilización de diversos inmunógenos de Staphylococcus aureus, con diferentes dosis y mediante distintas vías de administración.

Generalmente estas vacunas han sido evaluadas en relación a la inmunidad humoral generada (producción de anticuerpos), mientras que la inducción de inmunidad celular, como factor importante en la protección contra mastitis estafilocócica ha recibido poca importancia.

Por tanto se ensayarán diferentes vías de inmunización en ratón con un preparado de S. aureus muerto y se evaluará por medio de transformación blastoide (TB) la inmunidad celular después de dichos esquemas de inmunización.

Así los objetivos son:

- 1.- Obtención de ácido teicoico de Staphylococcus aureus aislado de un caso clínico de mastitis bovina para su utilización en la prueba de transformación blastoide.
- 2.- Evaluar la estimulación de la inmunidad celular por S. aureus mediante el uso de la microtécnica de transformación blastoide.
- 3.- Determinar si el ácido teicoico de S. aureus presenta actividad mitogénica en linfocitos de ganglios linfáticos mesentéricos (GLMs) y bazo de ratones Mus musculus CD-1.

2. MATERIAL Y METODOS

2.1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE Staphylococcus aureus

Se utilizaron 30 vacas con mastitis clínica de los ranchos "La Palma" (Coacalco, Edo. de México) y "El Terremoto" (carretera Cuautitlán-Zumpango). Dichas vacas fueron separadas en un lugar limpio para proceder a la toma de muestras (una muestra por cuarto).

En primer instancia se preparó la ubre mediante el lavado con agua limpia y tibia, secando perfectamente. Enseguida se desinfectó el meato de cada pezón con un algodón humedecido en alcohol etílico al 70%, empezando por los pezones del lado izquierdo (1o delantero, 2o trasero), continuando con los del lado derecho (3o trasero, 4o delantero). Con los dedos pulgar, índice y medio se ordeñó cada pezón con presión mínima manteniendo un tubo de ensayo estéril con tapón de rosca lo más horizontalmente posible y tapándolo rápidamente; se usó un tubo de ensayo por cuarto. Las muestras de leche fueron tomadas a partir de los primeros chorros. Una vez tomadas las muestras, se mantuvieron a 4°C realizando su siembra durante las primeras 5 horas de tomadas (47).

Las siembras de las muestras de leche se realizaron en agar sangre (5% de sangre bovina), incubándose a 37°C durante 24 a 48 horas. Aquellas colonias con morfología sospechosa de S. aureus (colonias cremosas o doradas lisas, de 3.5 mm de diámetro con zonas de hemólisis alfa o beta) se les practicó tinción de Gram, separando las colonias positivas a la tinción; a estas colonias

Gram positivas se les realizaron las pruebas bioquímicas correspondientes a S.aureus hasta su completa identificación. La obtención e identificación de la bacteria se esquematiza en el cuadro #1 (13). En seguida se procedió a la denominación de la cepa bacteriana, escogida de acuerdo a la realización de la prueba de coagulasa, siendo la bacteria aislada del cuarto posterior derecho de la vaca #713 propiedad del rancho "La Palma" la que produjo el coagulo mas visible, denominandose por ello cepa 2-713 PD.

2.2 OBTENCION DE ANTIGENO.

2.2.1 COSECHA DE Staphylococcus aureus.

A partir de placas de agar sangre con S.aureus. y en condiciones de esterilidad, se tomaron asadas del total de la placa para pasarse a PBS estéril pH 7.2 (ver apéndice). La bacteria se conservó a una temperatura de 4°C(15).

2.2.2 INACTIVACION DE Staphylococcus aureus

Al final de la cosecha de S. aureus, se le agregó formol al 2X manteniéndose en baño maría a 65°C durante 30 min. Posteriormente se lavó la suspensión de bacterias inactivadas por 3 veces a 500 g por 30 min., decantando el sobrenadante y manteniendo el sedimento que contenía el paquete bacteriano, el cual se colocó en un matríz en un volumen de 100 ml. de PBS estéril (6,15).

2.2.3 OBTENCION DE PARED CELULAR DE Staphylococcus aureus

Una vez inactivada la bacteria se preparó la pared celular (PC) de S. aureus de la siguiente manera:

Las bacterias fueron congeladas a -70°C e inmediatamente descongeladas en baño maría a 56°C. Posteriormente se realizaron 5 sonicaciones del paquete celular a máxima amplitud de

frecuencia (30 microns) durante 10 min. por cada sonicación. En seguida al mismo paquete se le practicó una trituración mecánica mediante un agitador mecánico, con adición de microperlas de vidrio; se efectuaron varios ciclos de trituración con duración de 15-20 min. por ciclo, a intervalos de 10 min. entre cada ciclo. Posteriormente se separaron las microperlas de vidrio del paquete bacteriano filtrandolas con papel Whatman #3.

Una vez que las bacterias fueron rotas, se procedió a separar la PC por centrifugación diferencial, primero a 3000g por 15 min para remover bacterias íntegras y posteriormente a 10,000g durante 30 min. para sedimentar la PC (34).

2.2.4 OBTENCIÓN DE ÁCIDO TEICOICO A PARTIR DE LA PARED CELULAR DE Staphylococcus aureus

Se realizó una preparación de PC al 2.5% en ácido tricloroacético (TCA) al 10% y se mantuvo la suspensión a 4° C durante 70 horas en agitación. Posteriormente se separó el insoluble mediante centrifugación a 500g por 30 min.; el sedimento resultante fué lavado con pequeñas cantidades de TCA al 10%.

El sobrenadante y los líquidos del lavado se mezclaron con igual volumen de éter etílico. En seguida se separó la fase acuosa y se redisolvió en TCA al 10%; a esta solución se le añadieron dos volúmenes de alcohol frío y se mantuvo a 4°C por 18 horas. Se separó el precipitado obtenido por centrifugación; de ello se obtuvo un precipitado (ácido teicoico) que se separó con alcohol, se secó con éter, y el polvo resultante fue resuspendido en PBS estéril.

El ácido teicoico resuspendido en PBS fue pasado a través de un filtro Millipore de 0.22µ de diámetro(18,34). En seguida se le determinó el contenido protéico por el método de Lowry (6,31). La obtención del ácido teicoico de la PC de S. aureus se resume en el cuadro #2 .

2.3 CARACTERIZACION DEL ANTIGENO.

La identificación del antígeno (ac. teicoico) de la PC de S. aureus se realizó mediante la prueba de inmunodifusión doble en agar, comparandose con ácido lipoteicoico comercial (SIGMA) (20,22).

2.3.1 OBTENCION DE SUERO HIPERINMUNE.

El suero hiperinmune empleado para la identificación antigénica fué obtenido a partir de un conejo inmunizado con una suspensión de S. aureus inactivado, utilizando adyuvantes completo e incompleto de Freund, como se describe en el cuadro #3 (25).

2.3.2 REALIZACION DE LA PRUEBA DE INMUNODIFUSION DOBLE EN AGAR.

Se preparó agarosa al 1% en solución salina isotónica (SSI) (ver apéndice). Se realizaron perforaciones circulares para colocar los antígenos y el suero hiperinmune como se esquematiza en la fig.1 (46).

2.4 PROGRAMAS DE INMUNIZACION.

2.4.1 CONDICIONES DE LOS ANIMALES.

Para la realización de los programas de inoculación se utilizaron grupos de 5 ratonas gestantes Mus musculus CD-1 donadas por el bioterio del Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología, INIFAP-SARH.

Dichos animales se encontraban en los últimos 7 días de gestación, con un peso aproximado de 45 gr y alimentados a base de concentrado y agua ad libitum.

2.4.2 ESTANDARIZACION DE LA DOSIS DEL INMUNOGENO (Staphylococcus aureus).

La cantidad de bacterias que se inocularon en los animales pertenecientes a diferentes esquemas de inmunización se determinó en base al método nefelométrico (6,33).

De una suspensión bacteriana de S. aureus vivo, una parte fue inactivada y otra se mantuvo viable conservándose a -70°C para después utilizarla en el método cuenta gotas.

Para la inoculación de los animales se utilizó la suspensión bacteriana inactivada, a la que se le agregó un volumen conocido de PBS. Las dos suspensiones bacterianas (inactivada y viable) se compararon con diferentes concentraciones de sulfato de bario, primero por turbidez y luego por medio del espectrofotómetro a 546nm (cuadro 4) (6,17).

El tubo seleccionado fue el #5, el cual correspondía a una concentración de $1500 \times 10^6 \text{ UFC/ml.}$, basándose en la concentración usada por Anderson en su experimento realizado en 1987(2).

Con el objeto de corroborar el método nefelométrico descrito se desarrolló el método cuenta gotas (37). En una serie de 9 tubos con 9 ml. de PBS se hicieron diluciones 1:10 a partir del tubo patrón (tubo #5 del nefelómetro) (fig. 2) que contenía suspensión bacteriana viable. De cada tubo se tomaron alícuotas de 20ul. con pipeta microvolumétrica y puntas estériles (una para cada dilución) para después depositarse en forma de 5 gotas sobre la superficie de una caja de agar sangre. Se esperó a que secaran las gotas y se incubó por 24 horas a 37°C .

Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a hacer el conteo de colonias por dilución, contando el número de colonias y después sacando el promedio entre las 5 gotas.

En las diluciones de los tubos 1 al 5 el número de colonias obtenidas excedía a la concentración escogida; en la dilución del tubo 6 el número de colonias obtenidas correspondía a la concentración escogida (fig.2).

2.4.3 DESCRIPCION DE LOS PROGRAMAS DE INMUNIZACION.

El número de programas utilizados fueron 6, con un promedio de 5 animales por programa como se esquematiza en cuadro 5 .

2.4.4 MANEJO DE LOS ANIMALES DURANTE LA INOCULACION.

Para la inoculación de la suspensión bacteriana, se utilizaron jeringas insulínicas con diferentes agujas, dependiendo la vía de inoculación. En el caso de las vías intramuscular, intraperitoneal e intracecal, la aguja que se usó fue 25x16mm; para la ruta oral la aguja fue del calibre 16x32mm, sin punta y con un ángulo de 45°. El manejo de los animales en las diferentes inoculaciones se describe a continuación (68):

a) Inoculación Intramuscular.- El ratón se tomó con la mano izquierda y con el 4o. o 5o. dedo se sostuvo la cola por la base. Con los dedos pulgar e índice se sujetó al animal por la nuca, retrayendo la piel para evitar que se moviera. Con ayuda de un asistente que sostenía la pierna izquierda del animal, la inoculación se hizo en la parte posterior del muslo, en el interior de los músculos insertando la aguja en ángulo recto a la mitad del fémur. Después de realizarse la inoculación, se retiró la aguja y se masajeó el lugar de la inyección.

b) Inoculación Intraperitoneal.- El ratón se tomó de la manera antes descrita, permitiendo que el animal cayera sobre la palma de la mano. Con los dedos restantes se presionó la pared abdominal; la aguja se insertó en el abdomen, ligeramente lateral a la cicatriz umbilical, con una profundidad de no más de 6mm para evitar daño a las vísceras.

c) Inoculación Intracecal.- En este caso el animal fue sometido a una laparotomía media, utilizándose anestesia general con

pentobarbital sódico (AnestesaI, Smith-Kline) con una dosis de 28mg/kg de peso (0.02ml./45gr de peso) por vía intraperitoneal.

En condiciones de esterilidad, el animal se colocó en decúbito dorsal con los cuatro miembros fijos. Se realizó antisepsia con cloruro de benzalconio y se procedió a incidir piel, músculos abdominales y peritoneo. Enseguida se extrajo el ciego y se procedió a inocular la suspensión bacteriana. Mientras el intestino permaneció afuera se hidrató con PBS estéril. Al terminar de inocular se regresó el intestino a su lugar y se procedió a suturar peritoneo junto con músculos abdominales y posteriormente piel, mediante material absorbible.

d) Inoculación Oral.- Sujeto el ratón de la forma como se mencionó en los incisos a y b, se colocó al animal en posición vertical; con la jeringa en posición paralela al animal, se introdujo la aguja sin punta y con ángulo de 45° hasta el fondo de la cavidad oral y se administró lentamente la dosis bacteriana.

2.5 PRUEBA DE TRANSFORMACION BLASTOIDE CON INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA (MICROMETODO)

2.5.1 PREPARACION DE LINFOCITOS.

Se extrajo el bazo y los ganglios linfáticos mesentéricos (GLMs) de todos los ratones (inoculados y testigos) para la obtención de linfocitos mediante la disgregación de estos órganos en medio RPMI-1640 no suplementado frío (ver apéndice); en seguida de la disgregación las células se lavaron 3 veces mediante centrifugación a 500 g por 10 min. con medio sin suplementar. Después de la última centrifugación, se decantó el sobrenadante y se les agregó 4 ml de medio suplementado frío (16,46).

A continuación se hizo el conteo de células viables por medio de la técnica de exclusión de tripán azul de la siguiente manera:

Con una pipeta microvolumétrica y punta estéril se tomó una alícuota de 50ul de cada una de las suspensiones linfocitarias y se colocó en una placa de microtitulación no estéril; se agregaron 50 ul de tripán azul al 0.2% para obtener una dilución 1:2. Se homogenizaron las suspensiones, y las células se depositaron en un hematocitómetro y se esperó 3 min. para empezar a contar las células vivas (sin teñir) de los 4 cuadrantes con ayuda de un microscopio óptico utilizando el objetivo de 40x (7,22).

2.5.2 ESTIMULACION DE LA PROLIFERACION DE LINFOCITOS CON UN MITOGENO (Concanavalina A).

Con el fin de determinar las concentraciones óptimas de estimulación mitogénica de Concanavalina A (Con A) se realizó una curva dosis-respuesta, donde se utilizó un grupo de 5 ratones que no habían recibido inmunizaciones, para verificarse la proliferación de linfocitos provenientes de bazo y GLMs, y demostrar que estas células se encontraban viables y en condiciones óptimas para una posible proliferación con el antígeno (16,46,50).

En placas de microtitulación con 96 pozos en fondo de "U" y tapa, se depositaron por triplicado 200,000 linfocitos por pozo, de bazo o de GLMs (según el caso) de los ratones en 100ul de RPMI suplementado. Se adicionaron 100ul de Con A a concentraciones de 1-50 ug/ml de medio de cultivo por pozo y se ajustó a un volumen final de 200ul. Se hicieron cultivos sin estimular (testigos) denominándoles concentración 0.

Las células se incubaron por 72 horas en una estufa a 37° C con 5% de CO₂ y humedad de 100%; 18 horas antes de finalizar la incubación, se agregó a cada pozo 1uCi de timidina tritiada con una actividad específica de 6.7 Ci/mmol (New England Nuclear) (fig.3).

De las concentraciones utilizadas en la curva dosis-respuesta de Con A se tomaron las concentraciones 1 y 3 ug/ml

empleándose como testigos positivos en linfocitos de bazo y GLMs de los ratones que habían sido previamente inmunizados.

2.5.3 ESTIMULACION DE LA PROLIFERACION DE LINFOCITOS CON ANTIGENO

Al igual que en la estimulación con Con A, se utilizaron placas de microtitulación idénticas, la misma cantidad de linfocitos por pozo y del medio de cultivo suplementado tanto para bazo como para GLMs (según el caso) de ratones inmunizados y testigos. En este caso, se adiciona a cada pozo en forma de triplicado por ratón, 100 ul de antígeno de S. aureus (ácido teicoico) suspendido en medio de cultivo no suplementado, ajustado a un volumen final de 200 ul/pozo. Las concentraciones utilizadas fueron:

a) Cultivos con concentración 0 (sin estimular) utilizados como testigos.

b) Cultivos con concentración 1,3,5,10,50,100 y 150ug de antígeno por mililitro de medio de cultivo suplementado (fig.4).

Estas concentraciones se utilizaron sólo en el grupo B experimental para realizar la curva dosis-respuesta del ácido teicoico en linfocitos de bazo y GLMs de ratones inmunizados y control para obtener las concentraciones óptimas a las cuales existió mejor respuesta (fig.4).

Dichas concentraciones se prepararon en base a la cantidad de proteína que presentó el antígeno al ser analizado por el método de Lowry.

c) Cultivos con concentraciones 5 y 10 ug de antígeno por mililitro de medio de cultivo suplementado.

Estas concentraciones se utilizaron en los grupos experimentales restantes (A,C,D,E y F) que fueron las concentraciones óptimas de respuesta determinadas por la curva dosis-respuesta llevada a cabo en el grupo B experimental.

Las células se incubaron por 120 horas en una estufa a 37° C con 5% de CO₂ y 100% de humedad; 18 horas antes de finalizar la

incubación se agregó a cada pozo 1 uCi de timidina tritiada (16,26,46).

Todo el manejo de células se realizó bajo condiciones de esterilidad, exceptuando el conteo de células viables, y se mantuvieron siempre a temperatura cercana a 4°C para evitar su muerte.

2.5.4 COSECHA DE LINFOCITOS MARCADOS CON TIMIDINA TRITIADA.

Después del periodo total de incubación, tanto para la estimulación con el mitógeno como para la estimulación con el antígeno, las células se cosecharon en PBS pH 7.2 frío en filtros de papel de fibra de vidrio mediante un microcosechador manual para 24 pozos conectado a una bomba de vacío. Se pasó por el filtro TCA al 5 y 10%, y metanol al 70% para fijar las células.

Una vez secos los filtros circulares de papel de fibra de vidrio pertenecientes a cada pozo, fueron colocados en viales de plástico con tapa de rosca, los cuales contenían 2ml de líquido de centelleo. Las lecturas para cada vial fueron obtenidas en cuentas por minuto (CPM) mediante un contador beta de centelleo (Escuela Superior de Medicina, IPN).

Las CPM obtenidas se transformaron en índices de estimulación (IE) utilizando la siguiente fórmula (16,26):

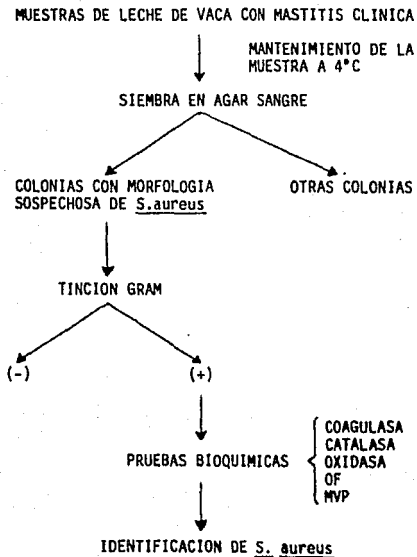
$$IE = \frac{\text{CPM de cultivos estimulados}}{\text{CPM de cultivos no estimulados}}$$

Todo el proceso de microtransformación blastoide queda resumido en el cuadro #6.

2.6 ANALISIS ESTADISTICO.

Los resultados obtenidos en las pruebas de transformación blastoide fueron comparados estadísticamente mediante un análisis de varianza (38).

CUADRO #1.- ESQUEMATIZACION DE LA OBTENCION E IDENTIFICACION DE
Staphylococcus aureus



CUADRO #2.- RESUMEN DE LA OBTENCION DE ACIDO TEICOICO
A PARTIR DE S.aureus

- A) COSECHA DE S. aureus.

- B) INACTIVACION DE S. aureus
(formaldehido al 2%, a 65°C/30min.)

- C) OBTENCION DE PARED CELULAR (PC)
 - 1.- RUPTURA DE BACTERIA.
 - 2.- SEPARACION DE PC.

- D) OBTENCION DE AC. TEICOICO DE PC DE S. aureus
(método de extracción con ácido tricloroacético).

- E) FILTRADO EN MEMBRANA MILLIPORE DE 0.22u DE DIAMETRO.

- F) DETERMINACION DE PROTEINA
(método de Lowry).

CUADRO #3.- PROGRAMA DE INMUNIZACION PARA LA OBTENCION DE SUERO
HIPERINMUNE CONTRA S. aureus EN CONEJO

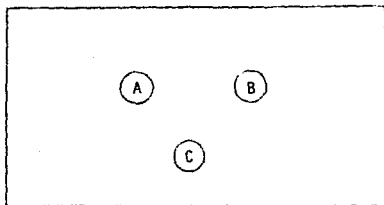
DIA	DOSIS	VIA DE INMUNIZACION
0	Sangrado inicial	
	1ml ag + 1ml ACF	INTRAMUSCULAR
	1ml ag	SUBCUTANEO
8	1ml ag + 1ml AIF	INTRAMUSCULAR
16	1ml ag + 1ml AIF	INTRAMUSCULAR
24	1ml ag + 1ml AIF	INTRAMUSCULAR
	1ml ag	SUBCUTANEO
32	1ml ag + 1ml AIF	INTRAMUSCULAR
40	1ml ag	INTRAVENOSO
48	2ml ag	INTRAVENOSO
	Sangrado	
56	3ml ag	INTRAVENOSO
64	Sangrado	

ACF= ADYUVANTE COMPLETO DE FREUND

AIF= ADYUVANTE INCOMPLETO DE FREUND

(24)

FIG. 1.- ESQUEMATIZACION DE LA PRUEBA DE INMUNODIFUSION EN PLACA (OUCHTERLONY) PARA DEMOSTRAR LA IDENTIDAD ANTIGENICA DEL ACIDO TEICOICO OBTENIDO.



A= ANTIGENO OBTENIDO DE LA PARED CELULAR (PC) DE S.aureus.
(AC. TEICOICO).

B= ANTIGENO COMERCIAL (SIGMA).

C= SUERO HIPERINMUNE DE CONEJO CONTRA S.aureus.

**CUADRO #4 .- RELACION ENTRE LA CONCENTRACION DE SULFATO DE BARIO
(BaSO₄) Y EL NUMERO DE BACTERIAS POR MILILITRO.**

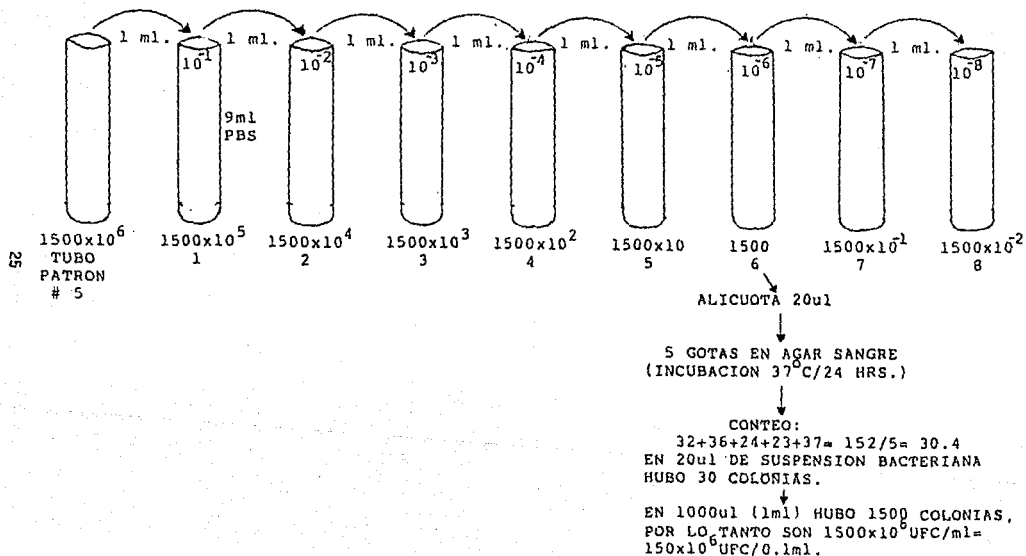
Tubo	1% BaCL(ml)	1% H ₂ SO ₄ (ml)	# Bact/ml	Absorbancia(DO)
1	0.1	9.9	300 x 10 ⁶	0.289
2	0.2	9.8	600 x 10 ⁶	0.666
3	0.3	9.7	900 x 10 ⁶	0.985
4	0.4	9.6	1200 x 10 ⁶	1.255
5	0.5	9.5	1500 x 10 ⁶	1.510 *
6	0.6	9.4	1800 x 10 ⁶	1.843
7	0.7	9.3	2100 x 10 ⁶	1.900
8	0.8	9.2	2400 x 10 ⁶	2.106
9	0.9	9.1	2700 x 10 ⁶	2.450
10	1.0	9.0	3000 x 10 ⁶	2.560

* CONCENTRACION ESCOGIDA.

D.O.= DENSIDAD OPTICA.

(14,32)

FIG. 2.- ESQUEMATIZACION DEL METODO CUENTA GOTAS PARA CORROBORAR LA CONCENTRACION BACTERIANA ESCOGIDA POR EL METODO NEFELOMETRICO.



CUADRO #5 .- PROGRAMAS DE INOCULACIONES EN RATONES HEMBRAS
GESTANTES CON Staphylococcus aureus

GRUPO	1a. DOSIS (+/- 7 días preparto)	2a. DOSIS (7 días postparto)
A *	-	-
B	INTRAMUSCULAR	INTRAMUSCULAR
C	INTRAMUSCULAR	ORAL
D	INTRAMUSCULAR	INTRAPERITONEAL
E	INTRAMUSCULAR	INTRACECAL
F	ORAL	INTRACECAL

* Grupo Testigo

La dosis de bacterias inactivadas inoculadas a los ratones fue de 150×10^6 UFC/0.1ml.

CUADRO #6.- ESQUEMATIZACION DE LA MICROTECNICA DE TRANSFORMACION BLASTOIDE.

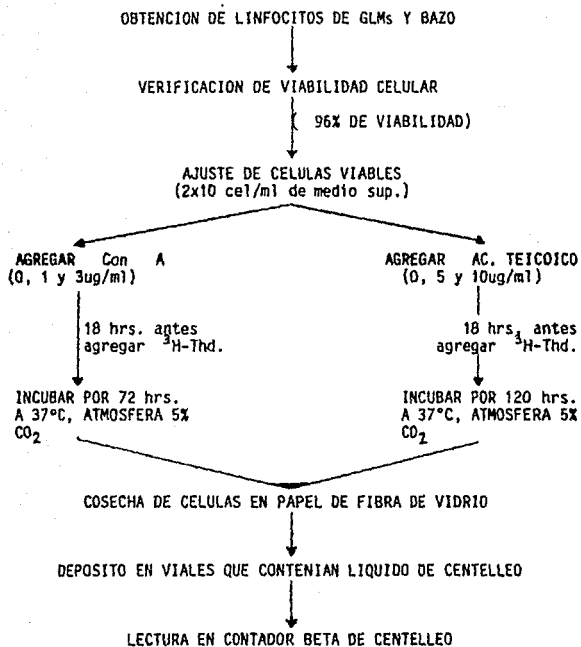
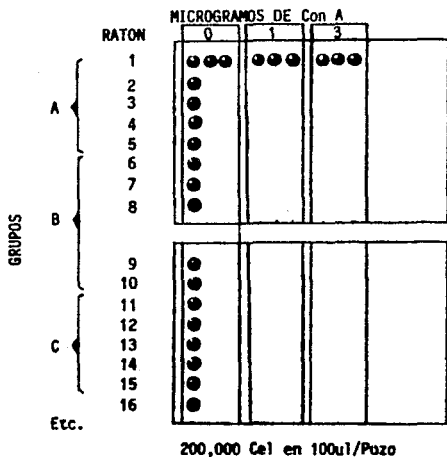


FIG. 3.- ESQUEMATIZACION DE LA TECNICA DE TRANSFORMACION BLASTOIDE PARA LA PROLIFERACION DE LINFOCITOS CON CONCAVALINA A



INCUBAR
2 DIAS 6 HORAS



1 uCi DE
TIMIDINA TRITIADA



INCUBAR
18 HORAS

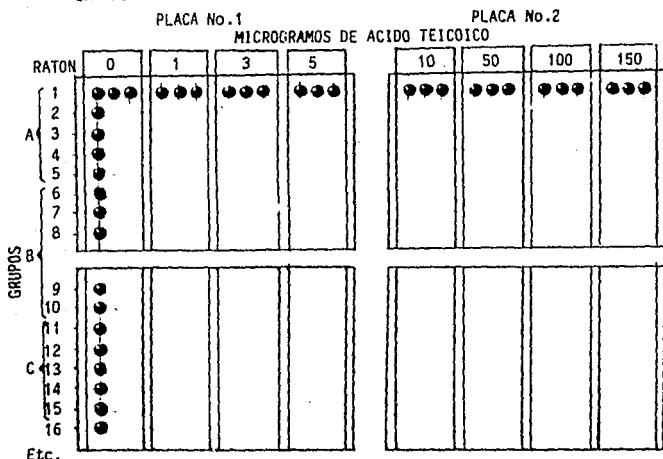


COSECHAR

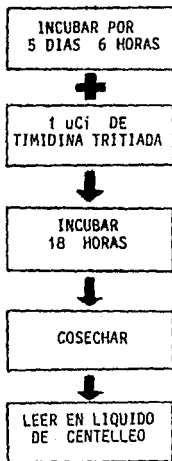


LEER EN LIQUIDO
DE CENTELLEO

FIG. 4.- ESQUEMATIZACION DE LA TECNICA DE TRANSFORMACION BLASTOIDE PARA LA PROLIFERACION DE LINFOCITOS CON ACIDO TEICOICO



200,000 Cel en 100 u1 / Pozo



3. RESULTADOS.

3.1 CARACTERIZACION DEL ACIDO TEICOICO.

Para verificar la identidad del ácido teicoico obtenido y empleado en este estudio, se realizó una prueba de inmunodifusión con un estandar comercial (SIGMA) (fig.5). La prueba de inmunodifusión (Ouchterlony) mostró la identidad antigénica de los dos antígenos que se confrontaron, el antígeno comercial y el que se obtuvo en este trabajo; para la realización de esta prueba se utilizó suero hiperinmune de conejo contra S. aureus.

3.2 ESTANDARIZACION DE LA PRUEBA DE TRANSFORMACION BLASTOIDE.

3.2.1 ESTABLECIMIENTO DE DOSIS OPTIMAS DE CONCAVALINA A.

Se establecieron las dosis óptimas para el micrométodo de transformación blastoide incorporando timidina tritlada ($^3\text{H-Thd}$) con linfocitos de bazo y GLMs, usándose como testigo positivo de proliferación linfocitaria inducida con Concanavalina A (Con A) con concentraciones de 1-50 ug/ml; se estableció la curva dosis respuesta a este mitógeno en linfocitos de ambos órganos de un grupo control de cinco ratones. Se observó que para linfocitos de bazo y GLMs las concentraciones 1 y 3 ug/ml de Con A dieron la máxima respuesta expresada en índices de estimulación (IE) (fig.6).

3.2.2 ESTABLECIMIENTO DE LAS DOSIS OPTIMAS DEL ANTIGENO.

Como se muestra en el cuadro 7 las concentraciones que alcanzaron las más altas CPM en cultivos de linfocitos de bazo provenientes de los ratones inmunizados fueron 5 y 10 ug/ml.

En el caso de los linfocitos provenientes de GLMs, la curva dosis-respuesta dió las más altas CPM con la concentración de 10 ug/ml, siendo significativamente superior en comparación con las demas concentraciones (cuadro #8).

Fue evidente que los linfocitos de GLMs arrojaron resultados mucho más elevados que los obtenidos con los linfocitos esplénicos. No obstante, en ambos casos los IE en los linfocitos de ratones inmunizados fueron consistentemente más altos que los obtenidos en animales no inmunizados (fig. 7 y 8).

Una vez determinadas las concentraciones óptimas de respuesta tanto para Con A (1 y 3 ug) como para ac. teicoico (5 y 10 ug) se procedió al desarrollo de la prueba de transformación blastoide para valorar la inmunidad celular en los diferentes esquemas de inmunización.

3.3 EFECTO DEL ACIDO TEICOCICO DE Staphylococcus aureus SOBRE LINFOCITOS DE BAZO Y GANGLIOS LINFATICOS MESENTERICOS.

3.3.1 OBSERVACIONES GENERALES

La mayoría de los esquemas de inmunización presentaron CPM más elevadas en comparación con el grupo de animales que no recibieron inmunización (GRUPO A), tanto en linfocitos de bazo como de GLMs, como se aprecia en los cuadros 9 y 10.

Se observaron CPM similares tanto para linfocitos de bazo como de GLMs en la mayoría de los esquemas de inmunización, exceptuando el esquema intramuscular-intramuscular (GRUPO B), en donde los linfocitos de ambos órganos provenientes de animales inmunizados obtuvieron los valores más elevados del estudio con diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.01$).

3.3.2 BAZO.

En linfocitos de bazo se observaron diferencias altamente significativas entre el esquema intramuscular-intramuscular (B) y los esquemas restantes ($P < 0.01$). Los esquemas intramuscular-oral (C), intramuscular -intraperitoneal (D), intramuscular-intracecal (E) y oral-intracecal (F) no arrojaron diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo de animales testigo (A) (cuadro #9).

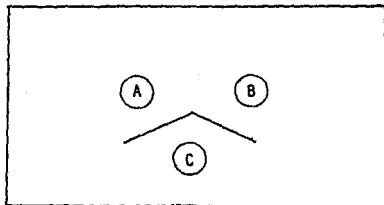
3.3.3 GANGLIOS LINFATICOS MESENTERICOS (GLMs).

Con linfocitos de GLMs se observó el mismo fenómeno que con linfocitos esplénicos, es decir, el único grupo que presentó diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) fue el grupo inmunizado por vía intramuscular-intramuscular (B) (cuadro #10).

3.3.4 COMPARACION ENTRTE LOS EFECTOS DE ACIDO TEICOICO Y CONCANAVALINA A SOBRE LINFOCITOS DE BAZO Y GANGLIOS LINFATICOS MESENTERICOS.

En los cuadros 9 y 10 se compara el efecto de ac. teicoico de la PC de S. aureus sobre linfocitos de ratones inmunizados, en relación al efecto de la dosis de mayor respuesta de Con A sobre linfocitos de ratones usados como controles positivos de proliferación linfocitaria. Estos resultados muestran que los linfocitos obtenidos tanto de bazo como de GLMs estimulados con Con A presentaron CPM significativamente más elevadas que los linfocitos estimulados con ac. teicoico, con excepción del esquema intramuscular-intramuscular (B).

FIG. 5.- ESQUEMATIZACION DE LA PRUEBA DE INMUNODIFUSION EN PLACA (OUCHTERLONY) PARA DEMOSTRAR LA IDENTIDAD ANTIGENICA DEL ACIDO TEICOICO OBTENIDO.



A= ANTIGENO OBTENIDO DE LA PARED CELULAR (PC) DE S.aureus.
(AC. TEICOICO).

B= ANTIGENO COMERCIAL (SIGMA).

C= SUERO HIPERINMUNE DE CONEJO CONTRA S.aureus.

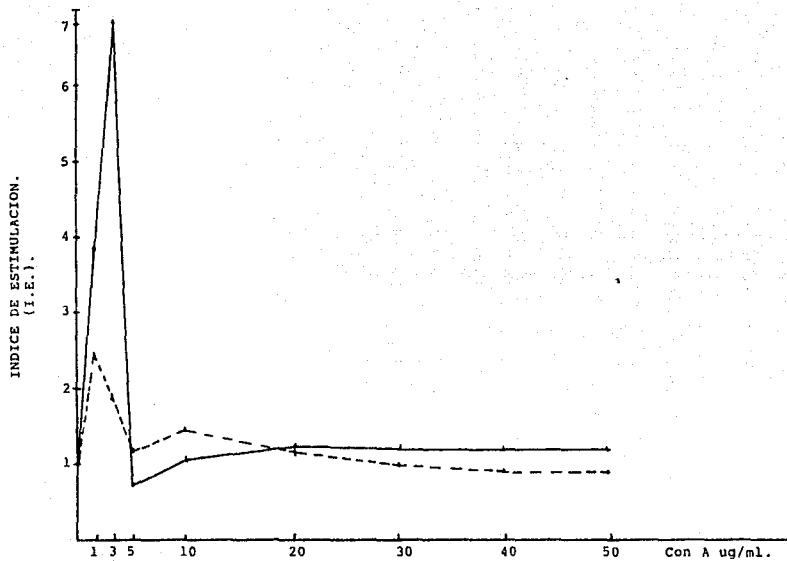


FIG. 6 -- Efecto de diferentes concentraciones de Concanavalina A sobre linfocitos -- de bazo y GLMs de ratones inmunizados.

---- BAZO
 — GLMs

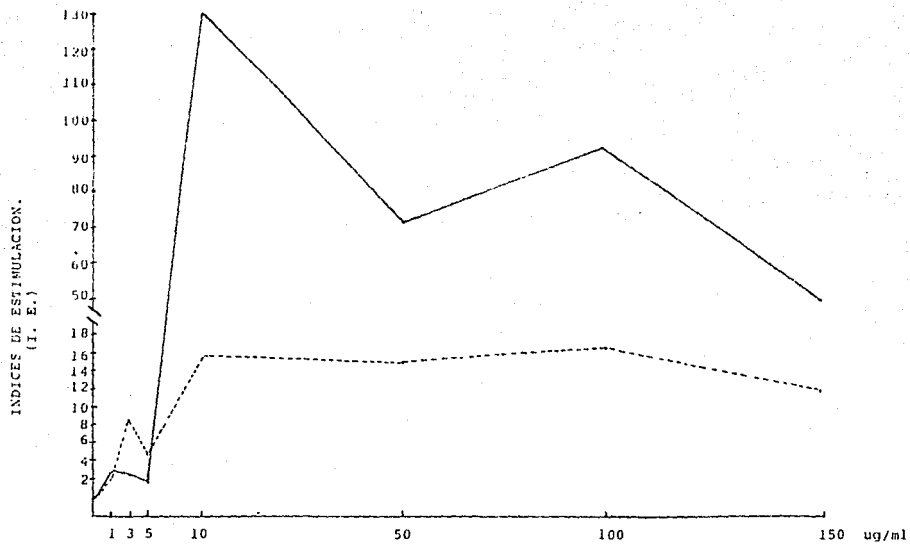


FIG. 7 -- Linfocitos de GLM estimulados con diferentes concentraciones de ácido teicoico por el método de transformación blastoide y expresado como I.E.

— GRUPO B: Animales inmunizados con suspensión bacteriana inactivada de S.aureus (150×10^6 UFC/0.1 ml.)
 - - - - GRUPO TESTIGO.

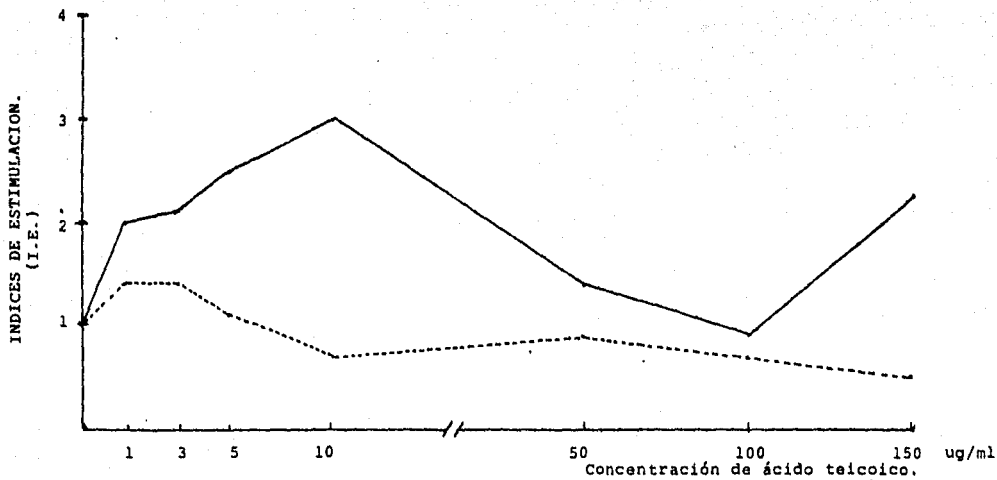


FIG. 8 .- Linfocitos de bazo estimulados con diferentes concentraciones de ácido teicoico por el método de transformación blastoide y expresado como I.E.

— GRUPO B: Animales inmunizados con suspensión bacteriana inactivada de S.aureus (150×10^6 UFC/0.1 ml.)

- - - GRUPO TESTIGO.

CUADRO # 7.- EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ACIDO TEICOICO DE Staphylococcus aureus SOBRE LINFOCITOS DE BAZO DE RATONES Mus musculus CD-1 INMUNIZADOS POR VIA INTRAMUSCULAR-INTRAMUSCULAR.

CONCENTRACION DE ACIDO TEICOICO (ug/ml)	CPM \bar{x}	D.E.
0	14838.0	4919.9
1	30427.3	10141.5
3	32258.8	8686.4
* 5	37112.3	16750.8
*10	42878.0	10799.0
50	21798.6	10635.2
100	14250.3	10681.5
150	35365.3	26636.2

PROMEDIO DE 4 RATONES POR CONCENTRACION DE ACIDO TEICOICO SE TRABAJARON MUESTRAS POR TRIPPLICADO PARA CADA RATON.

D.E.= DESVIACION ESTANDAR.

* = CONCENTRACIONES CON MAXIMA ESTIMULACION.

CUADRO # 8 .- EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ACIDO TEICOICO DE Staphylococcus aureus SOBRE LINFOCITOS DE GANGLIOS-LINFATICOS MESENERICOS DE RATONES Mus musculus CD-1 - INMUNIZADOS POR VIA INTRAMUSCULAR-INTRAMUSCULAR.

CONCENTRACION DE ACIDO TEICOICO (ug/ml)	CPM \bar{x}	D.E.
0	981.1	255.9
1	2619.1	744.0
3	2265.0	1588.0
5	1868.6	1046.5
* 10	127760.0	69870.2
50	72131.6	30118.2
100	95145.0	39010.0
150	49252.0	20235.0

PROMEDIO DE 4 RATONES POR CONCENTRACION DE ACIDO TEICOICO.
SE TRABAJARON MUESTRAS POR TRIPLICADO PARA CADA RATON.

D.E. = DESVIACION ESTANDAR.

* = CONCENTRACION CON MAXIMA ESTIMULACION.

CUADRO # 9.- EFECTO DE DOS CONCENTRACIONES DE ACIDO TEICOICO DE S. aureus SOBRE LINFOCITOS DE BAZO DE RATONES Mus musculus CD-1 INMUNIZADOS POR DIFERENTES VIAS, Y COMPARACION CON EL EFECTO DE CONCANAVALINA A SOBRE LOS MISMOS LINFOCITOS.
LOS RESULTADOS SE EXPRESAN EN CPM \bar{x} .

GRUPO	CONCENTRACION DE ACIDO TEICOICO (ug/ml)			Con A (ug/ml) 3
	0	5	10	
* A	339.6 ± 202.7 ^a	852.5 ± 421.5 ^a	863.0 ± 496.6 ^a	6545.6 ± 1137.8
B	14838.5 ± 4919.9 ^b	37112.3 ± 16750.8 ^b	42898.0 ± 10799.0 ^b	7368.8 ± 707.7
C	467.1 ± 222.5 ^a	1334.8 ± 948.1 ^a	709.8 ± 490.5 ^a	7126.6 ± 827.3
D	317.8 ± 174.6 ^a	771.2 ± 317.0 ^a	946.6 ± 259.0 ^a	6507.8 ± 1029.1
E	291.0 ± 121.0 ^a	1335.7 ± 682.3 ^a	1354.8 ± 710.0 ^a	7086.6 ± 1012.3
F	313.3 ± 151.1 ^a	1088.1 ± 441.6 ^a	1529.6 ± 755.0 ^a	6264.9 ± 790.6

a,b LITERALES DISTINTAS DENOTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS (P 0.01).

CPM \bar{x} DE 5 RATONES POR CONCENTRACION DE ACIDO TEICOICO.

LAS MUESTRAS SE TRABAJARON POR TRIPLICADO PARA CADA RATON.

* TESTIGO

CUADRO # 10.- EFECTO DE DOS CONCENTRACIONES DE ACIDO TEICOICO DE *S. aureus* SOBRE LINFOCITOS DE GANGLIOS LINFATICOS MESENERICOS DE RATONES *Mus musculus* INMUNIZADOS POR DIFERENTES RUTAS, Y COMPARACION CON EL EFECTO DE CONCAVALINA A SOBRE LOS MISMOS LINFOCITOS.
LOS RESULTADOS SE EXPRESAN EN CPM \bar{X} .

GRUPO	CONCENTRACION DE ACIDO TEICOICO (ug/ml)			Con A (ug/ml)
	0	5	10	1
* A	518.1 ± 179.3 ^a	932.0 ± 475.1 ^a	891.0 ± 383.6 ^a	4139.7 ± 611.7
B	981.1 ± 255.9 ^a	1868.6 ± 1046.5 ^b	127760.0 ± 69870.0 ^b	4224.8 ± 559.5
C	522.6 ± 131.2 ^a	1342.3 ± 616.0 ^a	1273.3 ± 471.3 ^a	3675.6 ± 411.9
D	336.5 ± 142.4 ^a	1166.5 ± 416.3 ^a	1331.1 ± 729.6 ^a	3597.4 ± 464.6
E	464.1 ± 245.2 ^a	367.2 ± 286.1 ^a	405.8 ± 213.3 ^a	4330.9 ± 607.9
F	358.2 ± 248.2 ^a	308.1 ± 94.9 ^a	442.6 ± 153.1 ^a	3489.6 ± 399.7

^{a, b} LITERALES DISTINTAS DENOTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS (P 0.01).

CPM \bar{X} DE 5 RATONES POR CONCENTRACION DE ACIDO TEICOICO.

LAS MUESTRAS SE TRABAJARON POR TRIPPLICADO PARA CADA RATON.

* TESTIGO

DISCUSION

Con el propósito de evaluar la respuesta inmune celular (RIC) inducida por *S.aureus*, se inocularon ratones hembras gestantes con una suspensión de esta bacteria inactivada con formol por diferentes rutas.

La respuesta inducida por cada una de ellas fué valorada por medio de la prueba de transformación blastoide, empleandose linfocitos de bazo y de ganglios linfáticos mesentéricos como poblaciones representativas de inmunidad sistémica y local respectivamente.

Las vías de inoculación probadas incluyeron vías sistémicas convencionales como la intramuscular, y combinaciones de esta con otras rutas que han demostrado estar relacionadas con la respuesta inmune local, como son las vías oral, intraperitoneal e intracecal (4,9).

En ambas poblaciones celulares (linfocitos de bazo y GLMs), solo la vía intramuscular-intramuscular indujo una buena respuesta inmune celular. Este hallazgo es interesante, puesto que se ha comprobado que la inoculación por ejemplo oral, que es una ruta local, resulta en la estimulación de inmunidad humoral en tracto respiratorio y en secreciones como la láctea(4,9,69).

Se ha aceptado que el sistema inmune secretor puede ser estimulado y actuar independientemente del sistema inmune sistémico (9) por lo que al hacer una inmunización oral o intragástrica, pueden aumentar los anticuerpos en sitios distantes como las glándulas mamaria, saliva y lacrimal. Con respecto a esto se puede hacer notar que linfocitos generados en sitios mucosos en respuesta a estímulos locales, pueden circular a otros sitios mucosos pero no a tejidos sistémicos (53).

Se ha puesto de manifiesto que el intestino delgado tiene estrecha asociación con otras superficies mucosas, y que la forma de inducir una mayor inmunidad a nivel de ellas, es por la estimulación de tejido linfoide asociado a intestino (53). Este tejido está constituido fundamentalmente por las placas de Peyer, importantes en la generación de linfocitos productores de IgA, que pueden migrar hacia otros tejidos secretores (4,69).

La importancia de IgA en la respuesta inmune desarrollada en mucosas, se ha comprobado en diferentes investigaciones (9,11,48) donde dicha inmunoglobulina demuestra ser la de mayor producción en respuesta a diferentes estímulos antigénicos en diversas especies animales.

Las rutas de inoculación escogidas en este trabajo, con excepción de la ruta intramuscular-intramuscular, presentaron una baja respuesta inmune presumiblemente tanto celular como humoral, ya que la prueba de transformación blastoide no diferencia células T de células B (44).

El alto índice de respuesta encontrado en este estudio por la vía intramuscular-intramuscular puede deberse en parte a que este grupo experimental fué el único que recibió dos inoculaciones por la misma vía (sistémica), probablemente aumentando así la magnitud de una respuesta secundaria a diferencia de las rutas restantes de inoculación (intramuscular-oral, intramuscular-intracelal, intramuscular-intraperitoneal) en las cuales se combinaron inmunizaciones sistémicas y locales.

Se ha comprobado que al estimularse el sistema inmune por vacunación, este es capaz de producir una respuesta de memoria, sin embargo se ha discutido la importancia en el tiempo de duración de este tipo de respuesta (Dayton, Small, Chanock, Kaufman y Tomasi, 1975). Por otro lado Pierce y Reynolds (1975) concluyeron en sus estudios de lavados yeyunales de perros inmunizados, que existe una rápida pero breve respuesta secundaria a antígenos inoculados localmente (4).

Por otra parte debe considerarse que la falta de respuesta inmune también pudiera deberse a que se inmunizó con la bacteria completa, pero solo se usó in vitro el ácido teicoico como antígeno, por lo cual cabría la posibilidad de que existiese una respuesta inmune a otros componentes bacterianos no probados en este estudio. También es importante resaltar que la disminuida respuesta obtenida de los linfocitos de animales sensibilizados previamente por inmunización con S.aureus muerto tanto de bazo como de GLMs, sugiere que el antígeno utilizado en la prueba de transformación blastoide (ácido teicoico) no tiene capacidad mitogénica (ver cuadro/9y10), corroborándose así los resultados

obtenidos por otros investigadores (19,44) tanto en infección natural como en experimental.

Vacunas contra S.aureus en distintas especies han sido evaluadas en cuanto a concentraciones específicas de anticuerpos en sangre y leche; poca atención ha sido enfocada sobre la respuesta inmune celular a estimulación antigénica. El fenómeno de inmunidad celular juega un importante papel en la patogénesis de la infección causada por S.aureus. Resultados en diferentes estudios indican que esta bacteria no es un verdadero parásito intracelular facultativo aunque es capaz de vivir dentro de ciertos fagocitos (3). El tipo de inmunidad generada después de una infección crónica en ratones con S.aureus, se ha sugerido que incluye la producción de linfocinas elaboradas por linfocitos sensibilizados (3) con la subsecuente activación de macrófagos (3,29) y atracción de polimorfonucleares (29,39,44).

En lo referente a la inducción de inmunidad celular por diferentes antígenos de S.aureus, se ha encontrado que con la estimulación antigénica sistémica se generan células linfoides sensibilizadas en tejido mamario (39). Se sugiere que la presencia de linfocitos sensibilizados por inoculación intramuscular pueden ser capaces de atraer polimorfonucleares probablemente por la inducción de linfocinas como se vió en experimentos realizados en vacas inoculadas por esta ruta, las cuales respondieron a un desafío intramamario, existiendo un gran aumento de polimorfonucleares, en comparación con vacas no sensibilizadas (44).

Diversos investigadores han dado importancia al número de inoculaciones y vías utilizadas con respecto al enriquecimiento de la respuesta inmune celular. Experimentos realizados en glándula mamaria denotan que existe una leucocitosis relativamente escasa a una primera inyección con pared celular y S.aureus muerto, pero que durante la segunda inyección se mejora grandemente el reclutamiento de leucocitos en una clásica respuesta inmune mediada por células (57); de forma semejante se ha encontrado que después de una inmunización intramamaria con S.aureus muerto por calor, el contacto del antígeno con células linfoides inunocompetentes puede resultar en su sensibilización

(57), y que una subsecuente exposición podría llevar a una respuesta inmune celular incluyendo el desprendimiento de linfocinas, resultando en el enriquecimiento del reclutamiento, activación e inmovilización de células fagocíticas (39).

Otro aspecto de interés en la inducción de inmunidad celular por efecto de vacunación podría incluir el tipo de vacuna, sea viva o muerta. En este sentido, el presente estudio encuentra una disminuida respuesta en la mayoría de los esquemas de inoculación utilizando bacteria inactivada con formol. Targowski y Baerman (1975), han encontrado sin embargo que el grado de respuesta inmune es mejorado al utilizar en las inoculaciones S.aureus vivo observandose por ejemplo mayor actividad fagocítica sobre esta bacteria durante un desafío posterior, suponiéndose entonces que existe una respuesta inmune mediada por células .

Bajo estas observaciones se podría sugerir que una bacteria viva es mas inmunogénica que una muerta, por lo que en este caso S.aureus sería capaz de exponer todos sus antígenos estando vivo, mientras que inactivado solo expondría antígenos somáticos como ácido teicoico, proteína A y peptidoglican. Sin embargo para la utilización de la bacteria viva debe considerarse la formación de absceso en la zona de inóculo, con ello el riesgo de poner en peligro la vida de los animales experimentales, por lo que de esta forma sería necesario tener que utilizar una cepa atenuada para el ratón.

Es de interés hacer notar que para estudios posteriores se pueden utilizar mas de una inmunización por vía, para tratar de fortalecer la respuesta secundaria al antígeno inoculado. También podría ser útil emplear la ruta intramamaria como ruta adicional a las empleadas en este experimento, así como el desarrollo de dosis de reto o desafío que puedan comprobar en forma práctica la protección conferida por la inmunización.

Debido a la complejidad en el entendimiento de la interacción de factores inmunes que actúan contra S.aureus en relación a la mastitis bovina, y la forma de proveer protección suficiente contra este agente infeccioso en la glándula mamaria mediante algún método de inmunización, es indiscutible que la cantidad de experimentos es cuantioso, por lo cual la importancia de utilizar

modelos experimentales como el ratón, y el uso de técnicas de cultivo in vitro y pruebas como la transformación blastoide, cada vez adquieren mayor atención por diversos investigadores.

Con respecto al uso del ratón en esta investigación como un modelo experimental, se apoya en las ideas propuestas en otros estudios refiriéndose a este animal como un modelo adecuado para llevar a cabo estudios básicos y experimentales tratando de comprender el comportamiento de S.aureus y especialmente su relación con la mastitis (1,2,10,30).

CONCLUSIONES.

- 1.- SOLO EL ESQUEMA INTRAMUSCULAR-INTRAMUSCULAR (GRUPO B) INDUJO INMUNIDAD CELULAR SIGNIFICATIVA.
- 2.- NO HUBO DIFERENCIAS ESTADISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS EN EL COMPORTAMIENTO DE LINFOCITOS DE GANGLIOS LINFATICOS MESENTERICOS(GLMs) COMPARADOS CON LINFOCITOS ESPLENICOS.
- 3.- LOS ESQUEMAS DE INMUNIZACION NO AFECTARON LA CAPACIDAD DE LAS CELULAS LINFOIDES DE RATON DE SER ESTIMULADAS CON Concanavalina A (Con A).
- 4 - EL ACIDO TEICOICO DE Staphylococcus aureus NO MOSTRO ACTIVIDAD MITOGENICA Y PARECE SER UN EXCELENTE ANTIGENO PARA EVALUAR LA RESPUESTA INMUNE CELULAR CONTRA S.aureus.

APENDICE

1.- Alcohol etílico al 70%

Etanol	70 ml.
Agua destilada	cbp 100 ml.

2.- Agar sangre al 5%

Base agar sangre	40 gr
Agua destilada	cbp 1000 ml

Esterilizar a 121°C por 20 min., enfriar a 45-50°C y añadir 5-10% de sangre bovina desfibrinada estéril, homogeneizar y vaciar en cajas de Petri estériles.

3.- Acido clorhídrico 1N

Acido clorhídrico	8.23 ml
Agua destilada y desionizada	cbp 100 ml

4.- Hidróxido de sodio 1N

Hidróxido de sodio	1.0 gr
Agua destilada y desionizada	cbp 100 ml

5.- Amortiguador salino de fosfatos (PBS)

Cloruro de sodio	8.45 gr
Fosfato dibásico de potasio	3.13 gr
Fosfato monobásico de potasio	1.36 gr
Agua destilada y desionizada	cbp 1000 ml

Ajustar el pH con HCL 1N o con NaOH 1N, antes de aforar.
Distribuir en alícuotas y esterilizar a 15 lbs por 15 min.
Verificar esterilidad y almacenar a 4°C.

6.- Formol al 2%

Formaldehído	2 ml
Agua destilada	cbp 100 ml

7.- Acido tricloroacético al 5% (P/V)

Acido tricloroacético	5 gr
Agua destilada	cbp 100 ml

8.- Acido tricloroacético al 10% (P/V)

Acido tricloroacético	10 gr
Agua destilada	cbp 100 ml

9.- Agarosa al 1%

Agarosa (Bioxon)	1.0 gr
Solución salina isotónica	cbp 100 ml

10.-Solución salina isotónica al 0.85% (P/V)

Cloruro de sodio	8.5 gr
Agua destilada	cbp 1000 ml

11.-Albumina sérica bovina (ASB) al 0.1% (P/V)

ASB fracción V (SIGMA)	0.01 gr
Solución salina isotónica	cbp 10 ml

12.-Solución 1 (Lowry)

Carbonato de sodio al 2% en Hidróxido de sodio 0.1N

13.-Solución 2 (Lowry)

Sulfato de cobre pentahidratado al 1%	1 parte
Tartrato de sodio o potasio al 2%	1 parte

14.-Solución 3 (Lowry)

Solución 1	50 partes
Solución 2	1 parte

15.-Reactivo de fenol diluido

Disponible comercialmente como reactivo de fenol, de acuerdo a Folin-Ciocalteu. Es aproximadamente 2N en ácido y se titula con NaOH y fenoftaleina como indicador, para diluirlo a 1N para la prueba. La dilución es cercana a 1:2.

16.-Sulfato de bario

BaCl	1%
H ₂ SO ₄	1%

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

23.-Liquido de centelleo

POPOP	0.1 gr
PPO	5.0 gr
Tolueno	cbp 1000 ml

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Anderson, J.C. (1978) Absence of bacterial adherence in the establishment of experimental mastitis in mice. Vet. Pathol. 15:770-775.
- 2.- Anderson, J.C. (1987) Dissemination of staphylococci in mice with experimental mastitis. J. Dai. Res. 54:339-345.
- 3.- Baughn, R.E. (1975) Cell mediated immune phenomena induced by lymphokines from splenic lymphocytes of mice with chronic staphylococcal infection. Infec. and Immun. 11(2): 313-319.
- 4.- Bienenstock, J.; Befus, A.D. (1980) Mucosal immunology Immunology 41:249-264.
- 5.- Blomqvist, L.; Appelgren, L.E. (1987) Distribution of ³H-labeled staphylococcal alfa-toxin and a toxin fragment in mice. Infec. and Immun. 55(8):1906-1913.
- 6.- Campbell, D.H.; Garrey, J.S. (1970) Methods in immunology a laboratory text for introduction and research. Vol. 3 pp.435
- 7.- Cartwright, H.M. (1973) Laboratorio hematológico. Ed. Científico Médico. 4a Edición, Barcelona, España pp.31-63.
- 8.- Cason, J. (1987) Analysis of human lymphocyte transformation responses to graded doses of cell T mitogens by curve fitting. J. Immun. Met. 102:109-117.
- 9.- Challacombe, S.J. Cellular factors in the induction of mucosal immunity by oral immunization.
- 10.- Chandler, R.L. (1970) Experimental bacterial mastitis in the mouse. J. Med. Micro. 3:273-282.
- 11.- Chang, C.C.; Winter, A.J. et al (1981) Immune response in the bovine mammary gland after intestinal, local, and systemic immunization. Inf. and Immun. 31(2):650-659.
- 12.- Concha, C.; Morein, B. et al (1980) Characterization and response to mitogens of mammary lymphocytes from the bovine dry-period secretion. J. Dai. Res. 47:305-311
- 13.- Cowan, S.T.; Steel, K.J. (1974) Manual para la identificación de bacterias de importancia médica. cap.6 2a Ed. Editorial Continental, Mex.D.F. pp 79-84.

- 14.- Daniel, L. R.; Chew, B. P. (1986) Peripartum changes in phagocyte and lymphocyte function in dairy cows. Dai. Sci. Abs. pp166.
- 15.- Díaz, O.F. (1983) Estudios preliminares sobre la respuesta inmunológica en conejos con bacterias causantes de mastitis. Tesis Profesional UNAM.
- 16.- Díaz, O.F. (1989) Actividad mitogénica de diferentes fracciones proteicas de *Entamoeba histolytica* cepa HM-1/MS sobre linfocitos de ganglios linfáticos mesentéricos y bazo de ratones BALB/c. Tesis Maestría. Fac. de Med. UNAM.
- 17.- DIFCO LABORATORIES (1972). DIFCO Supplementary literature Detroit, Michigan. pp 229.
- 18.- Ekstedt, R.D. (1966) Studies on immunity to staphylococcal infection in mice. IV The role of specific and non-specific immunity. J. Inf. Dis. 116;514-522.
- 19.- Elson, C.O. (1979) T-cell regulation of murine IgA synthesis. J. Exp. Med. 149;632.
- 20.- Fudenberg, H. (1980) Inmunología Clínica 2a. Ed. Editorial El Manual Moderno, Mex. D.F.
- 21.- Gorrill, R.H. (1963) Staphylococcal infection in the mouse. I The effect of route of injection. Brit. J. Exp. Pathol. 44;404-415.
- 22.- Hudson, D.L. (1980) Practical Immunology. Techniques in cellular Immunology. cap. 10, Blackwell Publications. 2a. Ed. pp 258-302.
- 23.- Hume, D.A.; Weidemann, M.J. (1980) Mitogenic lymphocyte transformation. Elsevier/Nort Holland, Amsterdam pp 22.
- 24.- Jaramillo, M. L. (1987) Aislamiento y caracterización de micoplasmas de pulmones neumónicos en cabras. Tesis UNAM Licenciatura.
- 25.- Kowalski, J.J. (1970) Preparation of cell wall antigen of *Staphylococcus aureus*. Inf. Immun. pp 54-5
- 26.- Kristensen, F. (1982) The lymphocyte test in veterinary immunology. Vet. Immunol. Immunopath. pp 203.
- 27.- Larinkari, U.M. (1977) Teichoic acid antibody test. Arch. Intern. Med. 137;1522-1525.

- 28.- Larson, B.L.; Devery, J.E. (1980) Immunoglobulin production and transport by the mammary gland. J. Dai. Sci. 63; 665-671.
- 29.- Lascelles, A.K. (1979) The immune system of the ruminant mammary gland and its role in the control of the mastitis. J. Dai. Sci. 62; 154-160.
- 30.- Lee, J.C.; Betley, M.J. (1987) Virulence studies in mice of transposon induced mutants of Staphylococcus aureus differing in capsule size. J. Infect. Dis. 156(5); 741-750.
- 31.- Lowry, O.H. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193; 265-275.
- 32.- Mc Dowell, G.H.; Watson, D.L. (1974) Immunity to experimental staphylococcal mastitis: Comparison of local and systemic immunization. Aust. Vet. J. 50; 533-536.
- 33.- Mc Farland, J. (1957) The nefelometer: 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.
- 34.- Margini, A (1982) Inmunología e Inmunoquímica. cap. 24, Panamericana, 3a. Ed. Buenos Aires, Arg. pp 474-476.
- 35.- Montaraz, J.A. (1989) Apuntes de Inmunología Veterinaria FMVZ UNAM.
- 36.- Morilla, G.A. (1989) Inmunología Veterinaria. Diana, 1a. Ed. Mex. D.F.
- 37.- Meynell, G.G.; Meynell, E (1969) Bacteriología Exp. Teoría y Práctica. Omega, S.A. Barcelona, España. pp 19.
- 38.- Naiman, A. (1987) Introducción a la estadística. Edit. McGraw Hill, 3a ed., Barcelona, España. pp. 293-295.
- 39.- Nickerson, S.C. (1985) Immune mechanisms of the bovine udder: An overview. J.A.V.M.A 187(1); 41-45.
- 40.- Nonnecke, B.J.; Harp, J.A. (1985) Effect of chronic staphylococcal mastitis on mitogenic response of bovine lymphocytes. J. Dai. Sci. 68; 3323-3328.
- 41.- Nonnecke, B.J. (1986) In vitro effect of Staphylococcus aureus on lymphocyte (LC) function and viability. J. Dai. Sci. supl. 1 (69); 179.

- 42.- Norcross, N.L. (1971) Immune response in the mammary gland. Sixty sixth Annual Meeting of the American Dairy Science Association; Michigan State University; pp 1880-1885.
- 43.- Olsen, R.G.; Krakowka, E. (1983) Inmunología e inmunopatología de animales domésticos. El Manual Moderno 1a Ed. Mex.D.F.
- 44.- Ojo-Amaize, E.A; Guidry, A.J. (1987) In vitro sensitization and stimulation of bovine lymphocytes with encapsulated or nonencapsulated Smith strain of *Staphylococcus aureus*. Ame.Jou.Vet.Res. 48(10);1456-1460.
- 45.- Pankey, J.W.; Boddie, N.T. (1985) Evaluation of Protein A and a commercial bacterin as a vaccines against *Staphylococcus aureus* using mastitis experimental challenge. J.Dai.Sci. 68;726-731.
- 46.- Peralta, J.H. (1989) Actividad mitogénica de un filtrado de *Entamoeba histolytica* cepa HM1-IMSS sobre linfocitos de ganglios linfáticos mesentéricos y bazo de ratones BALB/c. Tesis Profesional; U.A. Chiapas.
- 47.- Pérez, D.M. (1982) Manual sobre ganado productor de leche. Ed.Diana.1a.Ed. Mex.D.F.
- 48.- Porter, P (1980) Inter-relationship between mucosal and systemic immunity determining the balance between damage and defense in the bovine gut in response to environmental antigens. 19th Ann.Meeting.NMC, Kentucky. 901-909.
- 49.- Postle, D.S. (1978) Induced staphylococcal infection in the bovine mammary gland.Ame.J.Vet.Res. 39(1);29.
- 50.- Salata, R.; Ravdin, J. (1985) N-Acetyl-D-Galactosamine-Inhibitible adherence lectin of *Entamoeba histolytica* II. Mitogenic activity for human lymphocytes. J.Inf. Dis. 151(5);816-822.
- 51.- Schwartz, A.; Sutton, S.L. (1981) Histamine inhibition of Concanavalina A (Con A) Induced supresor T cell activation Dellular Immunology 60; 426-439.
- 52.- Sheagren, J.N. (1981) Technical aspects of the *Staphylococcus aureus* teichoic acid antibody assay: gel diffusion and counterimmuno-electrophoretic assays, antigen preparation, antigen selection, concentrations effects and cross-reactions with other organisms.J. Clin.Microb. 13;293-300.
- 53.- Sheldrake, R.F.; Husband, A.J. (1985) Immune defenses at mucosal surfaces in ruminants. J.Dai.Res. 52;599-613.

- 54.- Slanetz, L.W.; Bartley, C.H. (1963) Vaccination of fairy cattle against staphylococcic mastitis. Ame.J.Vet.Res. 24;923-932.
- 55.- Stites, D.P. (1985) Metodos clínicos de laboratorio para la localización de la función celular. Inmunología básica y clínica. El Manual Moderno. 5a. Ed. Mex. D.F. pp 334-378.
- 56.- Sucharit, B ; Muhly, M (1985) Isolation and partial characterization of staphylococcal decomplementation antigen. Inf. and Imm. 47(1);41-47.
- 57.- Targowski, S.P. (1975) Leucocytic response of bovine mammary gland to injection of killed cells and cells walls of Staphylococcus aureus. Ame.J.Vet.Res. 36; 1561-1565.
- 58.- Targowski, S.P. (1983) Role of immune factors in protection of mammary gland. J.Dai.Sci. 66;1781-1789.
- 59.- Taubler, J.H. (1968) Staphylococcal delayed hypersensitivity in mice. I Induction and in vivo hypersensitivity. J.Immunol. 546-549.
- 60.- Timothy, J.N.; Bourne, J. (1977) The natural of the local immune system of the bovine mammary gland. J. Immunol. 118(2).
- 61.- Tuazon, C; Sheagren, J. (1976) Teichoic acid antibodies in the diagnosis of serious infections with Staphylococcus aureus. Ann.Int.Med. 84;543-546.
- 62.- Vives, E.J. (1985) Medicina Interna. cap.17 Vol.II Ed. Marín. Barcelona, España. pp 1145-1146.
- 63.- Whaithe, W.I.; Hirschhorn, K. (1978) Lymphocyte response to activators. Application of immunological methods. Weir, D.M. Vol. II Blackwell Scientifics Publications 3a. Ed. London, England. pp 26.
- 64.- Watson, D.L. (1980) Immunologically specific resistance to infection with particular reference to staphylococcal mastitis. The ruminant immune system. Butler, E.J. Plenum Press, N.Y. pp 570-590.
- 65.- Watson, D.L. (1981) Immunologically-Specific resistance to infections with particular reference to staphylococcal mastitis. CSIRO Division of Animal. Armindale. New South Wales 2350: Australia.
- 66.- Watson, D.L. (1982) Virulence os Staphylococcus aureus grown in vitro or in vivo. Res.Vet.Sci. 32;311-315.

- 67.- Watson, D.L. (1988) Vaccination against experimental staphylococcal mastitis in ewes. Res.Vet.Sci. 45; 16-21.
- 68.- Weir, D.M. (1978) Application of immunological methods. Vol. I y III Blackwell Scientific Publications. 3a Ed. London, England.
- 69.- Weiz-Carrington, P; Roux, M.E. et al (1979) Organ and isotype distribution of plasma cells producing specific antibody after oral immunization: evidence for a generalized secretory immune system. J.Immunol. 123(4) 1705-1707.
- 70.- West, T.E.; Burdash, N.M. (1983) Evaluation of a commercial counterimmunoelectrophoresis kit for detection of Staphylococcus aureus teichoic acid antibodies. J.Clin.Microb. 17(4); 567-570.
- 71.- Whitbread, T.J.; Rowan, T.G. (1986) Simple technique for examining lymphocyte blastogenesis whole blood cultures for neonatal calves. Res.Vet.Sci. 40;161-165.
- 72.- Woolcock, J.B. (1979) Bacterial infection and immunity in domestic animals. Cap. 2 Ed. Elsevier Scientific Publishing Company. pp 13-24..