



## CINÉTICA DE ANTICUERPOS SÉRICOS FRENTE A *S. aureus* Y *E. coli* EN VACAS VACUNADAS FRENTE A LA MASTITIS BOVINA, Y CORRELACIÓN CON EL NIVEL DE ESTOS ANTICUERPOS EN LECHE.

Casademunt, S<sup>1</sup>; Foix, A<sup>1</sup>; Lorenzo, P<sup>1</sup>; Tórtora, J.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorios Hipra, S.A. Avda. de la Selva, 135 - 17170 Amer (Girona) - España.

<sup>2</sup>Unidad Multidisciplinaria de Investigación en Salud Animal. Dpto. de Ciencias Biológicas de la FES Cuautitlán UNAM, campo 4, Cuautitlán Izcalli 54700, San Sebastián Xala. México.

### Introducción

Las infecciones intramamarias (IMI) causadas por *S. aureus* son a menudo subclínicas y representan una pérdida económica considerable, ya sea por el descarte de leche, por el incremento de células somáticas del tanque, o por el deshecho temprano de animales crónicamente infectados, que responden muy pobremente a cualquier terapia antibiótica.

Los resultados de vacunación con diferentes antígenos potenciales de *S. aureus* y diferentes adyuvantes han sido hasta el momento variables, tanto en infección experimental como en ensayos de campo (5). De estos antígenos, el exopolisacárido "slime", un complejo antigénico compuesto de proteínas y polisacáridos que forma una envoltura externa a la cápsula bacteriana y que se une débilmente a ésta, se ha demostrado tanto "in vitro" como "in vivo" (1) (4) como un factor de virulencia fuertemente implicado en la adhesión de la bacteria al epitelio glandular, con lo que la inducción de anticuerpos (Ac) anti-slime podría reducir la adherencia y consiguiente colonización y desarrollo de la IMI.

La mastitis coliforme, causada por bacterias Gram negativas, genera asimismo pérdidas remarcables, particularmente en rebaños de alto nivel sanitario y con bajos recuentos de células somáticas. Estas pérdidas se derivan de la pérdida de producción, coste del tratamiento, así como por el coste del reemplazo temprano de vacas que presentan la forma tóxica de este tipo de mastitis coliforme, la cual va ligada a una sintomatología hiperaguda y un pronóstico pobre, aún con una atención clínica intensa. Tanto experimentalmente como en campo se ha demostrado que la vacunación durante el secado con una cepa mutante, la *E. coli* J5, reduce la sintomatología clínica de vacas con mastitis por *E. coli* (3), así como incrementa el título de Ac frente a *E. coli* J5 (2) (3).

#### Los objetivos de este trabajo fueron:

- 1) Estudiar la seroconversión inducida con dos dosis de vacuna, frente a *S. aureus* y *E. coli*, administradas durante el periodo seco.
- 2) Evaluar si existe una correlación del nivel de Ac detectados en suero con el nivel de Ac hallado en leche individual.

### Material y métodos

#### Animales:

Se utilizaron 38 novillas gestantes de primer parto,

de 22 meses de edad, no vacunadas frente a *E. coli* ni *S. aureus* y seronegativas a Ac anti-slime de *S. aureus* y Ac anti-*E. coli* J5.

#### Tratamientos:

Se establecieron dos grupos de animales. En un primer grupo de 18 animales, sobre el que se estudió los Ac anti-slime de *S. aureus*, 9 novillas fueron vacunadas con 3 ml de vacuna y según el plan vacunal recomendado por el fabricante (Laboratorios Hipra, S.A.): Vacunación aproximadamente 45 días antes de la fecha prevista de parto (Día 0 del estudio) y revacunación 35 días después (10 días antes de la fecha prevista de parto). Dentro de este grupo de animales otras 9 novillas fueron inoculadas con placebo (grupo control) según el mismo programa vacunal. El placebo utilizado consistió en la inoculación de la misma dosis de una emulsión conteniendo la misma composición que la vacuna en cuanto a adyuvante y excipientes, mientras que los principios activos fueron sustituidos por un igual volumen de solución PBS. En un segundo grupo de animales sobre los que se estudió la seroconversión a *E. coli* J5, 9 novillas fueron vacunadas y revacunadas con una dosis de vacuna siguiendo el mismo plan vacunal que el otro grupo de animales, y 11 novillas recibieron el mismo volumen de placebo. La vacuna utilizada contiene bacteria inactivada de *S. aureus* (TC5, TC8) que expresa el exopolisacárido SAAC (Slime Associated Antigenic Complex), y *E. coli* J5, que es una cepa mutada carente de la cadena O-polisacárido del LPS bacteriano, y que por tanto expresa el antígeno core del LPS bacteriano, inmunogénico y muy conservado estructural y antigénicamente entre las bacterias Gram negativas.

#### Muestreo:

Se realizaron siete extracciones de sangre por vaca para la determinación de Ac anti-slime de *S. aureus* y anti-*E. coli*-J5. Estas extracciones se realizaron los días -45, 0, 14, 35, 49, 69 y 73 para el grupo *S. aureus*, y los días -34, 0, 14, 35, 49, 55, 59 para el grupo *E. coli*, siendo el día 0 el día de la primera vacunación. Los días de extracción fueron distintos para cada grupo, dependiendo de la fecha de parto de las vacas en estudio de infección experimental. El último día de extracción de cada grupo se tomó también muestra de leche individual por vaca, en pool de los cuatro cuartos, y se realizó así mismo determinación de Ac sobre leche.

#### Kits de ELISA:

Se utilizaron dos kits de ELISA indirecto para la valoración de la respuesta serológica anti-*E. coli* J5 y anti-slime de *S. aureus* (2). En el primero, las placas ELISA se tapizaron con una cepa de la bacteria entera e inactivada de *E. coli*



J5. En el segundo, las placas ELISA se tapizaron con un purificado del exopolisacárido SAAC. En sueros bovinos, el punto de corte se estableció en un valor IRPC=16,0 para Ac anti-*slime* de *S. aureus* e IRPC = 34,0 para anticuerpos anti-*E. coli* J5.

**Análisis estadístico:**

Se utilizaron estadísticos descriptivos (media e intervalo de confianza) y el Modelo de Análisis Factorial de Medidas Repetidas para analizar la respuesta serológica dentro del mismo grupo y entre grupos. La correlación entre la respuesta serológica en sangre y en leche se estudió mediante regresión lineal y coeficiente lineal de Pearson. Se utilizó el 95% bilateral (dos colas) como nivel de confianza. Los programas Microsoft Excel 2000 y SPSS 11.5 se utilizaron como soporte informático para los cálculos y gráficos.

**Resultados**

La respuesta de Ac en suero se determinó en siete días diferentes durante el estudio.

Tabla 1. Promedio de grupo de la respuesta de anticuerpos anti-*slime* de *S. aureus* (IRPC/ELISA) a días post-vacunación en sangre

Día post-vacunación	-45	0	+14	+35	+49	+69	+73
Grupo vacunado	5,5	2,9	17,6	13,6	38,1	36,5	35,8
Grupo no vacunado	7,1	5,6	7,0	7,6	6,4	6,7	7,7

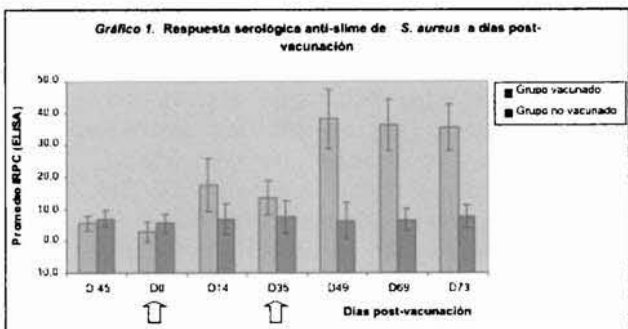
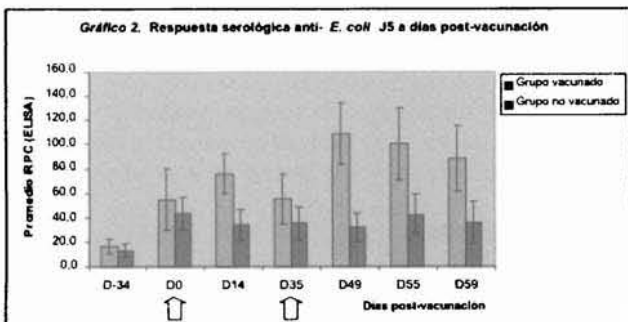


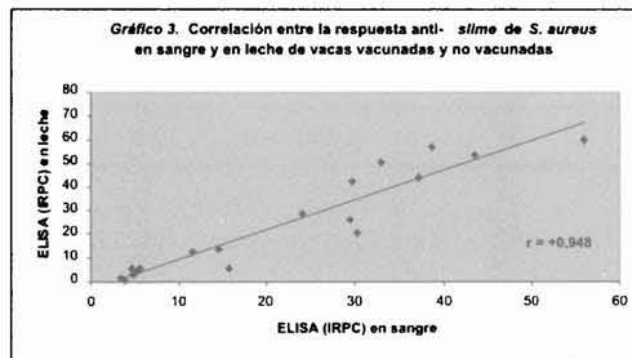
Tabla 2. Promedio de grupo de la respuesta de anticuerpos anti-*E. coli* J5 (IRPC/ELISA) a días post-vacunación en sangre

Día post-vacunación	-34	0	+14	+35	+49	+55	+59
Grupos no vacunados	13,4	43,2	33,9	35,3	31,8	42,5	35,9
Grupo vacunado	16,7	54,9	76,1	55,7	109,3	100,5	88,1

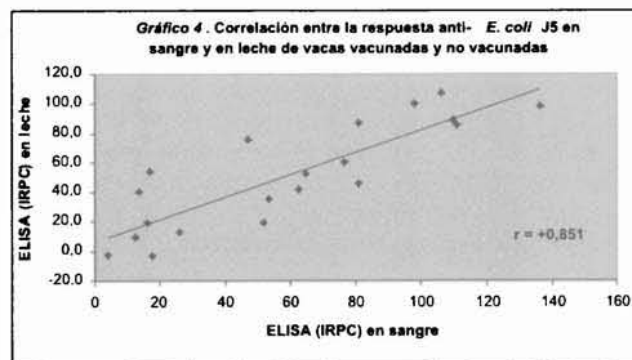


Flechas: Indican los días de vacunación. Barras de error:: Corresponden al intervalo de confianza del 95%

El día del último muestreo (día 73 para *S. aureus*, día 59 para *E. coli*) se determinó el título de Ac en suero y también en leche (pool de 4 cuartos) de cada vaca individual.



coeficiente de correlación (r) = +0,948  
n = 18 (9 vacunados + 9 no vacunados)  
p = 2,30x10<sup>-9</sup>



coeficiente de correlación (r) = +0,851  
n = 20 (9 vacunados + 11 no vacunados)  
p = 1,96x10<sup>-6</sup>

**Discusión**

El seguimiento de la seroconversión frente a *slime* de *S. aureus* mostró unas diferencias significativas estadísticamente (p<0,05) entre el grupo vacunado y el no vacunado ya en el día 14 (una sola dosis de vacuna administrada), y se mantuvieron significativas desde el día 49 en adelante. De acuerdo al punto de corte del ELISA anti-*slime* de *S. aureus* (IRPC > 16) el grupo vacunado se mantuvo en resultado positivo una vez se completó el curso vacunal de dos administraciones, es decir, a partir del día 49. Durante todo el ensayo el grupo control se mantuvo en la negatividad (IRPC<16). Después del parto de la totalidad de las vacas (día 50 post-vacunación), se realizó la determinación de Ac en leche individual (día 73 post-vacunación). Ese mismo día, y tras la toma de muestras de suero y leche previstas en este estudio, se sometió a los animales a una infección experimental. El gráfico 3 mues-



tra una alta correlación positiva ( $r = +0,948$ ), y altamente significativa ( $p=5,5 \times 10^{-9}$ ), de la respuesta en Ac anti-slime de *S. aureus*, medidos en IRPC, sobre suero y leche individuales, de las 18 vacas a día 73. La recta de regresión presenta un coeficiente de correlación ( $r$ ) positivo y muy cercano a 1, lo cual es indicativo de una alta correlación del título de Ac entre suero y leche. Respecto a la seroconversión frente a *E. coli* J5, las diferencias entre grupos resultaron estadísticamente significativas en los días 14, 49, 55, 59 ( $p < 0,05$ ). Así, una sola dosis de vacuna fue suficiente para generar un incremento significativo de Ac (d14) con respecto al grupo control, así como lo fue el programa vacunal completo de dos dosis (d49, 55, 59). En este grupo de animales, cerca de la mitad de las vacas del grupo control no vacunado mostraron títulos de *E. coli* J5 dentro de la positividad en algún momento del ensayo. Esto es debido a la reacción cruzada que pueden mostrar otras bacterias Gram negativas, generalmente ubicuas e inevitables, con el antígeno capsular *core* del kit de ELISA utilizado. Una vez hubieron parido todas las vacas, la respuesta serológica en leche del último día del ensayo (d59) resultó también significativamente mayor en el grupo vacunado ( $p=0,0311$ ) que en el no vacunado. Se estableció una alta correlación positiva (coeficiente de correlación  $r = +0,851$ ) y altamente significativa ( $p= 1,96 \times 10^{-6}$ ) entre la respuesta serológica anti-*E. coli* J5 en muestras de sangre y leche tomadas de todas las vacas del grupo *E. coli*, a día 59 post-vacunación.

Los resultados obtenidos en este estudio apoyan la hipótesis de que los Ac séricos se trasvasan a través de la mucosa a la cisterna de la glándula mamaria, contribuyendo por tanto a generar una inmunidad local y específica en la ubre.

---

---

## Conclusiones

---

---

La vacunación en el periodo seco con una vacuna combinada de mastitis, frente a *S. aureus* y *E. coli* J5, indujo una respuesta de Ac en suero superior en los dos grupos vacunados que en los dos grupos control que recibieron placebo. Efectivamente existe una correlación positiva y altamente significativa entre el nivel de Ac en suero y los Ac en leche, tanto para el slime de *S. aureus* como para *E. coli* J5.

---

---

## Bibliografía

---

---

- (1) Aguilar B., Amorena B. and Iturralde M. 2001. Effect of slime on adherence of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine and ovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 78: 183-191.
- (2) Casademunt, S., Prenafeta, A., Lorenzo, P., García, A., Tórtora, J. 2003. Estudio de la seroconversión frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* inducida con una vacuna combinada para la prevención de la mastitis bovina. V Congreso Nacional de control de mastitis, calidad de la leche y producción láctea. Mayo 2003, Aguascalientes, México.
- (3) Hogan, J.S., Weiss, W.P, Todhunter, D.A., Smith, K.L. and Schoenberger, P.S. 1992. Efficacy of an *Escherichia coli* J5 mastitis vaccine in an experimental challenge trial. *J Dairy Sci.*, 75: 415-422.
- (4) Sutra, L. and Poutrel, B., 1994. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.*, 40: 79-89