

A. 6955

1/ 2.3-I.6(043)  
AVI

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Veterinaria

Departamento de Patología Animal I

BIBLIOTECA UCM



5300909173

**ESTUDIO DE LA PATOGENIA DE LA  
ENFERMEDAD DE LOS ABSCESOS Y DE  
LA DEFICIENCIA RESPIRATORIA DE  
*Staphylococcus aureus*  
subsp. *anaerobius***



José Antonio Ruiz Santa Quiteria Serrano de la Cruz

Madrid, 1993

Colección Tesis Doctorales. N.º 15/93

© José Antonio Ruiz Santa Quiteria Serrano de la Cruz

Edita e imprime la Editorial de la Universidad  
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía.  
Escuela de Estomatología. Ciudad Universitaria.  
Madrid, 1993.  
Ricoh 3700  
Depósito Legal: M-1547-1993



La Tesis Doctoral de D. José Antonio Ruiz  
Santo. Quitaria. Secano de la Cruz.  
Titulada Estudio de la patogenia de la curiada de  
los abscesos y de la deficiencia respiratoria de staphylococci  
a. r. subsp. aureoflavus  
Director Dr. D. Ricardo de la Fuente Guillermo Juárez  
fue leída en la Facultad de ... Veterinaria .....

de la UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, el día .. 27 ..  
de ... Noviembre .. de 19 91 .., ante el tribunal

constituido por los siguientes Profesores:

PRESIDENTE Lucas Dominguez Rodriguez  
VOCAL Juan Ma. Flores Landeira  
VOCAL Santiago Vadillo Machote  
VOCAL Mariano Domingo Alvarez  
SECRETARIO Alfredo Salas Alondo

.....  
habiendo recibido la calificación de .....

..... Apto cum laude .....

Madrid, a 27 de Noviembre de 1991

EL SECRETARIO DEL TRIBUNAL.



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA.  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL I.

ESTUDIO DE LA PATOGENIA DE LA ENFERMEDAD DE LOS  
ABSCEOS Y DE LA DEFICIENCIA RESPIRATORIA DE  
*Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius*.

JOSE ANTONIO RUIZ SANTA QUITERIA SERRANO DE LA CRUZ.

MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE  
DOCTOR EN VETERINARIA.

Directores de la Tesis:

Dr. D. Ricardo de la Fuente López.

Dr. D. Guillermo Suárez Fernández.

Madrid, 1991



- Ves, Momo- le decía, por ejemplo- las cosas son así a veces  
tienes ante ti una calle larguísima. Te parece tan terriblemente larga, que  
mucho crees que podría acabarla.

Miró un rato en silencio a su alrededor: entonces siguió:

- Y entonces te empiezas a dar pasos, cada vez más pronto. Cada vez  
que levantas la vista, ves que la calle no se hace más corta. Y te esfuerzas  
más todavía, empiezas a tener miedo, al final estás en silencio. Y la calle  
sigue estando por delante. Así no se debe hacer.

Pensó durante un rato, entonces siguió hablando:

- Nunca se ha de pensar en toda la calle de una vez, ¿verdad?

Sólo hay que pensar en el paso siguiente, en la imperiosa siguiente, en la  
siguiente detrás. Nunca nada más que en el siguiente.

Volví a callar y reflexionar, antes de añadir:

- Entonces es divertido, eso es importante, porque entonces se hace  
bien la tarea. Y así ha de ser.

Después de una pausa y larga interrupción, siguió:

- De repente se da uno cuenta de que, paso a paso, se ha borrado  
toda la calle. Uno no se da cuenta cómo ha sido, y no se está en silencio.

Aumentó en silencio y dijo, poniendo pausa final

- Eso es importante-

Michael Ende

## Agradecimientos

En estas líneas me gustaría agradecer a todas y cada una de las personas del Departamento de Psicología Social de la Universidad Complutense de Madrid y especialmente a los profesores de la asignatura de Psicología Social, por haberme permitido acceder a esta asignatura y por haberme permitido acceder a esta asignatura y por haberme permitido acceder a esta asignatura.

Al profesor Dr. Ferrás de la Facultad de Psicología por haberme permitido acceder a esta asignatura y por haberme permitido acceder a esta asignatura y por haberme permitido acceder a esta asignatura.

Al profesor Dr. Guillermo Justo por su atención y apoyo, especialmente por haberme permitido acceder a esta asignatura y por haberme permitido acceder a esta asignatura.

A mis compañeros de la asignatura por su ayuda y apoyo, especialmente por haberme permitido acceder a esta asignatura y por haberme permitido acceder a esta asignatura.

A mis profesores de la asignatura por su atención y apoyo, especialmente por haberme permitido acceder a esta asignatura y por haberme permitido acceder a esta asignatura.

A mis profesores de la asignatura por su atención y apoyo, especialmente por haberme permitido acceder a esta asignatura y por haberme permitido acceder a esta asignatura.

A mis profesores de la asignatura por su atención y apoyo, especialmente por haberme permitido acceder a esta asignatura y por haberme permitido acceder a esta asignatura.

A mis profesores de la asignatura por su atención y apoyo, especialmente por haberme permitido acceder a esta asignatura y por haberme permitido acceder a esta asignatura.

A mis profesores de la asignatura por su atención y apoyo, especialmente por haberme permitido acceder a esta asignatura y por haberme permitido acceder a esta asignatura.

A mis profesores de la asignatura por su atención y apoyo, especialmente por haberme permitido acceder a esta asignatura y por haberme permitido acceder a esta asignatura.

A Francisco Javier Aguado con su valerosa colaboración, interés en la localización de nuevos locales de la Universidad de los estudios en la provincia de Zaragoza, y por los muchos y buenos momentos que pasamos juntos en estos últimos años de universidad.

Queremos, por fin, recordar a nuestros padres.

Al profesor Sr. Mariano Samartín y al Departamento de Anatomía y Anatomía Fisiológica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona por su hospitalidad, acogida y apoyo en el último histocatólogo.

Al Sr. Sr. Ferrnán Llobet de Llobet, y al Laboratorio Ferrnán de Llobet de la Universidad de Valencia, por la realización de los recuentos de células somáticas.

A Mariano Martín, con las horas empleadas en la corrección de este trabajo, y por las que ha tenido que prescindir de su tiempo.

A los Laboratorios Ayuso, con la financiación económica prestada para la realización de parte de este proyecto.

Al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, I<sup>o</sup> de la U. de Zaragoza y a la Universidad Complutense de Madrid, por permitirnos desarrollar en sus laboratorios una parte importante de este trabajo.

A mi familia, con su apoyo constante, incluso en estos últimos meses, por haberme permitido dedicarme a este trabajo sin preocuparme de nada más.

Por último me gustaría agradecer a Juanita su apoyo, estímulo constante y colaboración en todo momento, pero sobre todo el reconocimiento que hay que tener con respecto a ella, por haberme permitido dedicarme a este trabajo sin preocuparme de nada más.

---

# Indice.

CAPÍTULO I. INTRODUCCION.....	1
1. ENFERMEDAD DE LOS ABSCESOS DE LOS CORBEROS.....	1
1.1. Antecedentes históricos de la enfermedad.....	1
1.2. FAGOCITOSIS.....	15
1.2.1. Células con actividad fagocítica.....	15
1.2.1.1. Sistema mononuclear fagocítico.....	15
1.2.1.2. Sistema polinuclear fagocítico.....	16
1.2.2. Mecanismos de fagocitosis y digestión intracelular.....	18
1.2.2.1. Quimiotaxis.....	18
1.2.2.2. Oposonización.....	19
1.2.2.2.1. Oposonización por inmunoglobulinas.....	21
1.2.2.2.2. Oposonización por factores del complemento.....	22
1.2.2.3. Ingestión.....	21
1.2.2.4. Destrucción intracelular o actividad microbicida.....	21
1.2.2.4.1. Sistema citotóxico oxígeno dependiente.....	23
1.2.2.4.2. Sistema citotóxico de geneno independiente.....	23
1.2.2.5. Digestión celular.....	24
1.3. Mecanismos defensivos de los microorganismos frente a la acción de las células con actividad fagocitaria.....	26
1.2.4. Neutrófilos de la especie ovina.....	19
1.2.5. Métodos de estudio <i>in vitro</i> del fenómeno de fagocitosis.....	29
1.2.5.1. Métodos de estudio directos.....	29
1.2.5.2. Métodos de estudio indirectos.....	31
1.2.6. Métodos de estudio de la actividad microbicida.....	32
1.2.6.1. Métodos de evaluación global.....	34
1.2.6.2. Métodos de investigación de distintos factores específicos.....	32
1.2.6.2.1. Determinación de la actividad enzimática específica.....	32
1.2.6.2.2. Determinación de marcadores no enzimáticos.....	33
CAPÍTULO II. OBJETIVOS.....	3-
CAPÍTULO III. MATERIAL Y METODOS.....	13
III.1. ENSAYOS DE INDUCCIÓN DE MUTANTES CATALASA POSITIVOS A PARTIR DE CEPAS DE <i>S. Aureus</i> tipo ROBERGOLINA.....	14
111.1.1. Cepas empleadas.....	14
111.1.2. Inducción de mutaciones con rayos UV. de 2-5 nm de longitud de onda.....	16
111.1.3. Inducción de mutaciones con nitrosoguanidina.....	17
111.1.4. PURIFICACION DE CATALASA DE <i>S. Aureus</i> ATCC 12.600.....	19
111.1.1. Cultivo de las bacterias.....	19
111.1.2. Obtención de extractos celulares.....	40
111.1.3. Precipitación de los extractos crudos con una mezcla de etanol y cloroformo.....	40
111.1.4. Técnicas de purificación cromatográfica.....	41
111.1.5. Ensayo enzimático de la actividad catalasa.....	42
111.3. METODOS ELECTROFORÉTICOS.....	42
111.3.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de $\beta$ -caseína sulfato sódico SDS-PAGE.....	42
111.3.2. Tinciones de actividad enzimática en geles de poliacrilamida en presencia de SDS.....	43

III.4. ENSAYOS INMUNOLÓGICOS CON CATALASAS DE ESTAFILOCOCCOS.....	48
III.4.1. Cepas utilizadas.....	48
III.4.2. Obtención de sueros hiperinmunes y purificación de inmunoglobulinas frente a la catalasa de <i>S. aureus</i> ATCC 12.600.....	49
III.4.3. Electrotransferencia de proteínas desde geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) a soportes de nitrocelulosa y análisis inmunoenzimático ("Western blot" o "immunoblotting").....	51
III.4.3.1. Materiales.....	51
III.4.3.1.1. Soluciones y taponés.....	51
III.4.3.2. Métodos.....	53
III.4.3.2.1. Transferencia de proteínas a papel de nitrocelulosa.....	53
III.4.3.2.2. Inmunodetección.....	54
III.5. ESTUDIOS DE FAGOCITOSIS Y SUPERVIVENCIA INTRACELULAR.....	54
III.5.1. Materiales.....	54
III.5.1.1. Material biológico.....	54
III.5.1.2. Material de laboratorio.....	55
III.5.2. Métodos.....	56
III.5.2.1. Preparación de la suspensión bacteriana.....	56
III.5.2.2. Obtención de polimorfonucleares neutrófilos (PMN) de sangre circulante.....	57
III.5.2.3. Estudios de fagocitosis.....	58
III.5.2.4. Estudios de supervivencia intracelular.....	59
III.6. MÉTODOS ESTADÍSTICOS.....	60
III.7. ESTUDIOS EXPERIMENTALES EN ANIMALES.....	63
III.7.1. Inoculaciones experimentales en cadritos.....	63
III.7.2. Inoculaciones experimentales en cerdos.....	65
III.7.3. Inoculaciones experimentales en ovejas en lactación.....	66
III.8. PROCESADO DE LAS MUESTRAS PARA SU ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO.....	72
CAPITULO IV. RESULTADOS.....	76
IV.1. RESULTADOS DE LOS ENSAYOS DE INDUCCIÓN DE MUTANTES CATALASA POSITIVOS A PARTIR DE CEPAS DE <i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> .....	76
IV.1.1. Inducción de mutaciones con rayos U.V. de 2-5 nm. de longitud de onda.....	76
IV.1.2. Inducción de mutaciones con nitrosoguanidina.....	76
IV.2. RESULTADOS DE LA PURIFICACIÓN DE CATALASA DE <i>S. aureus</i> ATCC 12.600.....	76
IV.3. RESULTADOS DE LA DETECCIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE SDS.....	76
IV.4. RESULTADOS DE LOS ENSAYOS INMUNOLÓGICOS CON CATALASAS DE ESTAFILOCOCCOS.....	81
IV.4.1. Electrotransferencia de proteínas desde geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) a soportes de nitrocelulosa y análisis inmunoenzimático.....	81
IV.5. RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS DE FAGOCITOSIS Y SUPERVIVENCIA INTRACELULAR.....	82
IV.5.1. Análisis estadístico de los resultados de fagocitosis.....	82
IV.5.2. Análisis estadístico de los resultados de supervivencia intracelular.....	91
IV.5.3. Análisis del grado de correlación entre fagocitosis y supervivencia intracelular.....	100

iv. 6. RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS EXPERIMENTALES EN ANIMALES.....	104
iv. 6.1. Inoculaciones experimentales en cabritos.....	104
iv. 6.2. Inoculaciones experimentales en conejos.....	110
iv. 6.3. Inoculaciones experimentales en ovejas en lactación.....	114
CAPITULO V. DISCUSION.....	130
v.1. DEFICIENCIA RESPIRATORIA DE <i>S. <del>butyrlicus</del> <del>butyrlicus</del></i> .....	130
v.2. ESTUDIOS DE FAGOCITOSIS Y SUPERVIVENCIA INTRACELULAR.....	143
v.2.1. Discusión de la metodología empleada.....	144
v.2.2. Discusión de los resultados de fagocitosis y supervivencia intracelular.....	147
v.3. ESTUDIOS EXPERIMENTALES EN ANIMALES.....	163
v.3.1. Inoculaciones experimentales en conejos y cabritos.....	163
v.3.2. Inoculaciones experimentales en ovejas en lactación.....	170
CAPITULO VI. CONCLUSIONES.....	175
CAPITULO VII. RESUMEN (SUMMARY).....	177
CAPITULO VIII. BIBLIOGRAFIA.....	181



---

---

# **Introducción.**



## I.1. ENFERMEDAD DE LOS ABSCESOS DE LOS CORDEROS

La enfermedad de los abscesos es una linfadenitis específica del ganado ovino causada por Staphylococcus aureus subsp. anaerobius que afecta casi exclusivamente a los animales jóvenes hasta los 4 o 5 meses de edad y que se caracteriza clínicamente por la aparición de abscesos en los ganglios linfáticos superficiales.

La información bibliográfica acerca de esta enfermedad es escasa y procede, en su mayoría, de Francia, país en el que fue originalmente descrita y en el que de tarde en tarde ha sido diagnosticada por distintos autores (Morel, 1911; Aynaud, 1922, 1923, 1927, 1928; Carré, 1923a, 1923b, 1927; Cauchemez, 1924; Benito y Borral, 1957; Boukerrou *et al.*, 1985), y de España (Blanco Leizelier, 1960; De la Fuente y Suarez, 1985; De la Fuente *et al.*, 1985a). Fuera de estos países se han descrito focos en Kenia (Shirlaw y Ashford, 1962), Hungría (Bajmócy *et al.*, 1983, 1984), Iran (Hedjazi y Afnan, 1973; Afnan y Hedjazi, 1978), Italia (Valenti y Bieler, 1984) y, muy recientemente, en Sudán (El Sanousi *et al.*, 1989).

En los trabajos existentes acerca de esta enfermedad se advierten ciertas contradicciones tanto en la descripción del cuadro clínico como en el estudio del agente etiológico. Debido a estas contradicciones y a la escasa y, en muchas ocasiones, anticuada bibliografía, creemos conveniente llevar a cabo una detallada revisión de los antecedentes históricos de la misma.

### I.1.1. Antecedentes históricos de la enfermedad

Fue Morel, en 1911, el primer investigador que observó la presencia de cocos Gram positivos en el contenido purulento procedente de ovejas en las que se había diagnosticado linfadenitis caseosa. Según Morel los cocos eran el agente etiológico de la enfermedad, aun cuando no siempre conseguía aislar los microorganismos del contenido purulento. Este investigador consideró que las ovejas contraían la enfermedad por la mordedura de los perros de pastor, ya que entre los microorganismos presentes en la saliva de estos animales se observaban también unos cocos Gram positivos (Morel, 1911).

Once años más tarde Aynaud también observó en el examen directo del pus procedente de abscesos de corderos unos cocos Gram positivos, pero, al igual que Morel, no logró aislar los microorganismos, por lo que centró su investigación en el estudio histológico de las paredes de los abscesos, observando formaciones idénticas a los granos de la botriomicosis y describiendo el proceso como una botriomicosis que afectaba al ganado ovino. Aynaud, empleando dosis muy elevadas del contenido purulento de los abscesos, comprobó que estos cocos eran avirulentos para los animales de laboratorio (cobaya, conejo y ratón). Asimismo, el cobaya no era afectado por inoculación intraperitoneal, lo cual permitía diferenciar esta bacteria del bacilo de Preisz-Nocard (hoy denominado Corvnebacterium pseudotuberculosis) (Aynaud, 1922).

Carré, en 1923, fue el primer investigador que consiguió cultivar el microorganismo a partir de muestras de contenido purulento procedentes de abscesos subcutáneos de corderos empleando un medio líquido suplementado con suero de caballo. Carré encontró dificultades para obtener cultivos en medio sólido y señaló que las características culturales de todas las cepas estudiadas eran constantes y muy diferentes a las del estafilococo piógeno (Carré, 1923a).

Según este autor, la inoculación del pus de los abscesos naturales o de los cultivos del coco en los ovinos no provocaba más que una lesión mínima que curaba rápidamente, por lo que achacó el fuerte poder patógeno de los cocos a una asociación con el bacilo de Preisz-Nocard. En este trabajo Carré afirma que dicho microorganismo había alcanzado una gran difusión en Francia en aquellos años pero sin llegar a adquirir, ni con mucho, la importancia patógena del bacilo de Preisz-Nocard. Según Carré habría rebaños en los que los dos agentes coexistirían, pudiendo presentar un mismo absceso subcutáneo los dos microorganismos conjuntamente (Carré, 1923a).

En aquel mismo año de 1923 Aynaud aisló el coco Gram positivo de lesiones de bronconeumonía caseosa de ovejas. Los mejores resultados en el aislamiento los obtuvo empleando medios líquidos albuminosos o agar huevo. Aynaud definió a este coco como un microorganismo anaerobio, facultativamente aerobio y realizó la primera caracterización bioquímica de la bacteria confirmando que, además de la morfología, mantenía numerosos

caracteres comunes con los estafilococos, como son la licuefacción de la gelatina y la ausencia de producción de indol. Por ello lo consideró un estafilococo adaptado al organismo de la oveja y modificado por la simbiosis (Aynaud, 1923).

Por otra parte, Aynaud comprobó que los cultivos de las bacterias, que eran avirulentos para los animales de experimentación (Aynaud, 1922), provocaban en ovinos y caprinos la formación de abscesos de evolución lenta. El pus aislado de estos abscesos tenía las mismas características que en la enfermedad natural y las paredes de los abscesos presentaban el espesor y la estructura de las lesiones botriomicóticas (Aynaud, 1923).

Carré, en un nuevo trabajo, se mostró en desacuerdo con que este microorganismo fuese considerado semejante a los estafilococos, ya que sus características culturales y la necesidad de suplementar los medios de cultivo con sustancias albuminosas diferenciaban claramente el coco de Aynaud de los estafilococos. Será Carré quien por vez primera señale en este trabajo la influencia de la edad en la presentación de la enfermedad, indicando que era mucho más frecuente en los animales jóvenes que en los adultos. Según este investigador, los animales con la edad se muestran resistentes a la infección por el coco, llegando a desembarazarse de él si se infectan precozmente, mientras que, por contra, conservan toda su sensibilidad al bacilo de Preisz-Nocard en el curso de su existencia económica (Carré, 1923b).

En 1927 Carré denomina a este coco Gram positivo micrococo de Morel y lo considera un agente piógeno específico de los pequeños rumiantes que por sí mismo constituye una entidad microbiana definida (Carré, 1927).

En estos mismos años Aynaud introdujo la denominación de "enfermedad de los abscesos", puesto que para él el proceso se caracterizaba por la formación de abscesos en distintas partes del cuerpo sin que el estado general de los animales se viera afectado (Aynaud, 1927, 1928 y 1929). Según este investigador, no se trataría de una enfermedad nueva sino de un proceso, que probablemente había sido diagnosticado erróneamente como linfadenitis caseosa. Para Aynaud ambas enfermedades se diferenciarían por la localización de las lesiones: en la linfadenitis caseosa los abscesos se localizan en los ganglios linfáticos,

mientras que en la enfermedad de los abscesos aparecen la mayoría de las veces en el tejido celular subcutáneo y, en algunas ocasiones, entre los músculos. El estudio histológico realizado por este autor confirma que, aunque los abscesos pueden ocupar regiones ganglionares (punta de la espalda, región inguinal o ángulo de la mandíbula) e incluso aproximarse en su desarrollo a los ganglios linfáticos, su origen no es ganglionar. Otra diferencia con la linfadenitis caseosa sería, según Aynaüd, la ausencia de lesiones viscerales en la enfermedad de los abscesos (Aynaüd, 1927, 1928, 1929).

Este mismo autor da una descripción más precisa del agente causal definiéndolo como un microorganismo anaerobio facultativo que, entre otras propiedades, no produce hemolisinas cultivado en caldo suero y presenta un poder sacarolítico que hace imposible su diferenciación del estafilococo. La única diferencia entre estas bacterias y el estafilococo radicaría para Aynaüd en la dificultad de obtener el primer cultivo, propiedad común a muchos microorganismos a la salida del organismo (Aynaüd, 1923, 1928).

Aynaüd comprobó que la vía de inoculación más adecuada para reproducir los abscesos en los pequeños rumiantes era la intramuscular. Subcutáneamente las lesiones eran significativamente menores y la inoculación intravenosa, incluso a dosis muy altas, fracasaba la mayoría de las ocasiones. La vía oral no era efectiva en la reproducción experimental de la enfermedad (Aynaüd, 1928).

De sus extensos estudios anatomopatológicos y microbiológicos Aynaüd concluye que la enfermedad de los abscesos de los corderos equivale en los ovinos a la botriomicosis de los équidos, bóvidos y suidos producida por el estafilococo (Aynaüd, 1928).

Desde los trabajos de Aynaüd comentados anteriormente transcurrieron más de veinticinco años sin que apareciera referencia alguna en la literatura a la enfermedad de los abscesos hasta que en 1957 Benito y Borrel publicaron un nuevo estudio también en Francia. Estos autores centraron sus investigaciones en el agente etiológico y en la reproducción experimental de la enfermedad. Con respecto a la caracterización del agente etiológico aportan que produce hemolisinas y coagulasa,

si bien esta última en pequeña cantidad o de actividad débil, y lo consideran como un microorganismo aerobio facultativo que una vez sembrado se desarrolla normalmente incluso sobre medios sólidos. Benito y Borrel consideran a esta bacteria como una especie microbiana bien definida y suficientemente alejada de los estafilococos. La clasifican dentro del género Micrococcus y proponen la denominación de Micrococcus pyogenes ovis (Benito y Borrel, 1957).

Estos autores confirmaron la reproducción experimental de la enfermedad en el ganado ovino y caprino por todas las vías de inoculación ensayadas (subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intrapleural e intratesticular) a excepción de la intravenosa (Benito y Borrel, 1957).

Finalmente, Benito y Borrel estiman que la frecuencia de la enfermedad de los abscesos durante aquellos años era muy superior a la ocasionada por el Corynebacterium preisz-nocardi y demás agentes piógenos de los pequeños rumiantes (Benito y Borrel, 1957).

Un año más tarde (1958) Joubert publicó un estudio bacteriológico y sistemático del micrococo causante de la enfermedad de los abscesos, confirmando de nuevo que se trataba de un microorganismo aero-anaerobio. Según Joubert, esta bacteria no secretaba ninguna toxina (exotoxina, endotoxina, enterotoxina o hemolisina verdadera), no producía hialuronidasa, coagulasa, fibrinolisisina ni proteasas y era sensible a gran número de antibióticos y sulfamidas. Además, el microorganismo no podía clasificarse serológicamente entre los estreptococos y no era sensible a los bacteriófagos activos frente a los estafilococos. En función de los resultados obtenidos y dada la ausencia de descripción alguna de este microorganismo en los manuales de sistemática bacteriana, Joubert lo considera como una especie autónoma sin nombre aún y para la que propone la denominación de Micrococcus abscondens ovis (Morel 1911) (Joubert, 1958).

Sorprendentemente, desde este trabajo de Joubert no ha vuelto a aparecer en Francia referencia alguna sobre la enfermedad hasta 1985 en que Boukerrou et al. estudiaron nuevos aislamientos del microorganismo procedentes de ganado ovino. Aunque estos investigadores afirman que Micrococcus pyogenes ovis se asemeja bastante al estafilococo, consideran que los resulta-



dos de sus estudios bacteriológicos, serotípicos y lisotípicos son insuficientes para encuadrar taxonómicamente a la bacteria dentro del género Staphylococcus (Boukerrou *et al.*, 1985).

Volviendo al orden cronológico en las investigaciones realizadas sobre la enfermedad de los abscesos corresponde citar el trabajo publicado en 1960 por Blanco Loizelier, quien describió por primera vez la enfermedad en España, más concretamente en las provincias de Soria, Guadalajara, Zaragoza y Teruel.

Según el autor español, los abscesos afectan a los ganglios linfáticos superficiales y se localizan en un 90% de los casos en el ganglio intermaxilar o parotideo, entre un 5 y un 10% en el preescapular y en el resto de los casos en los ganglios linfáticos de distintas partes del cuerpo. En ocasiones pueden afectarse ganglios internos (mediastínicos y pelvianos) y en raras ocasiones los ganglios linfáticos de la región portal. La morbilidad del proceso en los brotes estudiados por Blanco Loizelier oscilaba entre un 5 y un 30%, llegando a alcanzar excepcionalmente el 60% (Blanco Loizelier, 1960).

El investigador español hace también referencia a la posible vía de entrada de la infección, mencionando las pequeñas heridas en la boca, los espacios linfáticos del anillo faríngeo e incluso la posibilidad de contagio a partir de la cicatriz umbilical. Asimismo, indica que es muy posible que estos microorganismos formen parte de la flora microbiana de la mama, de donde Blanco Loizelier lo aísla reiteradamente, por lo que debe considerarse la posibilidad de vehiculación de la infección a los corderos a través de la leche (Blanco Loizelier, 1960).

Una característica esencial del microorganismo causante del proceso, según Blanco Loizelier, es su lento desarrollo en los medios de cultivo, precisándose de 3 a 5 días para observar el crecimiento: en agar sangre aparecen un gran número de colonias diminutas al lado de otras de mayor tamaño. Además la bacteria produce hemólisis y coagula el plasma de conejo al cabo de 4 a 12 horas. Este investigador se muestra conforme con los estudios realizados por Benito y Borrel y acepta la denominación de Micrococcus pyocænes ovis.

Blanco Loizelier considera a la linfadenitis caseosa del ganado lanar no como una entidad clínica sino como un síndrome producido por diferentes especies de microorganismos.

Dos años más tarde (1962) en Kenia, Shirlaw y Ashford describieron el proceso en corderos y lo denominaron enfermedad de Morel. Al realizar la necropsia en 16 ovinos comprobaron que dos de ellos presentaban lesiones de tipo caseoso en los ganglios linfáticos preescapulares, de los cuales aislaron Corynebacterium ovis. Sin embargo, las lesiones halladas en la necropsia del resto de los animales no eran las típicas de la linfadenitis caseosa: cinco de los animales presentaban abscesos en las proximidades de los ganglios linfáticos de las regiones preescapular y femoral, presentando dichos ganglios una linfadenitis no supurativa; otros cuatro animales mostraban abscesos intramusculares en la proximidad del ganglio popliteo entre los músculos biceps femoral y semitendinoso, pero ni el ganglio ni los músculos aparecían directamente afectados; dos más presentaban granulomas intramamarios con fistulizaciones y abscesos situados en las regiones femoral y preescapular; por último uno de los animales mostraba abscesos en diferentes ganglios linfáticos superficiales (Shirlaw y Ashford, 1962).

En el estudio microbiológico del contenido purulento de estos abscesos Shirlaw y Ashford no obtuvieron crecimiento alguno en agar sangre tras incubar las placas durante 5 días en aerobiosis. Sin embargo, aparecían gran número de colonias al cabo de 48 horas en este mismo medio si la incubación se realizaba en una atmósfera con un 10% de CO<sub>2</sub>. Las bacterias aisladas eran cocos Gram positivos, catalasa negativos y producían β-hemolisina pero no coagulasa. Shirlaw y Ashford coinciden con los investigadores que consideran a este microorganismo como una especie autónoma, no descrita en los manuales de taxonomía bacteriana.

Estos mismos autores reprodujeron, como ya hicieran otros anteriormente, la enfermedad experimentalmente en el ganado ovino, e incluso demostraron que el conejo podía ser sensible a la bacteria por vía intradérmica (Shirlaw y Ashford, 1962).

Hedjazi y Afnan, en 1973, describieron en Irán la enfermedad de Morel en un rebaño de ovejas y cabras. Mientras que los corderos del rebaño estaban afectados en gran medida y las ovejas

en una proporción muy inferior, ninguno de los animales de la especie caprina contrajo la enfermedad. La localización preferente de los abscesos eran las regiones parotídea, submaxilar y testicular (Hedjazi y Afnan, 1973; Afnan y Hedjazi, 1978).

En 1983 Bajmócy *et al.* diagnostican la enfermedad en Hungría y hacen especial referencia a la gran morbilidad y facilidad de contagio del proceso: la infección que se inició en dos animales del rebaño afectaba al cabo de dos meses a 150 y en sólo cuatro meses a la totalidad del mismo. Asimismo, estos investigadores indican la existencia de recidivas de los abscesos en el mismo animal en el transcurso de seis a diez semanas. Todos los abscesos estudiados por Bajmócy *et al.* tenían una localización subcutánea (Bajmócy *et al.*, 1983; 1984).

Al año siguiente Valenti y Bieler describen por primera vez la presentación natural de la enfermedad de los abscesos en la especie caprina en Italia (Valenti y Bieler, 1984). Posteriormente, el proceso en cabras fue de nuevo diagnosticado en 1989 en Sudán por El Sanousi *et al.*, quienes encontraron que la enfermedad afectaba al 12% de los animales y que los abscesos se localizaban preferentemente en las regiones submandibular, parotídea y preescapular (El Sanousi *et al.*, 1989).

A partir de 1985 se produce un salto cualitativo muy importante en el conocimiento de la enfermedad de los abscesos y, sobre todo, de su agente etiológico a raíz de las investigaciones realizadas por De la Fuente *et al.* (De la Fuente y Suárez, 1985; De la Fuente *et al.*, 1985a, 1985b, 1985c). Este grupo investigador estudió diferentes brotes del proceso surgidos en distintas provincias de las Comunidades Autónomas de Castilla-León y de Castilla-La Mancha haciendo especial hincapié en la descripción del cuadro clínico, en la reproducción experimental de la enfermedad y en la caracterización del agente etiológico. A continuación exponemos los aspectos más relevantes de estas investigaciones.

Desde el punto de vista clínico los abscesos son prácticamente el único signo de la enfermedad y sólo en contadas ocasiones se aprecian otros síntomas, generalmente como consecuencia de un particular tamaño o localización de los abscesos, o bien debido a procesos secundarios. La localización más frecuente de los abscesos son los ganglios linfáticos de la



region mandibular (mandibulares, parotídeos y retrofaringeos laterales) seguidos en orden de importancia por los cervicales superficiales, subiliacos, poplíteos, mamarios y escrotales. En ningún caso encontraron estos autores abscesos en los ganglios internos ni en las vísceras (De la Fuente y Suárez, 1985; De la Fuente et al., 1985a).

Los abscesos, que se encuentran rodeados por una gruesa capsula de tejido conjuntivo, aumentan progresivamente de tamaño y terminan por fistulizar en ocasiones por más de un punto, liberando un contenido purulento de consistencia espesa y color verdoso. Las lesiones son muy crónicas y precisan de mucho tiempo para su completa regresión. Debido a las características de las lesiones, el tratamiento de la enfermedad es muy difícil y solo habría recurrir a la intervención quirúrgica, a pesar de sus importantes limitaciones (De la Fuente y Suárez, 1985; De la Fuente et al., 1985a).

Según De la Fuente et al. (1985a) la lesión macroscópica, independientemente de su localización, se caracteriza por la presencia de un ganglio hipertrofico al que se encuentra adosado un absceso formando todo una unidad. El grado de infartación ganglionar, el tamaño de la capsula y el del absceso dependerían de la antigüedad del proceso. Asimismo, indican que la lesión tendría un origen ganglionar, pues en lesiones recientes observaron pequeños focos purulentos en el interior de los ganglios linfáticos, de los que se aislaba el agente etiológico de esta enfermedad (De la Fuente y Suárez, 1985)

Histológicamente observaron una desorganización de los nodulos linfoides, en los que la estructura medular y capsular estaba muy indefinida. El tejido conjuntivo de la capsula ganglionar se continúa con un tejido de degradación rico en células plasmáticas, neovasos, macrófagos y, en su cara interna, ya en contacto con las zonas necróticas, se observan eosinófilos. En algunos casos comprobaban la existencia de células gigantes tipo Langhans y, en los casos avanzados, abundantes calcificaciones distróficas en el seno del foco ya necrosado. En muchas de las lesiones estudiadas comprobaron la existencia de unas formaciones nodulares que se correspondían con la imagen propia de los granulomas botriomicóticos. Del mismo modo, en los casos muy avanzados observaron una esclerosis ganglionar progresiva (De la Fuente y Suárez, 1985; De la Fuente et al., 1985a).

En los brotes estudiados por este grupo la prevalencia de la enfermedad en los animales jóvenes hasta los cinco o seis meses de edad oscilaba entre un 11 y un 80 por ciento. Estas prevalencias tan altas ocasionan importantes pérdidas económicas derivadas, sobre todo, del acusado retraso en el crecimiento que sufren los animales afectados. A ello habría que añadir los decomisos realizados en matadero, que pueden afectar a cuartos o a animales enteros en función de la localización de los abscesos (De la Fuente y Suárez, 1985; De la Fuente et al., 1985a).

De la Fuente et al. sugieren que la enfermedad de los abscesos había sido con frecuencia erróneamente diagnosticada en España como linfadenitis caseosa y describen los aspectos más importantes a considerar en el diagnóstico diferencial de ambos procesos. Desde el punto de vista clínico no existen diferencias importantes, pues ambos procesos son crónicos y se caracterizan por la presencia de abscesos purulentos en uno o varios ganglios linfáticos. No obstante, en la linfadenitis caseosa los abscesos pueden localizarse, además de en los ganglios linfáticos superficiales, en ganglios internos (fundamentalmente en los mediastínicos) y en las vísceras (sobre todo en el pulmón). En la enfermedad de los abscesos se localizarían exclusivamente en los ganglios linfáticos superficiales. Epidemiológicamente se diferencian en la edad de los animales afectados: la linfadenitis caseosa se presenta en animales de todas las edades, siendo frecuente en los adultos, mientras que la enfermedad de los abscesos se diagnostica casi exclusivamente en animales jóvenes, hasta los cuatro o cinco meses de edad, y su presencia en adultos puede calificarse de excepcional (De la Fuente et al., 1985b).

Estos mismos investigadores inocularon el microorganismo aislado de los casos de enfermedad en distintos animales de experimentación así como en ovinos. La bacteria no afectaba ni a los ratones ni a los cobayas, independientemente de la vía de inoculación empleada. Los conejos inoculados por vía intramuscular e intravenosa tampoco manifestaron reacción alguna y sólo uno de cuatro conejos inoculados por vía subcutánea desarrolló una pápula en el punto de inoculación que persistió hasta las 72 horas postinoculación (De la Fuente y Suárez, 1985).

Las inoculaciones experimentales en seis ovinos (dos corderos de un mes de edad, dos animales jóvenes de cuatro meses

y dos ovejas adultas de más de tres años) por vía subcutánea e intramuscular dieron como resultado general la formación de abscesos en los puntos de inoculación y la infartación más o menos intensa de los ganglios linfáticos regionales. Además, en la necropsia realizada a los dos meses y medio de la inoculación 5 de los animales presentaban abscesos distantes de los puntos de inoculación. En cuanto a la afección de los ganglios regionales hay que destacar que en la oveja de más de tres años de edad inoculada por vía subcutánea encontraron un absceso en el ganglio cervical superficial, que se correspondía perfectamente con la lesión característica de la enfermedad natural (De la Fuente y Suárez, 1985).

La respuesta a la inoculación intramuscular fue análoga en los tres animales inoculados: formación de abscesos entre los músculos de la pierna, en la proximidad del ganglio poplíteo y presencia de abscesos en el techo de la pelvis relacionados con los ganglios sacrales (De la Fuente y Suárez, 1985).

De la Fuente et al. (1985a) consideran más apropiada la denominación de enfermedad de los abscesos, utilizada pioneramente por Aynaud en los años veinte, que la de "enfermedad de Morel", introducida por Shirlaw y Ashford (1962) y posteriormente empleada por otros autores, ya que fueron Aynaud y Carré quienes primero contribuyeron al conocimiento de la enfermedad.

Con respecto a la caracterización y clasificación del agente etiológico, estos autores comprobaron, en primer lugar, que la bacteria crecía bien sobre medios sólidos suplementados con sangre, suero o yema de huevo siempre que la incubación se realizara en microaerobiosis o anaerobiosis pero no en aerobiosis. Las cepas aisladas eran cocos Gram positivos, catalasa negativos y bencidina negativos, esto es, carecían de la cadena aeróbica de citocromos. Además comprobaron que la coagulasa, la "DNA-sa" termoestable, la hialuronidasa y la producción de hemolisinas eran positivas, en tanto que el "clumping factor" y la producción de acetoina eran negativas. Todas las cepas que aislaron eran sensibles a la lisostafina (CMI inferior a 12,5  $\mu\text{g/ml}$ ) y resistentes a la lisozima (CMI superior a 1.000  $\mu\text{g/ml}$ ). Todas estas características, junto con el estudio de la composición de aminoácidos de la pared celular, indujeron a los investigadores a clasificar el microorganismo como S. aureus "deficiente respiratorio" por carecer de catalasa y citocromos,

descartando así otras clasificaciones anteriores que lo incluían en el género *Micrococcus*, e incluso la del propio manual de Bergey que en su octava edición lo incluía dentro del género *Micrococcus* (De la Fuente et al., 1955a; De la Fuente y Suarez, 1955).

En un trabajo posterior, con el objeto de conseguir una mejor caracterización del agente etiológico, realizaron estudios de la composición de bases del ADN, de las relaciones inmunológicas de la Lactato deshidrogenasa, de la composición química de la pared celular y de hibridación ADN-ADN que pusieron de manifiesto la estrecha relación existente entre estas estirpes deficientes respiratorias y la especie *Staphylococcus aureus*. Así, por ejemplo, la homología en los estudios de hibridación ADN-ADN entre dichas estirpes y *S. aureus* es superior al 80%. No obstante, teniendo en cuenta las peculiares características fenotípicas de esta bacteria y su importancia etiológica, propusieron su clasificación como una nueva subespecie de *S. aureus*, con la denominación de *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerophilus* (De la Fuente et al., 1955c). La bacteria con esta denominación aparece en la última edición del manual de Bergey (Nesbitt y Sneath, 1969).

Esta subespecie se diferencia del resto de los estafilococos por su crecimiento aeróbico débil e negativo en cultivo primario, por la ausencia de actividad catalasa y por la reacción negativa a la prueba de la hemidina. Otras características que permiten su diferenciación con *Staphylococcus aureus* aparecen reflejadas en la tabla I. Entre ellas pueden destacarse el "slumping factor", la fermentación del sacarato, la producción de acetoina, la reducción de nitrato y la producción de ácido a partir de distintos azúcares (De la Fuente et al., 1955c).

Los trabajos posteriores de este grupo investigador se centraron en el estudio de la deficiencia respiratoria de la bacteria. La hipótesis inicial de su trabajo fue doble, ya que la carencia de catalasa y citocromos podía deberse bien a una deficiencia en la síntesis de las correspondientes apoenzimas o bien a una alteración en la síntesis de hemina, grupo prostético común a la catalasa y a los citocromos. Para realizar este estudio aislaron cultivos espontáneos aerotolerantes de *S. aureus* subsp. *anaerophilus* que tienen la capacidad de crecer aeróbicamente

Tabla I.1. Características diferenciales entre *S. aureus* subsp. *anaerobius* y *S. aureus* (de la Fuente *et al.*, 1985c).

Característica	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> ssp. <i>anaerobius</i>
Catalasa	+	-
Crecimiento aeróbico	+	d ó -
Coagulasa	+	+
Clumping factor	+	-
Termonucleasa	+	+
Hemólisis	+	+
Fermentación del manitol	+	-
Hialuronidasa	+	+
Voges Proskauer	+	-
Reducción de nitratos	+	-
Hidrólisis de Tween 80	v	-
Producción de pigmento	+	-
Fosfatasa	+	+
Maltosa	+	+
Galactosa	+	-
Manosa	+	-
Trehalosa	+	-

+: 90% de las cepas son positivas; -: 90% de las cepas son negativas; v: del 11 al 89% de las cepas son positivas; d: débil.

pero siguen siendo catalasa negativos. Como control emplearon la cepa tipo de S. aureus ATCC 12.600.

En su estudio sobre el metabolismo de las porfirinas, precursores de la síntesis del grupo hemo, comprobaron que esta subespecie de estafilococo acumulaba coproporfirina en el medio y uroporfirina en el interior de las células en cantidades ocho veces superior a las acumuladas por la cepa tipo de S. aureus crecida en idénticas condiciones anaeróbicas. Ninguna de las cepas empleadas acumulaban protoporfirina. Además, las células de S. aureus subsp. anaerobius acumulaban un pigmento de color violeta con intensa fluorescencia bajo la luz ultravioleta, que no aparecía en la cepa patrón. Por degradación con el ácido crómico comprobaron que tenía estructura pirrólica y por tanto derivaba del metabolismo de las porfirinas. Según estos autores, ambos hechos indican una alteración en el metabolismo de las porfirinas, si bien no pudieron establecer con seguridad si la alteración era primaria o secundaria, es decir, consecuencia de alguna otra (De la Fuente et al., 1986).

Un año más tarde comprobaron que estos mutantes aerotolerantes de Staphylococcus aureus subsp. anaerobius sintetizaban citocromos, lo que demostraba que eran capaces de sintetizar hemina. El modelo de citocromos era cualitativamente similar al de Staphylococcus aureus, pero probaron que sólo sintetizaban aproximadamente un 25% de los citocromos encontrados en la cepa control. Esta cantidad no se veía incrementada cuando el medio se suplementaba con hemina, lo que indicaba una síntesis limitada de los apoenzimas (De la Fuente et al., 1987a).

Asimismo, la composición de los otros constituyentes de la cadena respiratoria aeróbica, las menaquinonas (MK), era cualitativamente análoga en los mutantes aerotolerantes y en la cepa tipo de S. aureus: con menaquinonas de ocho unidades de isopreno como principal componente, niveles importantes de MK-7 y pequeñas cantidades de MK-6 y MK-9. Pero, cuantitativamente, los mutantes poseían sólo un 30% de las menaquinonas encontradas en la cepa patrón. Estos investigadores concluyeron que existía una buena correlación entre la deficiencia de los componentes de la cadena respiratoria aeróbica, cifrada entre una tercera y una cuarta parte de los de S. aureus, que podría deberse a la existencia de un mecanismo común en la regulación de la síntesis

de citocromos y menaquinonas en los estafilococos (De la Fuente et al., 1987a).

Para finalizar con el estudio de esta subespecie de S. aureus, investigaron la composicion de ácidos grasos en comparacion con la cepa tipo de S. aureus ATCC 12.600, no observando diferencias cualitativas importantes entre las dos bacterias. Por lo tanto, segun De la Fuente et al., la composicion de ácidos grasos no presenta ventajas sobre otros caracteres fenotipicos para la diferenciacion taxonomica de estas bacterias (De la Fuente et al., 1987b).

## I.2. FAGOCITOSIS.

La fagocitosis es uno de los mecanismos defensivos más importantes del organismo frente a los agentes patogenos, ya que no sólo actúa indiscriminadamente ante cualquier sustancia extraña, sino que también coopera de una forma eficaz en el procesado y la presentacion de los antigenos a los linfocitos T, siendo por tanto esencial su cooperacion en el desarrollo de la respuesta inmune especifica.

### I.2.1. CÉLULAS CON ACTIVIDAD FAGOCITICA.

Las celulas fagociticas "profesionales" por excelencia son los leucocitos, que pueden clasificarse en dos grandes grupos denominados sistema mononuclear fagocitico y sistema polinuclear fagocitario.

#### I.2.1.1. Sistema mononuclear fagocitico.

Este sistema incluye los monocitos de sangre circulante, así como los macrófagos fijos o inmóviles, también llamados histiocitos, y los libres o móviles presentes en los tejidos.

##### I.2.1.1.1. Monocitos:

Los monocitos representan una fase en la maduración de la célula mononuclear fagocitaria originada en la médula ósea. Esta célula pasa a la sangre donde permanece entre ocho y diez horas.



Los monocitos en el ganado ovino representan aproximadamente el 2,5% (1-4%) de los leucocitos presentes en sangre circulante (Jain, 1986).

#### 1.1.1.1. Macrófagos:

Una vez que los monocitos desaparecen de sangre circulante no son eliminados del organismo como células muertas o dañadas sino que penetran en los tejidos donde se transforman en macrófagos y pueden alcanzar una vida media de varios meses a años. Su denominación está en función del tejido en que se localizan. Cuando los monocitos penetran en los tejidos sufren una metamorfosis caracterizada por un rápido aumento de su tamaño acompañado de un incremento en la síntesis proteica y en el contenido lisosómico (Barret, 1988).

Los macrófagos son las células fagocíticas más activas y desempeñan una función imprescindible en el procesamiento y presentación de los antígenos a los linfocitos T.

#### 1.2.1.2. Sistema polimorfonuclear fagocitario.

Este sistema incluye tres tipos celulares denominados eosinófilos, basófilos y neutrófilos según su afinidad por los colorantes ácidos, básicos o por ninguno de ellos respectivamente.

#### 1.2.1.2.1. Eosinófilos:

Su citoplasma contiene granulos acidófilos y representan aproximadamente el 3% (2-10%) de los leucocitos presentes en sangre circulante del ganado ovino (Jain, 1986). Los granulos citoplasmáticos contienen fosfatasa ácida, peroxidasa, histamina, acetilcolinesterasa, ribonucleasa, deoxiribonucleasa y proteinasa. La acción fagocítica es mucho menor que la de los neutrófilos (Barret, 1988).

#### 1.2.1.2.2. Basófilos:

Representan aproximadamente el 0,5% (0-3%) de las células de la serie blanca en sangre circulante de los ovinos (Jain, 1986). Su citoplasma contiene unos granulos con afinidad por los



lorantes básicos. La membrana de estos gránulos es muy fina, tal forma que cuando se produce la granulolisis tiene lugar liberación a sangre circulante y a los tejidos adyacentes de potente anticoagulante como es la heparina y de un activo sodilatador como es la histamina, por lo que estarían relacionados con la hipersensibilidad mediada por las inmunoglobulinas de tipo E (IgE) (Roitt *et al.*, 1985; Barret, 1988).

#### I.2.1.2.3. Neutrófilos:

Suponen alrededor del 30% (10-50%) de los leucocitos del nado ovino en sangre circulante (Jain, 1986). Son células de da media corta. En sangre circulante oscila entre seis y siete ras y algunos días en los tejidos (Douglas, 1983). Su núcleo tá constituido por dos a cinco lobulaciones conectadas por dio de unos filamentos muy finos.

Cuando se tiñen los neutrófilos, su citoplasma presenta una loración gris-rosácea pálida con unas finas granulaciones fusas. En las células maduras pueden diferenciarse tres tipos granulos citoplasmáticos:

a) primarios, azurófilos o peroxidasa positivos. Son riables en su forma y tamaño dependiendo de la especie animal. contenido incluye sustancias microbicidas como la mieloperoxidasa y la lisozima, enzimas digestivos del tipo hidrolasas ácidas proteasas neutras (Goldstein, 1983), proteínas catiónicas y ras enzimas lisosómicos (Bertram, 1985).

b) secundarios, específicos o peroxidasa negativos. Son s pequeños y pleomórficos que los anteriores y contienen factos antimicrobianos y enzimas microbicidas del tipo lisozima inopeptidasas, lactoferrina y fosfatasa alcalina (Bertram, 85).

c) Un tercer grupo sin denominación específica. La ferenciación entre los gránulos no es siempre neta y parece istir una tercera población que ya ha sido descrita en limorfnucleares neutrófilos (PMN) de hombre (Beard y Novikoff, 68), conejo (Spincer y Hardin, 1969), bóvido, caprido y óvido agiolini *et al.*, 1985), équido (Bertram y Coignoul, 1982) y rro (O'Donnell y Anderson, 1982). En el ganado vacuno se ha mostrado la presencia de este tercer tipo de gránulos conte-

niendo dos proteínas: una de elevado peso molecular que sería más efectiva frente a las bacterias Gram negativas y otra de bajo peso molecular que sería más efectiva frente a los microorganismos Gram positivos. Además de este potente mecanismo oxígeno independiente estos gránulos contendrían lactoferrina pero carecerían de peroxidasa, hidrolasas lisosómicas y metaloproteasas (Gennaro et al. 1983a; 1983b).

En la membrana celular de los PMN se localizan los receptores para la fracción cristalizable (Fc) de las inmunoglobulinas y para el componente C3b del complemento activado. Estos receptores son de gran importancia en los fenómenos de opsonización como se expondrá más adelante (Berken y Benacerraf; 1966; Leijh et al., 1986).

Los neutrófilos desempeñan un papel muy importante en la respuesta inmune durante la infección debido a su capacidad de migrar al foco inflamatorio, de fagocitar, digerir y destruir las bacterias por la acción de productos tóxicos derivados del oxígeno y de liberar el contenido lisosómico de los gránulos citoplasmáticos.

### I.2.2. MECANISMOS DE FAGOCITOSIS Y DIGESTIÓN INTRACELULAR.

Para una mejor comprensión del proceso, la ingestión y destrucción de las células vivas por células con capacidad fagocítica puede dividirse en las siguientes fases: quimiotaxis o atracción, unión u opsonización, ingestión o fagocitosis propiamente dicha, destrucción intracelular y digestión.

#### I.2.2.1. Quimiotaxis.

El primer paso en el estudio de la fagocitosis es conocer como contactan la célula fagocítica y la partícula extraña. Esta fase requiere escasas aclaraciones si el agente patógeno penetra por vía sanguínea, pues el contacto con los PMN sería inmediato. De la misma forma, como la sangre irriga los órganos internos, los macrófagos fijados en los mismos tienen la oportunidad de contactar con estas partículas y fagocitarlas rápidamente.

Por otra parte, las células con capacidad fagocítica van a orientar sus movimientos hacia el foco de la infección bajo la

influencia de gradientes químicos externos, fenómeno que se denomina quimiotaxis. De esta forma, los fagocitos se polarizan y migran hacia la concentración más alta de la sustancia que los atrae, la cual recibe el nombre genérico de leucotaxina o quimiotaxina.

Una de estas quimiotaxinas es la generada por el sistema de complemento como resultado de la combinación de los antígenos con ciertos isotipos de IgG o IgM, las cuales activarían dicho sistema. La molécula quimiotáctica sería la fracción C5a, que ejerce su acción sobre los macrófagos, los eosinófilos, los basófilos y los neutrófilos. (Jensen et al., 1969; Snyderman et al., 1969; 1970).

Otras quimiotaxinas relevantes son las linfoquinas quimiotácticas (Cohen et al., 1979; Snyderman et al., 1972), los factores quimiotácticos producidos por los PMN (Spillberg et al., 1976), los factores contenidos en los mastocitos (Goetzl y Austen, 1975; Wasserman et al., 1977) y los productos derivados del metabolismo del ácido araquidónico, de los cuales el más potente es el leucotrieno B<sub>2</sub> (Ford-Hutchinson et al., 1980; Goetzl y Pickett, 1980; Palmer et al., 1980).

Asimismo, se han señalado numerosos productos bacterianos como factores quimiotácticos y todos ellos tienen como estructura común la secuencia de aminoácidos compuesta por formil-metionina-leucina-fenilalanina (Schiffmann et al., 1975). Los neutrófilos tienen receptores de superficie para esta secuencia y pueden responder quimiotácticamente a los polipéptidos sintéticos compuestos por formil-metionina-leucina-fenilalanina. Se han hallado receptores para dicha secuencia en los PMN del hombre (Aswanikumar et al., 1977), del caballo (Snyderman y Pike, 1980), de la rata (Marasco et al., 1983) y del cobayo (Snyderman y Fudman, 1980), pero no del cerdo (El Awar et al., 1990).

#### 1.2.2.2. Oponización.

La oponización es el proceso por el cual las bacterias u otras partículas reaccionan con ciertos factores del suero denominados opsoninas, las cuales pueden actuar después como enlaces entre los agentes patógenos opsonizados y los receptores específicos localizados en la superficie de los fagocitos (Griffin, 1977; Guckian et al., 1978; Leijh et al., 1986).

Asimismo, las opsoninas reducen la repulsión de cargas entre las bacterias y los neutrófilos (Goldstein, 1983). El fenómeno de la opsonización puede ocurrir por la actuación de inmunoglobulinas o de factores del complemento activado (Absolom, 1986b).

I.2.2.2.1. Opsonización por inmunoglobulinas. Las opsoninas más potentes son las subclases de inmunoglobulinas G del tipo IgG1 e IgG3, que se unen específicamente a los antígenos por su fracción Fab y exponen al exterior su fracción cristalizable o Fc. De esta forma los complejos antígeno-anticuerpo son fijados por los receptores para la fracción cristalizable de las inmunoglobulinas presentes en la membrana de los macrófagos, neutrófilos y eosinófilos (Guidry et al., 1980; Barret, 1988). Otros autores consideran que las IgM son también anticuerpos citofílicos por lo que también tendrían esta capacidad opsonizante (Griffin et al., 1975; Guidry et al., 1980; Absolom, 1986b; Leijh et al., 1986; Barret, 1988).

I.2.2.2.2. Opsonización por factores del complemento. En este caso la opsonización se produce previa activación del complemento por la unión al antígeno de las IgG1, IgG2, IgG3 o IgM (vía clásica) o por la activación del mismo por la vía alternativa. Una vez activado el complemento se libera al medio el factor C3b que se deposita directamente sobre los antígenos o sobre los complejos antígeno-IgM. Los nuevos complejos formados (antígeno-C3b o antígeno-IgM-C3b) serían atraídos por los receptores para C3b presentes en la membrana de los macrófagos y neutrófilos (Griffin et al., 1975; Roitt et al., 1985; Leijh et al., 1986; Barret, 1988).

En el suero también pueden existir otras sustancias con capacidad opsonizante como la fibronectina (Barret, 1988) y la  $\alpha_2$ -macroglobulina (Absolom, 1986b).

### I.2.2.3. Ingestión.

La ingestión o fagocitosis propiamente dicha es el mecanismo por el que la bacteria pasa al interior del fagocito mediante la formación de pseudópodos que la engloban. Este englobamiento se realiza de una forma progresiva y circular hasta conseguir la fusión de los extremos distales de los pseudópodos con la subsiguiente formación del fagosoma que, con la ayuda del sistema

de microtúbulos, se aleja de la superficie celular hacia el interior (Drutz y Mills, 1983; Leijh et al., 1986).

#### I.2.2.4. Destrucción intracelular o actividad microbicida.

La ingestión de las bacterias culmina con la fusión del fagosoma con los lisosomas presentes en el citoplasma de las células fagocíticas, dando lugar a la formación del fagolisosoma. La destrucción de los microorganismos sensibles está íntimamente asociada al proceso de degranulación, es decir, a la liberación del contenido de los gránulos en el interior del fagosoma, paso previo necesario para que tenga lugar la siguiente fase de la digestión (Bainton, 1973).

En general, la actividad antimicrobiana eficaz depende principalmente del sistema citotóxico oxígeno dependiente y de la coexistencia del sistema microbicida oxígeno independiente.

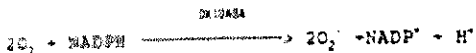
##### I.2.2.4.1. Sistema citotóxico oxígeno dependiente.

Los neutrófilos no activados emplean la glucólisis anaeróbica como principal fuente de producción de energía, por lo que transforman la glucosa en ácido láctico sin consumo de oxígeno.

Durante la ingestión de partículas y después de la misma se incrementa el consumo de oxígeno, produciéndose un cambio en la ruta metabólica de la glucosa hacia la vía hexosa monofosfato con el consiguiente incremento en la producción energética (Root y Stossel, 1974; Babior, 1978). Estos cambios se producen por la exposición de las células con actividad fagocítica a factores involucrados en procesos inflamatorios tales como los microorganismos opsonizados, el fragmento C5a del complemento, el leucotrieno B<sub>2</sub> (producido por los fagocitos estimulados) y los oligopéptidos de origen bacteriano entre otros (Babior, 1984).

La activación de esta vía metabólica tiene lugar unos segundos después de la estimulación y se caracteriza por un incremento brusco del consumo de oxígeno y por la producción de ion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), de radicales hidroxilo (OH<sup>-</sup>) y de otros compuestos, todos ellos altamente reactivos (Klebanoff, 1982; Karnovsky y Badwey, 1986).

La base bioquímica de este proceso reside en un sistema enzimático asociado a la membrana de los neutrófilos que se denomina oxidasa NADPH dependiente. Este sistema reduce el oxígeno molecular a radical superóxido por la adición de un electrón (Gatig y Leifer, 1986):



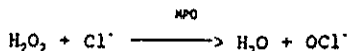
Esta reacción tiene lugar en la superficie del fagocito o sobre la superficie de la membrana invaginada dentro del fagosoma (Klebanoff, 1986). Basier *et al.* en 1973 fueron los primeros que propusieron que este radical superóxido, generado en la cadena respiratoria de los leucocitos durante la fagocitosis, era un agente bactericida (Basier *et al.*, 1973).

El anión superóxido, por sí mismo, no es muy tóxico pero es fácilmente convertible en agentes letales mas tóxicos, bien por desmutación espontánea o bien por acción enzimática. La superóxido dismutasa (SOD) es la enzima encargada de actuar sobre estos radicales superóxido y originar, a través de la adición de protones, peróxido de hidrógeno y oxígeno libre ( $O_2$ ):



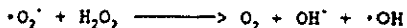
De esta forma todos los átomos del oxígeno tendrán sus orbitales completos (Barst, 1988). El oxígeno libre tiene el mismo número de electrones que el oxígeno molecular, pero sus electrones desapareados rotan en direcciones opuestas el uno del otro. Cuando este oxígeno libre recupera su estado normal provoca una explosión de luz (quimioluminiscencia) que puede ser detectada por contadores de centelleo durante el fenómeno de la fagocitosis. Iyer *et al.* en 1961 describieron por primera vez que parte del oxígeno consumido se transformaba en peróxido de hidrógeno y que este podría actuar como agente bactericida (Iyer *et al.*, 1961).

Cuando la mieloperoxidasa (MPO), presente en los granulos primarios de los neutrófilos, es liberada al fagosoma cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno a ion hipoclorito en presencia de iones cloruro según la reacción siguiente (Foote *et al.*, 1981):



La formación de hipoclorito por el sistema mieloperoxidasa podría conducir a la formación de cloraminas que oxidarían los grupos sulfhidrilo de algunas bacterias destruyéndolas (Thomas y Aune, 1978; Thomas, 1979). También pueden intervenir otros iones haluros como el I<sup>-</sup> o el Br<sup>-</sup> (Beaman y Beaman, 1984).

Otra de las formas tóxicas del oxígeno se produciría en el interior de los neutrófilos al reaccionar el peróxido de hidrógeno con radicales superóxido en presencia de hierro, dando lugar a oxígeno molecular (O<sub>2</sub>), iones hidroxilo (OH<sup>-</sup>) y radicales hidroxilo (·OH) según la reacción siguiente (Tauber y Babior, 1977; Rosen y Klebanoff, 1979):



El radical hidroxilo es el agente oxidante más potente producido por un sistema biológico.

La formación de productos tóxicos formados por el sistema citotóxico oxígeno dependiente se resumen en el diagrama I.1.

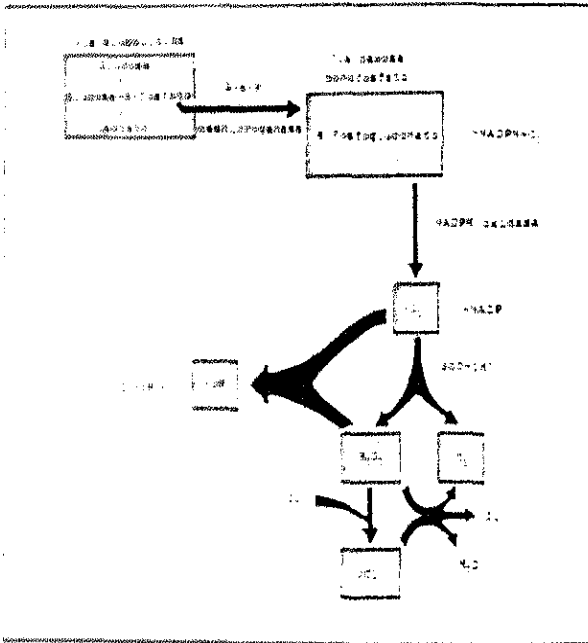
#### I.2.2.4.2. Sistema citotóxico oxígeno independiente:

La acumulación de ácido láctico y el descenso del pH hasta valores próximos a 4,5 en el interior del fagosoma crean unas condiciones bacteriostáticas, cuando no bactericidas (Drutz y Mills, 1983; Styrt y Klemperer, 1985; Barret, 1988).

El resto de las sustancias bactericidas del sistema citotóxico oxígeno independiente que han sido identificadas hasta ahora parecen preexistir en el fagocito antes de que se inicie el fenómeno de fagocitosis, ya que la mayoría de estas sustancias son proteínas (Elsbach y Weiss, 1981). Las principales proteínas de este sistema citotóxico aisladas de los gránulos citoplasmáticos de los neutrófilos son las siguientes:

a) Proteínas catiónicas, aisladas como un complejo de proteínas presentes en los monocitos y granulocitos. Las proteínas de elevado peso molecular inhiben la multiplicación e

Figura 1.1. Vías cíclicas del oxígeno producidas durante la fotosíntesis (tomado de Barret, 1988).





incrementan la permeabilidad de la membrana de Escherichia coli, Salmonella typhimurium y Pseudomonas aeruginosa pero no afectan a la mayoría de las bacterias Gram positivas. Por el contrario, las de bajo peso molecular inhiben la multiplicación de los estafilococos. Probablemente estas proteínas sean más activas cuando actúan conjuntamente con otros mecanismos antimicrobianos (Beaman y Beaman, 1984).

b) La lactoferrina, glicoproteína presente en los gránulos secundarios y que compete con las bacterias por el hierro (Wright, 1982; Beaman y Beaman, 1984).

c) La lisozima, presente tanto en los gránulos primarios como en los secundarios y que actúa sobre la unión glucosídica  $\beta$ -1-4 entre el ácido N-acetilmurámico y la N-acetilglucosamina del peptidoglicano de la pared celular de las bacterias. La acción bactericida de la lisozima por sí sola no está muy clara y se piensa más bien que podría actuar sobre bacterias debilitadas previamente por otros mecanismos. Este último sería el caso del Staphylococcus aureus, que es más sensible a la acción conjunta de la lisozima y las proteínas neutras después del tratamiento con penicilina (Beaman y Beaman, 1984).

#### I.2.2.5. Digestión celular.

Las sustancias extrañas no viables son rápidamente digeridas dentro del fagolisosoma mientras que los microorganismos son digeridos después de su muerte por la exposición a las formas tóxicas del oxígeno y a la acción del sistema citotóxico oxígeno independiente. Un gran número de microorganismos vivos son resistentes a las enzimas lisosómicas y, sólo cuando están muertos, son sensibles a ellas (Barret, 1988).

Los gránulos lisosómicos contienen un gran número de enzimas hidrolíticas activas frente a proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos, lípidos y otros biopolímeros. Entre estas enzimas podemos destacar las siguientes:  $\beta$ -acetilglucosamina hidrolasa, fosfatasa ácida, ribonucleasa ácida y desoxirribonucleasa, arilsulfatasa, catepsina, colagenasa, citocromo c reductasa, elastasa, esterasa,  $\beta$ -galactosidasa,  $\alpha$ -glucosidasa,  $\beta$ -glucuronidasa, hialuronidasa, lipasa, lisozima,  $\alpha$ -manosidasa y neuraminidasa. Mientras estas enzimas están digiriendo el contenido de los fagolisosomas, las células con actividad fagocitaria

regeneran sus lisozomas para proximos fenomenos de fagocitosis (Barrett, 1938).

### 1.2.3. MECANISMOS DEFENSIVOS DE LOS MICROORGANISMOS FRENTE A LA ACCIÓN DE LAS CELULAS CON ACTIVIDAD FAGOCITARIA.

Una vez que los agentes patogenos superan las barreras fisicas del organismo como la piel y las membranas mucosas se encuentran con las celulas con actividad fagocitica, desencadenandose todos los mecanismos descritos anteriormente. A su vez los microorganismos son capaces de desarrollar una gran variedad de mecanismos defensivos para evitar ser destruidos por los fagocitos.

Parece razonable pensar que la virulencia de las bacterias patogenas podria estar influenciada por su capacidad para sintetizar enzimas especificas capaces de destruir o neutralizar los productos del metabolismo oxidativo de los neutrofilos, tales como catalasa, peroxidasa y SOD. La funcion de estas enzimas seria la de catalizar la ruptura de las sustancias toxicas generadas para asi originar productos finales menos toxicos (Beaman y Beaman, 1964).

Segun esta hipotesis, las bacterias capaces de sintetizar estas enzimas deberian ser mas resistentes a la destruccion por los PMN. Pero lo cierto es que las bacterias son destruidas en mayor o menor medida por los neutrofilos independientemente de que posean o no estas enzimas. Por lo tanto, aun no esta claro como las bacterias patogenas que no son destruidas por los fagocitos se evaden de los efectos letales de los productos originados por el metabolismo oxidativo (Beaman y Beaman, 1964).

En *Mycardia satyridae* se ha comprobado que existe una correlacion directa entre, por un lado, la relativa virulencia de este microorganismo y su resistencia a la destruccion por los mecanismos oxidativos, y, por otro lado, la cantidad, el tipo y la localizacion de la SOD producida. Esta enzima cataliza la dismutacion del anion superoxido a la formacion del mas toxico todavia peroxido de hidrogeno. Este ultimo compuesto, solo o en combinacion con la mieloperoxidasa y los compuestos haluros, es altamente microbicida, por lo que la SOD no podria ser el unico mecanismo por el que se evade de la destruccion. Asi pues, la

catalasa que descompone el peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno molecular podría desempeñar un papel central en la resistencia de los microorganismos a los productos metabólicos derivados del oxígeno (Filice et al., 1980; Beaman et al., 1983).

Beaman et al. sugieren que los elevados niveles de catalasa en el citoplasma de esta especie de nocardia en combinación con una SOD secretada y otra asociada a la superficie celular desempeñarían un papel fundamental en la resistencia de este microorganismo a la actividad microbicida de los PMN y, por tanto, en la virulencia de esta especie de Nocardia (Filice et al., 1980; Beaman et al., 1983).

Jacket et al. estudiaron la virulencia de mutantes de Mycobacterium tuberculosis en cobayos. En general, los microorganismos que carecían de catalasa fueron mas sensibles a la destrucción por el peroxido de hidrógeno y menos virulentos que aquellos que contenían gran cantidad de catalasa. Sin embargo, estos mismos autores encontraron también cepas que, aun careciendo de actividad catalasa, eran resistentes al peroxido de hidrogeno y se mostraban virulentas (Jacket et al., 1978).

De todos estos estudios puede desprenderse que la resistencia de las micobacterias y las nocardias a los productos tóxicos derivados del oxígeno durante la fagocitosis podría radicar en una combinación interactuada entre una SOD extracelular, otra SOD asociada a la superficie y una elevada cantidad de catalasa intracelular (Filice et al., 1980; Beaman et al., 1983; Beaman y Beaman, 1984).

Mandell demostró que en Staphylococcus aureus existe también una correlación entre su virulencia relativa para el ratón y la cantidad de catalasa producida. Una elevada síntesis de catalasa estaría relacionada con una elevada virulencia, mientras que una producción escasa estaría relacionada con cepas avirulentas (Kanafani y Martin, 1985; Mandell, 1975). No obstante, ambas cepas, virulentas o no, fueron destruidas por PMN humanos en estudios realizados in vitro, aunque hay que destacar que las cepas virulentas o con mayor producción de catalasa fueron más resistentes que los mutantes con escasa producción de catalasa obtenidos con rifampicina. Este mismo autor no encontró correlación entre el contenido de SOD y la virulencia de los estafilococos (Mandell, 1975).

En los microorganismos anaerobios la mayor o menor resistencia a los productos tóxicos derivados del oxígeno está directamente relacionada con la cantidad de SOD que son capaces de sintetizar (Beaman y Beaman, 1984).

Además de estos mecanismos defensivos de tipo enzimático, existen otros no enzimáticos, como la presencia de cápsula. Las bacterias capsuladas son muy hidrófilas, por lo que en soluciones acuosas son más resistentes a la ingestión por células fagocíticas. En soluciones que contienen proteínas plasmáticas los anticuerpos frente a estas bacterias y la fracción C3b del complemento son capaces de unirse a estos microorganismos debido a su capacidad para atravesar las sustancias capsulares. Pero esta cubierta externa impide la unión de la fracción Fc de las IgG o de la fracción C3b del sistema de complemento a sus receptores situados en la superficie de las células con capacidad fagocítica. Sin embargo, las proteínas capsulares, las glicoproteínas y los polisacáridos son antigénicos, por lo que, si en el plasma existen inmunoglobulinas frente a estas sustancias, las bacterias, a pesar de poseer cápsula, son fácilmente fagocitadas a través de los mecanismos de opsonización ya explicados con anterioridad (Peterson *et al.*, 1978; Wilkinson *et al.*, 1979; Wilkinson, 1983). Estas cápsulas han sido descritas entre otros microorganismos en Streptococcus pneumoniae, en la cepa Smith de Staphylococcus aureus y en especies de estreptococos con la proteína M (Van Oss, 1986).

Otro mecanismo defensivo es la proteína A presente en la pared celular de los estafilococos. Esta proteína se une inespecíficamente a la fracción cristalizante de las inmunoglobulinas de tipo G, exponiendo hacia el exterior la fracción Fab, y no la Fc (Van Oss *et al.*, 1973).

La lisis de las células con actividad fagocítica es otro de los mecanismos defensivos de los microorganismos. Algunas especies del género Streptococcus son capaces de destruir los fagocitos lisando los gránulos citoplasmáticos por la acción de las estreptolisinas S y O (Davis *et al.*, 1980). La leucocidina estafilocócica es una exotoxina con actividad citotóxica específica para los leucocitos (Loeffler *et al.*, 1988). Las hemolisinas  $\alpha$  y  $\beta$  producidas por algunas especies de estafilococos tienen un efecto citotóxico sobre los polimorfonucleares

neutrófilos de algunas especies animales (Wadstrom, 1983) y del hombre (Gemmell et al., 1982).

#### 1.2.4. NEUTRÓFILOS DE LA ESPECIE OVINA.

La respuesta oxidativa de los neutrófilos de la especie ovina es mucho más reducida que la de los neutrófilos de origen humano y bovino, lo que parece indicar que la acción bactericida de los PMN de esta especie sería más independiente del metabolismo oxidativo que dependiente de este sistema (Buchta, 1990).

La actividad enzimática de los neutrófilos de la especie ovina comparada con la de otras especies animales queda reflejada en la tabla 1.2.

Hasta el momento en los neutrófilos ovinos aislados de sangre circulante y de secreción láctea se han descrito receptores para las Ig G2 (Watson, 1976) pero no para las Ig M (Kerlin y Watson, 1986; Mukkur e Inman, 1989) ni para las Ig G1, aunque se ha comprobado que las Ig M tienen capacidad opsonizante (Mukkur e Inman, 1989).

#### 1.2.5. METODOS DE ESTUDIO IN VITRO DEL FENOMENO DE FAGOCITOSIS.

Se han descrito varios métodos para el estudio de la ingestión de partículas por células con actividad fagocítica. Dichos métodos se basan en la incubación de partículas y neutrófilos en las condiciones apropiadas para favorecer el contacto entre los elementos que intervienen en la reacción. Los métodos de estudio pueden ser directos o indirectos (Absolon, 1986a).

##### 1.2.5.1. Métodos de estudio directos:

a) Determinación microscópica. Generalmente se evalúan el número de partículas ingeridas por las células, o índice fagocítico, y el número de células que contienen partículas, o índice de actividad fagocítica. Es un método de fácil ejecución, pero la interpretación puede ser complicada dada la dificultad que entraña discernir si la partícula tiene situación intracelular o está simplemente adherida a la superficie de la célula (Absolon, 1986a).

**Tabla 1.2. Actividad enzimática de las microfloras de nariz circunstante en las diferentes especies animales (tomado de Bertram, 1985).**

ESPECIE	B-GALACTOSIDASA	AMILASA PANCREÁTICA	PROTEOLISINASA	LIPASA	FOSFATASA ACIDICA	FOSFATASA NEUTRA
CANINA	++	+	++	++	+++	++
PERCINA	+	++	++	+	+++	++
MURINA	+	+++	+		++	+
OVIS	++	+	+		++	+
CANINA	+	NR	+++	+	+	NR
FELINA	+++	NR	+			NR

+++ : actividad enzimática elevada, ++ : actividad enzimática moderada, + : actividad enzimática baja, . : actividad enzimática no detectable, NR : sin datos

b) Métodos de marcaje con isótopos. El uso de partículas (como bacterias, levaduras, plaquetas, partículas de látex, inmunocomplejos, entre otros) marcadas con isótopos radiactivos del tipo  $C^{14}$ ,  $P^{32}$ ,  $H^3$ ,  $Cr^{51}$ ,  $Ca^{45}$  o  $Tc^{99}$  y la medición posterior de la radiactividad emitida por los fagocitos permite una interpretación objetiva de la reacción (Absolom, 1986a).

c) Métodos de extracción. Consisten en extraer las sustancias ingeridas por los fagocitos mediante disolventes adecuados y en determinar cuantitativamente las mismas. Entre estas técnicas hay que destacar la de Stossel que emplea aceite rojo O parafinado previamente estabilizado con una capa proteica (Stossel, 1973).

d) Otros métodos. Entre otros métodos cabe destacar uno que mide el índice de ingestión por parte de los neutrófilos de bacterias vivas opsonizadas. Esta técnica se emplea frecuentemente con cepas de Staphylococcus aureus (Leijh et al., 1986).

#### 1.2.5.2. Métodos indirectos:

Se fundamentan en el estudio de los mecanismos metabólicos de los PMN que siguen a la ingestión de partículas. Podemos destacar los siguientes:

a) Determinación del consumo de oxígeno por los neutrófilos empleando un electrodo de tipo Clark (Absolom, 1986a; Metcalf et al., 1986).

b) Estudios del metabolismo de la glucosa. Como ya se ha expuesto, la oxidación de la glucosa vía hexosamonofosfato se incrementa durante la estimulación de la fagocitosis. Este incremento puede medirse directamente utilizando  $C^{14}$ -1-glucosa como fuente de hidrato de carbono. El  $^{14}CO_2$  liberado se fija a una solución de KOH y, posteriormente, se mide cuantitativamente en un contador de centelleo (Mickenberg et al., 1970; Absolom, 1986a).

c) Medición de la quimioluminiscencia. La interacción entre un estímulo adecuado y los fagocitos da como resultado la liberación de ácido araquidónico a partir de los fosfolípidos de la membrana por la acción de una fosfolipasa activada. La oxidación de este ácido vía lipooxigenasa da lugar a la libera-



cion de energia, de tal manera que los reactivos derivados del oxigeno molecular producidos por la activacion de la NADPH oxidasa actúan como agentes oxidantes del acido araquidonico. La luz emitida puede detectarse y medirse con un luminometro adecuado (Absalom, 1986a).

d) Reduccion del colorante nitroazul de tetrazolium (NAT). La ingestion de NAT por los neutrofilos provoca su transformacion en formazan, cambiando de una coloracion amarilla a un precipitado azul oscuro. La cantidad de formazan producido puede determinarse espectrofotometricamente despues de su extraccion de los leucocitos con solventes organicos como el dioxano. Cualitativamente, puede observarse la presencia de formazan mediante la ayuda de un microscopio (Absalom, 1986a).

### **1.2.6. METODOS DE ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD MICROBICIDA.**

#### **1.2.6.1. Metodos de evaluacion global.**

Se han desarrollado diferentes tecnicas que se fundamentan en la incubacion en condiciones apropiadas de una mezcla de neutrofilos, bacterias vivas y suero fresco (Leigh *et al.*, 1986). A determinados intervalos de tiempo se procede a realizar un recuento del numero de bacterias que han permanecido viables extracelular e intracelularmente. En algunos metodos se añaden antibioticos que no sean capaces de atravesar la membrana de los leucocitos con el fin de destruir las bacterias que no han sido fagocitadas, o, en el caso de los estafilococos, se sustituye el antibioticado por listafina (Fleishman *et al.*, 1986; Metcalf *et al.*, 1984). La interpretacion de los resultados se realiza previa lisis de los neutrofilos y realizacion de recuento de los microorganismos viables por las tecnicas bacteriologicas convencionales (Leigh *et al.*, 1986).

#### **1.2.6.2. Metodos de investigacion de distintos factores especificos.**

##### **1.2.6.2.1. Determinacion de la actividad enzimatica especifica.**

Una de las tecnicas más empleadas es la deteccion de la actividad mieloperoxidasa (MPO) presente en los granulos primarios de los neutrofilos, pues desempeña una funcion muy



importante en la actividad microbicida de los PMN (Absolom, 1986a). La MPO en presencia de peróxido de hidrógeno es capaz de oxidar algunos sustratos como la O-toluidina, dando lugar a la formación de sustancias coloreadas que pueden medirse espectrofotométricamente (Metcalf et al., 1986).

Además de la MPO, puede detectarse la actividad de otras enzimas: SOD,  $\beta$ -glucoronidasa, lisozima, lactato deshidrogenasa, glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, fosfatasa ácida y alcalina entre otras (Absolom, 1986a).

#### I.2.6.2.2. Determinación de marcadores no enzimáticos

La lactoferrina se considera un excelente marcador de la degranulación durante la fagocitosis porque se libera de los gránulos secundarios a la más mínima perturbación de la membrana celular (Metcalf et al., 1986). Asimismo, podría determinarse la cobalamina o proteína fijadora de la vitamina B<sub>12</sub> (Absolom, 1986a).

---

# **Objetivos.**

De lo expuesto en la introducción puede deducirse que es mucho lo que resta por conocerse sobre la enfermedad de los abscesos y sobre su agente etiológico, en especial todo lo referente a la patogenia y profilaxis. La cuestión de la profilaxis sólo podrá abordarse con garantías cuando se disponga de un conocimiento más preciso de los mecanismos implicados en el establecimiento de la infección en los animales.

Al considerar la patogenia de la enfermedad de los abscesos es muy interesante tener presente, en primer lugar, las diferencias en la patogenicidad existente entre *S. aureus* subsp. *anaerobius* y las estirpes clásicas de *S. aureus*. Recordemos que *S. aureus* subsp. *anaerobius*, en condiciones de campo, es patógeno principalmente para los ovinos jóvenes y en mucha menor medida para los ovinos adultos y los caprinos (Valenti y Bleier, 1984; De la Fuente y Suarez, 1985; De la Fuente *et al.*, 1985a; El Sancusi *et al.*, 1989). Por contra, *S. aureus* es una bacteria muy ubicua y patógena para muchas especies animales. En concreto, en los ovinos es responsable principalmente de la manitis gangrenosa, de la dermatitis estafilocócica y de la folliculitis estafilocócica (una pioderma benigna de los corderos jóvenes).

Es lógico pensar que la distinta capacidad patógena de estas dos bacterias sea un reflejo de las diferencias en su composición y en sus características fisiológicas y bioquímicas. En este sentido, las peculiaridades distintivas más importantes de *S. aureus* subsp. *anaerobius* con respecto a *S. aureus* son la carencia de catalasa, de citocromos y de menaquinonas, todos ellos componentes de la cadena respiratoria aeróbica, lo que hace que la bacteria sea anaeróbica o microaerofílica (De la Fuente y Suarez, 1985; De la Fuente *et al.*, 1985c). Por el momento se desconoce a qué es debida la deficiencia en catalasa de *S. aureus* subsp. *anaerobius*, si bien se ha demostrado que la bacteria es capaz de sintetizar el grupo hemo, grupo prostético común a la catalasa y los citocromos (De la Fuente *et al.*, 1986; 1987a).

*S. aureus* subsp. *anaerobius* comparte, sin embargo, con *S. aureus* la capacidad de producir una serie de toxinas y enzimas que tradicionalmente se han relacionado con la patogenicidad de los estafilococos: coagulasa, "DNA-sa" termoestable, beta-hemolisina, hialuronidasa, lecitinasa, proteasa, etc. No debe descartarse que, además de las señaladas, otras diferencias aun por

conocer condiciones la diferente patogenicidad de estas bacterias.

Un primer aspecto a considerar en la patogenia de la enfermedad de los abscesos es la puerta de entrada de la infección. Aunque se han sugerido como posibles puertas de entrada las pequeñas heridas en la boca, los espacios linfáticos del anillo faringeo o incluso la cicatriz umbilical (Blanco Loizelier, 1960), la cuestión no ha sido investigada adecuadamente. Además, hay que tener en cuenta que en los intentos de reproducción experimental de la enfermedad en ovinos y caprinos realizados por diferentes autores se producen abscesos fácilmente en los puntos de inoculación empleando distintas vías, pero con mucha frecuencia no se consigue reproducir la enfermedad natural, es decir, la formación de abscesos en los ganglios linfáticos superficiales (Aynaud, 1922, 1923, 1928; Carre 1923a; Benito y Borrel, 1957; Blanco Loizelier, 1960; Shirlaw y Ashford, 1962; De la Fuente et al., 1985a. De la Fuente y Suarez, 1985; El Sansou, 1989).

Una vez que *S. aureus* subsp. *anaerobius* penetra en el hospedador, para que se establezca la infección y se desarrolle la enfermedad es necesario que el microorganismo supere los mecanismos defensivos inespecíficos y específicos del hospedador. Los polimorfonucleares neutrofilos (PMN) constituyen la primera línea de defensa contra la infección con su capacidad de fagocitar y destruir los microorganismos invasores. Dadas las características de presentación de la enfermedad, formación de abscesos en los ganglios linfáticos superficiales, el grado de eficacia de este proceso primario de defensa orgánica podría ser en gran medida responsable de que llegue o no a producirse la enfermedad.

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, los objetivos de esta tesis doctoral fueron los siguientes:

### II.1. Estudio de la deficiencia respiratoria de *S. aureus* subsp. *anaerobius*.

En primer lugar se contempló la hipótesis de que la deficiencia en catalasa de *S. aureus* subsp. *anaerobius* se debiera a una mutación y que esta fuera reversible, y que, por tanto,

podieran detectarse variantes catalasa positivas tras exponer a la bacteria a agentes mutágenos.

Un segundo propósito dentro de este objetivo consistió en investigar si la deficiencia en actividad catalasa de la bacteria es consecuencia de que la apoenzima no se sintetiza o, si bien, esta es sintetizada total o parcialmente pero no es activa. Recordemos que la posibilidad de que la ausencia de actividad catalasa se deba a una alteración en la síntesis del grupo prostético (hemo) está descartada. La investigación de este extremo se aborda desde el punto de vista inmunológico.

II.2. Conocer la eficacia de la fagocitosis y de la actividad bactericida de los PMN ovinos frente a Staphylococcus aureus subsp. anaerobius.

En el estudio de la patogenia de la enfermedad de los abscesos consideramos prioritario investigar la eficacia de la fagocitosis y de la actividad bactericida de los PMN ovinos frente a S. aureus subsp. anaerobius siempre en comparación con estirpes clásicas de S. aureus aisladas de procesos patológicos ovinos (mamitis). En definitiva, pretendemos comprobar si las diferencias fisiológicas y bioquímicas entre estas dos bacterias se traducen en un comportamiento diferente en su interacción con los PMN ovinos.

Asimismo, dado que la enfermedad natural afecta fundamentalmente a los ovinos jóvenes, nos planteamos investigar la influencia de la edad de los ovinos donadores de PMN en la eficacia de estos procesos comparando dos grupos de donadores: uno constituido por corderos de un mes de edad y el otro por animales adultos de entre dos y cuatro años.

II.3. Investigar la patogenicidad de S. aureus subsp. anaerobius en ovinos y caprinos realizando inoculaciones experimentales.

Los aspectos básicos de la patogenicidad experimental de S. aureus subsp. anaerobius en pequeños rumiantes han sido ya investigados por distintos autores. No obstante, aún quedan cuestiones por resolver. Algunas de ellas se abordan en este trabajo y se corresponden con los siguientes objetivos concretos:

### II.3.1. Estudiar la vía de entrada de la infección.

Insistamos en que la reproducción experimental de la enfermedad fracasa en muchas ocasiones utilizando distintas vías "clásicas" de inoculación como la subcutánea, la intramuscular... Es probable que estos fracasos se deban a que las vías de inoculación utilizadas hasta ahora no reproducen las condiciones en las que se establece la infección natural.

Teniendo en cuenta el cuadro clínico de la enfermedad parece razonable hipotetizar que la entrada de la bacteria en el organismo se produce a partir de soluciones de continuidad de la piel. Para probar esta hipótesis se ensaya una nueva forma de infectar a los animales consistente en impregnar con un cultivo de las bacterias ligeras incisiones en la piel.

### II.3.2. Conocer la sensibilidad de los cabritos a la infección.

Varios estudios han señalado que, en condiciones de campo, los cabritos parecen ser bastante más resistentes a la infección por S. aureus subsp. anaerobius que los corderos. Se pretende comprobar si los resultados de inoculaciones experimentales en cabritos por distintas vías apoyan o no esta afirmación.

### II.3.3. Comparar la patogenicidad de S. aureus subsp. anaerobius y S. aureus en corderos utilizando la forma de infección "no clásica".

Paralelamente a los ensayos realizados para investigar la puerta de entrada de la infección por S. aureus subsp. anaerobius se realizaron otros análogos infectando las incisiones con una cepa de S. aureus aislada de un caso de mamitis ovina con el fin de comparar la patogenicidad de ambas bacterias.

### II.3.4. Investigar la patogenicidad de S. aureus subsp. anaerobius por vía intramamaria en ovejas en lactación.

La patogenicidad de la bacteria por esta vía no ha sido aún estudiada, si bien, como hicimos referencia en la introducción, Blanco Loizelier (1960) afirma haber aislado el microorganismo reiteradamente de la mama de ovejas y Shirlaw y Ashford (1962) encontraron granulomas intramamarios con fistulizaciones y abscesos en dos animales.

---

# **Material y Métodos.**

El material general utilizado en el presente trabajo es propio de un laboratorio de investigación: placas de cultivo, pipetas, tubos, placas de petri, matraces, vasos de precipitación, pipetas, recipientes para la esterilización, jarres y recipientes de almacenamiento, etc.

Para el cultivo e identificación de los microorganismos estudiados en este trabajo se ha seguido un método de cultivo selectivo. Entre otros se cultivó junto con los reactivos coloreados en placas especiales donde preferían desarrollarse los apartados de la materia correspondientes al estudio.

Por lo que se refiere a los aparatos especiales para realización de este trabajo, no son otros que los habituales en un laboratorio de investigación científica: autoclaves, hornos Pasteur, etc., de acuerdo a diferentes temperaturas, para: trabajos de congelación, microscopios ópticos, centrífugas, baños de agua termostáticos, escalas de temperaturas regulables, etc.

A todo este material general hay que añadir el material específico utilizado en cada uno de los estudios realizados, y todo ello se detalla en los apartados correspondientes.

### III.1. ENSAYOS DE INDUCCIÓN DE MUTANTES CATALASA POSITIVOS PARTIR DE CEPAS DE *S. aureus* subsp. *aureus*.

#### III.1.1. Cepas empleadas.

Se emplearon dos cepas mutantes bacterianas de *S. aureus* cepas *aureus* M17 107 y M17 108 obtenidas según la técnica descrita por De la Fuente *et al.* (1965, 1966) y otras dos cepas M17 109 y M17 110 marcadas con el plásmido pCAL1. Estas y las otras cepas les confiere resistencia al cloranfenicol. La selección de cepas marcadas con este plásmido tenía como finalidad de facilitar el marcado fiable para seleccionar los posibles mutantes obtenidos. La inducción y selección de los mutantes catalasa positivos se realizó mediante dos métodos:

#### III.1.2. Inducción de mutaciones con rayos U.V. de 245 de longitud de onda.

Las bacterias se incubaron en matraces con 20 ml de caldo BHI durante 24 horas a 37 °C en agitación. En el caso de 1



cepas con plasmido se añadía al medio 25 µg/ml de cloranfenicol. Transcurrido este tiempo se añadían 1 ml del cultivo a una placa de Petri vacía y estéril que se exponía a la acción de los rayos U.V. de 245 nm durante 15, 30, 45, 60, 120 y 180 segundos. Seguidamente se realizaban diluciones del caldo y se resembraban en agar BHI con o sin cloranfenicol según la cepa tuviera o no plasmido. Tras incubarlas a 37 °C durante 24 a 48 horas, se procedía a la detección de mutantes catalasa positivos mediante la adición de peróxido de hidrógeno al 10% a cada una de las colonias crecidas. Si aparecían colonias catalasa positivas, estas eran inmediatamente resembradas en agar BHI o agar BHI con cloranfenicol para el posterior estudio de las características propias de esta subespecie de *S. aureus* (De la Fuente y Suarez 1985; De la Fuente et al. 1985a, 1985b, 1985c).

### III.1.3. Inducción de mutaciones con nitrosequanidina.

Las bacterias crecidas en matraces con 30 ml de medio durante 18 horas a 37 °C en agitación se recogían por centrifugación a 10.000 x g durante 10 minutos y se resuspendían en 10 ml de tampón Tris-HCl 50 mM, pH 5.9 con N-metil-N'-nitro N-nitrosequanidina (0.1 µg/ml). Tras una incubación de 15 minutos a 37 °C, se realizaban dos lavados de las células con tampón Tris-HCl 50 mM, pH 5.9. Las bacterias lavadas se resuspendían en 10 ml del mismo tampón y se resembraban a la dilución apropiada en agar BHI con o sin cloranfenicol. Una vez incubadas las placas a 37 °C durante 24 a 48 horas se detectaba la presencia de mutantes catalasa positivos como se ha descrito en el apartado anterior.

## III.2. PURIFICACION DE LA CATALASA DE *S. aureus* ATCC 12.600.

### III.2.1. Cultivo de las bacterias.

Para el cultivo de *S. aureus* ATCC 12.600 se empleó el medio utilizado por Rupprecht y Schleifer (1979), cuya composición es la siguiente:

Caseína	10,00 g
Extracto de levadura	5,00 g
NaCl	7,50 g
Agua destilada	1,00 l

Una vez disueltos todos los componentes en el agua destilada, se ajustó el pH a 7.0 y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

El crecimiento en medio líquido se realizó en matraces de 2 litros de capacidad, los cuales contenían un litro de medio. La inoculación se realizó a 17 °C, aeróbicamente y con agitación constante de 100 r.p.m. en un agitador orbital. Tras 18 horas se recogían las células por centrifugación a 15.000 x g durante 10 minutos y a 4 °C en una centrifugadora Sorvall RC 5B. Una vez recogidas las células se sometían a dos lavados con tampón fosfato sódico 50 mM, pH 7.0 y se conservaban en congelación a -20 °C hasta su utilización a la cual se procedía a la extensión de extractos celulares inmediatamente.

### III.2.2. Obtención de extractos celulares.

Las células procedentes de 10 litros de medio de cultivo se sometieron a ruptura mecánica. Antes de introducirse en el rompedor celular (Braun tipo 811011) se mezclaban en el recipiente de vidrio del mismo en la proporción de 2 a 1 con perlas de vidrio de un diámetro de 0.17-0.18 mm. Si era necesario se añadía a la mezcla tampón fosfato 50 mM, pH 7.0 hasta conseguir la consistencia deseada. Para la lisis de las bacterias se sometía la mezcla con refrigeración constante por medio de  $IC_2$  a 4 °C tratándose en el rompedor celular de treinta segundos con intervalos de 10 segundos de descanso para evitar un calentamiento excesivo de la preparación. Una vez lisadas las bacterias, los extractos obtenidos eran filtrados por presión negativa con filtros de placa porosa de vidrio 00, succionados a un matraz al vacío y a una bomba de vacío para retener las perlas de vidrio.

Los extractos recogidos se centrifugaron a 15.000 x g durante una hora a 4 °C y posteriormente se ultracentrifugaron a 50.000 x g durante otra hora para eliminar los restos celulares. El sobrenadante, que contenía la actividad enzimática, se recogió y se mantuvo en congelación a -20 °C hasta su utilización.

### III.2.3. Precipitación de los extractos crudos con una mezcla de etanol y cloroforme.

A los extractos celulares obtenidos tras la ultracentrifugación, refrigerados en un baño de hielo y mantenidos en

agitación constante, se añadía lentamente una mezcla de etanol al 95% y cloroformo en la proporción 10:5:3 (extracto:etanol:cloroformo). Tras una hora en agitación a 4 °C se centrifugaba la mezcla a 17.000 x g durante una hora a 4 °C. Tras la centrifugación aparecían dos fases netamente separadas y un sedimento. Tanto la fase superior (que contenía mayoritariamente etanol y cloroformo) como el sedimento se descartaban y se recuperaba la fase inferior que presentaba la actividad enzimática. Una vez recogida se mantenía en congelación a -20 °C hasta la siguiente etapa de purificación.

#### III.2.4. Técnicas de purificación cromatográfica.

##### III.2.4.1. Preparación de las columnas cromatográficas.

Tanto el Ultrogel ACA 34 (LKB) como DEAE-Sephacel (Pharmacia) venían en condiciones de ser utilizados sin previo tratamiento. Por lo tanto, las columnas se rellenaron con estos preparados previa desgasificación, vertiéndolos directamente a la columna mantenida en posición vertical. Se dejó que el gel se estabilizase durante 15 horas y, a continuación, se hizo pasar el tampón para su equilibrado. El lavado de la columna se realizó con un volumen del tampón utilizado en cada caso diez veces superior al volumen de la columna empleada.

##### III.2.4.2. Cromatografía de exclusión molecular.

El extracto proteico procedente de la precipitación con etanol y cloroformo se aplicaba a una columna de cromatografía líquida (100 x 2,6 cm) de ULTROGEL ACA 34 con un rango de separación molecular de 20 a 350 kilodaltons. La columna fue previamente equilibrada con tampón fosfato sódico 50 mM, pH 7,0. La elución se realizó manteniendo una presión y flujo constante de 20 ml/h y se recogieron fracciones de 2,5 ml. En ellas se medía la absorbancia a 280 nm para detectar la presencia de proteínas y a 405 nm para determinar la presencia del grupo hemo que forma parte de la catalasa. Asimismo, en cada una de las fracciones se determinaba la actividad catalasa.

##### III.2.4.3. Cromatografía de intercambio iónico.

Las fracciones con mayor actividad enzimática obtenidas por cromatografía de exclusión molecular se mezclaban y se aplicaban

a una columna cromatografica 140 x 1.6 cm. de DEAE-SEPHACEL previamente equilibrada con tampón fosfato potasio 0.01 M, pH 7.0. Una vez aplicada la muestra se continúa lavando la columna hasta obtener una densidad óptica de valor 0 a 280 nm en el eluato. A continuación se eluye la catalasa manteniendo una presión y flujo constante de 12 ml/h con un gradiente lineal de NaCl 0.2-0.4 M disueltos en tampón fosfato potasio 0.01 M, pH 7.0. En las fracciones recogidas (de 1.5 ml) se mide la absorbancia a 280 nm, a 405 nm, así como la actividad catalasa.

### III.2.5. Ensayo enzimático de la actividad catalasa.

La actividad catalasa en los extractos celulares y en los sucesivos pasos de purificación se determinaba por el método descrito por Klotz (1972). Esta técnica se basa en la reducción del dicromato en presencia de ácido acético o acetato amónico cuando la muestra se calienta en presencia de peróxido de hidrógeno. El acetato amónico se cuantifica colorimétricamente a 570 nm en un espectrofotómetro.

En la figura III.1 se presenta un esquema de la metodología seguida en la purificación de la catalasa de *S. aureus* ATCC 11494.

## III.3. METODOS ELECTROFORETICOS.

### III.3.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilo sulfato sodio (SDS-PAGE).

Para el análisis de proteínas por SDS-PAGE se siguió el sistema de electroforesis horizontal descrito por Laemmli y Favre (1973) utilizando geles de 145 x 145 x 2 mm.

#### III.3.1.1. MATERIALES.

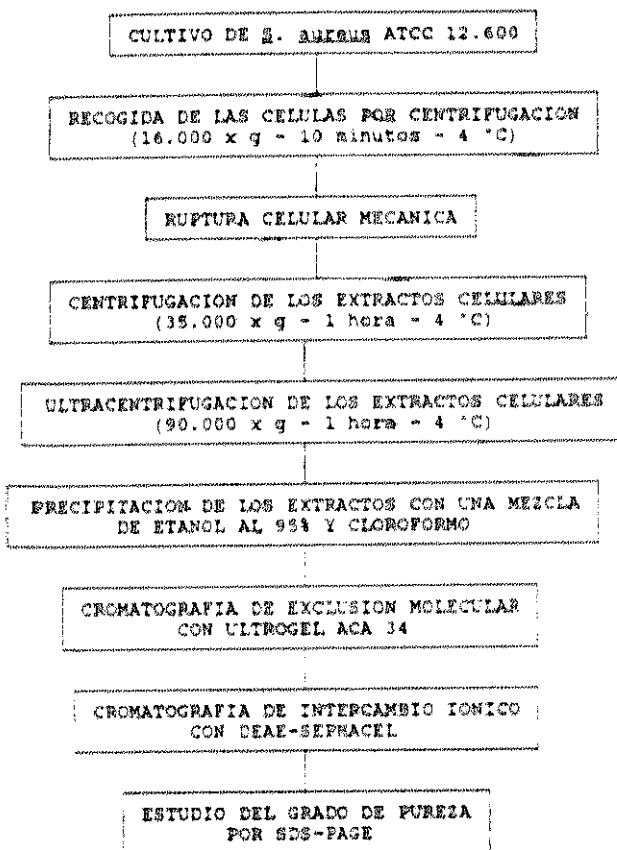
##### III.3.1.1.1. ~~Reactivos~~.

- Fuente de alimentación LKB Power Supply (LKB 2197).
- Cámara de electroforesis LKB Multiphor (LKB 2117).

##### III.3.1.1.2. Soluciones y tampones.

##### III.3.1.1.2.1. Solución de acrilamida.

Figura III.1. Metodología seguida en la purificación de catalasa de *Staphylococcus aureus* ATCC 12.600.



La composición es la siguiente:

Acrilamida	11 g
Acrilato de metilo	11 g
Agua destilada	100 ml

Para su preparación se disuelven los 11 gramos de acrilamida y los 0,6 gramos de bisacrilamida en 50 ml de agua destilada. Se agita hasta la perfecta disolución de los componentes y se completa con agua destilada hasta un volumen total de 100 ml. Una vez lista, se filtra y se conserva en un frasco opaco a 4 °C. En estas condiciones es estable al menos durante 100 semanas, aunque lo recomendable es utilizarla en el momento de su preparación.

III.1.1.1. Solución de persulfato amónico al 1,5% en agua destilada para aplicación por preparación siempre en el momento de su uso.

III.1.1.2. Solución madre de tampón fosfato (0,2 M, pH 7,4).

Se prepara mezclando a las proporciones indicadas los componentes siguientes:

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	34,0 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	29,0 g
H <sub>2</sub> O	1000
Agua destilada	100

III.1.1.3. Tampón de electrolitos.

Se añade el tampón anterior a la solución III.1.1.2 en una relación.

III.1.1.4. Tampón de la muestra.

Se prepara una solución con la siguiente composición:

Solución madre de tampón fosfato	5,0 ml
SDS	1,0 g
Electrolitos	10 ml
Agua destilada	100 ml
Agua destilada	50 ml

III.1.1.5. Solución de fijado.

Para el fijado de los geles de poliacrilamida se emplea una solución con la composición siguiente:

Acido trisodio borato	17 g
Acido sulfónico metano	17 g
Metanol	150 ml
Agua destilada	250 ml

Se prepara añadiendo los acidos a la mezcla de metanol y agua destilada. Esta solución conservada a temperatura ambiente puede utilizarse varias veces.

#### III.2.1.1.7. Solución de tinte.

Los geles se tiñeron para detectar las bandas de proteína con el colorante azul de Coomassie G 250 preparado de la siguiente manera:

Bl. de Coomassie G 250	100 mg
Metanol	250 ml
Acido acético	100 ml
Agua destilada	250 ml

Se disuelve el colorante en la mezcla de metanol y agua destilada en agitación lenta durante una hora. Después se añade el ácido acético y se filtra para eliminar las partículas no disueltas. Esta solución puede reutilizarse repetidas veces siempre y cuando se filtre previamente.

#### III.2.1.1.8. Solución de destainado.

Para el destainado de los geles se emplea la siguiente mezcla:

Etanol	500 ml
Acido acético	100 ml
Agua destilada	500 ml

#### III.2.1.1.9. Solución conservadora.

Se prepara mezclando a las proporciones indicadas los componentes siguientes:

Etanol	500 ml
Acido acético	100 ml
Formol	100 ml
Agua destilada	500 ml

### III.3.1.2. MÉTODOS.

#### III.3.1.2.1. Preparación de los geles.

Los geles de poliacrilamida con SDS empleados tenían una concentración de acrilamida del 10%. Las dimensiones de los mismos eran de 125 x 260 x 2 mm con capacidad para 20 muestras.

Para su preparación se mezclaban los siguientes componentes en las proporciones indicadas a continuación:

Solución madre de tampón fosfato	33,00 ml
Solución de acrilamida	29,70 ml
Solución de persulfato amónico	3,20 ml
TEMED (K81820-104)	0,35 ml

En un matraz kitasato se mezclaban la solución madre de tampón fosfato y la solución de acrilamida y se desgasificaba por presión negativa con una bomba de vacío. A continuación se añadían el persulfato y el TEMED e inmediatamente se rellenaba el molde del gel y se dejaba polimerizar a temperatura ambiente.

#### III.3.1.2.2. Preparación de las muestras.

Las muestras se prepararon añadiendo la cantidad adecuada de extracto enzimático al tampón de muestra para obtener una concentración final de proteína entre 0,2 y 2,0 mg/ml y sometiendo el conjunto a un tratamiento térmico de 100 °C durante dos a cinco minutos.

Las muestras empleadas eran extractos crudos o en diferentes etapas de purificación de *S. aureus*, *S. aureus* subsp. *anaerobius* y de otras especies de estafilococos según los experimentos (*S. caprae*, *S. capitis*, *S. sciuri*, *S. xylosus* y *S. simulans*).

#### III.3.1.2.3. Aplicación de las muestras y electroforesis.

Previamente a la aplicación de las muestras se realizó una preelectroforesis con el fin de retirar los electrolitos y conseguir así una corriente homogénea en todo el gel. Para ello, se aplicó al gel una intensidad de corriente constante de 150 mA durante 30 minutos. Una vez realizada la preelectroforesis se añadían 10 µl de las muestras en cada uno de los pocillos.



La electroforesis se inicio ajustando la fuente de alimentacion a 20 mA durante 10 minutos o el tiempo necesario para que las muestras se concentrasen y penetrasen en el gel. Despues se ajusto la fuente de alimentacion a 190 mA durante aproximadamente 6 horas. La electroforesis finalizaba cuando el marcador (azul de cresofenol) llegaba a un centimetro del extremo final del gel.

#### III.3.1.2.4. Teñido y conservacion de los geles.

Finalizada la electroforesis se separaba el gel de su soporte de vidrio y se introducía en la solución de fijado durante una hora. Despues de fijar el gel se procedía al teñido de las proteínas manteniendolo durante una hora en la solución de teñido con azul de Coomassie R 250. A continuación se procedía a su desteñido sumergiendolo en la solución de desteñido repetidas veces y cambiando la solución con frecuencia. La operación se daba por finalizada cuando se conseguía un gel gradualmente incoloro con las bandas de proteína bien visibles.

Los geles que interesaba conservar se sumergían en la solución de conservacion durante una hora y, seguidamente, se depositaban sobre un vidrio o soporte plastico transparente de su medida y se cubrían con papel de celofan humedecido en solución conservadora. En estas condiciones se mantenía hasta su completa desecación a temperatura ambiente.

Ademas del sistema tradicional de electroforesis expuesto anteriormente, tambien se utilizo el sistema de electroforesis semi-automatizado "PhastSystem" (Pharmacia) para cuya realizacion se siguieron en todo momento las instrucciones del fabricante. Se emplearon geles ultrafinos (45 x 15 x 0,3 mm) con un gradiente de concentracion del 8 al 15% de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con SDS ("Phast Gel Gradient 4-15", Pharmacia).

En las electroforesis se incluía un patron de peso molecular ("Low Molecular Calibration kit", Pharmacia) constituido por una mezcla de las 6 proteínas siguientes: fosforilasa B de musculo de conejo (94 kd), seroalbumina bovina (67 kd), ovoalbumina (43 kd), anhídrido carbonico de extractos bovinos (30 kd), inhibidor de la tripsina (20,1 kd) y  $\alpha$ -lactoalbumina bovina (14,4 kd). El peso molecular de las bandas proteicas de interes obtenidas en los distintos pasos de purificacion se calculo a partir de los geles SDS-PAGE tomando como referencia los coeficientes de

migración de las bandas correspondientes a las proteínas de referencia.

### III.3.2. Condiciones de actividad enzimática en geles de poliacrilamida en presencia de SDS.

En los geles de poliacrilamida en los que se habían separado las proteínas electroforéticamente se detecta la actividad catalasa por el método desarrollado por Gregory y Faller en 1974 modificado por Lina et al. (1981).

#### III.3.2.1. REACTIVOS.

Para la realización de las tinciones se usó el kit de reactivo fosfato potásico 50 mM pH 7.0 a partir del cual se prepararon las siguientes soluciones:

- peróxido de hidrógeno 5 mM
- 10 mg/ml de peroxidasa de rábano
- 0.3 mg/ml de diaminobencidina

#### III.3.2.2. PROCEDIMIENTO.

##### III.3.2.2.1. Detección de la actividad catalasa.

En la tinción negativa en la que aparece teñido todo el gel, excepto la banda correspondiente a la proteína con actividad enzimática. Para su realización se expone el gel en la solución de peroxidasa de rábano durante 45 minutos y después se añade la solución de peróxido de hidrógeno 5 mM que se lava actuar durante 15 minutos. A continuación se lava el gel dos veces con agua destilada y se sumerge en la solución de diaminobencidina hasta completar la tinción.

En caso de que se detecte actividad catalasa aparecerá todo el gel, teñido de un color marrón intenso excepto la zona correspondiente a la banda proteica con actividad enzimática. En caso negativo aparece teñido todo el gel.

### III.4. ENSAYOS INMUNOLÓGICOS CON CATALASAS DE ESTAFILOCOCCOS.

#### III.4.1. Copas utilizadas.

- 1. Salmonella ATCC 12 600
- 2. Salmonella disenteriae M.V. 7, M.V. 7BR, M.V. 43, M.V. 43BR, M.V. 267, M.V. 267BR
- 3. Salmonella cholerae S. 571
- 4. Salmonella ATCC 29 977
- 5. Salmonella ATCC 29 062
- 6. Salmonella ATCC 27 649
- 7. Salmonella ATCC 27 648

### III.4.2. Obtención de sueros hiperinmunes y purificación de inmunoglobulinas frente a la catalasa de S. aureus ATCC 12.600.

#### III.4.2.1. Animales de experimentación.

Se emplearon 2 conejos hembra de raza Nueva Zelanda de 1 meses de edad y un peso aproximado de 2,5 kg al comenzar la experiencia.

Los animales se alojaron en jaulas de acero inoxidable elevadas del suelo y provistas de bebederos automáticos y comederos acoplables con tolva. La alimentación consistía en un pienso compuesto para conejos denominado Sanderscuni Familiar (SANDERS, S.A.) y agua ad libitum.

#### III.4.2.2. Pauta de inoculación.

La inoculación de los conejos se realizó con catalasa electroforéticamente pura a una concentración de 0,25 mg/ml siguiendo la pauta descrita por Rupprecht y Schleifer (1974). El protocolo se presenta en la tabla III.1. La primera inoculación se realizó emulsionando la cantidad de proteína correspondiente en un volumen igual de adyuvante completo de Freund mientras que en las inoculaciones posteriores se emplea adyuvante incompleto de Freund. La emulsión se obtenía agitando durante 2 a 3 minutos la mezcla en un agitador de tubos e, inmediatamente, se procedía a inocular dicha emulsión via subcutánea a cada lado del dorso del conejo en la zona de proyección de la escápula.

#### III.4.2.3. Extracción de sangre y obtención de suero.

Antes de la primera inoculación (día 0) se extrajo sangre de los animales para comprobar la ausencia de reacciones inmunológicas del suero frente a la catalasa purificada. Las siguientes extracciones se realizaron en los días 73, 84, 101 y 116 postinoculación (p.i.). La obtención de sangre se realizaba practicando un corte en la vena marginal de la oreja del animal

Tabla III.1. Pauta seguida para la inmunización de conejos frente a catalasa de *E. aerogenes* ATCC 12600 (Supprecht y Schieffer, 1979).

Día	-1	0	28	42	59	71	74	88	89	101	129	116
mg proteína inocular		0,7	0,4	0,4	0,4		0,4		0,4		0,4	
proteína total inocular (mg)		0,7	1,1	1,5	1,9		2,3		2,7		3,1	
Sangre extraída (en ml)	2					25		50		50		100

e introduciendo el apéndice auricular en un dispositivo de vacío con colector de sangre. Extraída la sangre se obtenía el suero que se conservaba en congelación a  $-15^{\circ}\text{C}$  hasta su empleo.

#### III.4.3.4. Purificación de inmunoglobulinas.

Se siguió la técnica descrita por Hebert et al. (1971) modificada ligeramente. Tras medir exactamente el volumen de suero se añadía un volumen igual de agua destilada y mediante una varilla magnética se favorecía la agitación lenta y constante de la mezcla. En estas condiciones se añadía gota a gota el mismo volumen inicial de suero de una solución saturada de sulfato amónico. A medida que se añadía el sulfato amónico podía apreciarse un incremento de la turbidez. La mezcla se mantenía en agitación lenta a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 12 horas antes de proceder a su centrifugación a 3.000 x y durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Tras la centrifugación se retiraba el sobrenadante y el sedimento se reconstituía en 5 ml de PBS 0.01 M. Esta solución se dializaba durante 24 horas a  $4^{\circ}\text{C}$  en un tubo de celofán tipo 8.32 (Serva) frente a un tampón fosfato sódico 50 mM, pH 7,0.

La solución dializada se aplicó a una columna de cromatografía líquida (100 x 2,6 cm) de ULTROGEL ACA 14, previamente equilibrada con tampón fosfato sódico 50 mM, pH 7,0. La elución se realizó manteniendo una presión y flujo constante de 20 ml/h. Se recogieron fracciones de 2,5 ml en las que se medía su absorbancia a 280 nm para detectar la presencia de proteína.

#### III.4.3. Electrotransferencia de proteínas desde geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) a soportes de nitrocelulosa y análisis inmunoenzimático ("Western blot" e "immunoblotting").

##### III.4.3.1. MATERIALES.

- Papel de filtro
- Membranas de nitrocelulosa (Schleicher & Schüll).
- Cubeta de transferencia eléctrica LKB modelo 2003 "Transphor".

##### III.4.3.1.1. Soluciones y tampones.

##### III.4.3.1.1.1. Tampón de transferencia (Tris-glicina-metanol).

El tiempo de transferencia empleado era de 10 min. Tras, 150 nm  
de distancia del receptor al 114.

NaOH 10% (w/v)	100 g
NaCl 0.9% (w/v)	100 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.1% (w/v)	100 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.1% (w/v)	100 g

Una vez preparada se ajustaba el pH a 8.0. Mantenido en  
refrigeración podía conservarse hasta un mes.

### III.4.3.1.2. Solución de lavado.

La solución de lavado contenía NaCl 0.1% y Tween 20 0.1%.  
Se preparaba mezclando los siguientes componentes en un  
litro de agua.

NaCl	100 g
Tween 20	100 g

### III.4.3.1.3. Tampon de bloqueo.

Se emplea tampon fosfato sodico 0.01 M, 0.15 M NaCl, pH 7.4  
con Tween 20 al 0.5%. Para su preparacion se parte de las  
soluciones siguientes:

Solucion 1	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.01 M	100 g
	NaCl	150 g
	H <sub>2</sub> O destilada	1000 g
Solucion 2	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.01 M	100 g
	NaCl	150 g
	H <sub>2</sub> O destilada	1000 g

Se añade la solución 2 sobre la 1 hasta conseguir un pH de  
7.4. Posteriormente, se añaden 5 ml de Tween 20 por cada litro  
de tampon.

### III.4.3.1.4. Conjugaada anti-especie.

Se utilizó suero anti-inmunoglobulinas de conejo obtenido en  
carde y marcado con peroxidasa (Dakopatts).

### III.4.3.1.5. Solución del sustrato.

Se empleo una solución de diaminobencidina (DAB) preparada de la siguiente forma:

Tampón de D. Osorio sin Tween 20	100 ml.
Diaminobencidina (Sigma)	50 mg
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a. 33% (Panreac)	100 $\mu$ l.

### III.4.3.2. METODOS.

#### III.4.3.2.1. TRANSFERENCIA de proteínas a papel de nitrocelulosa.

Las proteínas separadas electrofóreticamente sobre geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) fueron transferidas a papel de nitrocelulosa de acuerdo con la técnica descrita por Towbin *et al.* (1979). Se emplearon geles de poliacrilamida ultrafinos de 45 x 35 x 0,5 mm con capacidad para ocho muestras.

Una vez realizada la separación electrofóretica mediante el sistema de electroforesis semiautomático "PhastSystem™" (Pharmacia, 1986) los geles se depositaron sobre una membrana de nitrocelulosa previamente equilibrada en tampón de transferencia. El conjunto gel-membrana fue a su vez situado entre dos papeles de filtro previamente equilibrados en tampón de transferencia. A continuación se pasaba, a modo de rodillo, una pipeta sobre los papeles de filtro con el fin de eliminar las burbujas de aire que pudieran interferir en la transferencia de las proteínas.

Antes de introducirlo en la cubeta de transferencia el conjunto papel de filtro-gel-membrana de nitrocelulosa-papel de filtro se situaba entre las dos esponjas tipo "Scotch Brite", colocando el gel del lado del cátodo y la membrana del lado del ánodo. En estas condiciones de transferencia las proteínas migran desde el polo negativo al positivo.

La electrotransferencia se realizaba a una intensidad de corriente constante de 0,3 amperios durante 2 horas. Tras efectuar la transferencia de las proteínas, cuya eficacia se comprobaba teniendo los geles con azul de Coomassie, el papel de nitrocelulosa se pasaba a una cubeta de vidrio tipo "Wertheim" dispuesta sobre un agitador orbital para proceder al lavado de la misma, renovando tres veces el tampón de lavado que se dejaba actuar durante cinco minutos cada vez.

#### III.4.3.2.2. Inmunodetección.

La membrana de nitrocelulosa, una vez lavada, se sumergía en el tampón de bloqueo durante 30 minutos a temperatura ambiente y en agitación suave. A continuación se incubaba en una solución de los anticuerpos anti-catalasa en tampón de bloqueo durante 4 horas a temperatura ambiente con agitación suave. Transcurrido este tiempo se volvía a lavar de nuevo la membrana.

El conjugado empleado fue un suero anti-inmunoglobulinas de conejo, obtenido en cerdo, marcado con peroxidasa. Se utilizó a una dilución 1/1.000 en tampón de lavado. En esta solución se dejó reaccionar la membrana durante 90 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Después de lavar de nuevo la membrana se mantuvo en la solución de sustrato hasta conseguir el revelado de la misma. La reacción se detenía lavando la membrana con agua destilada.

### III.5. ESTUDIOS DE FAGOCITOSIS Y SUPERVIVENCIA INTRACELULAR.

#### III.5.1. MATERIALES.

##### III.5.1.1. Material biológico.

##### III.5.1.1.1. Animales de experimentación.

Como donadores de sangre para el aislamiento de neutrófilos se emplearon los siguientes animales:

Cinco corderos de un mes de edad de raza Castellana alojados en un establo y alimentados con una dieta a base de paja de cereales, alfalfa, pienso compuesto OVISANDERS 0-00 (Sanders S. A.) y agua ad libitum., y

Cuatro ovinos adultos (3 hembras y un macho) entre 2 y 4 años de edad de raza Castellana mantenidos en idénticas condiciones que los corderos, con la salvedad de que el pienso compuesto utilizado para su alimentación era OVISANDERS 0-41 (Sanders S. A.).



Todos los animales en el momento de la realización del presente estudio se encontraban desparasitados y sin alteraciones evidentes de su estado de salud.

### III.5.1.1.2. Sueros animales.

Para la opsonización de las bacterias se emplea una mezcla de sueros inactivados procedentes de ovejas sanas a una dilución 1/16. Previamente se comprobó que los sueros por sí solos no tenían actividad bactericida cuando eran incubados con las suspensiones bacterianas empleadas en este estudio.

### III.5.1.1.3. Cepas bacterianas.

Se utilizaron dos cepas mutantes aerotolerantes de *S. aureus* subsp. *anaerobius* (MVF 7SR y MVF 43SR) obtenidas según el método descrito por De la Fuente et al. (1986, 1987a). Asimismo, con fines comparativos, se emplearon tres cepas de *S. aureus* (MN 27, MN 42 y MN 45) aisladas de casos de mamitis gangrenosa ovina. Estas cepas presentaban  $\alpha$  y  $\beta$  hemólisis, así como todas las características propias de este microorganismo.

### III.5.1.2. Material de laboratorio.

#### III.5.1.2.1. Aparatos.

- Centrífuga de mesa con rotor basculante.
- Baño de agua termostático Thermomix 1442D (Braun).
- Espectrofotómetro (Hitachi 150-20).

#### III.5.1.2.2. Soluciones y tampones.

III.5.1.2.2.1. Solución salina hipertónica estéril al 0,8%.

III.5.1.2.2.2. Solución salina equilibrada de Hanks, sin calcio ni magnesio (HBSS) con la siguiente composición:

NaCl	8,34 g
KCl	0,40 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,20 g
Glucosa	1,00 g
Agua destilada	1,00 l



Una vez disueltos todos los componentes se ajusta el pH a 7.2 y se esteriliza por filtración. Esta solución puede conservarse en congelación a -20 °C.

#### III.5.1.2.2.1. Solución gelatinosa de Hanks al 0,1% (HSSS-gel).

HSSS	100,00 ml
de gelatina (0,1%)	2,00 g

Se añaden los 100 mg de gelatina a 5 ml de HSSS. Se disuelve con calor suave y se completa hasta 100 ml con la misma solución. Se esteriliza por filtración y se almacena en refrigeración a 4 °C.

#### III.5.1.2.2.4. Ficolil-Paque (Pharmacia).

Ficolil-Paque es una mezcla preparada comercialmente con Ficolil 400 (5,1% p/v) y diatrizoato sódico (9% p/v) con una densidad de 1,097 g/ml.

III.5.1.2.2.5. Solución de azul tripan al 0,4% en tampón fosfato potásico 0,0M, pH 7,2.

#### III.5.1.2.2.6. Solución de lisostafina.

Se preparó una solución madre de lisostafina (Sigma, 220 unidades/mg) a una concentración de 500 µg/ml en agua destilada estéril, que se conservaba en congelación hasta su utilización. En el momento de su empleo para los estudios de supervivencia intracelular se hacía una dilución 1:5 en HSSS-gel.

#### III.5.1.2.2.7. Solución de tripsina.

La solución contenía tripsina a una concentración de 25 mg/ml en PBS, pH 8,3. Se conservaba en congelación hasta el momento de su empleo.

### III.5.3. MÉTODOS

#### III.5.3.1. Preparación de la suspensión bacteriana.

Las bacterias a estudiar se cultivaban en caldo BHI y una vez crecidas se lavaban dos veces con HBSS. A continuación se ajustaban espectrofotométricamente a 570 nm a una concentración final aproximada de  $2 \times 10^7$  ufc/ml en HBSS-gel.

#### III.5.2.2. Obtención de polimorfonucleares neutrofilos (PMN) de sangre circulante.

Se siguió la técnica descrita por Boyum (1984) modificada por Johnson *et al.* (1986) con ligeras variaciones.

Para la obtención de PMN se extraían del animal correspondiente 30 ml de sangre mediante un sistema de tubos con vacío (Venoject) que contenían heparina de sodio como anticoagulante (15 unidades/ml). La sangre extraída se centrifugaba en estos mismos tubos a  $400 \times g$  durante 15 minutos a temperatura ambiente.

##### III.5.2.2.1. Obtención de leucocitos.

De la sangre centrifugada se tomaba la capa de leucocitos situada en la interfase entre el plasma y los hematíes con la ayuda de una pipeta Pasteur estéril procurando arrastrar la menor cantidad posible de eritrocitos. Los hematíes contaminantes se lisaban por choque hipotónico añadiendo 3 ml de agua destilada estéril. A los 20 segundos se recuperaba la isotonicidad del medio añadiendo un mililitro de solución salina hipertónica estéril.

Los leucocitos libres de eritrocitos se sedimentaban por centrifugación a  $200 \times g$  durante 10 minutos y se lavaban dos veces resuspendiéndolos en 5 ml de HBSS. Las células obtenidas tras el segundo lavado se resuspendían en 3 ml de HBSS.

##### III.5.2.2.2. Aislamiento de PMN.

La fase siguiente consistía en separar los PMN del resto de las células sanguíneas de la serie blanca mediante la formación de un gradiente de densidad. Los leucocitos obtenidos (3 ml) se depositaban cuidadosamente sobre la superficie de 1,5 ml de Ficoll-Paque contenidos en un tubo estéril de poliestireno de 16 x 100 mm. A continuación se centrifugaba a  $300 \times g$  durante 30 minutos a temperatura ambiente en una centrifuga de mesa con rotor basculante. Tras la centrifugación se observaban las

siguientes capas desde la superficie del tubo hasta el fondo del mismo:

HBSS  
células mononucleares (linfocitos y monocitos)  
Ficol-Paque  
células polimorfonucleares (mayoritariamente PMN).

Una vez retirado el sobrenadante se obtenían las células polimorfonucleares y se sometían a dos lavados con HBSS para posteriormente resuspenderlas en HBSS-gel.

Seguidamente se determinaba cuantitativamente la viabilidad celular por la técnica del azul tripan: las células viables no toman el colorante mientras que las inviables lo retienen. Asimismo, se determinaba el porcentaje de neutrófilos presentes realizando una tinción de Giemsa, que permitía identificar los diferentes tipos celulares: linfocitos, monocitos, basófilos, eosinófilos y neutrófilos. Finalmente se realizaba el recuento de los PMN y se ajustaban a una concentración de  $4 \times 10^6$  células vivas/ml en HBSS-gel.

### III.5.2.3. Estudios de fagocitosis.

Los ensayos in vitro de fagocitosis de S. aureus subsp. anaerobius y S. aureus están basados en la técnica descrita por Hirsch y Strauss (1964) y Watson (1975) modificando el tiempo de incubación. Para ello se realizaban las siguientes mezclas en tubos estériles de poliestireno de 11 x 70 mm:

	Control suero	Problema
Suero inactivado (1/16)	0,8 ml	0,8 ml
Suspensión bacteriana ( $2 \times 10^7$ ufc/ml)	0,2 ml	0,2 ml
Suspensión PMN ( $4 \times 10^6$ células/ml)	0,0 ml	1,0 ml
HBSS-gel	1,0 ml	0,0 ml

La relación entre bacterias y PMN era de aproximadamente entre 1:1 a 3:1.

En primer lugar se añadian la suspension bacteriana y el suero inactivado. La suspension de PMN (ensayos problema) y la solución gelatinosa de Hanks (control de suero) se añadian a continuación.

El numero de bacterias empleadas en cada ensayo se determinaba por recuento en placas de agar BHI en el momento mismo de añadir la suspension de neutrofilos o la solución gelatinosa de Hanks, esto es, a tiempo 0 ( $T_0$ ).

Los tubos se incubaban a continuación a 37 °C en agitación suave en un baño de agua termostático durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo se centrifugaban los tubos a 100 x g durante 8 minutos y se realizaba un recuento de las bacterias presentes en el sobrenadante o bacterias no fagocitadas (T).

#### III.5.2.3.1. Calculo del numero de bacterias fagocitadas.

El porcentaje de bacterias fagocitadas a los 15 minutos de incubación en las condiciones descritas con respecto al numero inicial de bacterias se calculaba de la siguiente forma:

$$X \text{ de bacterias fagocitadas (B)} = \left( \frac{T_0 - T}{T_0} \right) \times 100$$

$T_0$  = N° inicial de bacterias.

$T$  = N° de bacterias presentes en el sobrenadante tras centrifugar.

#### III.5.2.4. Estudios de supervivencia intracelular.

Una vez realizado el recuento de bacterias no fagocitadas se calculaba el porcentaje de bacterias supervivientes intracelulares. Para ello, las células se resuspendían de nuevo y se añadian 100  $\mu$ l de la solución de lisostafina (que destruye los estafilococos no fagocitados presentes en el sobrenadante) y se dejaba actuar en las mismas condiciones descritas durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo se añadian 160  $\mu$ l de la solución de tripsina (4 mg) para inactivar la lisostafina añadida previamente y se centrifugaba a 100 x g durante 8 minutos. Tras la centrifugación se realizaba un recuento de las bacterias presentes en el sobrenadante para confirmar que todas ellas habían sido destruidas con el tratamiento con lisostafina.

A continuación se incubaba la mezcla a 37 °C durante 90 minutos y se tomaban muestras cada 30 minutos para realizar recuentos de las bacterias supervivientes intracelulares a los diferentes tiempos (30, 60 y 90 minutos). En estos recuentos se tomaban 0,1 ml de la suspensión celular y se añadían a 0,9 ml de agua destilada estéril a 0 °C. Para favorecer la destrucción celular de los PMN, además del choque hipotónico con agua destilada estéril, la mezcla se agitaba intensamente en un agitador de vasos.

El número de bacterias supervivientes intracelulares se expresaba como porcentaje con respecto al número de bacterias recuperadas.

Todas las pruebas se realizaron por cuadruplicado dos a dos en días diferentes.

En la figura III.2 y en la III.3 se resumen la pauta empleada para la obtención de PMN de sangre circulante y la metodología seguida en los estudios de fagocitosis y supervivencia intracelular respectivamente.

#### III.4. METODOS ESTADISTICOS.

Con los resultados obtenidos en los estudios de fagocitosis se obtiene uno de los valores estadísticos más representativos, como es la media aritmética ( $\bar{X}$ ) = su error estándar ( $\pm S_{\bar{X}}$ ) (Lacort, 1976).

En los estudios de significancia, para determinar si dos resultados o parámetros eran significativamente diferentes o no, se aplicó la prueba "t" de Student. Esta prueba permite comparar las medias cuando el número de datos de al menos uno de los parámetros es inferior a 30. Cuando los valores de t exceden del límite "t", para una seguridad del 95%, correspondiente a  $v$  grados de libertad ( $v = n_1 + n_2 - 2$ ), se consideran que mantienen diferencias significativas. Si el valor de t es inferior a este límite la diferencia entre las dos medias se considera como no significativa.  $t$  representa los valores particulares de la distribución del parámetro  $t$  correspondiente a los límites de seguridad del 95%;  $n_1$  y  $n_2$  representan el número de datos de cada uno de los parámetros y  $v$  los grados de libertad (Weiss y

Figura III.2. Pauta empleada en la obtención de PMN de sangre circulante.

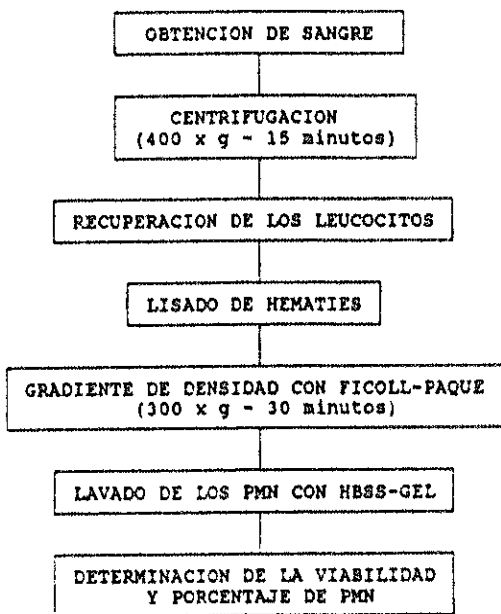
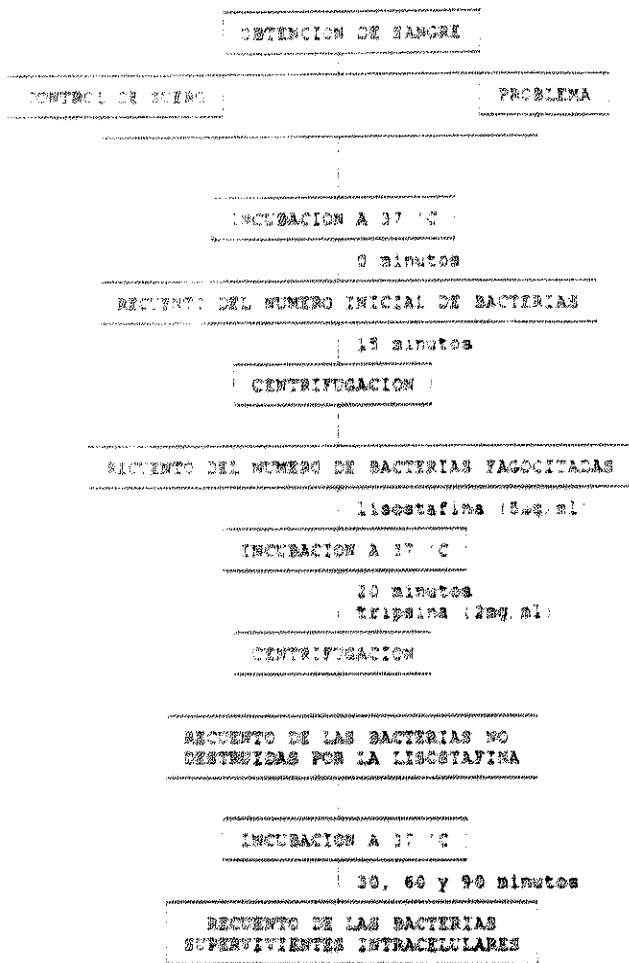


Figura III.9. Metodologías utilizadas en los estudios de fagocitosis y supervivencia intracelular.





Hassett, 1976). Esta prueba se empleo para determinar si existian diferencias significativas o no entre los porcentajes de fagocitosis y de supervivencia intracelular entre las diferentes capas y los diferentes animales estudiados.

Asimismo, para determinar el grado de correlacion entre el porcentaje de bacterias fagocitadas y la supervivencia intracelular se empleo el coeficiente de correlacion lineal de Pearson (r, Weiss y Hassett, 1976).

### III.6.1. Formulas empleadas:

(1) Media aritmetica. 
$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

(2) Error estandar. 
$$SE = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

(3) Coeficiente de variacion. 
$$CV = \frac{100s}{\bar{x}}$$

(4) "t" de Student. 
$$t = \frac{\bar{x} - \bar{x}_0}{\frac{s}{\sqrt{n}}}$$

(5) Coeficiente de correlacion. 
$$r = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sqrt{(\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n})(\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n})}}$$

s, es la desviacion tipo o desviacion cuadratica media.

## III. 7. ESTUDIOS EXPERIMENTALES EN ANIMALES.

### III.7.1. Inoculaciones experimentales en cabritos.

#### III.7.1.1. Animales de experimentacion.

Se emplearon nueve cabritos de raza Murciana-Granadina de dos meses de edad y un peso aproximado de once kilogramos al iniciar la experiencia. Los animales se alojaron en establos y su alimentación consistía en una dieta a base de paja de cereales, alfalfa, pienso compuesto Caprisanders G-00 (Sanders S.A.) y agua ad libitum. Todos los animales se encontraban sin alteraciones evidentes en su estado de salud al iniciar las inoculaciones experimentales.

III.7.1.2. Cepa de estafilococo y obtención de cultivos.

Para la inoculación de los animales se empleó una cepa de S. aureus subsp. anaerobius denominada MVF 207 que había sido aislada del contenido purulento de un ganglio submaxilar de un cordero de raza Churra de seis meses de edad que padecía la enfermedad de los abscesos. Este microorganismo presentaba todas las características típicas de esta subespecie de S. aureus.

La inoculación de los animales se realizó con cultivos de la cepa en caldo BHI incubados a 37 °C durante aproximadamente 18 horas para obtener un crecimiento en fase estacionaria. Previamente a la inoculación se realizaba un recuento del número de ufc/ml mediante el método de diluciones decimales.

III.7.1.3. Vías de inoculación y dosis.

Según la vía de inoculación empleada se realizaron los siguientes grupos:

- Dos de los animales se inocularon vía subcutánea en la región del flanco detrás de la última costilla (0,5 ml) y en la extremidad torácica del mismo lateral por encima de la articulación carpiana (0,3 ml) con la cepa MVF 207 a una concentración de  $3,5 \times 10^7$  ufc/ml.

- Otros dos animales se inocularon intramuscularmente en la región femoral (0,5 ml) con la cepa MVF-207 a una concentración de  $3,5 \times 10^7$  ufc/ml.

- En tres cabritos se practicaron 3 ó 4 incisiones superficiales en la piel del labio inferior y en una de las extremidades torácicas por encima de la articulación carpiana

(ver fig. IV.19). Para realizar la inoculación, se impregnaron las heridas con una torunda empapada en caldo BHI con S. aureus subsp. anarcticus MVF 207 a una concentración de  $3,5 \times 10^7$  ufc/ml.

- Los dos animales restantes se utilizaron como testigos, es decir, no fueron inoculados.

Durante la experiencia se alojaron juntos en un establo los dos animales inoculados por vía subcutánea, los dos inoculados vía intramuscular y uno de los animales no inoculados. En otro establo se alojaron los animales en los que se habían practicado las incisiones junto con el otro animal testigo.

#### III.7.1.4. Seguimiento clínico de la infección.

Una vez practicadas las inoculaciones de los animales, se realizaba diariamente un seguimiento clínico prestando especial atención a la exploración de los puntos de inoculación y de los ganglios linfáticos sobre los que drenan las zonas inoculadas. Si se formaban abscesos y fistulizaban se procedía a la toma de muestras del contenido purulento para su estudio microbiológico.

Una vez desarrolladas las lesiones típicas o transcurrido mes y medio postinoculación (p.i.), se sacrificaban los animales con pentobarbital sódico. En la necropsia se tomaron muestras de las lesiones encontradas para su posterior estudio tanto histopatológico como microbiológico.

#### III.7.2. Inoculaciones experimentales en corderos.

##### III.7.2.1. Animales de experimentación.

Se emplearon seis corderos de raza Castellana de dos meses de edad y un peso aproximado de 10 kilogramos al comenzar la experiencia. Los animales se alojaron en establos y su alimentación consistía en una dieta a base de paja de cereales, alfalfa, pienso compuesto Ovisanders 0-00 (Sanders S.A.) y agua ad libitum.

##### III.7.2.2. Cepas empleadas y obtención de cultivos.

Ademas de la cepa empleada en la inoculacion de los cabritos MTF 297 se empleo una cepa de S. aureus denominada MD 23 aislada de un caso de mamitis gangrenosa.

La extension de cultivos se realizo en caldo BHI tal como se ha descrito en el apartado III.7.1.2.

### III.7.2.3. Vias de inoculacion y dosis.

Los animales se distribuyeron de la siguiente forma:

- En cuatro de los animales se practicaron 3 o 4 incisiones superficiales en la piel del labio inferior y en una de las extremidades toracicas por encima de la articulacion carpiana. La inoculacion se realizo impregnando las heridas con una torunda esteril empapada en el caldo de cultivo correspondiente. Dos de los animales se inocularon con la cepa de S. aureus MD 23 ( $1 \times 10^7$  ufc/ml) y los dos restantes con S. aureus susp. anaerobius MTF 297 ( $2.1 \times 10^7$  ufc/ml).

- Dos de los corderos se emplearon como testigos, por lo que no se inocularon.

La distribucion de los animales se realizo en dos establos independientes, situando en uno de ellos los dos animales inoculados con la cepa MD 23 y un animal testigo y en el otro los dos corderos inoculados con la cepa MTF 297 junto con el otro animal no inoculado.

### III.7.2.4. Seguimiento clinico de la infeccion.

Una vez inoculados los animales se realizaba diariamente un seguimiento clinico como se ha descrito previamente en el apartado III.7.2.4.

## III.7.3. Inoculaciones experimentales en ovejas en lactancia.

### III.7.3.1. MATERIALES.

#### III.7.3.1.1. Material biologico.

##### III.7.3.1.1.1. Animales de experimentacion.

Se emplearon siete ovejas de raza Manchega entre dos y cuatro años de edad en periodo de lactación y de las que los corderos habían sido destetados aproximadamente quince días antes. Los animales se alojaban en establos separados y su alimentación consistió en una dieta a base de paja de cereales, alfalfa, pienso compuesto Ovisanders O-41 (Sanders S.A.) y agua ad libitum.

Antes de realizar las inoculaciones se comprobaba que los animales estuvieran correctamente desparasitados y sin padecer proceso patológico alguno. Se puso especial interés en la palpación de la ubre y de los ganglios linfáticos retromamarios para detectar posibles anomalías. Asimismo, antes de inocular a los animales se realizaron controles bacteriológicos y recuentos de células somáticas de la leche.

#### III.7.3.1.1.2. Cepa de estafilococo empleada.

Los animales se inocularon con la cepa de S. aureus subsp. anaerobius MVF 207.

#### III.7.3.1.2. Material de laboratorio.

##### III.7.3.1.2.1. Soluciones y reactivos.

##### III.7.3.1.2.1.1. Solución conservadora para las muestras de leche.

Las muestras de leche se conservaban desde su recogida hasta la realización de los recuentos celulares añadiendo una solución con la siguiente composición:

Cloranfenicol	1,50 g
Azida de sodio	36,00 g
Citrato trisódico 5,5 hidratado	-5,00 g
Azul de bromofenol	0,35 g
Etanol	10,00 ml
Agua destilada estéril (pH>6)	1000,00 ml

La solución se prepara disolviendo primero el cloranfenicol en el etanol. Después se añaden 600 ml de agua destilada y el citrato y la mezcla se lleva a un baño termostático a 50 °C para favorecer su disolución. Cuando todos los componentes se han disueltos se deja enfriar y se completa hasta un litro con agua

destilada. Finalmente se añade el azúcar de transferencia, se conserva en refrigeración a 4 °C.

### III.7.1.2.1.1. Reactivo para la realización de la prueba de difteria para mastitis (DMT).

Para la realización del DMT se emplea un reactivo comercial con púrpura de bromocresol como indicador de pH y la siguiente composición:

Agua destilada	100 ml
Agua destilada	100 ml
Agua destilada	100 ml

### III.7.1.2.1.2. Inoculación de las vacas.

Los animales a emplear se seleccionan en el caso de las vacas de la lechería en el apartado III.7.1.2. En algunas ocasiones las bacterias producidas se inyectan a las vacas con soluciones salina fisiológica estéril y se administran experimentalmente a las lactantes que seada en esta misma solución antes de inocular a las animales.

### III.7.1.2.2. Inoculación de los animales.

En cada animal se inocula la cepa de la enfermedad en una de las tetas. Se realiza la teta con la inoculación. La teta de inoculación se realiza con un tubo estéril. La inoculación se realiza por la aguja de una cámara de plástico estéril para cada uno de los animales. La piel de la glandula mamaria se lava con agua y jabón y se desinfecta con alcohol antes de introducir la cámara por el pezón.

En la tabla III.2. se detalla para cada uno de los animales la teta inoculada, el medio utilizado para vehicular los entofitos y la dosis empleada.

### III.7.1.2.3. Seguimiento clínico de los animales.

Tabla III.2. Medio utilizado para vehicular *S. aureus* subsp. *anaerobius* (MVF 207) y dosis empleadas en las inoculaciones intramamarias de ovejas en lactación.

Oveja	Medio empleado	Dosis (ufc/ml)	Mama inoculada
R	SSF	1 ml ( $3,8 \times 10^4$ )	dcha.
L	SSF	0,75 ml ( $1,7 \times 10^4$ )	izda.
M	SSF	2 ml ( $1,3 \times 10^6$ )	dcha.
B	BHI	1,5 ml ( $1,2 \times 10^8$ )	izda.
N	BHI	1,5 ml ( $1,2 \times 10^8$ )	izda.
LB	BHI	1,5 ml ( $3 \times 10^8$ )	izda.
LN	BHI	1,5 ml ( $3 \times 10^8$ )	izda.

SSF: solución salina fisiológica (las bacterias se habfan lavado previamente en la misma solución);  
BHI: caldo infusión cerebro corazón.

Los controles clínicos y analíticos de los animales se realizaban desde cinco días antes de la inoculación hasta el sacrificio de los mismos. Los controles se hacían diariamente a la hora del ordeño, salvo en las primeras 72 horas p.p. en que se realizaban cada 8 horas, y consistían en:

- a. Medida de la temperatura rectal.
- b. Examen clínico de la glándula mamaria.

Se realizó por inspección y palpación de la glándula con el fin de detectar inflamación, calor local, edema, así como cualquier alteración de la consistencia detectable por palpación. Asimismo, se palpaban los ganglios retromamarios para comprobar el grado de inflamación de los mismos.

- c. Examen bacteriológico de la leche.

Diariamente se recogían muestras de leche de ambas mamas (leche de ordeño) para llevar a cabo el examen bacteriológico y el recuento del número de microorganismos presentes por diluciones decimales en agua de peptona al 0.1% y siembra de 100 µl en agar sangre de carne al 5% y en agar Baird Parker selectivo para estafilococos. Las placas se incubaban a 37°C durante 48 a 72 horas tanto en aerobiosis como en microaerofilia (sistema de jarra con vela). Al cabo de este tiempo se realizaban los recuentos del número de microorganismos presentes en la muestra de leche y los resultados se expresaban en ufu/ml. Sobre estos medios de cultivo se comprobaba asimismo la posible presencia de otros microorganismos contaminantes diferentes a los empleados en la inoculación.

- d. Prueba de California para el diagnóstico de mastitis.

En esta prueba se mezclaban en un gotillo de fondo oscuro los mililitros de la muestra de leche con dos mililitros del reactivo California. A continuación se procedía a la observación y puntuación de la prueba según la tabla III.3.

- e. Recuento de células somáticas con técnicas instrumentales.



Tabla III.3. Puntuación empleada en la interpretación de los resultados del CMT (Smith y Roginsky, 1977).

Puntuación	Denominación	Descripción	Color
0	Negativa	La muestra permanece + vida	Grasoso
1(+)	Dudoso	Ligera agregación con tendencia a desaparecer con el movimiento de la muestra en el poquito.	Gras viscoso
2(+)	Debilitado positivo	Agregación apreciable con formación de coágulo.	Gras viscosa
3(++)	Claramente positivo	Formación inmediata de gel que se deshace con el movimiento de la muestra en el poquito.	Viscoso
4(+++)	Fuertemente positivo	Desarrollo de una superficie convexa en el gel que se adhiera a las paredes del poquito.	Viscoso

El recuento de células somáticas se hizo por el método "Fossomatic" basado en la tinción fluorescente del ADN con bromuro de etidio y en la medida de la fluorescencia emitida. Una vez recogidas las muestras de leche en contenedores, se mezclaban 10 ml de leche con 0,1 ml de la solución conservadora. Esto permitía mantener las muestras a 4 °C hasta una semana antes de enviarlas al Laboratorio Pecuário de Eskalmedí de la Diputación Foral de Alava (Vitoria), lugar donde se realizaron los recuentos con un aparato Fossomat 100/119.

#### f) Estudio de las lesiones.

Los animales se sacrificaban a determinados intervalos de tiempo por degüello y posterior sangría para realizar la necropsia sistemática, ordenada y completa de los mismos. Se tomaron muestras de todas las lesiones encontradas para su posterior estudio microbiológico e histopatológico.

### III.8. PROCESADO DE LAS MUESTRAS PARA SU ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO.

#### III.8.1. MATERIAL.

##### III.8.1.1. APARATOS.

- Inclinador de parafina automático "British American Optical" modelo "Histokinette".
- Microtomo de rotación Reichert-Jung modelo 1110 Biscont.
- Unidad formadora de bloques Reichert-Jung modelo Histostat 8114.

##### III.8.1.2. REACTIVOS Y SOLUCIONES.

###### III.8.1.2.1. Formal tamponado a pH 7,0.

NaOH 20% w/v	100 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 g
Formol 37% en agua	100,00 ml
Agua destilada	900,00 ml

###### III.8.1.2.2. Albumina glicerinada de Mayer.

Cloro de niquel	50 ml
Gliserina	50 ml
Albumina	1 gramo

Se mezcla la clara de huevo con la glicerina y se filtra con papel de filtro y presión negativa para acelerar el proceso. A continuación se añade el cristal de timol y se conserva en refrigeración.

#### III.8.1.2.3. Hematoxilina de Mayer.

Cristales de hematoxilina	1,00 g
Yodato sódico	0,20 g
Alumbre potásico	50,00 g
Acido cítrico	1,00 g
Hidrato de cloral	50,00 g
Agua destilada	1,00 l

Se disuelve el alumbre en el agua destilada sin calentar y se añade la hematoxilina. Una vez disuelta se añade el yodato sódico, el ácido cítrico y el hidrato de cloral.

#### III.8.1.2.4. Eosina al 1%.

Eosina Y	1 g
Acido acético	1-2 gotas
Agua destilada	100 ml

#### III.8.1.2.5. Eukitt (Kindler GmbH y Co., Friburgo)

III.8.1.2.6. Paraplast plus Ref. HRI 9685-502004 (Monoject Scientific).

### III.8.2. MÉTODOS.

#### III.8.2.1. Fijado de las muestras.

Las muestras recogidas durante la necropsia eran inmediatamente fijadas en una solución tamponada de formol al 10%. La duración de la etapa de fijación era como mínimo de 24 horas. Posteriormente, se procedía a su tallado en piezas de inclusión. Las muestras talladas eran introducidas en "cassettes" de inclusión identificados con la clave correspondiente a cada experiencia y sometidas nuevamente a fijación durante un periodo que oscilaba entre 12 y 24 horas.

#### III.8.2.2. Inclusión.

El proceso de inclusión en parafina se realizó según la técnica detallada a continuación:

1. Anestesia éterica 70% I	4 horas y 30 minutos
2. Anestesia éterica 70% II	2 horas
3. Anestesia éterica 80%	1 hora
4. Anestesia éterica 80%	1 hora
5. Anestesia éterica 100% I	1 hora
6. Anestesia éterica 100% II	1 hora
7. Bañado de metano	30 minutos
8. Benzol I	45 minutos
9. Benzol II	30 minutos
10. Paraplast I	1 hora
11. Paraplast II	2 horas y 30 minutos
12. Paraplast III	1 hora

El medio de inclusión empleado (Paraplast) tenía un punto de fusión de 55-57 °C. La inclusión se hizo de manera automática con un incluser "Histomixette" ("British American Optical").

La sección de los bloques de parafina se realizó mediante una Unidad Histostat 8015 (Reichert Jung).

#### III.3.2.3. Microtomea.

Las placas incluidas en parafina (Paraplast) fueron cortadas con el microtomo de rotación Bicut 1130 (Reichert Jung) al que se emplearon cuchillas desechables R15 (Feather). El grosor de las secciones histológicas eran de 4-6  $\mu$ m.

Una vez obtenidas del microtomo, las secciones histológicas eran depositadas sobre un baño termostático de agua a 37 °C con el fin de hidratárlas. Posteriormente, eran recogidas en portales desechables, que previamente habían sido recubiertos con una sustancia adhesiva (albumina glicerinada de Mayer).

Finalmente, una vez montadas, las preparaciones eran secadas en estufa a 60 °C durante al menos 12 horas.

#### III.3.2.4. Técnica histológica.

##### III.3.2.4.1. Hematoxilina-eosina (H-E):

1. Deshidratación en alcohol	30 min. (x2)
2. Inmersión en solución de propileno de propileno decolorante	
3. Lavado con agua	3 minutos
4. Hematoxilina de Mayer	3 minutos

- |   |             |
|---|-------------|
| 5. Lavar con agua                                   | 10 minutos  |
| 6. Eosina y al 1%                                   | 1 minuto    |
| 7. Deshidratación en alcohol etílico de 96% y 100%  | 5 min. (x2) |
| 8. Aclaramiento en xileno                           | 5 min. (x2) |
| 9. Montaje de las secciones histológicas con Eukitt |             |

### III.8.2.4.2. Tinción de Gram:

- |  |             |
|--|-------------|
| 1. Desparafinado e hidratación de las secciones histológicas |             |
| 2. Solución cristal violeta-oxalato                          | 30 segundos |
| 3. Lavar con agua  |             |
| 4. Solución de Weigert                                       | 20 segundos |
| 5. Lavar con agua  |             |
| 6. Decolorar con acetona                                     | 5 segundos  |
| 7. Lavar con agua  |             |
| 8. Tinción de contraste con rojo neutro al 1%                | 1 minuto    |
| 9. Lavar con agua y secar con papel de filtro                |             |
| 10. Deshidratación en acetona I y II                         |             |
| 11. Aclaramiento en xileno                                   |             |
| 12. Montaje con Eukitt                                       |             |

---

# Resultados.

#### IV.1. RESULTADOS DE LOS ENSAYOS DE INDUCCION DE MUTANTES CATALASA POSITIVOS A PARTIR DE CEPAS DE S. AUKAMA subsp. ARRABICHIMI.

##### IV.1.1. Induccion de mutaciones con rayos U.V. de 245 nm. de longitud de onda.

En los multiples intentos realizados con esta tecnica de induccion de mutaciones, e independientemente de los tiempos empleados (3, 10, 45, 60, 120 y 180 segundos), no se obtuvieron mutantes catalasa positivos con ninguna de las cuatro cepas empleadas tanto marcadas con el plasmido con resistencia al tetraciclico como sin marcar.

##### IV.1.2. Induccion de mutaciones con nitroseguanidina.

En los intentos de induccion empleando nitroseguanidina a una concentracion de 0,1 mg/ml tampoco se consiguio aislar mutante alguno con actividad catalasa sobre mas de 10.000 colonias probadas.

#### IV.2. RESULTADOS DE LA PURIFICACION DE CATALASA DE S. AUKAMA ATCC 12.400.

##### IV.2.1. Precipitacion del extracto celular crudo con una mezcla de etanol y cloroformo.

El extracto con actividad catalasa parcialmente purificado por precipitacion con la mezcla de etanol y cloroformo presentara una coloracion amarillenta. Dicha coloracion fue practicamente constante en todos los pasos de la purificacion por lo que resulto util en la identificacion orientativa de las fracciones con actividad catalasa. No obstante, dicha actividad se confirmaba por el metodo colorimetrico de Sinha (1972) en todas las fracciones obtenidas en los diferentes pasos de la pauta de purificacion de la catalasa.

##### IV.2.2. Tecnicas cromatograficas.

##### IV.2.2.1. Cromatografia de exclusion molecular.

El extracto proteico obtenido tras la precipitacion con la mezcla de etanol y cloroformo se paso por una columna de cromatografia liquida de Nitrogel ACA 14 (LFB). Este gel tiene un rango de separacion molecular de 20 a 150 kilodaltos. En el cromatograma obtenido tras la elucion con tampon fosfato sodico 50 mM, pH 7.0 se detectaron tres fracciones proteicas mayoritarias o picos de absorcion maxima a 280 nm (fig. IV.1). La medida simultanea de la absorcion a 405 nm permitio detectar al grupo hemo unicamente en el pico intermedio correspondiente a las fracciones 104 a 122 (fig. IV.1). La determinacion de la actividad catalasa por el metodo de Minna confirmo que dicha actividad se localizaba exclusivamente en las fracciones 104 a 122.

#### IV.2.2.2. Cromatografia de Intercambio Ionico.

Las fracciones 104 a 122 obtenidas en la cromatografia de exclusion molecular se reunieron y se aplicaron a una columna de cromatografia liquida DEAE-Sephacel (Pharmacia). Este gel es un debil intercambiador anionico con un limite de exclusion molecular de 10<sup>6</sup> daltons. Una vez aplicada la muestra, la columna se lavaba con tampon fosfato potasio 0,01 M, 0,2 M NaCl, pH 7,0. Generalmente era necesario hacer pasar por la columna un volumen del tampon de lavado aproximadamente dos veces superior al volumen de la columna para arrastrar las proteinas no retenidas por el intercambiador anionico (absorcion 0 a 280 nm). A continuacion se eluyen las proteinas retenidas con un gradiente lineal de NaCl 0,2-0,5 M en el mismo tampon de lavado. En estas condiciones de elucion, como puede verse en la fig. IV.2, se obtuvieron cinco picos de absorcion maxima a 280 nm. A 405 nm la absorcion fue positiva unicamente en el tercer pico (fracciones 127 a 147) (fig. IV.2). Asimismo, la actividad catalasa se detecto exclusivamente en las fracciones 127 a 147 correspondientes al tercer pico.

#### IV.2.3. Rendimiento de la purificacion de la catalasa de *S. aureus* ATCC 12.600.

A continuacion se expresa la cantidad de proteina total obtenida (en mg) en los diferentes estadios de la pauta de purificacion de la catalasa de *S. aureus* ATCC 12.600 partiendo de las celulas crecidas en 10 litros de medio de cultivo. Asimismo, se expresa el porcentaje de proteina obtenido para cada



Figura IV.1. Separación por cromatografía de exclusión molecular (MILTROGEL AHA 34) del extracto celular precipitado con la mezcla de etanol y cloroformo.

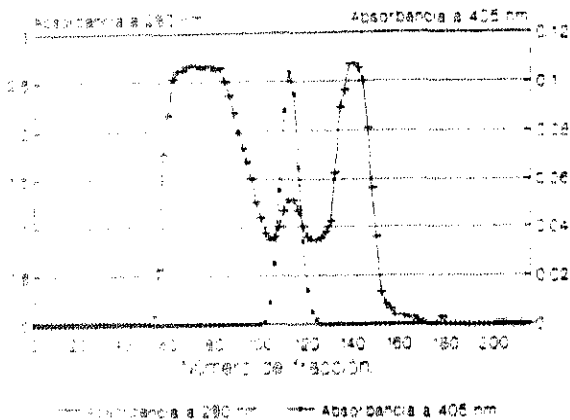
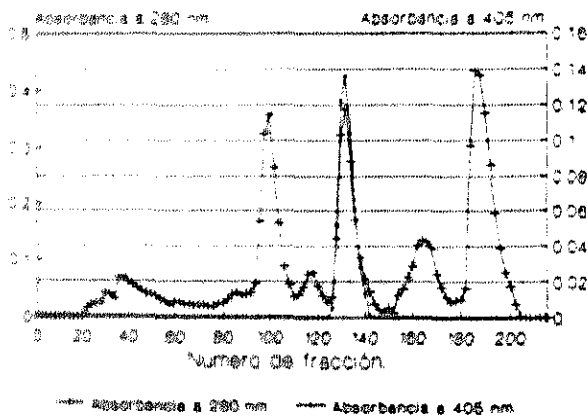


Figura IV.2. Separación por cromatografía de intercambio iónico (DEAE-SXPACEL) de las fracciones con actividad catalasa obtenidas en la cromatografía de exclusión molecular.



uno de los diferentes grados de purificación con respecto a la cantidad de proteína obtenida tras la ultracentrifugación de los extractos celulares crudos.

	Proteína total (mg/grafos)	Porcentaje
Ultracentrifugación de los extractos celulares	119,90	88,36
Extracción con la mezcla de etanol y cloroformo	139,90	79,61
Cromatografía de exclusión molecular (CULTROBE, ADA 34)	37,26	17,16
Cromatografía de intercambio iónico (DEAE-Sephacel)	9,26	4,16

#### IV.2.4. Estudio del grado de pureza por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE).

Las fracciones con actividad catalasa obtenidas tras la cromatografía de intercambio iónico se reunieron y se analizaron por SDS-PAGE. Como puede apreciarse en el gel de la fig. IV.17, en el carril correspondiente a dichas fracciones se detecta una única banda de proteína situada ligeramente por debajo de la seroalbumina bovina. El peso molecular de esta banda proteica se estimó en 60.000 daltons. Por lo tanto, la catalasa obtenida de *S. aureus* ATCC 12.600 se consideró electroforéticamente pura, se utilizó como antígeno para producir anticuerpos específicos frente a la catalasa de *S. aureus* en conejos.

#### IV.3. RESULTADOS DE LA DETECCIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE SDS.

Empleando la técnica en SDS-PAGE desarrollada por Lecroy y Friedovien (1974) modificada por Claret *et al.* (1984) se detectó en los extractos celulares crudos y parcialmente purificados de *S. aureus* ATCC 12.600 una banda de proteína con actividad catalasa.

En los extractos celulares crudos o parcialmente purificados de las cepas de *S. aureus* subsp. *anaerobius* probadas (MVF 1, MVF 7SR, MVF 43, MVF 43SR, MVF 207 y MVF 207SR) no se logró detectar actividad catalasa.

94 -  
67 -  
43 -  
30 -  
20.1 -  
14.4 -

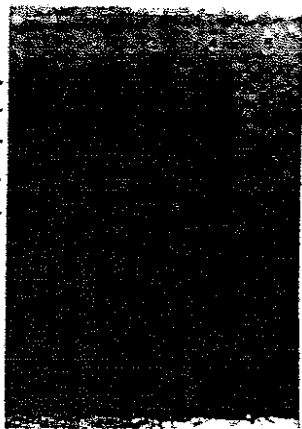


Figura IV.3. Electroforesis en gel almidón 50% PAGE con un gradiente de concentración del R al 25% de izquierda a derecha: patina de bajo peso molecular (1); extracto celular crudo de la cepa de *S. aureus* ATC 12.600 (2) y de la cepa de *S. aureus* subsp. *anopheles* MVI 45R (3 y 4), catalasa de *S. aureus* ATC 12.600 tras los diferentes pasos de purificación (5).

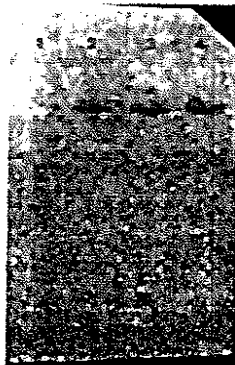


Figura IV.4. Transferencia electroforética. De izquierda a derecha: extracto celular crudo de la cepa de *S. aureus* subsp. *anopheles* MVI 45 (1); catalasa electroforéticamente pura de *S. aureus* ATC 12.600 empleada como testigo de reacción positiva (2); extracto celular crudo de la cepa de *S. aureus* ATC 12.600 (3 y 4).

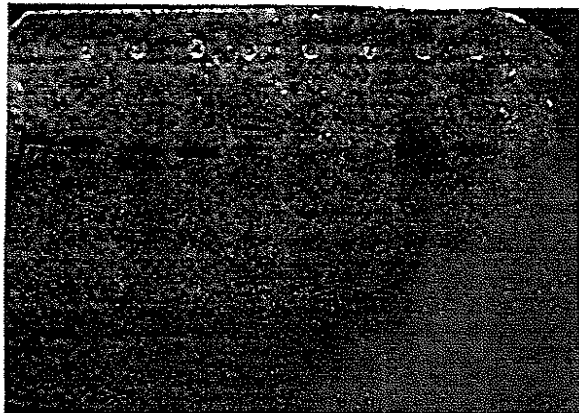


Figura IV.5. Transferencia electroforética. De izquierda a derecha: extractos celulares crudos de *S. xylophilus* ATC 29.971 (1), de *S. griseus* ATC 29.062 (2), de *S. capitis* ATC 27.840 (3), de *S. capitis* (CM 3.573) (4), de *S. simulans* ATC 27.845 (5), de *S. aureus* subsp. *anopheles* MVI 45R (6 y 7), y de *S. aureus* ATC 12.600 (8); catalasa electroforéticamente pura de *S. aureus* ATC 12.600 empleada como testigo de reacción positiva (9).

#### IV.4. RESULTADOS DE LOS ENSAYOS INMUNOLOGICOS CON CATALASAS DE ESTAFILOCOCCOS.

##### IV.4.1. Electrotransferencia de proteínas desde gels de poliacrilamida (SDS-PAGE) a soportes de nitrocelulosa y análisis inmunoenzimático.

Los ensayos previos realizados para poner a punto la técnica pusieron de manifiesto que los sueros de los dos conejos obtenidos antes de comenzar la pauta de inoculación no reaccionaban en el análisis inmunoenzimático con la catalasa electroforéticamente pura de *S. aureus* ATCC 12.600. Uno de estos sueros fue utilizado en los experimentos posteriores como testigo negativo. Por el contrario, todos los sueros obtenidos de los dos conejos una vez comenzado el protocolo de inmunización (a los 73, 83, 110 y 116 días de la primera inoculación) reconocieron perfectamente en el análisis inmunoenzimático la banda de 60 kd de catalasa electroforéticamente pura, dando una señal intensa y específica (fig. IV.4). Además, con todos estos sueros se obtuvieron resultados similares, por lo que se seleccionó uno de ellos, el correspondiente a la primera extracción (día 73 de la pauta de inmunización) del conejo 1, para purificar las inmunoglobulinas a emplear en los sucesivos experimentos de electrotransferencia y análisis inmunoenzimático.

La dilución óptima de las inmunoglobulinas purificadas para la realización de la técnica fue 1:1.000.

En la fig IV.4 puede observarse que las inmunoglobulinas purificadas reconocieron una única banda proteica de idéntico peso molecular a la catalasa electroforéticamente pura en un extracto celular crudo de *S. aureus* ATCC 12.600, pero no reaccionaron con proteína alguna del extracto crudo de *S. aureus* subsp. *anaerobius* MVF 41SR. En experimentos análogos realizados con extractos crudos y parcialmente purificados (hasta el paso de precipitación con la mezcla de etanol y cloroformo) de las cepas de *S. aureus* subsp. *anaerobius* MVF 7, MVF 7SR, MVF 41, MVF 207 y MVF 207SR tampoco se detectó banda alguna de reacción.

Adicionalmente, y con fines comparativos, se comprobó la capacidad de las inmunoglobulinas anti-catalasa de *S. aureus* de reconocer específicamente en extractos crudos las catalasas de distintas especies de estafilococos coagulasa negativas: *S.*

caprae, S. xylosus, S. sciuri, S. capitis y S. simulans. En todos los casos las inmunoglobulinas anti-catalasa de S. aureus reaccionaron con una banda proteica de movilidad electroforética semejante a la de la catalasa electroforéticamente pura de S. aureus ATCC 12.600 (fig. IV.5). En el caso de S. simulans se detectó una segunda banda de reacción de mayor peso molecular aunque de menor intensidad (fig. IV.5).

#### IV.5. RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS DE FAGOCITOSIS Y SUPERVIVENCIA INTRACELULAR.

Los resultados de los estudios de fagocitosis y supervivencia intracelular de las diferentes cepas se reflejan en las tablas IV.1 a IV.5. En cada tabla se exponen los resultados de una de las cepas con los PMN de cada uno de los animales donadores (corderos 1 a 5 y adultos 1 a 4). Los resultados de las bacterias fagocitadas se expresan en tanto por ciento con respecto al número inicial de microorganismos añadidos a tiempo 0, mientras que los porcentajes de bacterias supervivientes se calculan con respecto a los microorganismos fagocitados a los 15 minutos.

En las tablas IV.1 a IV.5 sólo aparecen tres de los cuatro valores obtenidos con cada uno de los animales. Esto se ha hecho para partir en los análisis estadísticos del mismo número de resultados en todos los casos, ya que en ocasiones fue preciso prescindir de algún valor debido a contaminaciones. Cuando hubo lugar los valores descartados fueron los extremos.

##### IV.5.1. Análisis estadístico de los resultados de fagocitosis.

Para facilitar el estudio estadístico se han elaborado las tablas IV.6 a IV.9 a partir de los resultados de fagocitosis expuestos en la tabla IV.1 a IV.5.

En la tabla IV.6 se expresa la media aritmética con su error estándar para un coeficiente de seguridad del 99% de los resultados de fagocitosis de cada una de las cepas de estafilococos investigadas considerando los valores de fagocitosis obtenidos con los PMN de los animales jóvenes en conjunto. La media de cada una de las cepas se comparó una a una con la de las

Tabla IV.1. Resultados de fagocitosis y supervivencia intracelular de *S. aureus* subsp. *anaerobius* MVF 7SR en función del animal donador de PMN.

	% FAGOCITOSIS	% SUPERVIVENCIA INTRACELULAR			
	15 minutos	30 minutos	60 minutos	90 minutos	
CORDERO 1	55,55	0,36	0,95	1,07	
	57,40	0,52	0,75	1,43	
	54,45	0,75	0,92	0,99	
CORDERO 2	58,04	0,55	0,72	0,80	
	46,58	1,20	1,37	1,41	
	51,28	0,41	1,10	1,16	
CORDERO 3	50,34	0,98	1,53	1,13	
	50,86	0,83	0,90	0,71	
	50,57	0,97	0,94	1,20	
CORDERO 4	61,89	0,33	0,51	0,59	
	59,84	0,44	0,62	0,70	
	60,79	0,39	0,57	0,65	
CORDERO 5	50,64	0,73	1,58	1,10	
	48,32	1,17	1,27	1,10	
	48,53	1,09	1,26	1,31	
ADULTO 1	69,01	0,79	0,72	0,99	
	70,91	0,84	0,74	0,25	
	69,80	0,82	0,73	0,89	
ADULTO 2	63,37	0,72	0,68	1,69	
	64,00	0,73	0,50	1,61	
	65,47	0,75	0,70	1,43	
ADULTO 3	67,54	0,79	0,71	1,17	
	64,42	0,73	0,69	1,56	
	65,99	0,76	0,70	0,98	
ADULTO 4	67,04	0,78	0,71	1,20	
	63,63	0,72	0,68	1,66	
	66,53	0,77	0,71	1,10	

Tabla IV.2. Resultados de fagocitosis y supervivencia intracelular de *S. aureus* subsp. *anaerobius* MVF 43SR en función del animal donador de PMN.

	I FAGOCITOSIS	II SUPERVIVENCIA INTRACELULAR			
	15 minutos	30 minutos	60 minutos	90 minutos	
CORDERO 1	42,96	1,40	1,57	1,61	
	46,29	0,52	0,62	1,43	
	43,78	1,43	1,92	2,09	
CORDERO 2	52,89	0,84	1,01	1,07	
	56,84	0,61	0,84	0,70	
	56,02	0,99	0,84	0,90	
CORDERO 3	60,00	0,41	0,84	0,43	
	58,00	0,55	0,73	0,80	
	55,98	0,66	0,84	0,91	
CORDERO 4	61,13	0,37	0,55	0,63	
	59,71	0,45	0,63	0,71	
	60,49	0,41	0,59	0,66	
CORDERO 5	51,32	0,39	1,04	0,62	
	51,31	0,95	1,10	1,16	
	50,18	0,99	1,16	1,22	
ADULTO 1	74,20	0,89	0,76	0,21	
	84,00	0,73	0,50	1,61	
	69,76	0,61	0,73	0,97	
ADULTO 2	69,90	0,73	0,84	1,53	
	57,12	0,90	0,71	1,38	
	66,09	0,76	0,70	1,35	
ADULTO 3	74,37	0,89	0,76	0,21	
	69,76	0,82	0,73	0,85	
	69,96	0,83	0,73	0,87	
ADULTO 4	76,66	0,94	0,94	0,12	
	73,60	0,88	0,76	0,44	
	70,94	0,83	0,73	0,86	

Tabla IV.3. Resultados de fagocitosis y supervivencia intracelular de *S. aureus* MN 27 en función del animal donador de PMN.

	% FAGOCITOSIS	% SUPERVIVENCIA INTRACELULAR			
	15 minutos	30 minutos	60 minutos	90 minutos	
CORDERO 1	60,29	0,13	0,34	0,38	
	58,11	0,30	0,31	0,36	
	58,48	0,30	0,31	0,37	
CORDERO 2	58,92	0,21	0,32	0,56	
	62,09	0,33	0,36	0,39	
	66,36	0,66	0,41	0,41	
CORDERO 3	56,43	0,36	0,29	0,36	
	55,49	0,55	0,39	0,51	
	60,26	0,28	0,42	0,28	
CORDERO 4	74,51	0,42	0,64	0,62	
	77,07	0,44	0,54	0,57	
	72,58	0,40	0,49	0,44	
CORDERO 5	63,19	0,19	0,17	0,39	
	61,52	0,33	0,36	0,38	
	62,24	0,33	0,31	0,39	
ADULTO 1	61,62	0,84	1,25	0,47	
	65,68	0,73	1,01	0,45	
	64,53	0,77	1,08	0,54	
ADULTO 2	71,43	0,59	0,89	0,68	
	75,56	0,75	0,80	0,75	
	71,42	0,59	0,89	0,68	
ADULTO 3	77,27	0,44	0,32	0,81	
	65,62	0,74	1,01	0,56	
	71,58	0,59	0,66	0,69	
ADULTO 4	57,71	0,94	1,76	0,39	
	61,72	0,84	1,74	0,48	
	62,79	0,81	1,18	0,50	





Tabla IV.4. Resultados de fagocitosis y supervivencia intracelular de *S. aureus* MN 42 en función del animal donador de RBC.

	I FAGOCITOSIS	II SUPERVIVENCIA INTRACELULAR			
	75 minutos	30 minutos	60 minutos	90 minutos	
CONDICIÓN 1	54,64	0,26	0,24	0,33	
	56,22	0,29	0,29	0,44	
	59,90	0,29	0,26	0,35	
CONDICIÓN 2	59,47	0,19	0,17	0,16	
	62,74	0,33	0,17	0,26	
	66,42	0,32	0,34	0,38	
CONDICIÓN 3	68,75	0,50	0,40	0,38	
	68,92	0,28	0,46	0,48	
	67,19	0,52	0,59	0,34	
CONDICIÓN 4	60,44	0,43	0,42	0,50	
	56,92	0,29	0,28	0,35	
	60,89	0,32	0,36	0,38	
CONDICIÓN 5	58,49	0,30	0,37	0,37	
	65,11	0,34	0,35	0,39	
	67,22	0,32	0,35	0,38	
ABRIL 70 1	63,08	0,80	0,73	0,73	
	64,69	0,76	1,07	0,54	
	66,72	0,73	0,98	0,57	
ABRIL 70 2	67,62	0,85	1,25	0,47	
	67,79	0,83	1,26	0,46	
	68,34	0,80	1,15	0,51	
ABRIL 70 3	66,69	0,63	0,63	0,63	
	68,64	0,69	0,62	0,46	
	68,98	0,73	0,99	0,57	
ABRIL 70 4	74,87	0,52	0,50	0,74	
	74,87	0,50	0,46	0,76	
	72,69	0,66	0,59	0,71	

Tabla IV.3. Resultados de fagocitosis y supervivencia intracelular de *S. aureus* MN 45 en función del animal donador de PMN.

	I FAGOCITOSIS	I SUPERVIVENCIA INTRACELULAR			
	15 minutos	30 minutos	60 minutos	90 minutos	
CORDERO 1	57,29	0,49	0,45	0,33	
	54,94	0,28	0,27	0,33	
	57,42	0,38	0,39	0,36	
CORDERO 2	56,67	0,29	0,31	0,32	
	50,38	0,22	0,26	0,30	
	55,44	0,28	0,28	0,33	
CORDERO 3	65,00	0,35	0,39	0,40	
	65,00	0,35	0,40	0,39	
	63,49	0,32	0,37	0,34	
CORDERO 4	62,36	0,11	0,36	0,39	
	63,74	0,34	0,36	0,40	
	64,00	0,34	0,38	0,40	
CORDERO 5	61,83	0,33	0,35	0,36	
	65,64	0,56	0,40	0,40	
	63,17	0,34	0,37	0,39	
ADULTO 1	73,53	0,81	0,34	0,73	
	70,83	0,83	0,80	0,67	
	70,22	0,62	0,74	0,66	
ADULTO 2	70,12	0,57	0,81	0,66	
	63,12	0,80	1,10	0,43	
	66,84	0,77	0,94	0,99	
ADULTO 3	72,30	0,56	0,62	0,70	
	72,07	0,57	0,63	0,70	
	71,01	0,60	0,69	0,68	
ADULTO 4	70,72	0,68	0,96	0,84	
	70,85	0,60	0,88	0,67	
	70,17	0,57	1,08	1,21	

Tabla IV.6. Media aritmética con su error estándar para un coeficiente de seguridad del 99% de los resultados de fagocitosis de cada una de las cinco cepas estudiadas considerando los valores obtenidos con los PMN de los animales jóvenes en conjunto.

CEPA DE ESTAFILOCOCO	MEDIA ARITMETICA	ERROR ESTANDAR
MF 72R	53,67	±3,53
MF 432R	53,65	±4,30
M 27	63,76	±4,71
M 42	60,94	±3,28
M 45	60,44	±3,32

Tabla IV.7. Media aritmética con su error estándar para un coeficiente de seguridad del 99% de los resultados de fagocitosis de cada una de las cinco cepas de estafilococos estudiadas considerando los valores obtenidos con los PMN de los animales adultos en conjunto.

CEPA DE ESTAFILOCOCO	MEDIA ARITMETICA	ERROR ESTANDAR
MF 72R	66,67	±1,78
MF 432R	69,97	±3,06
M 27	67,26	±4,77
M 42	67,07	±3,73
M 45	70,16	±2,13

Tabla. IV.8. Media aritmética con su error estándar para un coeficiente de seguridad del 99% de los resultados de fagocitosis de las cepas MVF 7SR y MVF 43SR consideradas como un único grupo (*S. aureus* subsp. *anaerobius*) para cada uno de los nueve animales donadores de PMN.

ANIMAL	MEDIA ARITMETICA	ERROR ESTANDAR
CORDERO 1	50,07	±5,95
CORDERO 2	53,60	±5,31
CORDERO 3	54,29	±5,33
CORDERO 4	60,64	±1,00
CORDERO 5	50,21	±1,93
ADULTO 1	69,44	±4,05
ADULTO 2	65,25	±1,31
ADULTO 3	68,62	±4,26
ADULTO 4	69,34	±5,00

Tabla. IV.9. Media aritmética con su error estándar para un coeficiente de seguridad del 99% de los resultados de fagocitosis de las cepas MN 27, MN 42 y MN 45 consideradas como un único grupo (*S. aureus*) para cada uno de los nueve animales donadores de neutrófilos.

ANIMAL	MEDIA ARITMETICA	ERROR ESTANDAR
CORDERO 1	57,01	±1,74
CORDERO 2	59,18	±4,26
CORDERO 3	63,39	±4,60
CORDERO 4	65,74	±6,64
CORDERO 5	62,26	±1,78
ADULTO 1	66,70	±5,64
ADULTO 2	67,17	±4,75
ADULTO 3	70,33	±3,30
ADULTO 4	68,42	±5,62

otras cuatro con la prueba t de Student (coeficiente de seguridad del 99%) encontrándose diferencias significativas entre las cepas de S. aureus subsp. anaerobius (MVF 7SR: 53,67  $\pm$ 3,53 y MVF 43SR: 53,85  $\pm$ 4,30) y S. aureus (MN 27: 63,16  $\pm$ 4,71; MN 42: 60,94  $\pm$ 3,28; MN 45: 60,44  $\pm$ 3,32).

La tabla IV.7 refleja los mismos parámetros estadísticos que la IV.6 para cada una de las cepas investigadas considerando los valores de fagocitosis obtenidos en los ensayos con PMN de los animales adultos en conjunto. Con los valores de esta tabla se encontraron diferencias significativas en los resultados de fagocitosis entre las cepas MVF 7SR (66,47  $\pm$ 1,78) y MVF 43SR (69,97  $\pm$ 3,06) y entre las cepas MVF 7SR (66,72  $\pm$ 1,78) y MN 45 (70,14  $\pm$ 2,13).

Siguiendo con los estudios de significancia de los resultados expuestos en las tablas IV.6 y IV.7 se compararon los resultados de fagocitosis de las cepas de S. aureus subsp. anaerobius obtenidos con los PMN de corderos (parte superior de la tabla IV.6) con los obtenidos con los PMN de adultos (parte superior de la tabla IV.7) encontrándose diferencias significativas muy claras en los porcentajes de fagocitosis de dichas cepas entre los PMN de los corderos y de los adultos. Asimismo, al comparar los resultados de fagocitosis de las cepas de S. aureus obtenidos con los PMN de los corderos (parte inferior de la tabla IV.6) con los de los adultos (parte inferior de la tabla IV.7) se apreciaron diferencias significativas en todos los casos excepto entre la cepa MN 27/PMN-corderos con las cepas MN 27/PMN-adultos y MN 42/PMN-adultos.

En la tabla IV.8 se ha calculado la media aritmetica con su error estándar para un coeficiente de seguridad del 99% de los resultados de fagocitosis de las cepas MVF 7SR y MVF 43SR consideradas como un único grupo (S. aureus subsp. anaerobius) para cada uno de los animales utilizados como donadores de neutrófilos (corderos 1 a 5 y adultos 1 a 4). Al igual que en los casos anteriores se comparó la media de cada uno de los animales una a una con las del resto mediante la prueba t de Student (coeficiente de seguridad del 99%), encontrándose diferencias significativas en la fagocitosis de S. aureus subsp. anaerobius entre todos los animales jóvenes y todos los adultos. Además, comparando los valores de los animales jóvenes entre sí se observaron diferencias significativas entre el cordero 4 (60,64

$\pm 1,00$ ) y el resto de los animales de este grupo (cordero 1: 50,07  $\pm 8,03$ ; cordero 2: 53,60  $\pm 5,31$ ; cordero 3: 54,29  $\pm 5,30$  y cordero 5: 50,21  $\pm 1,93$ ) (fig. IV.6a). Haciendo lo propio con los valores de los animales adultos no se encontraron diferencias significativas entre ellos (fig. IV.6a).

Los valores de la tabla IV.9 se han obtenido como los de la tabla IV.8, considerando las cepas MN 27, MN 42 y MN 45 como un grupo único (S. aureus). En la figura IV.6b se representan gráficamente todas las diferencias significativas encontradas entre los diferentes animales. Comparando los resultados de cada uno de los corderos con cada uno de los adultos aparecen diferencias significativas en todos los casos excepto entre el cordero 4 (65,74  $\pm 6,64$ ) con todos los adultos (adulto 1: 66,70  $\pm 3,64$ ; adulto 2: 67,17  $\pm 4,75$ ; adulto 3: 70,33  $\pm 3,32$  y adulto 4: 68,42  $\pm 5,62$ ) y entre el cordero 3 (63,39  $\pm 4,60$ ) con los adultos 1 (66,70  $\pm 3,64$ ) y 2 (67,17  $\pm 4,75$ ) (figura IV.6b). Además, comparando los valores de los corderos entre sí aparecen diferencias significativas entre el cordero 1 con el resto de los corderos excepto con el 2 (figura IV.6b). Los animales adultos no mostraron diferencias significativas entre sí.

Comparando los resultados de fagocitosis de los corderos con S. aureus subsp. anaerobius (parte superior de la tabla IV.8) con los de los mismos animales con S. aureus (parte superior de la tabla IV.9) se encontraron las diferencias significativas que aparecen representadas gráficamente en la figura IV.6c. Como puede apreciarse en dicha figura únicamente no se hallaron diferencias significativas entre el cor-4/ana (cordero 4 con S. aureus subsp. anaerobius) con cor-2/aur (cordero 2 con S. aureus), cor-3/aur, cor-4/aur y cor-5/aur y entre el cor-3/ana con cor-1/aur y cor-2/aur. Finalmente, haciendo la misma comparación en el caso de los animales adultos entre los resultados con S. aureus subsp. anaerobius (parte inferior de la tabla IV.8) y los resultados con S. aureus (parte inferior de la tabla IV.9) no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los casos.

#### IV.5.2. Análisis estadístico de los resultados de supervivencia intracelular.

Al igual que en el caso de la fagocitosis, para facilitar el análisis estadístico, se han elaborado las tablas IV.10 a

Figura IV.6a. Representación gráfica de las diferencias significativas (sombreado) encontradas entre los diferentes animales en los estudios de fagocitosis frente a las cepas de *S. aureus* subsp. *anaerobius*.

CORDERO 2								
CORDERO 3								
CORDERO 4								
CORDERO 5								
ADULTO 1								
ADULTO 2								
ADULTO 3								
ADULTO 4								
	CORDERO 1	CORDERO 2	CORDERO 3	CORDERO 4	CORDERO 5	ADULTO 1	ADULTO 2	ADULTO 3

Figura IV.6b. Representación gráfica de las diferencias significativas (sombreado) encontradas entre los diferentes animales en los estudios de fagocitosis frente a las cepas de *S. aureus*.

CORDERO 2								
CORDERO 3								
CORDERO 4								
CORDERO 5								
ADULTO 1								
ADULTO 2								
ADULTO 3								
ADULTO 4								
	CORDERO 1	CORDERO 2	CORDERO 3	CORDERO 4	CORDERO 5	ADULTO 1	ADULTO 2	ADULTO 3

Figura IV.6c. Representación gráfica de las diferencias significativas (sombreado) encontradas en los estudios de fagocitosis entre *S. aureus* subsp. *anaerobius* y *S. aureus* cuando se emplean PMN de corderos.

<i>S. aureus</i> subsp. <i>anaerobius</i>	CORDERO 1						
	CORDERO 2						
	CORDERO 3						
	CORDERO 4						
	CORDERO 5						
	CORDERO 1	CORDERO 2	CORDERO 3	CORDERO 4	CORDERO 5	<i>S. aureus</i>	

(\*) Los resultados muestran diferencias significativas para un coeficiente de seguridad del 95%.

IV.13 a partir de los resultados de supervivencia intracelular a los 30, 60 y 90 minutos expuestos en las tablas IV.1 a IV.5.

En la tabla IV.10 se expresa la media aritmética con su error estándar para un coeficiente de seguridad del 99% de los resultados de supervivencia intracelular a los 30, 60 y 90 minutos de cada una de las cepas de estafilococos investigadas considerando los valores obtenidos con los PMN de los animales jóvenes en conjunto. En los tres tiempos considerados se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de supervivencia intracelular entre las cepas de S. aureus subsp. anaerobius y las de S. aureus.

La tabla IV.11 es análoga a la IV.10 pero, en este caso, se consideran los valores de supervivencia intracelular obtenidos en los ensayos con PMN de los animales adultos en conjunto a los 30, 60 y 90 minutos. A los 30 minutos solamente se hallaron diferencias significativas entre las cepas MVF 43SR ( $0,80 \pm 0,07$ ) y la cepa MN 45 ( $0,66 \pm 0,06$ ) y a los 60 minutos únicamente entre la cepa MVF 7SR ( $0,68 \pm 0,03$ ) y la MN 27 ( $1,04 \pm 0,28$ ). Sin embargo, a los 90 minutos se detectaron diferencias significativas entre las cepa MVF 7SR ( $1,21 \pm 0,29$ ) y todas las cepas de S. aureus (MN 27:  $0,58 \pm 0,09$ ; MN 42:  $0,59 \pm 0,07$  y MN 45:  $0,71 \pm 0,13$ ).

Continuando con los estudios de significancia de los resultados expuestos en las tablas IV.10 y IV.11 se compararon los resultados de supervivencia intracelular a los 30, 60 y 90 minutos de las cepas de S. aureus subsp. anaerobius obtenidos con los PMN de corderos (parte superior de la tabla IV.10) con los obtenidos con los PMN de adultos (parte superior de la tabla IV.11) encontrando que no hay diferencias significativas en ninguno de los casos excepto, a los 60 minutos, entre la cepa MVF 7SR/adu con la MVF 7SR/cor y con la MVF 43SR/cor de S. aureus subsp. anaerobius. Asimismo, al comparar los resultados de supervivencia intracelular a los 30, 60 y 90 minutos de las cepas de S. aureus obtenidos con los PMN de los corderos (parte inferior de la tabla IV.10) con los de los adultos (parte inferior de la tabla IV.11) se apreciaron diferencias significativas muy claras en los porcentajes de supervivencia intracelular de dichas cepas entre los PMN de los corderos y de los adultos.



Tabla IV.10. Media aritmética con su error estándar para un coeficiente de seguridad del 99% de los resultados de supervivencia intracelular a los 30, 60 y 90 minutos considerando los valores obtenidos con los PMN de los animales jóvenes en conjunto.

CEPA	30 minutos	60 minutos	90 minutos
MPF 732	0,71 ±0,02	0,99 ±0,22	1,02 ±0,18
MPF 4322	0,73 ±0,03	0,95 ±0,24	0,99 ±0,29
MI 27	0,74 ±0,07	0,57 ±0,06	0,42 ±0,05
MI 42	0,31 ±0,03	0,33 ±0,04	0,35 ±0,03
MI 45	0,31 ±0,06	0,35 ±0,05	0,36 ±0,01

Tabla IV.11. Media aritmética con su error estándar para un coeficiente de seguridad del 99% de los resultados de supervivencia intracelular a los 30, 60 y 90 minutos considerando los valores obtenidos con los PMN de los animales adultos en conjunto.

CEPA	30 minutos	60 minutos	90 minutos
MPF 732	1,75 ±0,01	0,68 ±0,03	1,21 ±0,29
MPF 4322	0,26 ±0,07	0,74 ±0,06	0,86 ±0,37
MI 27	0,77 ±0,09	1,04 ±0,28	0,58 ±0,09
MI 42	0,71 ±0,07	0,87 ±0,20	0,59 ±0,07
MI 45	0,56 ±0,06	0,82 ±0,13	0,71 ±0,13

Tabla IV.12. Media aritmética con su error estándar para un coeficiente de seguridad del 99% de los resultados de supervivencia intracelular a los 30, 60 y 90 minutos de las cepas MYF 7SR y MYF 43SR consideradas como un único grupo (*S. aureus* subsp. *ANAKOBINA*) para cada uno de los nueve animales donadores de PMN.

ANIMAL	30 minutos	60 minutos	90 minutos
CORDERO 1	0,83 ±0,49	1,12 ±0,53	1,43 ±0,41
CORDERO 2	0,76 ±0,31	0,96 ±0,24	1,06 ±0,27
CORDERO 3	0,73 ±0,24	0,96 ±0,29	0,86 ±0,29
CORDERO 4	0,39 ±0,03	0,57 ±0,03	0,65 ±0,03
CORDERO 5	0,86 ±0,29	1,23 ±0,19	1,08 ±0,24
ADULTO 1	0,81 ±0,05	0,69 ±0,09	0,82 ±0,34
ADULTO 2	0,69 ±0,05	0,66 ±0,10	1,49 ±0,06
ADULTO 3	0,60 ±0,05	0,72 ±0,02	0,94 ±0,46
ADULTO 4	0,82 ±0,07	0,73 ±0,09	0,69 ±0,58

Tabla IV.13. Media aritmética con su error estándar para un coeficiente de seguridad del 99% de los resultados de supervivencia intracelular a los 30, 60 y 90 minutos de las cepas MN 27, MN 42 y MN 45 consideradas como un único grupo (*S. aureus*) para cada uno de los nueve animales donadores de PMN.

ANIMAL	30 minutos	60 minutos	90 minutos
CORDERO 1	0,28 ±0,05	0,31 ±0,03	0,36 ±0,02
CORDERO 2	0,30 ±0,11	0,29 ±0,06	0,34 ±0,07
CORDERO 3	0,36 ±0,07	0,43 ±0,06	0,38 ±0,05
CORDERO 4	0,34 ±0,07	0,40 ±0,10	0,42 ±0,07
CORDERO 5	0,33 ±0,07	0,33 ±0,05	0,38 ±0,01
ADULTO 1	0,76 ±0,05	0,92 ±0,16	0,59 ±0,07
ADULTO 2	0,73 ±0,09	1,01 ±0,14	0,56 ±0,09
ADULTO 3	0,61 ±0,06	0,70 ±0,16	0,64 ±0,07
ADULTO 4	0,68 ±0,11	1,01 ±0,39	0,78 ±0,19

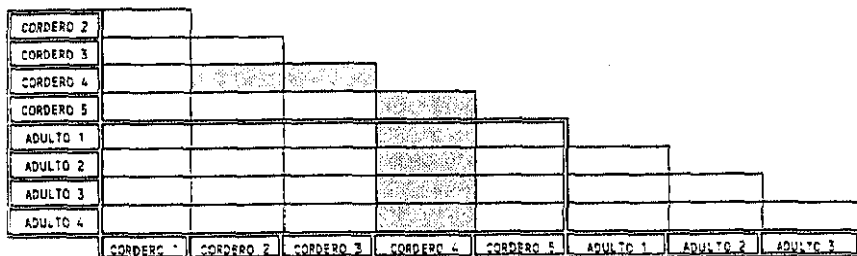
En la tabla IV.12 se ha calculado la media aritmetica con su error estandar para un coeficiente de seguridad del 99% de los resultados de supervivencia intracelular a los 30, 60 y 90 minutos de las cepas MVF 7SR y MVF 43SR consideradas como un unico grupo (*S. aureus* subsp. *anaerobius*) para cada uno de los animales donadores de PMN. Como puede apreciarse en la fig. IV.7.1 las diferencias significativas encontradas entre los diferentes animales a los 30 (fig. IV.7.1.a), 60 (fig. IV.7.1.b) y 90 minutos (fig. IV.7.1.c) fueron heterogeneas en funcion de la edad de los animales. Es decir, no se detectaron diferencias significativas en los porcentajes de supervivencia intracelular de *S. aureus* subsp. *anaerobius* entre el grupo de animales jovenes y el de adultos.

La tabla IV.13 es semejante a la IV.12 considerando las cepas MN 21, MN 43 y MN 45 como un unico grupo (*S. aureus*). En los tres tiempos considerados (30, 60 y 90 minutos) se hallaron diferencias significativas en los porcentajes de supervivencia intracelular de *S. aureus* entre todos los animales jovenes y todos los adultos (fig. IV.7.2). Como puede observarse en la fig. IV.7.2, adicionalmente se detectaron diferencias significativas, a los 30 minutos entre el adulto 1 (0,76  $\pm$  0,65) y el 2 (0,61  $\pm$  0,64) y a los 60 minutos entre el cordero 3 (0,43  $\pm$  0,66) y los corderos 1 (0,31  $\pm$  0,33) y 2 (0,29  $\pm$  0,66) y entre el adulto 2 (0,61  $\pm$  0,64) y el 1 (0,76  $\pm$  0,65).

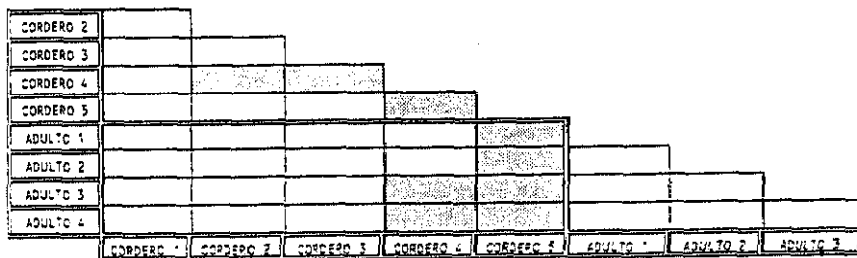
Comparando los resultados de supervivencia intracelular a los 30, 60 y 90 minutos de los corderos con *S. aureus* subsp. *anaerobius* (parte superior de la tabla IV.12) con los de los mismos animales con *S. aureus* (parte superior de la IV.13) se encontraron diferencias significativas en todos los casos excepto, a los 30 minutos, entre el cor-4 ana (cordero 4 con *S. aureus* subsp. *anaerobius*) con cor-2/aur (cordero 2 con *S. aureus*), cor-3/aur, cor-4 aur y cor-5/aur. Finalmente, haciendo la misma comparacion en el caso de los animales adultos entre los resultados con *S. aureus* subsp. *anaerobius* (parte inferior de la tabla IV.12) y los resultados con *S. aureus* (parte inferior de la tabla IV.13) las diferencias significativas encontradas fueron bastante dispares por lo que aparecen reflejadas en la figura IV.8.

Figura IV.7.1. Representación gráfica de las diferencias significativas (sombreado) encontradas entre los diferentes animales en los estudios de supervivencia intracelular de las cepas de *S. aureus* subsp. *anaerobius* a los 30 (7.1.a), 60 (7.1.b) y 90 minutos (7.1.c).

7.1.a.



7.1.b.



7.1.c.

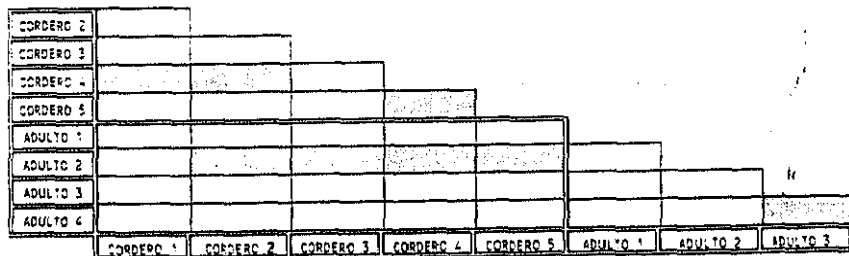
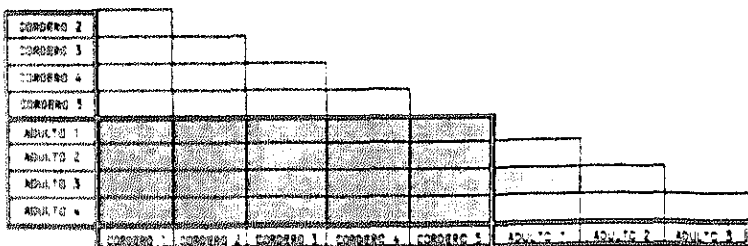
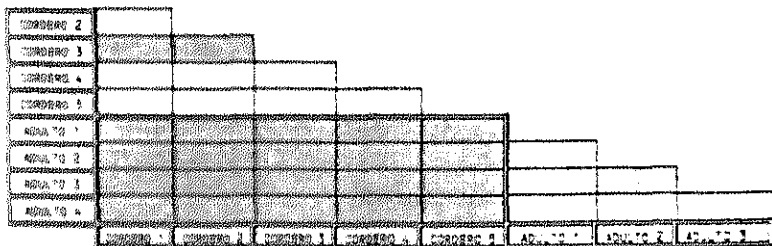


Figura IV.2.2. Representación gráfica de las diferencias significativas (sombreado) encontradas entre los diferentes animales en los estudios de supervivencia intracelular de las hepas de *S. aureus* a los 30 (7.2.a), 60 (7.2.b) y 90 minutos (7.2.c).

7.2.a.



7.2.b.



7.2.c.

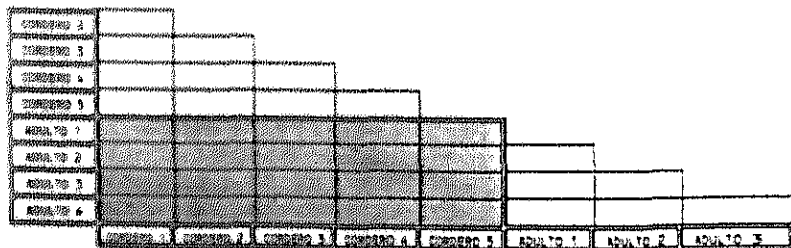


Figura IV.8. Representación gráfica de las diferencias significativas (sombreado) encontradas entre *S. aureus* subsp. *anaerobius* y *S. aureus* en los estudios de supervivencia intracelular cuando se emplean PMN de animales adultos a los 30 (8a), 60 (8b) y 90 (8c) minutos.

8a.

1. <i>S. aureus</i> subsp. <i>anaerobius</i>	ADULTO 1				
	ADULTO 2				
	ADULTO 3				
	ADULTO 4				
	ADULTO 1	ADULTO 2	ADULTO 3	ADULTO 4	
1. <i>S. aureus</i>					

8b.

2. <i>S. aureus</i> subsp. <i>anaerobius</i>	ADULTO 1				
	ADULTO 2				
	ADULTO 3				
	ADULTO 4				
	ADULTO 1	ADULTO 2	ADULTO 3	ADULTO 4	
2. <i>S. aureus</i>					

8c.

3. <i>S. aureus</i> subsp. <i>anaerobius</i>	ADULTO 1				
	ADULTO 2				
	ADULTO 3				
	ADULTO 4				
	ADULTO 1	ADULTO 2	ADULTO 3	ADULTO 4	
3. <i>S. aureus</i>					

#### IV.5.3. Analisis del grado de correlacion entre fagocitosis y supervivencia intracelular.

En este estudio cuando nos referimos a S. aureus subsp. anaerobius o a S. aureus estamos expresando los resultados de fagocitosis considerando a las dos (MVF 7SR y MVF 43SR) o a las tres cepas (MN 27, MN 42 y MN 45) de cada una de las bacterias en conjunto. Lo mismo ocurre al hablar del grupo de animales juvenes (corderos 1 a 5) y del de adultos (adultos 1 a 4). Los resultados del estudio del grado de correlacion entre los estafilococos fagocitados en 15 minutos y las bacterias supervivientes intracelulares transcurridos 30, 60 y 90 minutos aparecen reflejados cuantitativamente en las tablas IV.14 y IV.15 y de forma grafica en las figuras IV.9 y IV.10.

La fagocitosis y la supervivencia intracelular de S. aureus subsp. anaerobius con PMN obtenidos de sangre circulante de animales juvenes (corderos 1 a 5) presentan unos valores de correlacion inversa de -0,80, -0,83 y -0,81 a los 30, 60 y 90 minutos de incubacion respectivamente (tabla IV.14). Estos valores del coeficiente de correlacion indican que a medida que disminuye el porcentaje de S. aureus subsp. anaerobius fagocitados aumenta el porcentaje de los mismos supervivientes intracelularmente, y que estos porcentajes de supervivencia son inferiores a los 30 minutos de incubacion (fig. IV.9a) que transcurridos 60 (fig. IV.9b) y 90 minutos (fig. IV.9c).

En la tabla IV.14 tambien se muestran los coeficientes de correlacion entre los resultados de fagocitosis de S. aureus y su supervivencia intracelular a los 30 (0,38), 60 (0,62) y 90 minutos (0,81) con PMN obtenidos de sangre circulante de los animales juvenes. Estos coeficientes de correlacion de signo opuesto a los obtenidos con S. aureus subsp. anaerobius expresan una correlacion directa, esto es, cuando aumenta el porcentaje de fagocitosis aumenta tambien el porcentaje de supervivencia intracelular de S. aureus como puede apreciarse en las figuras IV.9d (a los 30 minutos), fig. IV.9e (a los 60) y IV.9f (a los 90).

En la tabla IV.15 se expresan los coeficientes de correlacion entre los porcentajes de fagocitosis y de supervivencia intracelular de S. aureus subsp. anaerobius y de S. aureus cuando los ensayos se hicieron con PMN de sangre circulante de animales

Tabla IV.14. Coeficiente de correlación entre las bacterias (*S. ANKARA* subsp. *ANAEROBIUM* y *S. ANKARA*) fagocitadas y las supervivientes intracelulares transcurridos 30, 60 y 90 minutos cuando los ensayos se realizaron con PMN obtenidos de sangre circulante del grupo de animales jóvenes (corderos 1 a 5).

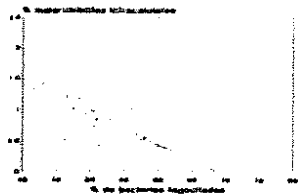
BACTERIA y TIEMPO DE INCUBACION		COEFICIENTE DE CORRELACION	COVARIANZA
<i>S. ANKARA</i> subsp. <i>ANAEROBIUM</i>	30 minutos	-0,89	-1,42
	60 minutos	-0,83	-1,64
	90 minutos	-0,87	-1,61
<i>S. ANKARA</i>	30 minutos	0,38	0,21
	60 minutos	0,63	0,38
	90 minutos	0,51	0,21

Tabla IV.15. Coeficiente de correlación entre las bacterias (*S. ANKARA* subsp. *ANAEROBIUM* y *S. ANKARA*) fagocitadas y las supervivientes intracelulares transcurridos 30, 60 y 90 minutos cuando los ensayos se realizaron con PMN obtenidos de sangre circulante del grupo de animales adultos (adultos 1 a 4).

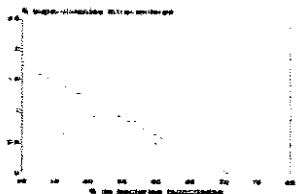
BACTERIA y TIEMPO DE INCUBACION		COEFICIENTE DE CORRELACION	COVARIANZA
<i>S. ANKARA</i> subsp. <i>ANAEROBIUM</i>	30 minutos	0,75	0,25
	60 minutos	0,66	0,27
	90 minutos	0,95	-1,75
<i>S. ANKARA</i>	30 minutos	-0,73	-0,43
	60 minutos	-0,83	-1,36
	90 minutos	0,70	0,52



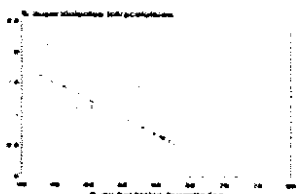
**Figura IV.9.** Representación gráfica del grado de correlación entre los porcentajes de fagocitosis y de supervivencia intracelular cuando los ensayos se realizaron con PMN obtenidos de sangre circulante del grupo de animales jóvenes. Las figuras 9a, 9b y 9c corresponden a *S. aureus* subsp. *aureus* a los 10, 60 y 90 minutos respectivamente y las figuras 9d, 9e y 9f a *S. aureus* a los mismos tiempos.



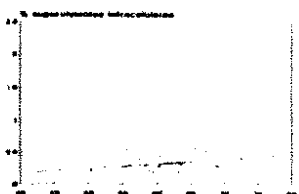
9a



9b



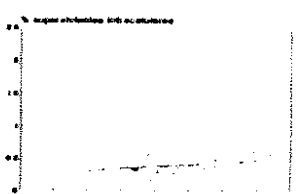
9c



9d

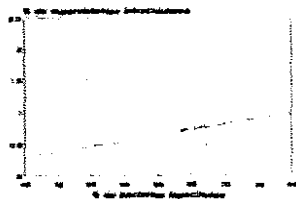


9e

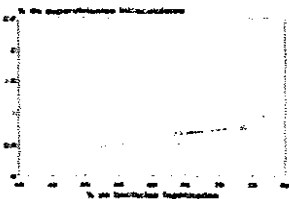


9f

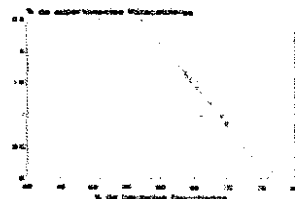
**Figura IV.10.** Representación gráfica del grado de correlación entre los porcentajes de fagocitosis y de supervivencia intracelular cuando los ensayos se realizaron con PMN obtenidos de sangre circulante del grupo de animales adultos. Las figuras 10a, 10b y 10c corresponden a *S. aureus* subsp. *aerobius* a los 30, 60 y 90 minutos respectivamente y las figuras 10d, 10e y 10f a *S. aureus* a los mismos tiempos.



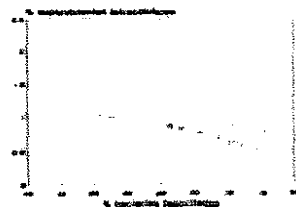
10a



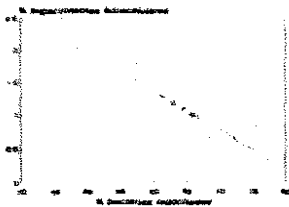
10b



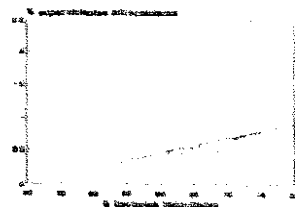
10c



10d



10e



10f

adultos. A los diferentes tiempos considerados la correlación para *S. aureus* susp. anaerobios es de signo opuesto a la de *S. aureus*: a los 30 y 60 minutos es positiva para *S. aureus* susp. anaerobios (fig. IV.10a y fig. IV.10b) y negativa para *S. aureus* (fig. IV.10c y fig. IV.10e); mientras que a los 90 minutos es negativa para la primera bacteria (fig. IV.10c) y positiva para la segunda (fig. IV.10e). Estos valores del coeficiente de correlación indican que a los 30 y 60 minutos la supervivencia intracelular es mayor a medida que aumenta la fagocitosis en el caso de *S. aureus* susp. anaerobios y menor en el de *S. aureus*, mientras que a los 90 minutos el comportamiento de las bacterias se invierte.

Comparando los coeficientes de correlación de *S. aureus* susp. anaerobios cuando se emplean PMN de animales jóvenes con los de la misma bacteria utilizando PMN de animales adultos se observa que a los 30 y 60 minutos la correlación es inversa (coeficiente de correlación negativo) en los animales jóvenes y directa (coeficiente de correlación positivo) en los adultos, mientras que a los 90 minutos es inversa en ambos (tablas IV.14 y IV.15 y fig. IV.9 y IV.10). Haciendo la misma comparación en el caso de *S. aureus* se aprecia un fenómeno análogo en cuanto que los signos de los coeficientes de correlación son opuestos en los animales jóvenes y adultos a los 30 y 60 minutos e iguales a los 90, pero totalmente diferentes en cuanto que lo que en *S. aureus* susp. anaerobios era correlación directa en *S. aureus* es inversa y lo que era inversa es directa (tablas IV.14 y IV.15, fig. IV.9 y IV.10).

#### IV.6. RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS EXPERIMENTALES EN ANIMALES.

##### IV.6.1. Inoculaciones experimentales en cabritos.

###### IV.6.1.1. Inoculaciones anaerobias.

Los tres animales inoculados subcutáneamente con la cepa XV7 207 de *S. aureus* susp. anaerobios evolucionaron de forma similar, por lo que sus alteraciones se describen conjuntamente.

En los puntos de inoculación (extremidad torácica izquierda por encima de la articulación carpiana y región del flanco izquierdo por detrás de la última costilla) se apreció reacción

inflamatoria desde las 24-48 horas postinoculación (p.p.i.) hasta el momento de su sacrificio al mes y medio. Las alteraciones se iniciaron con la formación de una papula a las 24-48 horas, que aumentaba progresivamente de tamaño, alcanzando a los cinco días un diámetro de 1,5 cm. La piel de la zona inoculada aparecía alopecica, enrojecida y caliente. Los ganglios regionales explorables (subiliaco y cervical superficial del lateral izquierdo) se encontraban ligeramente hipertroficados desde las 48 h.p.i.

Durante los cinco primeros d.p.i. se registra un ligero aumento de la temperatura corporal (40,2 °C) que resalto posteriormente. En estos primeros días se aprecio dificultad de apoyo en la extremidad toracica inoculada.

A los ocho días se apreciaba claramente la formación de abscesos en los puntos de inoculación, de aproximadamente dos cm de diámetro en la extremidad toracica y de aproximadamente tres centímetros y medio de diámetro en la region costal (fig. IV.11). Entre los días diez y catorce p.i. los abscesos fistularon expulsando un contenido purulento espeso y verdoso (fig. IV.12) del que se aisló en todos los casos *S. aureus subsp. aureolius*. Los ganglios cervical superficial y subiliaco del lado inoculado (izquierdo) se encontraban infartados a la palpacion con respecto a sus homólogos del lado derecho.

En el transcurso de la tercera, cuarta y quinta semana se observaron en los puntos de inoculación nuevas fistalizaciones, algunas de ellas ulceradas, otras antiguas y cerradas y otras recientes, por las que fluia el pus característico. El tamaño de los abscesos se reducía considerablemente a medida que transcurría el tiempo, pero los ganglios cervical superficial y subiliaco izquierdos de los dos animales se encontraban bastante infartados con respecto a sus homólogos del lado derecho. Asimismo, los animales estaban más decaídos y comían menos con el consiguiente retraso en su crecimiento.

A las seis semanas las lesiones en los puntos de inoculación mostraban una regresión muy evidente, mientras que los ganglios regionales del lado inoculado seguían muy infartados. Además, en la zona de exploración del ganglio subiliaco izquierdo de uno de los animales se apreciaba un gran abultamiento (fig. IV.13).

En la necropsia, realizada a las siete semanas, las lesiones de la extremidad torácica aparecían cicatrizadas, pero el ganglio cervical superficial izquierdo de los dos cabritos se encontraba bastante infartado con respecto al derecho. También las lesiones del punto de inoculación del flanco habían cicatrizado y en uno de los animales el ganglio subiliaco izquierdo se encontraba bastante infartado. En el otro cabrito, que externamente mostraba un gran abultamiento, se encontró un absceso en el ganglio subiliaco izquierdo. Una vez disecada la lesión se observó el ganglio muy hipertrofiado y, adosado a él, una estructura de 4 x 5 cm más o menos firme y fluctuante que una vez abierta se correspondía con un típico absceso rodeado de una gruesa capsula conjuntiva (fig. IV.14).

El resto de los órganos de estos dos animales aparecieron sin alteraciones macroscópicas de interés.

Histológicamente, los ganglios linfáticos cervical superficial y subiliaco del lateral derecho (no inoculado) no presentaban alteraciones y solo aparecían discretamente activados o hiperplásicos en el cortex. En el ganglio subiliaco izquierdo, que macroscópicamente presentaba un absceso, se apreciaban histológicamente los componentes principales de esta lesión, es decir, una capsula de tejido conjuntivo fibrosa, con vasos y células mononucleares, neutrófilos y un foco central necrótico que contenía restos celulares (fig. IV.15). Con la tinción de Gram se observó la presencia de cocos Gram positivos en el interior del absceso. Este ganglio mostraba una activación evidente del cortex, con un número elevado de células activadas.

#### IV.4.1.2. ~~Inoculaciones intramusculares.~~

Las alteraciones encontradas en los dos animales inoculados con *E. rhusiopathiae* subsp. *anischaetis* por vía intramuscular en la región femoral de la extremidad pelviana izquierda se describen conjuntamente dada su similitud.

Estos animales presentaron un aumento de la temperatura corporal (41.2 °C) así como reacción dolorosa a la palpación en el punto de inoculación y dificultad de apoyo de la extremidad inoculada durante los cuatro primeros d.p.i. Los ganglios

linfaticas regionales explorables no presentaron modificaciones en su tamaño con respecto a sus homólogos del lateral derecho.

A la semana y media p.i. se apreciaba en el punto de inoculación un abultamiento hacia el exterior muy evidente. Que aumentó progresivamente de tamaño y que terminó por fistulizar al cabo de cuatro semanas, fluyendo un pus de coloración verdosa del que se aisló la bacteria inoculada. A partir de esta primera fistulización, y hasta el momento de su sacrificio, se observaron múltiples fistulizaciones seguidas de cicatrización. La lesión englobaba la región de exploración del ganglio popliteo, por lo que no pudo hacerse un seguimiento de la posible infartación de este ganglio durante la experiencia.

En la necropsia, realizada a las siete semanas, las lesiones aparecieron localizadas en la región muscular inoculada (Fig. IV.16). Diseccionando la zona se encontraron en la proximidad del ganglio popliteo dos abscesos bien encapsulados en uno de los animales y tres en el otro. De todos ellos se aisló *G. ANAEROBIA* subsp. *ANAEROBIUS*. En ambos animales, sin embargo, el ganglio popliteo presentaba un tamaño prácticamente normal. Además, en uno de los animales el ganglio escrotal izquierdo estaba muy infartado en relación con su homólogo del lado derecho (Fig. IV.17). Al realizar un corte longitudinal de este ganglio se encontró un pequeño foco purulento del que se aisló la subespecie de estafilococo inoculada.

En el resto de los órganos de estos animales no se encontraron alteraciones macroscópicas dignas de mención.

#### IV.6.1.3. Animal utilizado como testigo en el grupo de inoculaciones subcutáneas e intramusculares.

Este animal, que no fue inoculado, permaneció durante toda la fase de experimentación en contacto con los animales inoculados por vía intramuscular y subcutánea.

A las cuatro semanas del inicio de la experiencia se apreció un ligero abultamiento en la región parotidea derecha que aumentó rápidamente de tamaño haciéndose muy evidente a las cinco semanas (Fig. IV.18). A las seis semanas el absceso fistulizó, y del pus espeso y verdoso se aisló en cultivo puro *G. ANAEROBIA* subsp. *ANAEROBIUS*.

Alrededor de la sexta semana comenzó también a apreciarse una infartación evidente del ganglio cervical superficial derecho. En el transcurso de la séptima y octava semana p.i. la lesión de la región parotídea fue remitiendo paulatinamente, mientras que la alteración del ganglio cervical superficial fue haciéndose más evidente.

Al realizar la necropsia del animal, al final de la octava semana, se encontraron sendos abscesos en el ganglio parotídeo derecho, que se apreciaba ligeramente hipertrofico y hemorrágico, y en el ganglio cervical superficial derecho, que estaba muy infartado. La apariencia macroscópica de estas lesiones era similar a la descrita en el apartado IV.6.1, con la única salvedad de que la pared interna del absceso encontrado en el ganglio parotídeo derecho estaba ligeramente hemorrágica.

Los ganglios mandibular y retrofaríngeo lateral izquierdos se encontraban ligeramente hipertroficados y hemorrágicos con respecto a sus homólogos, pero no presentaban absceso alguno.

#### IV.6.1.4. Inoculaciones practicando incisiones cutáneas.

Los tres animales inoculados de esta forma con la cepa MVF 207 de *S. aureus* subsp. *aureus* presentaron una evolución similar, por lo que sus alteraciones se describirán conjuntamente.

En la fig. IV.19 pueden apreciarse las incisiones practicadas en la extremidad torácica por encima de la articulación carpiana en uno de los animales antes de proceder a la inoculación. De esta misma forma se practicaron otras tres incisiones en el labio inferior.

Durante la primera semana p.i. no se apreció alteración alguna ni en los puntos de inoculación ni en los ganglios linfáticos regionales explorables. Transcurrido este tiempo comenzó a apreciarse una ligera hipertrofia de los ganglios mandibular y parotídeo izquierdos con respecto a sus homólogos del lado derecho. Asimismo, se constató una ligera elevación de la temperatura corporal (40,5 °C). La infartación ganglionar se hizo más evidente a medida que transcurría el tiempo.

A las dos semanas la temperatura corporal era normal y la hipertrofia de los ganglios de la cabeza continuaba en aumento. Al mismo tiempo se detectaba una ligera infartación del ganglio cervical superficial izquierdo que con el tiempo también fue aumentando de tamaño.

A partir de las tres semanas y media en todos los animales se constataba la presencia de abscesos tanto en la región mandibular (fig. IV.20) a simple vista como en la zona del ganglio cervical del lateral inoculado por palpación.

La necropsia de los animales se realizó a las cinco semanas, encontrándose en todos ellos abscesos en los ganglios mandibular (figs. IV.21 y IV.22) y cervical superficial (fig. IV.23) izquierdos, que, además, se encontraban muy hipertroficados. El aspecto macroscópico de estas lesiones era similar al descrito en el apartado de inoculaciones subcutáneas, si bien la pared interna del absceso encontrado en el ganglio cervical estaba muy hemorrágica (fig. IV.23). De todos los abscesos ganglionares se aisló la bacteria inoculada.

En todos los animales los ganglios parotideo y retrofaríngeo lateral del mismo lado en que se hallaba el ganglio mandibular con abscesos estaban ligeramente hipertroficados con respecto a sus homologos (fig. IV.21). Los retrofaríngeos laterales estaban además hemorrágicos.

En el resto de los órganos no aparecieron alteraciones macroscópicas evidentes.

Histológicamente, las lesiones encontradas en los abscesos ganglionares no difieren de las apuntadas anteriormente en el apartado de inoculaciones subcutáneas. Se aprecian los componentes habituales de un absceso: una capsula de tejido conectivo fibroso, sin vasos y células mononucleares, neutrófilos y un foco central necrótico que contiene restos celulares.

Aquellos ganglios descritos anteriormente que no presentaban abscesos pero se encontraban ligeramente infartados mostraban una activación evidente del cortex con un elevado número de folículos activados.



#### IV.6.1.5. Animal inculcado con LEECHER en el plano de inoculaciones practicadas con lesiones suaves.

En este animal no se observo alteracion alguna durante el desarrollo de la fase experimental ni se encontraron lesiones en la necropsia realizada a las cinco semanas.

#### **IV.6.2. Inoculaciones experimentales en corderos.**

##### IV.6.2.1. Inoculaciones con la cepa MIE 127 de S. aureus MEXX. ANACARDIA.

En uno de los corderos inoculados no se constato alteracion alguna a lo largo de toda la experiencia ni en los puntos de inoculacion ni en los ganglios linfaticos regionales explorables.

En el otro animal ya durante la primera semana p.i. comenzo a apreciarse una ligera hipertrofia del ganglio mandibular izquierdo. Durante la segunda semana ocurrio otro tanto con el ganglio cervical superficial del lado inoculado. En ambos casos, y al igual que ocurría en los cabritos, las alteraciones fueron haciendose mas evidentes con el tiempo apreciandose a simple vista a las tres o cuatro semanas.

En ningun momento se detecto incremento de temperatura en el animal.

En la necropsia, realizada a las cinco semanas, se encontraron nodos abscesos en el ganglio mandibular izquierdo (fig. IV.24) y en el ganglio cervical superficial izquierdo (figs. IV.25 y IV.26). Macroscopicamente las lesiones eran semejantes a las descritas en anteriores apartados. El resto de ganglios de la cabeza (parotideo y retrofaringeo lateral) aparecieron normales e ligeramente infartados (fig. IV.24).

Micologicamente, el ganglio mandibular izquierdo, que contenia el absceso, presentaba una activacion folicular intensa, con un incremento del numero y tamaño de los foliculos, mostrando centros germinales evidentes (figs. IV.28 y IV.29). En la zona exterior al ganglio se apreciaba fibrosis y en el centro una reaccion purulenta con neutrofilos y material necrotico. Los ganglios mandibular, parotideo y retrofaringeo lateral izquierdos mostraban un claro fenomeno de activacion del cortex ganglionar.

En la necropsia del cordero que no mostró alteraciones durante la experiencia se encontraron, como única lesión macroscópica destacable, dos focos purulentos muy pequeños en el interior del ganglio mandibular derecho (fig. IV.17), de los que en el caso *S. ANKANA* subsp. *ANAKANINA* histológicamente, el ganglio no aparecía visiblemente activado. En la zona paracervical se observó la presencia de estos microabscesos así como macrófagos de cuerpo tierno (fig. IV.18). En general, en los ganglios de este animal se detectó una excesiva activación ganglionar. En los cordones medulares se detectó la presencia de células plasmáticas. Este fenómeno se observa en los ganglios del lado izquierdo pero no en los del derecho.

El animal empleado como control en este grupo no presentó alteraciones durante la fase experimental ni durante la realización de la necropsia.

#### IV.6.2. Inoculaciones con la cepa *W* al *S. ANKANA*

Los dos animales inoculados con esta cepa no presentaron alteraciones evidentes durante las cinco semanas que duró la experiencia. El único dato digno de mención es que a los dos días se apreciaba una ligera hiperemia de los ganglios mandibular y cervical superficial izquierdo con respecto a sus homólogos de la derecha, pero esta alteración remitió hasta su tamaño inicial al cabo de una semana.

Ni en la necropsia ni en el posterior estudio histopatológico se hallaron lesiones evidentes.

El animal empleado como control en este grupo no presentó alteraciones dignas de mención durante la fase experimental, ni lesiones al realizar la necropsia.

#### IV.6.3. Inoculaciones experimentales en ovejas en lactación.

Los de los animales utilizados en este estudio desarrollaron al día siguiente de la inoculación una mamitis gangrenosa por *BRUCELLA ABORTUS* ANKANA, por lo que sus resultados no se considerarán. A lo largo de toda la experiencia en los cinco animales restantes no se detectó bacteria alguna que no fuera *S. ANKANA* subsp. *ANAKANINA*.

En las tablas IV.16 a IV.20 se exponen los resultados de los recuentos diarios de células somáticas y de bacterias efectuados en ambas mamas para las ovejas R, B, LM, LB y N respectivamente. Estos mismos resultados se expresan gráficamente en las figuras impares de la IV.21 a IV.29. Los recuentos de células somáticas se expresan en número de células por ml de leche y los de bacterias, realizados en agar sangre, en unidades formadoras de colonia por ml de leche (ufc/ml). En las tablas anteriores se recogen además, para los distintos animales, la producción láctea en ml de cada una de las mamas y la temperatura corporal en grados centígrados. En las figuras pares de la IV.30 a la IV.38 se expresan gráficamente estos resultados. De la oveja R (tabla IV.16 y fig. IV.21) no se dispone de datos sobre la producción láctea.

La prueba de California, al realizarse inmediatamente después de tomar la muestra de leche, nos permitió hacer una primera estimación del número de células somáticas hasta disponer de los recuentos laboratoriales precisos. Por ello, los resultados de esta prueba no aparecen expresados en las tablas.

En función de la respuesta clínica a las inoculaciones y de los resultados microbiológicos pueden establecerse dos grupos de animales. Uno de ellos estaría formado por las ovejas R y B, en las que no se detectaron alteraciones clínicas y solamente se aislaron bacterias de la leche durante las primeras 48 horas p.p. El otro lo integrarían las ovejas LM, LB y N que sí presentaron algún grado de respuesta clínica. Además, de la leche de estos animales se aislaron bacterias no solo los días siguientes a la inoculación, como durante distintos periodos que se intercalaban con otros en los que no había liberación de B. agrius subsp. brachycilia.

#### IV.4.1.1. Ovejas R y B.

En la oveja R destaca el bajo número de bacterias presentes en la leche los dos primeros días postinoculación (130 ufc/ml), hecho que se acompañó de un incremento moderado de los recuentos de células somáticas en la mama inoculada (tabla IV.16 y fig. IV.21).

En la oveja B se detectó un mayor número de bacterias en la mama inoculada durante las 48 horas siguientes a la inoculación

Tabla IV.16. Oveja R: resultados de los recuentos de células somáticas y de *S. aureus* subsp. *adolfowortii* en la mama izquierda (no inocular) y derecha (inocular) a lo largo de la experiencia. También figura la temperatura corporal.

DÍA	MAMA IZQUIERDA		Temperatura en °C	MAMA DERECHA	
	cfu/ml A.S.	células x1000/ml		cfu/ml A.S.	células x1000/ml
2	0	106	38,0	0	115
3	0	106	38,1	0	115
4	0	120	38,8	120	127
5	0	315	38,4	120	130*
6	0	285	38,6	0	130*
7	0	117	38,8	0	65
8	0	115	38,8	0	65
9	0	539	38,8	0	85
10	0	89	38,6	0	60
11	0	154	38,6	0	600
12	0	124	38,7	0	300
13	0	112	38,8	0	300
14	0	12	38,8	0	300
15	0	90	38,8	0	300
16	0	167	38,8	0	204
17	0	225	38,8	0	104
18	0	224	38,8	0	204
19	0	226	38,8	0	220



Tabla IV.17. Oveja B: resultados de los recuentos de células somáticas y de *S. aureus* subsp. *anagropius* de la mama izquierda (inoculada) y derecha (no inoculada) a lo largo de la experiencia. También figuran la producción láctea de ambas mamas y la temperatura corporal.

DÍA	MAMA IZQUIERDA			Temperatura en °C	MAMA DERECHA		
	ufc/ml A.S.	células x1000/ml	ml de leche		ufc/ml A.S.	células x1000/ml	ml de leche
2	0	122	600	38,5	0	70	600
3	0	122	600	38,5	0	70	600
4	40000	22491	500	40,0	0	98	500
5	2000	25000	60	39,5	0	70	240
6	0	20000	50	39,2	0	114	360
7	0	10370	80	39,4	0	111	320
8	0	4118	140	39,2	0	39	300
9	0	574	140	39,6	0	26	360
10	0	5910	140	39,2	0	75	360
11	0	2944	160	39,0	0	165	360
12	0	1303	160	38,9	0	65	300
13	0	797	200	39,2	0	50	400
14	0	846	240	39,1	0	91	400
15	0	1136	400	39,2	0	115	400
16	0	1404	200	38,9	0	145	300
17	0	2948	300	39,2	0	220	400
18	0	975	200	39,2	0	217	300
19	0	544	200	39,2	0	195	300
20	0	8905	100	39,2	0	74	360
21	0	12394	120	39,2	0	45	360
22	0	1505	160	39,0	0	38	360
23	0	437	200	38,9	0	32	400
24	0	1046	180	39,2	0	474	360
25	0	1384	100	39,4	0	410	400
26	0	1531	140	39,0	0	137	500
27	0	531	80	38,6	0	230	400
28	0	2539	140	38,9	0	113	360
29	0	1170	140	38,6	0	189	200
30	0	1939	120	38,6	0	191	300
31	0	2017	100	38,5	0	68	360
32	0	752	100	39,0	0	65	300
33	0	2333	150	39,0	0	85	400
34	0	95	48	39,0	0	98	200
35	0	95	80	38,8	0	110	280
36	0	3304	100	38,5	0	128	260
37	0	955	100	38,5	0	227	260
38	0	760	80	38,5	0	188	200
39	0	3324	60	38,7	0	81	220
40	0	1153	80	38,8	0	49	300

Tabla IV.10. Oveja LN: resultados de los recuentos de células somáticas y de *S. aureus* subsp. *anaerophilus* de la mama izquierda (inoculada) y derecha (no inoculada) a lo largo de la experiencia. También figuran la producción láctea de ambas mamas y la temperatura corporal.

DÍA	MAMA IZQUIERDA			Temperatura en °C	MAMA DERECHA		
	ufc/ml A.S.	celulas x1000/ml	ml de leche		ufc/ml A.S.	celulas x1000/ml	ml de leche
2	0	75	450	39,2	0	20	250
3	0	82	500	39,1	0	22	250
4	4000	21167	500	40,4	0	26	200
5	4300	27099	400	40,5	0	23	200
6	4000	19644	350	38,9	0	37	300
7	0	11781	500	38,9	0	51	370
8	0	6887	700	38,9	0	90	360
9	0	2732	800	39,3	0	173	380
10	0	1221	800	38,5	0	245	360
11	0	720	1200	39,0	0	53	300
12	0	9203	1100	39,1	0	23	300
13	0	17049	950	38,7	0	13	300
14	0	4204	900	38,7	0	19	300
15	0	703	950	38,8	0	20	300
16	0	1333	1200	38,9	0	9	300
17	4000	5032	600	39,0	1	23	170
18	0	1000	600	38,8	0	61	300
19	0	357	1000	38,7	0	19	300
20	4000	4072	1000	38,9	0	1	200
21	4000	10705	500	38,8	0	48	200
22	0	5118	600	38,7	0	17	270
23	0	900	700	38,7	0	22	200
24	4000	12614	650	38,7	0	98	300
25	330	1200	600	38,7	0	24	300

Tabla IV.19. Oveja LB: resultados de los recuentos de células somáticas y de *S. aureus* subsp. *anacrotius* de la mama izquierda (inoculada) y derecha (no inoculada) a lo largo de la experiencia. También figura la producción láctea de ambas mamas y la temperatura corporal.

DÍA	MAMA IZQUIERDA			Temperatura en °C	MAMA DERECHA		
	ufc/ml A.S.	células x1000/ml	ml de leche		ufc/ml A.S.	células x1000/ml	ml de leche
1	0	19	275	39,0	0	20	275
2	2	17	275	39,2	0	24	275
3	4-500	21312	300	39,5	0	27	275
4	1500	23129	200	39,0	0	20	200
5	2500	8073	150	38,7	0	17	300
6	2500	4297	150	38,8	0	7	170
7	0	1495	200	39,0	0	22	230
8	0	520	350	38,9	0	18	400
9	0	353	200	38,9	0	22	350
10	3000	1301	300	38,8	0	11	170
11	0	2780	200	38,8	0	79	320
12	0	1557	300	39,0	0	10	300
13	0	1132	310	38,9	0	11	400
14	0	1753	200	38,9	0	58	300
15	0	1286	240	38,8	0	52	290
16	0	436	100	38,8	0	11	140
17	2000	679	250	39,2	0	10	170
18	7500	129	200	38,9	0	12	400
19	4200	3412	180	39,0	0	42	300
20	8000	4637	100	39,1	0	53	250
21	3000	4773	110	39,2	0	13	240
22	50	973	100	39,1	0	5	200
23	241	13913	100	39,1	0	0	300
24	740	10744	75	39,1	0	7	170

Tabla IV.26. Oveja N: resultados de los recuentos de células somáticas y de *S. aureus* subsp. *anaerobius* de la mama izquierda (inoculada) y derecha (no inoculada) a lo largo de la experiencia. También figuran la producción láctea de ambas mamas y la temperatura corporal.

DÍA	MAMA IZQUIERDA			Temperatura en °C	MAMA DERECHA		
	cfu/ml A. S.	células x1000/ml	ml de leche		cfu/ml A. S.	células x1000/ml	ml de leche
1	0	119	600	39,7	0	84	600
2	0	119	500	39,0	0	164	700
3	12000	21900	375	40,4	0	974	375
4	6000	24250	300	39,3	0	362	600
5	0	17043	90	38,9	0	77	600
6	0	4140	100	39,6	0	37	600
7	0	266	150	38,8	0	74	600
8	0	50	300	39,1	0	29	600
9	0	28	400	38,9	0	73	600
10	31400	7032	600	39,2	0	43	700
11	15000	11123	500	39,0	0	34	700
12	4213	11070	500	38,6	0	67	700
13	2900	8699	350	38,5	0	69	700
14	2500	9397	450	39,2	0	70	700
15	1400	3996	500	38,9	0	100	700
16	4000	4613	500	39,1	0	30	700
17	500	4150	450	39,0	0	320	600
18	0	1754	400	39,2	0	22	600
19	0	2585	300	38,0	0	80	500
20	0	3120	300	39,0	0	16	500
21	0	1160	500	39,2	0	74	600
22	0	1157	300	39,0	0	79	600
23	0	1536	250	39,2	0	81	500
24	0	1810	150	39,0	0	115	600
25	130	10000	120	39,0	0	148	375
26	180	8103	190	38,4	0	150	600
27	200	11749	95	38,7	0	64	500
28	0	17706	100	39,0	0	34	500
29	30	10815	75	39,3	0	200	600
30	370	3024	75	38,5	0	101	600
31	390	6480	55	38,8	0	94	600
32	600	21767	60	38,9	0	148	600
33	140	9341	75	37,8	0	139	600
34	1120	30050	50	38,3	0	92	600
35	230	30096	30	38,5	0	131	500
36	390	12241	30	38,5	0	192	600
37	150	9552	39	38,5	0	89	600
38	2750	19826	70	38,8	0	85	600
39	4700	23667	50	39,0	0	81	615



Figura. IV.31. Oveja R: recuentos de células somáticas y de *S. aureus* subsp. *anaerobius* de la mama izquierda (no inoculada) y derecha (inoculada) a lo largo de la experiencia.

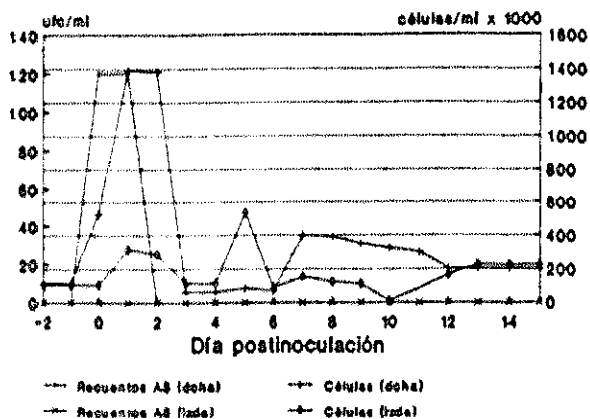


Figura. IV.32. Oveja R: temperatura corporal a lo largo de la experiencia.

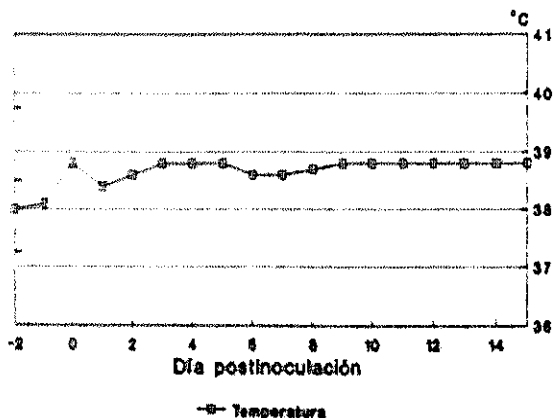


Figura. IV.33. Oveja B: recuentos de células somáticas y de *B. ANTRAXIS* subsp. *ANTRAXIS* de la masa izquierda (inoculada), y derecha (no inoculada) a lo largo de la experiencia.

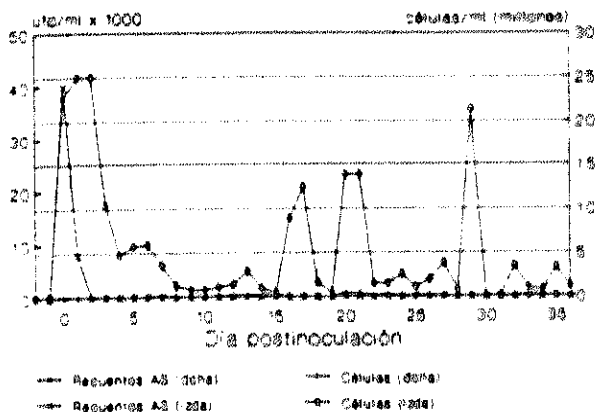


Figura. IV.34. Oveja B: temperatura corporal y producción láctea de la mama izquierda (inoculada) y derecha (no inoculada) a lo largo de la experiencia.

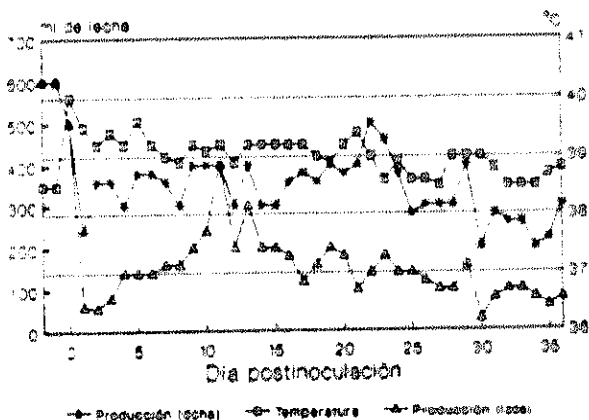


Figura. IV.13. Oveja LN: recuentos de células somáticas y de *S. aureus* subsp. *anarthrus* en la mama izquierda (inoculada) y derecha (no inoculada) a lo largo de la experiencia.

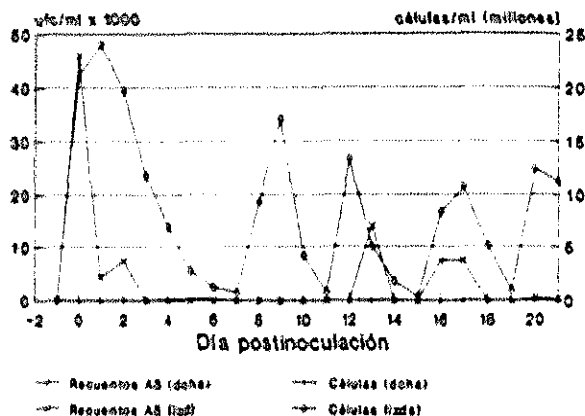


Figura. IV.14. Oveja LN: temperatura corporal y producción lactea de la mama izquierda (inoculada) y derecha (no inoculada) a lo largo de la experiencia.

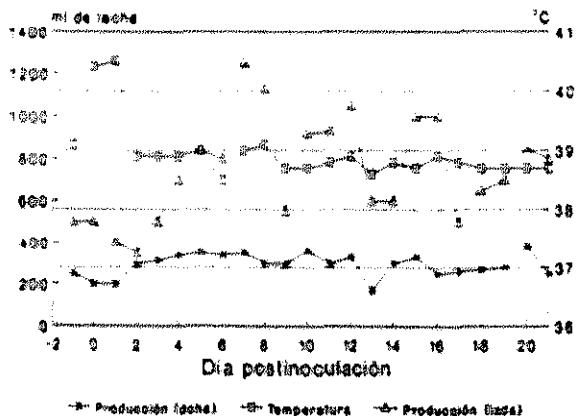


Figura. IV.37. Oveja LB: recuentos de células somáticas y de *S. aureus* subsp. *anarthrus* de la mama izquierda (inoculada) y derecha (no inoculada) a lo largo de la experiencia.

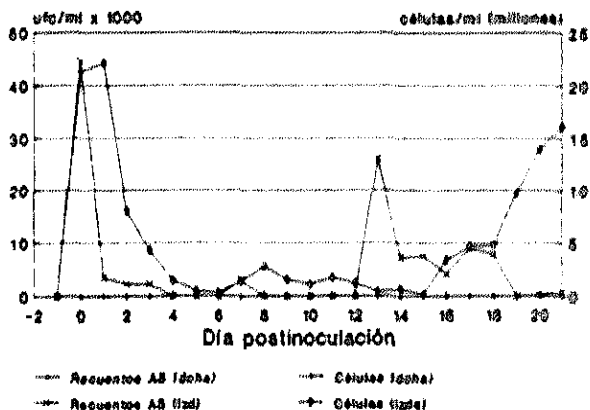


Figura. IV.38. Oveja LB: temperatura corporal y producción lactea de la mama izquierda (inoculada) y derecha (no inoculada) a lo largo de la experiencia.

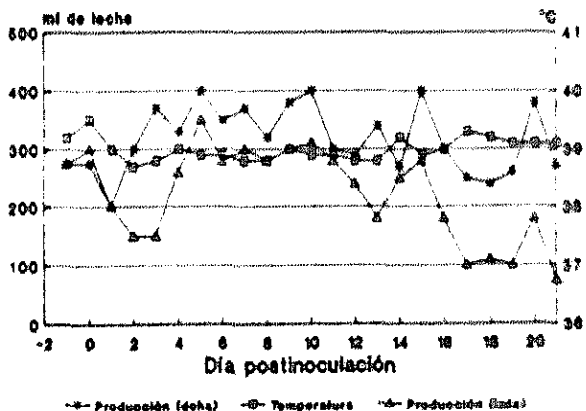


Figura. IV.39. Oveja N: recuentos de células somáticas y de *S. aureus* subsp. *anarthrus* en la mama izquierda (inoculada) y derecha (no inoculada) a lo largo de la experiencia.

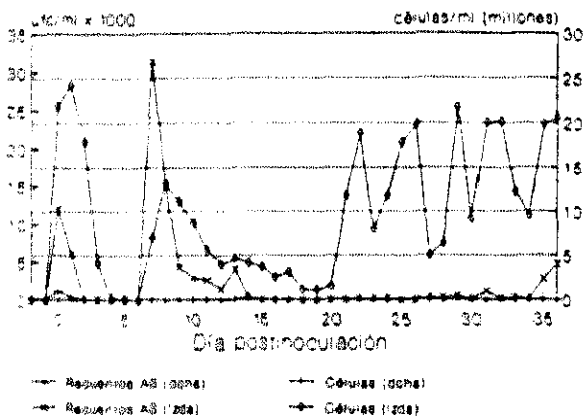
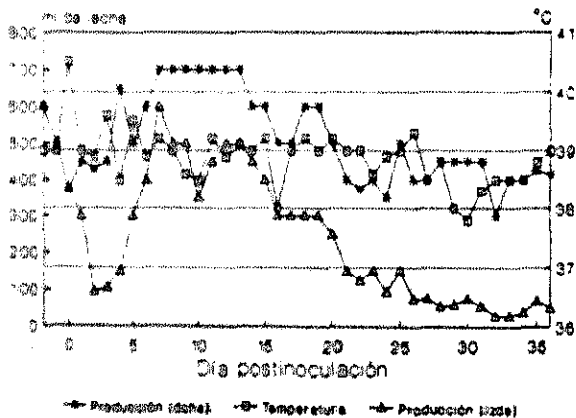


Figura. IV.40. Oveja N: temperatura corporal y producción láctea de la mama izquierda (inoculada) y derecha (no inoculada) a lo largo de la experiencia.



140.000 y 8.000 ufc./ml). y los incrementos de células somáticas fueron elevadísimos (mayores de  $2 \times 10^8$  células/ml, tabla IV.17 y fig. IV.32). Estos recuentos disminuyeron progresivamente hasta el día 15 postinoculación, para posteriormente sufrir tres incrementos muy claros en los días 17 ( $1,24 \times 10^7$  células/ml), 21 ( $1,38 \times 10^7$  células/ml) y 29 ( $2,13 \times 10^7$  células/ml). Incrementos que, sin embargo, no se acompañaron de liberación de bacterias en la leche (tabla IV.17 y fig. IV.33). Además, en esta oveja se observó un ligero incremento de la temperatura los días siguientes a la inoculación y una clara disminución de la producción láctea de la mama inoculada (hasta aproximadamente una tercera parte) con respecto a la no inoculada (tabla IV.17 y fig. IV.34).

En las ovejas R y B no se observaron alteraciones ni en la glándula mamaria ni en los ganglios linfáticos mamarios durante la experiencia. Tampoco en las necropsias, realizadas a los 15 días en la oveja R y a los 36 en la B, ni en los estudios histopatológicos subsiguientes se hallaron lesiones destacables.

#### IV.6.3.2. Ovejas LN, LB y N.

En los tres animales se constató un ligero incremento de la temperatura corporal durante las 34-48 horas siguientes a la inoculación.

En estas tres ovejas, al igual que en las dos anteriores, se aislaron bacterias de la mama inoculada los días posteriores a la inoculación, y los aislamientos se acompañaron de recuentos muy elevados de células somáticas, superiores a  $2 \times 10^8$  células/ml (tablas IV.18, IV.19 y IV.20 y figs. IV.35, IV.37 y IV.39). Este primer período de presencia de bacterias en la leche duró entre 48 y 96 horas, según los animales. Además, en los tres casos, tras unos días en los que no se detectaban bacterias en la leche y en los que, en general, había una paulatina disminución de los recuentos celulares, se detectaron nuevos períodos de liberación de *S. aureus* subsp. *anarthrus* por la leche. Coincidiendo con estos períodos de producción, en general, incrementos de los recuentos celulares, si bien en la oveja LB el incremento de células se inició tres días después de la liberación de estafilococos (tablas IV.18, IV.19 y IV.20 y figuras IV.35, IV.37 y IV.39).

Los recuentos de células somáticas de las mamas no inoculadas se mantuvieron muy bajos y prácticamente constantes durante toda la experiencia (tablas IV.18, IV.19 y IV.20 y figuras IV.35, IV.37 y IV.38).

En las mamas inoculadas de las ovejas LB y N se produjo una importante disminución de la producción láctea (por encima del 50%) coincidiendo con los periodos de liberación de bacterias por la leche (tablas IV.18 y IV.19 y figuras IV.36 y IV.38). Además, en el caso de la oveja N la producción era prácticamente nula al final de la experiencia (tabla IV.20 y figura IV.40). En la oveja LB, sin embargo, así se constató una muy ligera disminución de la producción el segundo d.p.i., pero a partir del cuarto la producción se recuperó e incluso aumentó (tabla IV.18 y figura IV.38).

Clinicamente, en los tres animales se detectó a las 48 h.p.i. infartación del ganglio mamario izquierdo correspondiente a la mama inoculada. Esta alteración fue haciéndose mas evidente con el tiempo. Asimismo, al cabo de una semana y media los animales LB y N mostraban una reacción dolorosa a la palpación de la mama inoculada, que aparecía inflamada y con una consistencia mas firme de lo normal. La inflamación e induración de esta mama fue en aumento y era muy evidente a partir de la segunda semana. La secreción láctea mantenía, sin embargo, su aspecto normal. Como máximo, se apreciaba algo mas densa. A la palpación de la glándula inoculada de la oveja LN no se detectó alteración alguna durante la experiencia.

La única alteración macroscópica encontrada en la necropsia de la oveja LN, practicada a los 21 días, fue una ligera infartación del ganglio mamario izquierdo. Histológicamente, en el ganglio se observó una moderada activación del córtex, así como abundantes células plasmáticas en los cordones medulares. La glándula mamaria mostraba una estructura prácticamente normal, es decir, bien aparecían algunos neutrófilos en la luz alveolar y pequeños grupos de células plasmáticas en el intersticio.

Las lesiones encontradas en las ovejas LB y N fueron similares, por lo que se describen en conjunto. Macroscópicamente, los ganglios linfáticos mamaricos izquierdos aparecían muy infartados con respecto a los derechos (fig. IV.41) y las glándulas inoculadas estaban aumentadas de tamaño y su consisten-

ria era fibrrosa. Al corte se apreciaban múltiples microabscesos encapsulados (fig. IV.42) que contenían un pus espeso y verdoso del que se aisló *S. aureus* subsp. *aureus*.

Histológicamente, en los ganglios mamarios correspondientes a las mamas inoculadas se observó una discreta activación folicular, así como la presencia de numerosas células plasmáticas y macrófagos de cuerpo tingible en los cordones medulares hiperplásicos (figs. IV.44 y IV.45) (en la oveja M aparecían también macrófagos de cuerpo tingible). En la glándula mamaria se apreciaron múltiples microabscesos en el parénquima mamario compuestos por neutrófilos, macrófagos, células plasmáticas, fibroblastos y algunos cocos Gram positivos (figs. IV.46 y IV.47). Asimismo, se observaron acumulos de neutrófilos en la luz de algunos alveolos mamarios (fig. IV.48) y fenómenos fibróticos en el intersticio (fig. IV.43). La luz de grandes conductos secretores se encuentran ocluidas por proliferaciones de tejido fibroso, neovascularesizadas y parcialmente invadidas por cordones epiteliales (fig. IV.49). El epitelio del conducto todavía presente, muestra numerosas capas de células epiteliales. Alrededor del epitelio se observa una reacción inflamatoria crónica fibrrosa.



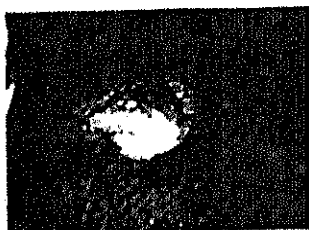


Figura IV.11. Conejo de dos meses de edad inoculado subcutáneamente con *S. aureus* subtipo *MRSA* 207. En la fotografía tomada a la semana 1 se observa en el punto de inoculaci3n de la regi3n ocular la formaci3n de un absceso de aproximadamente 3.5 cm de diámetro.



Figura IV.12. Conejo de dos meses de edad inoculado subcutáneamente con *S. aureus* subtipo *MRSA* 207. A las 2 semanas D.I. se observa como el absceso del punto de inoculaci3n de la extremidad anterior ha fistulizado expulsando un contenido purulento espeso y verdoso.



Figura IV.13. Conejo de dos meses de edad inoculado subcutáneamente con *S. aureus* subtipo *MRSA* 207. A las 6 semanas D.I. se observa en la zona de inoculaci3n del ganglio submaxilar la formaci3n de un gran absceso.

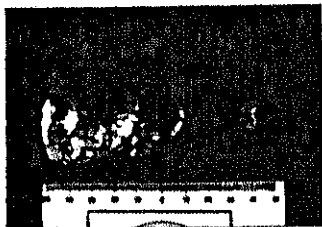


Figura IV.14. Conejo de dos meses de edad inoculado subcutáneamente con *S. aureus* subtipo *MRSA* 207. En el momento a las 10 semanas D.I. una vez el absceso a la zona de la figura IV.13. Se observa un absceso al nivel del ganglio submaxilar (g) que está muy hipertrofiado con respecto al derecho.

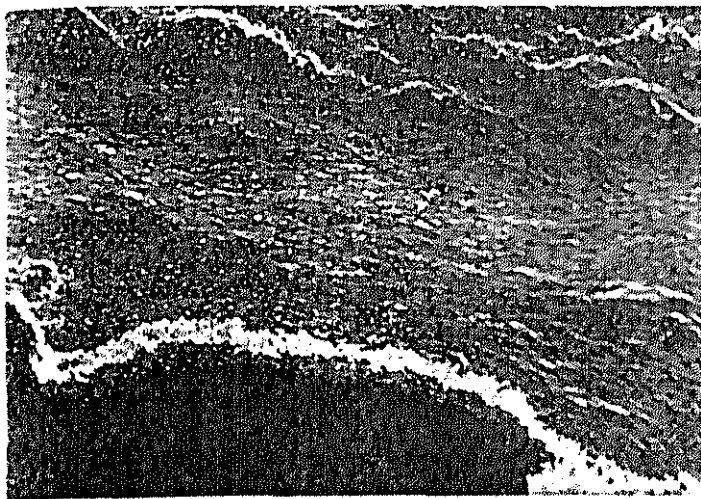


Figura IV.15. Conejo de dos meses de edad inoculado subcutáneamente con *S. aureus* susp. *S. aureus* MvF 207. Sacrificado a las 7 semanas p.i. Ganglio subiliaco izquierdo. Absceso mostrando una gruesa cápsula de tejido conjuntivo con macrófagos y otras células mononucleares delimitando una zona central con material necrótico y neutrófilos. En la parte superior de la imagen se observa tejido linfático normal comprimido (143x).



Figura IV.16. Conejo de dos meses de edad inoculado intramuscularmente con *S. aureus* susp. *S. aureus* MvF 207. Sacrificado a las 7 semanas p.i. Como se muestra en esta fotografía las abscesos aparecen en la región muscular inoculada. Una vez diseccionada la zona se observan en la proximidad del ganglio poplíteo (g) dos abscesos en encapsulados (a).

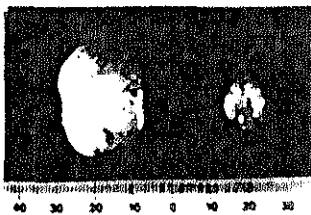


Figura IV.17. Conejo de dos meses de edad inoculado intramuscularmente con *S. aureus* susp. *S. aureus* MvF 207. Sacrificado a las 7 semanas p.i. En esta fotografía se aprecia como el ganglio espinal izquierdo está muy hipertrofiado con respecto a su homólogo del lado derecho.



Figura 14.18. Cabeza de dos meses de edad (nacida como hembras) en el grupo de machos, con un tumor a nivel del ángulo de la mandíbula inferior. A las 12 horas de la mañana se le practicó la castración y a las 15 horas se le practicó la castración y a las 18 horas se le practicó la castración y a las 21 horas se le practicó la castración.



Figura 14.19. Cabeza de dos meses de edad (nacida como machos) con un tumor a nivel del ángulo de la mandíbula inferior. A las 12 horas de la mañana se le practicó la castración y a las 15 horas se le practicó la castración y a las 18 horas se le practicó la castración y a las 21 horas se le practicó la castración.



Figura 14.20. Cabeza de dos meses de edad (nacida como machos) con un tumor a nivel del ángulo de la mandíbula inferior. A las 12 horas de la mañana se le practicó la castración y a las 15 horas se le practicó la castración y a las 18 horas se le practicó la castración y a las 21 horas se le practicó la castración.

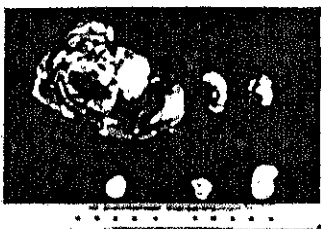


Figura 14.21. Cabeza de dos meses de edad (nacida como machos) con un tumor a nivel del ángulo de la mandíbula inferior. A las 12 horas de la mañana se le practicó la castración y a las 15 horas se le practicó la castración y a las 18 horas se le practicó la castración y a las 21 horas se le practicó la castración.

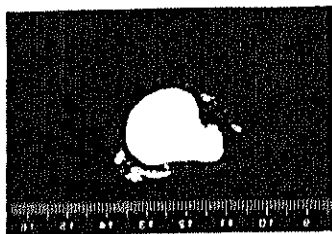


Figura 14.22. Cobrolo de dos meses de edad inoculado infectando incisiones cutáneas con *[Mycobacterium tuberculosis]* Myr 207 y sacrificado a las 5 semanas p.i. Corte longitudinal de la lesión encontrada en el ganglio mandibular izquierdo (ver en forma). En la parte derecha se observa el ganglio linfático hipertrofico y unido a el un absceso tipico rodeado de una gruesa capsula de tejido conjuntivo.

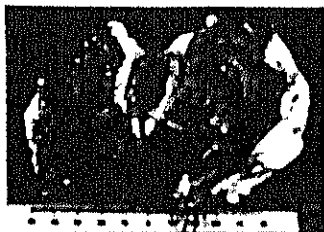


Figura 14.23. Cobrolo de dos meses de edad inoculado infectando incisiones cutáneas con *[Mycobacterium tuberculosis]* Myr 207 y sacrificado a las 5 semanas p.i. Corte longitudinal del ganglio cervical superficial izquierdo. La imagen muestra como la pared interna del absceso, una vez abierta este y eliminado el contenido purulento, aparece muy hemorragica.



Figura 14.24. Corcebo de dos meses de edad inoculado infectando incisiones cutáneas con *[Mycobacterium tuberculosis]* Myr 207 y sacrificado a las 5 semanas p.i. En la parte inferior de la imagen se observa como los ganglios mandibular (dcha.), parotideo (centrl) y retrofaríngeo lateral izquierdo (izda.) están hipertroficados con respecto a sus homólogos del lado derecho (parte superior de la imagen).

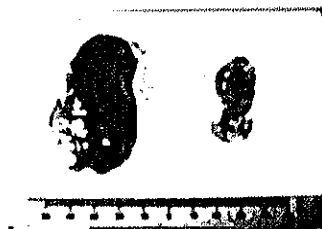


Figura 14.25. Corcebo de dos meses de edad inoculado infectando incisiones cutáneas con *[Mycobacterium tuberculosis]* Myr 207 y sacrificado a las 5 semanas p.i. En la fotografía se observa un absceso unido al ganglio cervical superficial izquierdo que está muy hipertrofico con respecto al derecho.

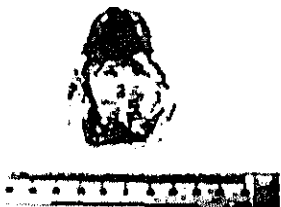


Figura IV.26. Cordón de dos meses de edad infectado por lesiones cutáneas con *S. BUBISUB* subdo. *BRASILIENSIS* MVS 207 y sacrificado a las 3 semanas p.p. Corte longitudinal de la lesión encontrada en el ganglio cervical superficial (27-50, arco fig.). Se observan lesiones de pared interna de nodos que una vez que ésta ha sido abierta y se observan los contenidos purulentos (a).



Figura IV.27. Cordón de dos meses de edad infectado por lesiones cutáneas con *S. BUBISUB* subdo. *BRASILIENSIS* MVS 207 y sacrificado a las 3 semanas p.p. Corte longitudinal del ganglio mandibular derecho en el que se observan los focos purulentos muy pequeños.



Figura IV.28. Cordón de dos meses de edad infectado por lesiones cutáneas con *S. BUBISUB* subdo. *BRASILIENSIS* MVS 207 y sacrificado a las 3 semanas p.p. Ganglio mandibular izquierdo. En esta imagen se observan numerosos focos de gran tamaño en la zona cortical del ganglio. M8(43A).

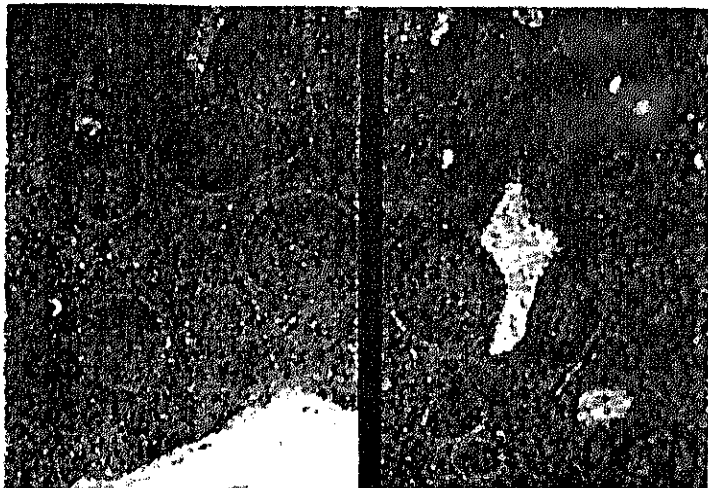


Figura IV.29. Cordeiro de dos meses de edad inoculado infectando indicaciones cutáneas con *S. aureus* (ATCC 29213) MVF 207 y sacrificado a las 5 semanas p.i. Ganglio mandibular izquierdo (a la izquierda de la imagen) comparado con el ganglio mandibular derecho (derecha de la imagen). En el ganglio mandibular izquierdo, correspondiente al lado inoculado, se observa un número elevado de inclusiones intracitoplasmáticas secundarias (B&A).]



Figura IV.30. Cordeiro de dos meses de edad inoculado infectando indicaciones cutáneas con *S. aureus* (ATCC 29213) MVF 207 y sacrificado a las 5 semanas p.i. Ganglio mandibular derecho. En la imagen se observa un microcápsulo rodeado de una gruesa capsula de tejido conectivo, que contiene células inflamatorias y que delimita una zona central con restos celulares de PMA. (B&A).]

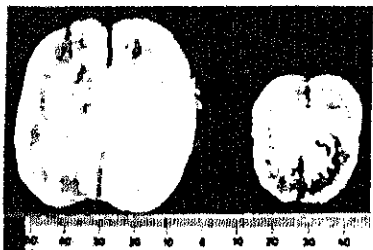


Figura IV.41. Oveja (B) de tres años de edad inoculada por vía intracameraria con la cepa MVF 207 de *S. ANKARA SUBDO. ANKARINAE* (7,5 x 10<sup>7</sup> UFC). Sacrificada a las 5 semanas p.i. En la imagen se aprecia como el ganglio ciliar izquierdo, correspondiente a la mano inoculada, está muy agrandado con respecto al contrario.



Figura IV.42. Oveja (H) de tres años de edad inoculada por vía intracameraria con la cepa MVF 207 de *S. ANKARA SUBDO. ANKARINAE* (7,5 x 10<sup>7</sup> UFC). Sacrificada a las 5 semanas p.i. En esta fotografía de la mano inoculada se observan múltiples microcistitos encapsulados con un contenido purulento espeso.

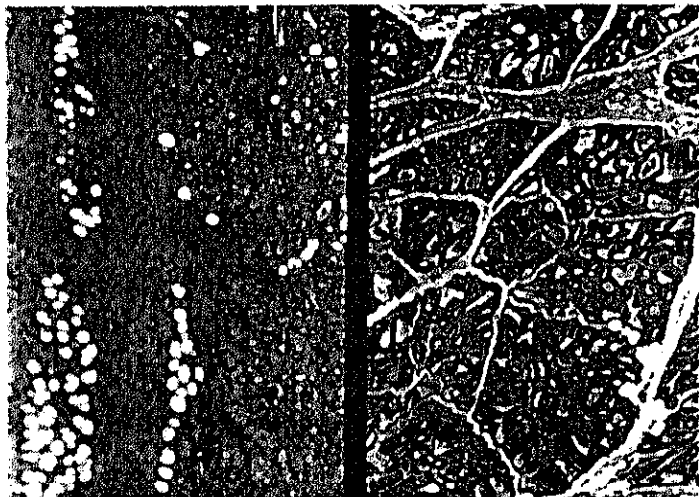


Figura IV.43. Oveja (I) de tres años de edad inoculada por vía intracameraria con la cepa MVF 207 de *S. ANKARA SUBDO. ANKARINAE* (7,5 x 10<sup>7</sup> UFC). Sacrificada a las 5 semanas p.i. Se observa mano inoculada (I) y ojo contrario (II) después de ser tratado con la granulla hemática inoculada. En la fotografía se aprecia a izquierda \*gránula microcistiter con engrosamiento evidente de las tabiques (100x) y de la granulla (200x). En los tabiques se aprecia un infiltrado inflamatorio leve y grupos de eritrocitos. (200x)

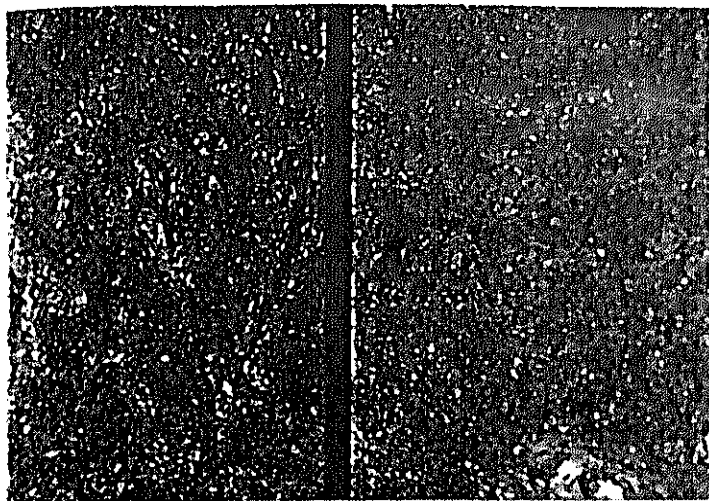


Figura IV.44. Oveja (LB) de tres años de edad inoculada por vía intravenosa con la cepa Myr 207 de *Mycobacterium tuberculosis* (1,2 x 10<sup>8</sup> UFC). Sacrificada a las 5 semanas p.i. Ganglio linfático (derecho) con el control (izquierdo) comparado con el derecho. Se observan cordones medulares gruesos con numerosas células plasmáticas. En el ganglio correspondiente a la mama inoculada, los cordones son de un grosor normal y muestran una discreta población de células plasmáticas (H&E(43x)).

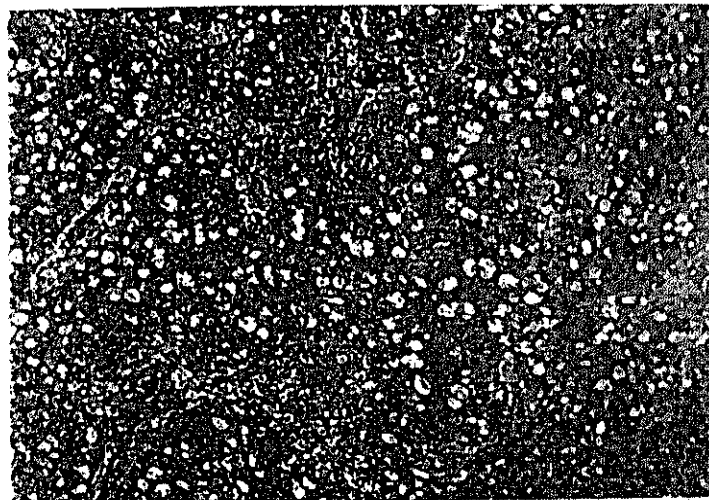


Figura IV.45. Oveja (M) de tres años de edad inoculada por vía intravenosa con la cepa Myr 207 de *Mycobacterium tuberculosis* (1,2 x 10<sup>8</sup> UFC). Sacrificada a las 5 semanas p.i. Ganglio linfático medular (derecho) correspondiente al lado inoculado. En la imagen se observan los cordones medulares engrosados con presencia de numerosas células plasmáticas y abundantes células eosinófilas de cuerpo tingible. (H&E(407x)).



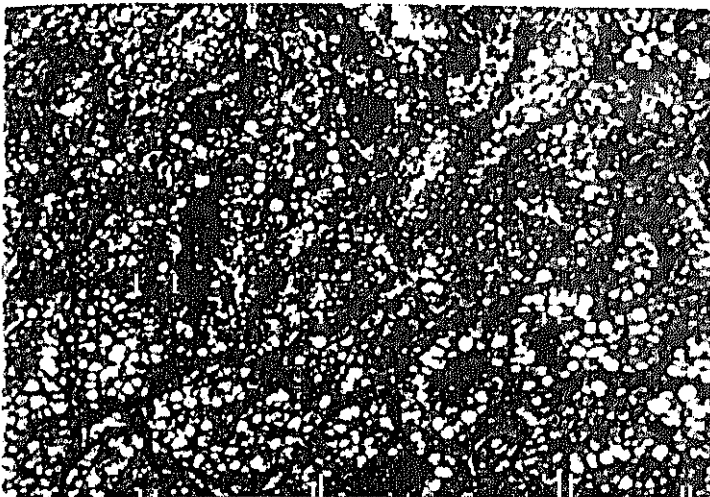


Figura IV.48. Oveja (M) de tres años de edad inoculada por vía intravenosa con la cepa MVR 207 de *Brucella abortus* ( $1,2 \times 10^6$  UFC). Sacrificada a las 5 semanas p.i. En esta imagen, correspondiente a la ganglia linfática inoculada, se observan numerosos linfocitos normales, mientras que en la zona de algunos de ellos aparecen acumulos de PMN. HE(107x).



Figura IV.49. Oveja (M) de tres años de edad inoculada por vía intravenosa con la cepa MVR 207 de *Brucella abortus* ( $1,2 \times 10^6$  UFC). Sacrificada a las 5 semanas p.i. En el centro de la imagen se observa un conducto excretor de gran tamaño con una masa central de tejido conectivo que oculta completamente la luz del conducto. El epitelio se ordena en múltiples capas (hiperplasia). HE(107x).

---

## **Discusión.**

## V.1. DEFICIENCIA RESPIRATORIA DE Staphylococcus aureus subsp. anaerobius.

La investigación de la deficiencia respiratoria de S. aureus subsp. anaerobius ha sido abordada previamente por De la Fuente et al. (1966, 1967a), quienes encontraron que mutantes aerotolerantes de la bacteria sintetizaban citocromos, lo que demostraba que eran capaces de sintetizar el grupo hemo, grupo prostético de la catalasa y los citocromos. Sin embargo, dichos mutantes, al igual que las cepas parentales, no presentaban actividad catalasa.

Dado que la falta de actividad catalasa de S. aureus subsp. anaerobius no puede achacarse a una alteración en la síntesis del grupo hemo, la atención debe dirigirse a la apoenzima. En principio caben dos posibilidades: bien la apoenzima no se sintetiza o bien está alterada y no es funcional. A su vez, cada una de estas posibilidades podrían ser consecuencia de distintas alteraciones.

La hipótesis más sencilla es que la deficiencia se deba a una mutación que afecte a la regulación de la síntesis o a la propia síntesis de la apoenzima de la catalasa. Si así fuera, en principio, cabría la posibilidad de que la mutación fuera reversible y de que, por tanto, pudieran detectarse variantes catalasa positivas tras someter a la bacteria a agentes mutágenos.

Los resultados negativos obtenidos en los múltiples intentos de obtener variantes catalasa positivas de S. aureus subsp. anaerobius por los agentes mutágenos probados no permiten descartar dicha hipótesis.

Respecto de S. aureus subsp. anaerobius, en la literatura precedente se han descrito 3 aislamientos de estafilococos catalasa negativos Lucas y Seeley, 1955; Everall y Stacey, 1958; Bulmer y San Clemente, 1963; Tu y Palutke, 1976; Schumacher-Pérdreau et al., 1981). De ellos merece especial comentario el realizado por Schumacher-Pérdreau et al. (1981), a partir de una infección urinaria de una paciente que padecía un carcinoma de colon y que tras la extirpación quirúrgica fue sometida a radioterapia. Los autores plantean la posibilidad de que esta cepa de S. aureus podría haber mutado a catalasa negativa como

consecuencia de las radiaciones. Aunque en ninguno de los 3 aislados catalasa negativos se investigo en que consistia la deficiencia en catalasa, los tres en los que se estudio la praeura de la benzidina (los descritos por Lucas y Seeley, Schumacher-Ferdreau *et al.* y Tu y Palutke) esta fue positiva, es decir, las bacterias presentaban el sistema de citocromos. Estas cepas, por lo tanto, comparten con *S. aureus* subsp. *anaerophilus* la capacidad de sintetizar hemo y, sin embargo, ser catalasa negativas. No obstante, hay una diferencia sustancial entre dichas cepas y *S. aureus* subsp. *anaerophilus* puesto que aquellas constituyen aislamientos clinicos ocasionales, mientras que esta subespecie de estafilococo es el agente etiologico de una enfermedad claramente definida y diagnosticada en multiples ocasiones en diferentes paises.

Por otra parte, tambien se han descrito algunas cepas de estafilococos incapaces de sintetizar hemo y que dependian de la incorporacion al medio de esta sustancia para sintetizar catalasa (Regan *et al.*, 1939; Jensen, 1961; Borderson y Mercedal-Ceanu, 1976; Devriese, 1977). Este tipo de mutantes catalasa negativos, que pierden la capacidad de sintetizar hemo, se obtienen facilmente en el laboratorio creciendo la bacteria en presencia de neomicina (Sassarman *et al.*, 1968, 1970). Al transferir al medio de cultivo hemo o alguno de sus precursores, las bacterias se transforman en catalasa positivas.

Jensen (1961) en una de estas cepas de estafilococo deficiente en la sintesis de hemo detecto inmunologicamente la apocatalasa (grupo proteico de la catalasa) y demostro que su sintesis era independiente de la presencia del grupo prostetico. En su estudio empleo suero anticatalasa producido en conejos inculados con catalasa purificada de *S. aureus*, la tecnica de inmunodifusion doble en placa.

Rupprecht y Schleifer (1979) y Schleifer *et al.* (1979) investigaron las relaciones inmunologicas existentes entre las catalasas de las diferentes especies de estafilococos coagulasa positivas y negativas con fines taxonomicos. Estos autores emplearon tambien sueros obtenidos en conejos inmunizados con catalasas purificadas de distintas especies de estafilococos y las tecnicas de inmunodifusion y microfijacion de complemento. Esta ultima les permitia determinar la distancia inmunologica existente entre las distintas catalasas. En general encontraron

reacciones cruzadas más o menos intensas entre las diferentes catalasas y, en concreto, las distintas cepas de *S. aureus* estudiadas mostraban una reacción de identidad entre sí (Rupprecht y Schleifer, 1979).

El planteamiento experimental realizado para comprobar si la apoenzima de la catalasa de *S. aureus* subsp. *anaerobius* se sintetiza totalmente o en parte se basa en asumir que la apoenzima reacciona inmunológicamente con anticuerpos policlonales producidos frente a la catalasa de *S. aureus*. Esta idea se corrobora, además de en los trabajos mencionados anteriormente, en la estrecha relación genética existente entre ambas bacterias que muestran rasgos de un ídolo de homología en estudios de hibridación (DNA-DNA) y en el hecho de que la L-lactato deshidrogenasa de *S. aureus* subsp. *anaerobius* está muy relacionada inmunológicamente con la de *S. aureus* ATCC 11400, como lo demuestran los bajos valores de distancia inmunológica (de 4 a 6) encontrados con la técnica de microdifusión de complemento (De la Fuente et al. 1980).

La metodología empleada en este estudio para la purificación de la catalasa de *S. aureus* ATCC 11400 sigue la pauta clásica descrita por Stansell y Deutsch (1965) para la purificación de esta enzima de eritrocitos humanos, si bien se han introducido ciertas modificaciones. Así, se ha suprimido el paso de la precipitación fraccionada con sulfato amónico, lo que simplifica la purificación sin afectar al resultado final. En el método empleado por nosotros solamente se precipita con una mezcla de etanol y cloroformo antes de realizar las cromatografías. Rupprecht y Schleifer (1979) sin embargo, en la pauta utilizada para purificar las catalasas de distintas especies de estafilococos describen la precipitación por etanol y cloroformo con la precipitación fraccionada con sulfato amónico.

La cromatografía de exclusión molecular empleada (Ultragel 4000) fue la misma utilizada por Rupprecht y Schleifer (1979), aunque en nuestro caso se hizo uso de ella a continuación de la precipitación con la mezcla de etanol y cloroformo, mientras que estos autores la usan después de pasar el extracto proteico por una columna de intercambio iónico.

El gradiente lineal de NaCl utilizado para eluir la catalasa retenida por el intercambiador aniónico (DEAE-Sephacel), entre

0,2 y 0,5 M de NaCl en un tampon fosfato potasico 0,01 M, pH 7,0, concuerda con los margenes de valores de gradiente encontrados por Wayne y Diaz (1988) para eluir del mismo intercambiador las catalasas T (0,20-0,28M), M (0,29-0,32M) y A (0,44M) de Mycobacterium spp.

El rendimiento del proceso de purificación desarrollado por nosotros es comparable al obtenido por Loewen y Switala (1986) en la purificación de la catalasa HPII de Escherichia coli. Partiendo de las bacterias crecidas en 10 litros de medio de cultivo estos autores obtuvieron 9,5 mg. de proteína final y nosotros 9,24 mg.

Al analizar la proteína final obtenida tras los sucesivos pasos de purificación por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) se detectó una única banda de proteína situada ligeramente por debajo de la seroalbumina bovina. El peso molecular estimado de esta banda fue de 60 Kd. La catalasa está constituida por cuatro subunidades de idéntico peso molecular (Fita y Rossmann, 1985), por lo que según nuestros resultados el peso molecular estimado de la catalasa de S. aureus ATCC 12600 sería 240.000 daltons, muy semejante al hallado por Rupprecht y Schleifer (1979) (245.000 daltons).

Con la técnica descrita por Gregory y Fridovich (1974), modificada por Clare et al. (1984) no se detectó banda alguna de actividad catalasa en los extractos crudos de las diferentes cepas de S. aureus subsp. anaerobius probadas, mientras que los extractos de S. aureus ATCC 12600 mostraron una banda de actividad. Estos resultados son lógicos puesto que en los extractos crudos de S. aureus subsp. anaerobius tampoco se detecta actividad catalasa con el método clásico de Sinha (De la Fuente et al., 1987a). Empleando la misma técnica de detección de catalasa en SDS-PAGE, Schumacher-Ferdreau et al. (1981) tampoco detectaron actividad enzimática en las cepas catalasa negativas Km 26 (aisladas por ellos) y SCM 2561 (aisladas por Lucas y Seeley).

Para la producción de suero anticatalasa se inmunizaron conejos con la catalasa electroforéticamente pura siguiendo la pauta de inoculación descrita por Rupprecht y Schleifer (1979). Según estos autores se requieren periodos de inmunización de 3 meses para alcanzar títulos constantes con la técnica de microfijación de complemento. En nuestro estudio los resultados

fueron similares con los sueros obtenidos a diferentes días (73, 82, 110 y 114) del comienzo de la inmunización. Todos ellos reconocieron perfectamente en el análisis inmunoenzimático la banda de 60 Kd de la catalasa. Aunque no se ensayaron sueros antes de los 73 días del inicio de la inmunización, es probable que, dada la sensibilidad del ensayo inmunoenzimático utilizado por nosotros, no se precise un período de inmunización tan largo como en el caso de utilizar la microfijación de complemento.

En nuestro estudio se ha preferido la técnica de electrotransferencia y posterior análisis inmunoenzimático sobre las utilizadas por otros autores en análisis inmunológicos de catalasas, como la inmunodifusión doble en placa o la microfijación de complemento, por dos razones principales. En primer lugar, por su mayor sensibilidad, pues permite detectar cantidades muy pequeñas de antígeno del orden de ng (O'Donnell y Andersen, 1982), y en segundo lugar porque permite conocer con cuántas proteínas y de que pesos moleculares reaccionan los anticuerpos. De esta forma, y en función de los pesos moleculares de las proteínas que reaccionan pueden detectarse reacciones inespecíficas.

Por otra parte, esta técnica serviría para detectar reacciones cruzadas entre catalasas de distintas especies bacterianas (especialmente de estafilococos) pero, al contrario de la microfijación de complemento, no permitiría calcular la distancia inmunológica entre las diferentes catalasas.

Los resultados negativos obtenidos en los intentos de separación del grupo proteico de la catalasa en extractos crudos o parcialmente purificados de distintas cepas de *S. aureus* subsp. *aureus* con la técnica de electrotransferencia y análisis inmunoenzimático parecen indicar que esta bacteria no sintetiza la especie de la catalasa. Al no detectarse banda proteica alguna de reacción ni de peso molecular semejante ni distinto al de la catalasa de *S. aureus* tampoco parece que la bacteria sintetice parte del grupo proteico.

El hecho de que las inmunoglobulinas anticatalasa reaccionen específicamente con una banda proteica de movilidad electroforética semejante a la catalasa purificada en extractos crudos de *S. aureus* y de las otras especies de estafilococos coagulasa

negativas pone de manifiesto la validez del planteamiento experimental.

El reconocimiento por parte de las inmunoglobulinas anticatalasa de dos bandas proteicas en el extracto crudo de *S. ginsengensis* coincide con lo descrito para esta especie por Zimmerman (1976), quien detecto dos bandas con actividad catalasa y distinta movilidad relativa en geles de poliacrilamida, si bien hay que tener en cuenta que realizo la electroforesis sin SDS, es decir, en condiciones no desnaturalizantes. Además, este mismo autor detecto dos bandas proteicas que presentaban actividad catalasa y diferente movilidad electroforética en alguna otra especie de estafilococo, entre ellas, en *S. aureus* (Zimmerman, 1976). Nosotros, sin embargo, utilizando SDS-PAGE, esto es, condiciones desnaturalizantes, solamente detectamos una banda con actividad catalasa en *S. aureus*. En el caso de Zimmerman, al realizar la electroforesis sin SDS, las distintas bandas podrian deberse a formas de la enzima compuestas por distinto numero de subunidades mas que a formas multimoleculares de la enzima como sugiere el investigador. Sin embargo, este razonamiento no explicaria la deteccion de dos bandas de reaccion en *S. ginsengensis*. Se precisa un estudio mas detallado para aclarar la reaccion inmunologica cruzada de estas dos proteinas con la catalasa de *S. aureus* y para determinar si se trata de dos catalasas distintas. Habria que comenzar investigando si ambas proteinas tienen actividad catalasa o no, cuestion que no hemos abordado por escaparse de los objetivos de esta Tesis Doctoral. En contra de que se trate de dos catalasas distintas estan los resultados encontrados en otras bacterias, puesto que las dos catalasas descritas en *S. gall* (HPI y HPII) (Loewen y Switala, 1986) y las tres en *Mycobacterium* spp. (A, X y Y) (Wayne y Diaz, 1988) son inmunologicamente diferentes entre si.

Los resultados de nuestro estudio indican que la deficiencia respiratoria de *S. aureus* subsp. *anaerobius* se debe a que la apoenzima de la catalasa no se sintetiza. La falta de sintesis del grupo proteico de la catalasa podria, a su vez, ser consecuencia de alguna alteracion (posiblemente una mutacion por sustitucion, adiccion o deleccion) que afecte al gen o genes reguladores de la sintesis de la catalasa o al gen estructural de la proteina. La posibilidad de que la bacteria haya perdido totalmente alguno de estos genes parece bastante mas improbable.



Sea cual sea la causa final, la resolución del problema pasa por un estudio genético. Hasta el momento no se ha estudiado el gen de la catalasa de S. aureus ni el de otras especies de estafilococos. Tampoco se sabe si la síntesis de la catalasa en los estafilococos tiene algún mecanismo de regulación. En otros microorganismos se ha conseguido mapear, clonar e incluso secuenciar los genes de la catalasa (Hartig y Ruis, 1986; Melik-Adamyán et al., 1986; Okada et al., 1987; Cohen et al., 1988; Triggs-Raine et al., 1988; Von Ossowski et al., 1991) y en algún caso se ha comprobado que existe un mecanismo de regulación (Christman et al., 1985; Morgan et al., 1986; Belazzi et al., 1991).

Dada la carencia de estudios sobre el gen de la catalasa (y sobre el o los posibles genes reguladores) de los estafilococos, un planteamiento experimental para abordar la cuestión podría consistir en transformar S. aureus con un plásmido que contenga un trasposón e inducir mutaciones por inserción del trasposón en el gen de la catalasa y posterior detección de los transformantes catalasa negativos. El trasposón insertado en los transformantes podría utilizarse como sonda para localizar y estudiar el gen de la catalasa. Una vez conocido y secuenciado el gen de la catalasa de S. aureus, la resolución de la deficiencia respiratoria de S. aureus subsp. anaerobius se nos antoja relativamente sencilla, siempre que fuera este el gen alterado. La estrategia consistiría en definir unos "cebadores" para amplificar el gen de S. aureus subsp. anaerobius por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en clonar el gen amplificado en un vector, secuenciarlo y compararlo con el gen funcional de S. aureus.

Para terminar con esta parte de la discusión quisieramos hacer una consideración sobre lo que denominamos "deficiencia respiratoria" de S. aureus subsp. anaerobius. Esta expresión no deja de ser un término comparativo en relación con las características habituales de S. aureus y del resto de especies de estafilococos. Lo que nosotros con esta visión comparativa consideramos una "alteración" del microorganismo podría muy bien tratarse, desde un punto de vista biológico-evolutivo, de una "adaptación" de la bacteria al organismo de los ovinos que de alguna manera le permite competir mejor en la interacción hospedador-parásito. Los resultados de fagocitosis y de supervivencia intracelular que se discuten en el siguiente apartado apoyarían esta idea.

## V.2. ESTUDIOS DE FAGOCITOSIS Y SUPERVIVENCIA INTRACELULAR.

Una vez que *S. aureus* subsp. *anaerobius* penetra en el hospedador, para que se establezca la infección y se desarrolle la enfermedad es necesario que el microorganismo supere los mecanismos defensivos específicos e inespecíficos del hospedador. Los polimorfonucleares neutrofilos (PMN) constituyen la primera línea de defensa contra la infección con su capacidad de fagocitar y destruir los microorganismos invasores. Dadas las características de presentación de la enfermedad, formación de abscesos en los ganglios linfáticos superficiales, el grado de eficacia de este proceso primario de defensa orgánica podría ser en gran medida responsable de que llegue o no a producirse la enfermedad. De ahí que dentro del estudio de la patogenia de la enfermedad de los abscesos bayanos considerado prioritario investigar la eficacia de la fagocitosis y de la actividad bactericida de los PMN ovinos frente a *S. aureus* subsp. *anaerobius*.

En el planteamiento experimental de estos estudios se ha tenido en cuenta tanto la diferente capacidad patogénica para los ovinos de *S. aureus* subsp. *anaerobius* y *S. aureus* como la decisiva influencia de la edad de los animales en la presentación natural de la enfermedad de los abscesos. Por ello los estudios de fagocitosis y supervivencia intracelular de *S. aureus* subsp. *anaerobius* se han realizado siempre en comparación con estirpes clásicas de *S. aureus* aisladas de procesos patológicos ovinos (mamitis) y se han utilizado tanto PMN procedentes de animales jóvenes como de adultos. Con la comparación entre las dos bacterias se pretende comprobar si las diferencias fisiológicas y bioquímicas existentes entre ellas se traducen en un comportamiento distinto en su interacción con los PMN ovinos. Con la utilización de PMN de animales jóvenes y adultos se intenta demostrar si la edad de los donadores de PMN influye en su capacidad para fagocitar y destruir las bacterias estudiadas.

Antes de entrar en la discusión propiamente dicha de los resultados de estos estudios consideramos que, dada la falta de estandarización de las técnicas de estudio de fagocitosis y supervivencia intracelular, es interesante comentar la metodología empleada. Asimismo, es preciso señalar que existen muy pocos estudios sobre fagocitosis con PMN de la especie ovina.

### V.2.1. Discusion de la metodologia empleada.

La presencia de opsoninas es un requerimiento importante para la optima fagocitosis de las bacterias por los PMN. Prueba de ello es que los resultados de fagocitosis obtenidos en estudios en los que se utilizan agentes opsonizantes son mayores que aquellos en los que se emplean bacterias no opsonizadas (Vandencroucke-Grauls et al., 1985), e incluso estos resultados pueden llegar a ser nulos en ausencia de opsoninas cuando las bacterias estudiadas son *S. aureus* o *E. coli* (Williams y Bunch, 1981).

En nuestro estudio, al igual que en los realizados por otros muchos investigadores (Jule et al., 1967; Paape et al., 1975; Renshaw et al., 1976; Williams et al., 1984, 1985; Anderson y Williams, 1987; Serra et al., 1988), se utilizo una mezcla de sueros autologos procedentes de cone animales donadores sanos vivos, para la opsonizacion de las bacterias. La mezcla de sueros se usa solo por calor con el fin de que las inmunoglobulinas fuesen el unico agente opsonizante sin la intervencion de factores del complemento (Williams et al., 1984, 1985; Anderson y Williams, 1987; Vandencroucke-Grauls et al., 1987).

La concentracion final de suero, 2,5%, utilizada para la opsonizacion de las bacterias en este estudio es superior a la del 0,5% empleada por Williams y Bunch (1981) y Anderson y Williams (1987) pero inferior a la del 10% utilizada por Paape et al. (1975), Ward (1976) y Jule (1967). Paape et al. (1975) y Anderson (1987) encontraron que la tasa de fagocitosis disminuia al disminuir la concentracion de suero empleada en la opsonizacion. Ademàs, segun Paape et al. (1975) el 10% seria la concentracion optima. Por lo tanto, estos datos parecen de tenerse en cuenta en la interpretacion de los resultados obtenidos por los diferentes investigadores.

La obtencion de leucocitos se realizo segun la metodologia descrita por Boyes (1984) con ligeras modificaciones. Este metodo se fundamenta en la utilizacion de gradientes de densidad para la purificacion de los PMN y con el se obtiene un elevado rendimiento. Se ha preferido este metodo de purificacion de PMN sobre el de Carlson y Kaneko (1973), que unicamente emplea sucesivas centrifugaciones y lisis de los hematies, puesto que, aunque con ambos se obtiene una viabilidad celular muy similar (por encima

del 93%), la pureza de los PMN obtenidos varía considerablemente de una técnica a otra: mientras que con el método de Carlson y Kaneko (1973) los porcentajes de PMN obtenidos oscilan entre el 82 y un 92% (Williams y Bunch, 1981; Czuprynsky y Hamilton, 1983; Novde y Gray, 1986; Sanchez et al., 1986; Suttrop et al., 1987; Mayer et al., 1988a; Nonnecke y Harp, 1988; Silva et al., 1988), con la pauta desarrollada por Boyan (1984) estos porcentajes, independientemente del producto empleado para formar el gradiente, superan en todas las ocasiones el 93% (Fleischman et al., 1986; Johnson et al., 1986; El Awar et al., 1990). En nuestro estudio hemos empleado "Ficoll-Paque" para la elaboración del gradiente de densidad, obteniendo unos porcentajes medios de viabilidad del 97% y de pureza del 93%, que concuerdan con los descritos por otros investigadores (Vandenbroucke-Grauls et al., 1985, 1987).

La proporción de PMN:bacterias empleada en este estudio fue de 1:1 a 1:3, similar a la utilizada por Guie et al., (1987); Johnson et al. (1986), Yoneyama et al. (1989) y Marodi et al. (1990). No obstante, según demuestran los estudios de Macvar et al. (1976) realizados con *S. aureus* y *S. enteritidis* esta proporción puede elevarse hasta 1:10 sin que los resultados obtenidos varíen considerablemente.

Otra diferencia encontrada en las técnicas de estudio de la vía de fagocitosis entre distintos investigadores es el tiempo de fagocitosis, es decir, el tiempo que se mantienen en contacto los PMN con las bacterias estudiadas antes de cuantificar el porcentaje de microorganismos fagocitados. Este tiempo varía generalmente entre los 15 y los 120 minutos (Williams y Bunch, 1981; Anderson y Williams, 1985; Williams et al., 1987; Craver et al., 1988; Johnson et al., 1988; Fox et al., 1987; Mayer et al., 1988a; Silva et al., 1988). En nuestros estudios se ha optado por 15 minutos con el fin de conservar mejor las posibles diferencias en los porcentajes de fagocitosis tanto de los PMN de corderos como de adultos con las dos bacterias estudiadas.

El cálculo de las bacterias fagocitadas en este trabajo (igual al número inicial de bacterias menos el número de bacterias presentes en el sobrenadante tras la centrifugación a los 15 minutos) no tiene en cuenta las bacterias adheridas a los PMN pero no fagocitadas ni los posibles grupos de bacterias que sedimentan tras la centrifugación. El ligero error introducido

al no considerar estos hechos no afectaría a los resultados de este estudio considerados desde un punto de vista comparativo, pues los experimentos se realizaron en todos los casos en las mismas condiciones, con lo que se supone que el posible error introducido es análogo. Los resultados obtenidos por Williams *et al.* (1985) en un estudio de fagocitosis de *S. aureus* con PMN bovinos apoyan claramente nuestro punto de vista, ya que estos investigadores calcularon una correlación de 0,98 entre la fagocitosis calculada sin considerar las bacterias asociadas a los PMN ni las sedimentarias y la fagocitosis calculada teniendo en cuenta estos hechos.

En los estudios de supervivencia intracelular también hay discrepancias en los métodos utilizados por diferentes autores. Como en el caso de la fagocitosis el tiempo de incubación de los PMN y las bacterias varía, oscilando generalmente en este caso entre 30 y 120 minutos (Anderson y Williams, 1985; Williams *et al.*, 1985; Craven *et al.*, 1986; Johnson *et al.*, 1986; Mayer *et al.*, 1988a). Además hay que tener en cuenta que en muchos estudios la mayor o menor eficacia de la función de los PMN frente a los microorganismos se mide directamente como el porcentaje de bacterias supervivientes intracelulares al cabo de un tiempo determinado (Koneyama *et al.*, 1989). En estos casos los PMN y las bacterias se mantienen en contacto durante todo el tiempo considerado y solo al final se cuantifica la proporción de supervivientes intracelulares.

Dubin *et al.* (1984) describieron que la lisostafina era capaz de penetrar en el interior de los PMN y destruir los estafilococos presentes en el interior, por lo que, según estos autores, la lisostafina no podría utilizarse en los estudios de fagocitosis si posteriormente se pretende determinar la supervivencia intracelular. No obstante, en nuestro estudio, siguiendo la opinión de la mayoría de los investigadores que consideran que la lisostafina únicamente destruye los estafilococos extracelulares asociados o no a los PMN (Anderson y Williams, 1985; Williams *et al.*, 1985; Craven *et al.*, 1986), hemos empleado para determinar los estafilococos supervivientes intracelulares un tratamiento con lisostafina consistente en añadir 5 µg/ml durante 20 minutos a 37 °C en agitación suave y posterior inactivación de la misma con tripsina (1-2 mg/ml). Nuestras observaciones coinciden con las de Johnson *et al.* (1986) en que ni la lisostafina ni la tripsina afectan la viabilidad de los PMN.

En este trabajo se ha pretendido diferenciar claramente la fagocitosis de la supervivencia intracelular, por lo cual una vez cuantificado el porcentaje de bacterias fagocitadas a los 15 minutos se destruían todos los microorganismos no fagocitados (incluyendo los asociados a los PMN) con lisostafina y a continuación, se estudiaba la supervivencia intracelular de los microorganismos fagocitados en esos 15 minutos a diferentes tiempos.

Las diferencias señaladas en los métodos de estudio de la fagocitosis y de la supervivencia intracelular hacen que la comparación de los resultados de los diferentes estudios sea complicada.

#### V.2.2. Discusión de los resultados de fagocitosis y supervivencia intracelular.

Las diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) encontradas en los resultados de fagocitosis entre las cepas de *S. aureus* subsp. *anaerophilus* y las de *S. aureus* cuando se utilizan PMN de animales jóvenes (tabla IV.6) ponen claramente de manifiesto la diferente capacidad fagocítica de los PMN de los ovinos jóvenes frente a estas dos bacterias, siendo significativamente más elevados los porcentajes de fagocitosis obtenidos frente a *S. aureus* que frente a *S. aureus* subsp. *anaerophilus*. En otras palabras, los PMN de los ovinos jóvenes fagocitan más eficazmente a *S. aureus* que a *S. aureus* subsp. *anaerophilus*.

Recordemos que en la tabla IV.6 los resultados de fagocitosis frente a cada una de las cepas de estafilococos estudiadas se han calculado considerando los valores obtenidos con los PMN de los 3 ovinos jóvenes en conjunto. Lógicamente esta forma de presentar los datos no permite analizar si existen o no diferencias individuales entre los corderos utilizados como donadores de PMN. Las posibles diferencias individuales pueden estudiarse comparando los resultados reflejados en la parte superior de las tablas IV.8 y IV.9, donde se expresan los porcentajes de fagocitosis obtenidos con cada uno de los corderos frente a las cepas de *S. aureus* subsp. *anaerophilus* consideradas en conjunto (tabla IV.8) y frente a las cepas de *S. aureus* consideradas en conjunto (tabla IV.9). Los estudios de significancia (ver figura IV.6c) confirman, como es lógico por los resultados ya vistos de la tabla IV.6, la diferente capacidad fagocítica de los PMN de

Los corderos frente a las dos bacterias estudiadas. Ahora bien, las diferencias en los porcentajes de fagocitosis obtenidos con los PMN de los diferentes corderos con S. aureus subsp. anaerobius y con S. aureus no fueron significativas en todos los casos observándose, además, una diferencia individual muy clara en el caso del cordero 4. El resultado de fagocitosis de este animal con S. aureus subsp. anaerobius (60.64  $\pm$  1.00) no mostró diferencias significativas con los resultados de los corderos 2, 3, 4, y 5 con S. aureus (figura IV.6c). Ello es consecuencia de la mayor capacidad fagocítica que el cordero 4 muestra frente a S. aureus subsp. anaerobius en comparación con el resto de los corderos. En los bovinos se han encontrado reiteradamente diferencias en la capacidad fagocítica entre distintos animales (Williams y Bunch, 1981; Williams et al., 1984; Mullan et al., 1985; Craven et al., 1986).

De los resultados analizados puede afirmarse que S. aureus subsp. anaerobius es más resistente que S. aureus a la fagocitosis de los PMN de ovinos jóvenes.

Por el contrario, analizando los resultados de la tabla IV.7, en la que se expresan los porcentajes de fagocitosis de los PMN de los animales adultos considerados en conjunto frente a las diferentes cepas de estafilococos estudiadas, puede deducirse que los PMN de los ovinos adultos no muestran diferencias en su capacidad fagocítica frente a las dos bacterias estudiadas, ya que únicamente fueron significativas las diferencias entre las cepas MVF 7SR y MVF 4ISR y entre las cepas MVF 7SR y MN 4S. La cuestión aparece mucho más clara cuando se comparan los porcentajes de fagocitosis de cada uno de los animales adultos frente a las cepas de S. aureus subsp. anaerobius consideradas en conjunto (parte inferior de la tabla IV.8) con los porcentajes de fagocitosis de los mismos animales frente a las cepas de S. aureus (parte inferior de la tabla IV.9), ya que no aparecen diferencias significativas en ninguno de los casos. Por lo tanto, de acuerdo con estos resultados puede afirmarse que los PMN de los animales adultos fagocitan con igual efectividad a S. aureus subsp. anaerobius que a S. aureus.

Para completar el análisis de los resultados que figuran en las tablas IV.6 a IV.9 resta por comparar, por una parte, los resultados de fagocitosis de los PMN de los ovinos jóvenes frente a S. aureus subsp. anaerobius con los de los PMN de los animales

adultos frente a la misma bacteria y, por otra, los resultados de fagocitosis de los PMN de los corderos jóvenes frente a *S. aureus* con los de los PMN de los animales adultos frente a esta misma bacteria.

En el primer caso cuando la comparación se hace considerando en conjunto a los animales jóvenes (parte superior de la tabla IV.6) y a los adultos (parte superior de la tabla IV.7) se aprecian diferencias significativas muy claras mostrando los animales adultos una mayor capacidad fagocítica, frente a las cepas de *S. aureus* subsp. *anaerobius* que los animales jóvenes. A la misma conclusión se llega, como es lógico, comparando los resultados de fagocitosis frente a esta bacteria de cada uno de los corderos con cada uno de los corderos adultos (tabla IV.8), puesto que aparecen diferencias significativas entre todos los animales jóvenes y todos los adultos (ver figura IV.6a). Además, comparando los resultados de los corderos entre sí se observan diferencias significativas entre el cordero A y el resto de los animales de este grupo (figura IV.6a). La diferencia individual de este animal con el resto de los corderos también aparecía al comparar los resultados de fagocitosis de los corderos frente a las dos bacterias estudiadas. Los animales adultos no muestran diferencias entre sí.

Como resumen puede decirse que los PMN de los animales adultos fagocitan más eficazmente a *S. aureus* subsp. *anaerobius* que los PMN de los corderos.

Finalmente, en el caso de *S. aureus*, cuando la comparación se efectúa considerando a los animales jóvenes y adultos en conjunto (parte inferior de las tablas IV.6 y IV.7 respectivamente) frente a las diferentes cepas de esta bacteria, únicamente la cepa MN 27/PMN-cor no mostraron diferencias significativas con MN 27/PMN-adu ni con MN 42/PMN-adu. Por lo tanto, tomando los resultados de significancia en conjunto puede considerarse que los PMN de los corderos y de los adultos mantienen diferencias significativas en su capacidad fagocítica frente a *S. aureus* siendo mayor la de los PMN de los adultos.

Comparando los resultados de fagocitosis frente a *S. aureus* (considerando las diferentes cepas en conjunto) de cada uno de los corderos con cada uno de los adultos (tabla IV.9) aparecen diferencias significativas en todos los casos excepto entre el



cordero 4 con todos los adultos y entre el cordero 3 con los adultos 1 y 2 (figura IV.6r). Si exceptuamos el cordero 4, que claramente representa una diferencia individual, el conjunto de los resultados de significancia confirman la diferente capacidad fagocítica de los PMN de los corderos y de los adultos frente a *S. aureus*.

Comparando los resultados de los corderos entre si aparecen diferencias significativas entre el cordero 1 con el resto de los corderos excepto con el 2. Esta diferencia individual entre los corderos es consecuencia de la menor capacidad fagocítica del cordero 1 frente a las cepas de *S. aureus* en comparación con la mayoría de este grupo de animales. Los animales adultos no muestran diferencias entre si en la fagocitosis frente a *S. aureus*.

En definitiva puede decirse que los PMN de los animales adultos fagocitan mas eficazmente que los PMN de los animales jóvenes a *S. aureus*.

Analizando los resultados de fagocitosis en conjunto parece claro que la edad de los animales considerados influye decisivamente en la capacidad fagocítica de los PMN, al menos frente a las cepas estudiadas, como lo demuestra el hecho de que los PMN de los animales jóvenes fagocitan menos eficazmente que los PMN de los adultos tanto a *S. aureus* subsp. *aureus* como a *S. aureus* *harrardina* (El Al. (1991) también encontraron que la capacidad fagocítica de los PMN de corderos de 2 días de edad era significativamente menor que la de los PMN de ovinos adultos frente a distintos inmunocomplejos. Asimismo, se ha descrito que la capacidad funcional de los PMN de neonatos humanos (Miller, 1969 de perros (Cohenoul et al., 1984) y de terneros (Fenshaw et al. 1981) es menor que la de los PMN de sus respectivos animales adultos. Este hecho podría estar relacionado con la maduración funcional de los PMN o, mas genericamente, de los mecanismos de defensa celular (Wolbeniwet y Rowan, 1990).

No obstante, todas las diferencias observadas en nuestro estudio no pueden ser atribuidas exclusivamente al factor edad de los animales, puesto que si solo influyera la edad cabria esperar que los PMN de los ovinos jóvenes, al igual que ocurre con los PMN de los adultos, mostrasen una capacidad fagocítica analoga frente a *S. aureus* y frente a *S. aureus* subsp. *aureus*.

una, dado que estas bacterias están estrechamente relacionadas. Sin embargo, como se dijo anteriormente, los PMN de los corderos fagocitan más eficazmente a *S. aureus* que a *S. aureus* subsp. *anarthrus*. Por lo tanto, en el caso de los PMN de los corderos jóvenes parece que las posibles diferencias existentes entre las dos bacterias influyen en su menor capacidad fagocítica frente a *S. aureus* subsp. *anarthrus*.

Para intentar explicar la diferente capacidad fagocítica de los PMN de los corderos frente a estas dos bacterias hay que tener en cuenta que en las condiciones en que se han realizado los experimentos *in vitro* los principales factores implicados en la mayor o menor eficacia fagocítica son las estructuras superficiales de las bacterias que entran en contacto con los PMN y la opsonización. Adicionalmente podrían intervenir mecanismos físico-químicos como la hidrofobicidad superficial y la carga electrostática de las bacterias.

En los componentes superficiales de los estafilococos pueden incluirse la pared celular (con el peptidoglucano y el ácido teicoico), la proteína A y las proteínas externas. La composición de la pared celular es idéntica en ambas bacterias, a saber, peptidoglucano del tipo Lys-Gly<sub>2</sub> y ácido teicoico, teicoico sustituido con N-acetilglucosamina (De la Fuente et al., 1976). Por lo tanto debe descartarse.

En cuanto a la proteína A, si se han descrito diferencias entre ambas bacterias: De la Fuente y Suárez (1985), utilizando un método cualitativo, no detectaron proteína A en *S. aureus* subsp. *anarthrus*. A la proteína A se la considera un mecanismo defensivo de los estafilococos frente a la fagocitosis por su capacidad de unirse inespecíficamente a la fracción cristalizante (Fc) de la inmunoglobulina de tipo G, con lo que queda expuesta hacia el exterior la fracción Fab y no la Fc, para la que los PMN tienen receptores (Van Oss et al., 1971). Paradojalmente los PMN de los corderos fagocitan con menor eficacia a la bacteria que carece (o al menos tiene mucha menor cantidad) de proteína A. Por lo tanto, no parece probable que la falta (o la menor cantidad) de proteína A de *S. aureus* subsp. *anarthrus* sea la responsable de las diferencias en la fagocitosis de los PMN de corderos frente a las dos bacterias.

Tanto en *S. aureus* (Greung y Fischetti, 1988) como en *S. epidermidis* (Patrick et al., 1990) se han encontrado proteínas de superficie asociadas a la pared celular y expuestas al exterior y que, por tanto, pueden interactuar con el hospedador. Asimismo, se han descrito proteínas de superficie en cepas de *S. aureus* aisladas de mamitis bovinas que tienen la capacidad de adherirse a las células epiteliales de la mama y que pueden jugar un papel en el desarrollo de la mamitis (Lindhal et al., 1990).

Las posibles diferencias en la composición de las proteínas superficiales entre *S. aureus* subsp. *anserophilus* y *S. aureus* y su consiguiente interacción con los PMN de los ovinos jóvenes podría explicar las diferencias en la fagocitosis. Por el momento no se han realizado estudios comparativos de proteínas externas entre *S. aureus* subsp. *anserophilus* y *S. aureus*. Es, pues, esta una cuestión interesante a investigar en un futuro próximo que pensamos puede ayudar a resolver la cuestión.

En cuanto a la posible influencia de la opsonización, en principio no parece que ésta sea determinante por cuanto en todos los ensayos realizados se utilizó la misma mezcla de sueros procedentes de animales adultos. Ahora bien, cabe la posibilidad de que, si existen diferencias en las proteínas externas entre las bacterias, las sueras de los animales empleados para la opsonización tengan anticuerpos frente a las proteínas superficiales de *S. aureus*, que no los tengan o los tengan en mucha menor cantidad, frente a las de *S. aureus* subsp. *anserophilus*, con lo cual la opsonización, y por tanto la fagocitosis, sería más efectiva frente a *S. aureus*. No obstante, los resultados de fagocitosis de los PMN de los animales adultos frente a *S. aureus* subsp. *anserophilus* no apoyan esta idea.

La principal diferencia conocida entre las dos bacterias, la presencia o no de la cadena respiratoria aerobia, en el ovinos parece paraca que ésta influya sobre la fagocitosis.

En definitiva, no está claro el porque *S. aureus* subsp. *anserophilus* es fagocitado menos eficazmente por los PMN de los ovinos que *S. aureus*, aunque lo más lógico es que sea consecuencia de alguna diferencia todavía por conocer en la composición de las estructuras superficiales entre estas dos bacterias.

A continuación se discuten los resultados de supervivencia intracelular siguiendo el mismo esquema comparativo utilizado en el caso de la fagocitosis.

Al comparar la supervivencia intracelular de las diferentes cepas de estafilococos estudiadas con los PMN de los ovinos jóvenes considerados en conjunto (tabla IV.10) se encontraron diferencias significativas en los tres tiempos considerados entre las cepas de *S. aureus* subsp. *anaerobius* y las de *S. aureus*, siendo mayores los porcentajes de supervivencia intracelular de *S. aureus* subsp. *anaerobius*.

Si la misma comparación se hace considerando los PMN de los ovinos jóvenes individualmente y las cepas de cada una de las bacterias estudiadas en conjunto (parte superior de las tablas IV.12 y IV.13) se llega, como es lógico, a la misma conclusión de que existen diferencias significativas claras en la supervivencia intracelular entre las dos bacterias con los PMN de los ovinos jóvenes. Además, esta forma de analizar los datos permite detectar las posibles diferencias entre los corderos como ocurre con el caso del cordero 4. Los resultados de supervivencia intracelular de *S. aureus* subsp. *anaerobius* con los PMN de este animal, al contrario de lo que ocurre con los del resto de los corderos, no muestran diferencias significativas con los resultados de supervivencia intracelular de *S. aureus* con los PMN de los mismos animales jóvenes excepto con el cordero 1. Los PMN del cordero 4 muestran en general una actividad bactericida significativamente mayor frente a *S. aureus* subsp. *anaerobius* que los PMN del resto de los corderos (figura IV.7.1).

En resumen, puede afirmarse que *S. aureus* subsp. *anaerobius* es más resistente a la acción bactericida de los PMN de los corderos que *S. aureus*.

Las diferencias encontradas en los porcentajes de supervivencia intracelular entre las cepas de *S. aureus* subsp. *anaerobius* y las de *S. aureus* con los PMN de los ovinos adultos (tabla IV.11) fueron significativas en muy pocos casos (ver el apartado de resultados). Por lo tanto, considerando globalmente los estudios de significancia podría decirse que no existen diferencias significativas en la actividad bactericida de los PMN de los animales adultos frente a las dos bacterias. Haciendo la misma comparación pero considerando los PMN de los animales



adultos individualmente y las cepas de S. aureus subsp. anaerobius y las de S. aureus en conjunto (parte inferior de las tablas IV.12 y IV.13) las diferencias significativas encontradas fueron muy irregulares (figura IV.8). Recordemos que, mientras a los 30 (fig. IV.8a) y a los 90 minutos (fig. IV.8c) únicamente aparecían diferencias significativas con uno de los animales, a los 60 minutos (fig. IV.8b) las diferencias fueron significativas en todos los casos excepto entre el adu-3/aur con todos los adultos/ana. La interpretación de estos resultados, máxime teniendo en cuenta los estudios de correlación entre fagocitosis y supervivencia intracelular (ver más adelante), se nos antoja complicada. Pensamos que antes de llegar a una conclusión definitiva, como parecía desprenderse de los resultados considerando a los animales adultos en conjunto, se precisa investigar más la cuestión, bien ampliando el número de animales o bien introduciendo alguna modificación en la técnica que permita obtener resultados más evidentes como, por ejemplo, aumentar la relación bacterias:PMN y/o estudiar la supervivencia intracelular de las bacterias directamente manteniendo continuamente en contacto las bacterias con los PMN, es decir, sin limitar el tiempo de fagocitosis.

En cualquier caso, la dificultad de interpretación de los resultados de este caso concreto no afecta a los objetivos planteados en esta Tesis Doctoral.

Comparando los resultados de supervivencia intracelular de S. aureus subsp. anaerobius con los PMN de los corderos considerados en conjunto (parte superior de la tabla IV.10) con los resultados obtenidos con los PMN de los animales adultos (parte superior de la tabla IV.11) sólo aparecieron diferencias significativas a los 60 minutos entre la cepa MVF 7SR/PMN-adu con MVF 7SR/PMN-cor y con MVF 43SR/PMN-cor. Asimismo, las diferencias significativas encontradas comparando los resultados con los PMN de los diferentes animales por separado (tabla IV.12) fueron escasas y heterogeneas en función de la edad de los animales (fig. IV.7.1). Por lo tanto, considerando globalmente los estudios de significancia podría decirse que no se observan diferencias en los resultados de supervivencia intracelular de S. aureus subsp. anaerobius entre los PMN de los corderos y los adultos. Es decir, los PMN de los animales jóvenes y los de los adultos muestran una capacidad bactericida analoga frente a S. aureus subsp. anaerobius.

Por ultimo, comparando los resultados de supervivencia intracelular de *S. aureus* con los PMN de los animales juvenes y adultos considerados en conjunto (parte inferior de las tablas IV.13 y IV.15) se detectaron diferencias significativas en todos los casos, siendo mas elevados los porcentajes de supervivencia intracelular con los PMN de los adultos. Cuando esta misma comparacion se realizo considerando los PMN de los diferentes animales individualmente y las cepas de *S. aureus* en conjunto (tabla IV.13) tambien se encontraron diferencias significativas entre todos los corderos y todos los adultos en los tres tiempos consideradas (fig. IV.7.2). De acuerdo con estos resultados puede afirmarse que los PMN de los corderos muestran una mayor actividad bactericida frente a *S. aureus* que los PMN de los adultos.

Al analizar el grado de correlacion se comprobo que la supervivencia intracelular estaba altamente correlacionada con la fagocitosis en la mayoria de los casos, como se desprende de los altos valores absolutos de los coeficientes de correlacion encontrados (tablas IV.14 y IV.15). Estos valores unicamente fueron inferiores a 0.60 en el caso de fagocitosis de *S. aureus* con los PMN de corderos y supervivencia intracelular a los 30 y 60 minutos (tabla IV.14).

Lo mas llamativo de los estudios de correlacion entre supervivencia intracelular y fagocitosis es que tanto los PMN de los corderos como los de los adultos muestran una tendencia contraria con *S. aureus* subsp. *anaerobius* que con *S. aureus* (los coeficientes de correlacion son de signo opuesto). En el caso de los PMN de los corderos con *S. aureus* subsp. *anaerobius* la tendencia en los tres tiempos es que cuando hay mayor fagocitosis la supervivencia intracelular es menor, esto es, la eficacia bactericida es mayor (coeficiente de correlacion negativo), mientras que con *S. aureus* ocurre lo contrario (coeficiente de correlacion positivo). La tendencia en el caso de los PMN de adultos con *S. aureus* subsp. *anaerobius* a los 30 y 60 minutos es que a mayor fagocitosis la supervivencia intracelular es mayor (correlacion positiva), si bien a los 90 minutos la tendencia es opuesta (correlacion negativa), mientras que con *S. aureus* la tendencia a los tres tiempos se invierte.

Williams et al. (1985) son los unicos autores, que nosotros tengamos conocimiento, que han hecho un estudio de correlacion

similar al nuestro entre fagocitosis y supervivencia intracelular. En su investigación, realizada con PMN de 20 vacas, encontraron que excluyendo a uno de los animales obtenían un coeficiente de correlación de  $-0,67$ , es decir, la tendencia detectada era que los PMN de las vacas con una elevada tasa de fagocitosis generalmente destruían más eficazmente las bacterias fagocitadas (Williams *et al.*, 1985).

Las diferencias observadas en la fagocitosis y en la supervivencia intracelular con los PMN de los corderos entre *S. aureus* subsp. *anaerobius* y *S. aureus* explicarían la diferente tendencia encontrada en los estudios de correlación. No obstante, no puede decirse lo mismo en el caso de los animales adultos. Si, como muestran los estudios de correlación, la tendencia es distinta con las dos bacterias y, como vimos, no había diferencias en la fagocitosis, esta tendencia contraria sería achacable a la influencia de la supervivencia intracelular que debería ser distinta. Recordemos que al analizar los resultados de supervivencia intracelular ya dijimos que con los resultados de este estudio la interpretación era difícil, pues considerando los PMN de los animales en conjunto no parecían observarse diferencias significativas mientras que al considerarlos individualmente los resultados de significancia eran confusos. Los estudios de correlación apuntan a que deberían existir diferencias significativas en la supervivencia intracelular entre las dos bacterias con los PMN de los adultos. Hay que insistir en que esta aparente contradicción en los resultados necesita ser investigada más detenidamente.

Con los resultados de este estudio tampoco puede explicarse el por qué en el caso de los animales adultos la tendencia frente a las dos bacterias cambia a los 90 minutos en relación con la tendencia mostrada a los 30 y a los 60 minutos (tabla IV.15), aunque, lógicamente, debe ser consecuencia de la interacción de los diferentes mecanismos que contribuyen a la acción bactericida de los PMN (ver más adelante).

Los PMN disponen de un variado arsenal de mecanismos para destruir los microorganismos fagocitados que pueden dividirse en dos grandes grupos: el sistema citotóxico oxígeno dependiente y el oxígeno independiente. La activación del primero de ellos se caracteriza por un aumento brusco del consumo de oxígeno con la producción de ion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ),

radicales hidroxilo (OH<sup>•</sup>) y de otros compuestos todos ellos altamente reactivos.

Aunque algunos microorganismos pueden ser destruidos en condiciones anaerobicas, la actividad bactericida de los PMN en general es mucho mas eficaz en condiciones aerobicas, lo que pone de manifiesto la importancia relativa del sistema citotoxico oxigeno dependiente (Beaman y Beaman, 1984). En el caso de *S. aureus* se ha encontrado que la destruccion eficaz de la bacteria por los PMN humanos (Mandell, 1975; Beaman y Beaman, 1984; Ellis et al., 1986) y bovinos (Williams et al., 1985; Mullian et al., 1986; Mayer et al., 1988b) esta ligada en gran medida al sistema oxigeno dependiente.

En general se considera que la virulencia de muchos microorganismos depende en gran medida de su resistencia innata a los productos altamente reactivos originados al activarse el sistema citotoxico oxigeno dependiente de los PMN y/o de la capacidad de los microorganismos para producir enzimas capaces de neutralizar estos productos, como la catalasa y la SOD (Beaman y Beaman, 1984).

Distintos investigadores han tratado de relacionar la actividad catalasa y SOD de los estafilococos con su virulencia (Mandell, 1975; Kanafani y Martin, 1985; Nishihara et al., 1987). Mandell (1975) inoculando intraperitonealmente ratones con cepas de *S. aureus* que tenian una actividad catalasa variable encontro una buena correlacion ( $r=0,88$ ) entre la actividad catalasa de las cepas y la letalidad para el raton (las cepas con mayor actividad eran mas virulentas), pero no entre la actividad SOD y la letalidad ( $r=0,14$ ). Ademas, inoculando cepas de baja actividad catalasa junto con catalasa exogena aumentaba la virulencia de estas cepas para el raton. Sin embargo, la virulencia no se alteraba cuando las cepas se inyectaban junto con SOD exogena.

Mandell (1975) tambien realizo estudios comparativos de fagocitosis entre una cepa de *S. aureus* (Wood 46) virulenta o con elevada actividad catalasa y un mutante no virulento de esta cepa, obtenido por seleccion en presencia de rifamicina, que se caracterizaba por tener una actividad catalasa muy baja. Las dos bacterias eran fagocitadas en igual medida por los PMN humanos y la adiccion de catalasa exogena no influa en la fagocitosis. Sin embargo, las cepas con actividad catalasa alta eran mas



resistentes a la acción bactericida de los PMN que las de baja actividad. Además, cuando se añadía catalasa exógena en los experimentos con las cepas de baja actividad catalasa, las bacterias eran protegidas de los mecanismos bactericidas de los PMN en la misma medida que las cepas con más alta actividad catalasa. Por el contrario, este fenómeno no se observaba cuando se añadía SOD. En contradicción con este último resultado Johnston *et al.* (1978) encontraron que la adición de SOD exógena protegía a *S. aureus*, *E. coli* y *Streptococcus viridans* de la acción bactericida de los PMN. Mandell (1975) concluye que la catalasa estafilocócica protege a las bacterias de la acción bactericida de los PMN por destrucción del peróxido de hidrógeno producido por los PMN y, por tanto, podría ser un factor significativo de virulencia en los estafilococos.

Kanafani y Martín (1985) encontraron diferencias significativas en la actividad catalasa y SOD entre cepas de *S. aureus* virulentas (aisladas de procesos patológicos) y avirulentas (aisladas de boca y fosas nasales de individuos sanos). Asimismo, comprobaron que el peso medio ganado por ratones de tres días inoculados subcutáneamente con cepas virulentas o con actividad catalasa alta era significativamente menor que el ganado por ratones inoculados con cepas avirulentas. Según estos investigadores, el nivel de catalasa, de SOD o de ambas enzimas podrían determinar la virulencia de *S. aureus*.

Nishihara *et al.* (1985) realizaron un estudio semejante al de Mandell comparando la cepa de *S. aureus* Cowan-I con un mutante espontáneo de esta misma bacteria que presentaba una actividad catalasa muy baja. Si bien sus resultados coinciden con los de Mandell en que la bacteria mutante era mucho menos patógena para el ratón que la parental, no ocurre lo mismo con los estudios de fagocitosis, pues las dos bacterias se mostraron igual de resistentes a la acción bactericida de los PMN humanos. En función de estos resultados, Nishihara *et al.* sugieren que *S. aureus* tendría otro mecanismo de protección frente a la actividad bactericida de los PMN diferente al de la degradación del peróxido de hidrógeno por la catalasa.

El hecho de que *S. aureus* subsp. *anaerobius*, a pesar de carecer de actividad catalasa, sea patógeno para los ovinos contradice abiertamente la opinión de aquellos autores que como Mandell (1975) o Kanafani y Martín (1985) consideran avirulentos

los estafilococos con escasa actividad catalasa. Parece claro que para que este tipo de afirmaciones tengan validez deben de hacerse en referencia a hospedadores concretos, pues la interacción bacteria-hospedador, y por tanto la virulencia, puede ser diferente en función del hospedador considerado.

En este trabajo, a diferencia de los estudios citados antes, hemos tenido la oportunidad de comparar cepas patogénicas de *S. aureus* con estirpes de *S. aureus* subsp. *anarabina* que carecen de actividad catalasa, en lugar de hacer la comparación con mutantes con escasa actividad (pero no ausencia total). Pensamos que esto nos permite hacer un análisis más preciso del posible papel protector de la catalasa estafilocócica frente a la acción bactericida de los PMN ovinos. De acuerdo con los resultados de este estudio, la actividad catalasa de los estafilococos no parece jugar un papel determinante en la mayor o menor resistencia de las bacterias a la acción bactericida de los PMN ovinos. Si así fuera, cabría esperar que la actividad bactericida de los PMN ovinos fuera más eficaz frente a *S. aureus* subsp. *anarabina* que frente a *S. aureus* o, dicho de otra manera, que *S. aureus* fuera más resistente a la acción bactericida. Pero, como hemos visto, en el caso de los PMN de los ovinos adultos esta no se observa con claridad y en el caso de los PMN de los corderos ocurre lo contrario: que *S. aureus* subsp. *anarabina* es más resistente.

Diferentes autores han descrito que la respuesta oxidativa de los PMN ovinos, medida como producción de anión superóxido, es mucho menor que la de los PMN bovinos y humanos (Young y Beswick, 1986; Gueifi y Courdouhji, 1987; Buchta, 1990). Según Buchta (1990) esto podría indicar que en los PMN ovinos existe una menor dependencia de la actividad microbicida oxígeno dependiente y, en consecuencia, la principal respuesta de los PMN ovinos podría ser oxígeno independiente. Los resultados de este estudio apoyarían este punto de vista. No obstante, para comprobar esta afirmación en el caso de las bacterias que nos ocupan, habría que valorar por separado la actividad bactericida oxígeno independiente enfrentando las bacterias con extractos enzimáticos de los gránulos citoplasmáticos de los PMN y compararla con la actividad bactericida de los PMN recién obtenidos.

S. aureus subsp. aureus podría utilizarse para investigar la importancia relativa del sistema citotóxico oxígeno dependiente e independiente de los PMN de otras especies animales frente a los estafilococos.

También se ha comprobado que los PMN ovinos tienen cantidades más bajas de varios componentes granulares en comparación con los PMN humanos y bovinos (Rausch y Moore, 1975; Healy, 1982; Buchta, 1990), lo que según Buchta (1990) indicaría que la respuesta a la infección de los PMN ovinos podría ser bastante diferente a la de los PMN humanos y posiblemente a la de los PMN bovinos.

Los resultados de este estudio parecen indicar que los mecanismos microbicidas de los PMN de los corderos y de los adultos no son idénticos, al menos frente a las bacterias estudiadas, puesto que S. aureus es significativamente más resistente a la acción bactericida de los PMN de los adultos que a la de los PMN de los juvenes. Este resultado es tanto más sorprendente cuanto que los estudios realizados en otras especies animales demuestran que la actividad bactericida de los PMN de los animales juvenes frente a S. aureus es menos eficaz que la de los adultos (Baranek et al., 1974; Coignoul et al., 1984; Kaiser et al., 1985; Koldenietz y Rowan, 1990). La explicación de esta discrepancia, como ha sugerido Buchta (1990), podría estar en que la respuesta de los PMN ovinos frente a la infección sea bastante diferente a la de los PMN de otras especies. Los recientes conocimientos actuales sobre la función de los PMN ovinos no permite explicar satisfactoriamente las diferencias en la actividad bactericida entre los PMN de los corderos y de los adultos frente a S. aureus, si bien cabe la posibilidad de que con el tiempo se produzca una selección de los PMN que implique cambios en las diferentes mecanismos bactericidas o en su liberación.

Es preciso tener en cuenta, asimismo, que si bien S. aureus muestra significativamente más resistencia a la acción bactericida de los PMN de los corderos que a la de los animales adultos, los PMN de los adultos fagocitan significativamente mejor a esta bacteria que los PMN de los corderos. Aunque en este trabajo la fagocitosis y la supervivencia intracelular se han estudiado por separado, a la hora de intentar relacionar los

resultados in vitro con la posible patogenicidad de las bacterias es preciso considerar ambas en conjunto.

La mayor resistencia de *S. aureus* subsp. *anaerobius* a la acción bactericida de los PMN de los corderos en comparación con *S. aureus* debe ser consecuencia de las diferencias fisiológicas y/o bioquímicas existentes entre ambas bacterias. En concreto, parece lógico pensar que la carencia de la cadena respiratoria aeróbica por parte de *S. aureus* subsp. *anaerobius*, por cuanto supone la diferencia fundamental con *S. aureus*, sea la responsable directa o indirectamente de la mayor resistencia. En este supuesto, quedaría por investigar el mecanismo por el cual la deficiencia respiratoria confiere resistencia a la bacteria frente a la acción bactericida de los PMN de los corderos. Consideramos que para la resolución de esta cuestión sería necesario estudiar la importancia relativa del sistema oxígeno independiente, ya que, como dijimos antes, se piensa que en los ovinos puede jugar un papel muy importante. Un planteamiento experimental análogo al de esta Tesis, en el que se comparasen los sistemas oxígeno dependiente e independiente de PMN de corderos y de adultos frente a las dos bacterias, podría ayudar a resolver algunos de los interrogantes planteados al analizar los resultados de este estudio y, en definitiva, a comprender mejor los mecanismos funcionales de los PMN ovinos.

Los resultados obtenidos con los PMN del cordero 4 (recordemos que en comparación con los PMN del resto de los corderos muestran una eficacia fagocítica y una actividad bactericida significativamente mayores) indican que, sin perjuicio de la tendencia general, algunos corderos son capaces de responder más eficazmente a la infección por *S. aureus* subsp. *anaerobius*, sin que por el momento se conozcan las razones. Presumiblemente el cordero 4 sería más resistente a la enfermedad de los abscesos que el resto de los corderos.

El principal componente del sistema citotóxico oxígeno independiente parecen ser las proteínas catiónicas. La actividad antibacteriana de estas proteínas frente a *S. aureus*, medida indirectamente utilizando extractos granulares crudos de PMN de conejo (Odeberg y Olsson, 1975) y bovinos (Gennaro et al., 1978; Mayer et al., 1988a), depende en buena medida del pH. Esta actividad es más efectiva a pH por encima de la neutralidad e incluso los extractos granulares de los PMN bovinos no presentan

actividad antibacteriana por debajo de un pH de 6,5 (Mayer et al., 1988a). En el caso de los PMN ovinos se desconoce en qué medida el pH puede influir en la mayor o menor actividad del sistema citotóxico oxidante independiente. No puede descartarse que el propio metabolismo de las bacterias fagocitadas contribuya a modificar el pH dentro de los fagosomas.

Mayer et al. (1988a) han sugerido que las diferencias observadas en la actividad antimicrobiana de extractos granulares crudos de PMN bovinos frente a distintas especies y cepas bacterianas podrían deberse a que las diferencias en las proteínas superficiales de los microorganismos afectasen a la unión de las bacterias con las proteínas catiónicas. La misma explicación se ha dado al hecho de que distintas cepas de *Candida albicans* (Hester et al., 1985) y de *Salmonella typhimurium* (Rest et al., 1985) muestran una sensibilidad diferente a la acción bactericida de proteínas granulares purificadas.

Los resultados en conjunto de los estudios de fagocitosis y supervivencia intracelular *in vitro* con los PMN de los corderos frente a las dos bacterias estudiadas coinciden plenamente con la patogenidad natural y experimental mostrada por estas bacterias en los corderos. *S. aureus* subsp. *anarthrosis*, que en comparación con *S. aureus* es más resistente a la función de los PMN de los corderos, se comporta como un patógeno persistente y es el agente causal de la enfermedad de los abscesos, mientras que *S. aureus* es un patógeno frecuente para los corderos, pues únicamente se ha relacionado a esta bacteria con una pioderma localizada de los corderos llamada la folliculitis estafilocócica. Los resultados de las inoculaciones experimentales realizadas con *S. aureus* en los corderos que se discuten en el siguiente apartado concuerdan con los obtenidos en los estudios de la función de los PMN *in vitro*.

Los ovinos adultos son afectados por la enfermedad de los abscesos aunque con mucha menor frecuencia que los animales jóvenes (Carra, 1938a; De la Fuente et al., 1985; De la Fuente et al., 1988a). Los resultados de los experimentos *in vitro* de este trabajo justifican, al menos en parte, esta observación, puesto que los PMN de los ovinos adultos fagocitan con mucha mayor eficacia al agente causal de la enfermedad que los PMN de los corderos, si bien en la supervivencia intracelular de la bacteria no se hallaron diferencias significativas entre los PMN

de los dos grupos de animales. La presentación natural de la enfermedad en pequeños porcentajes de los animales adultos podría deberse, entre otras causas, a un defecto de la función de los PMN de los animales afectados.

Aunque en la patogenia de la enfermedad de los abscesos pueden intervenir otros factores, los resultados de este estudio sugieren que la incapacidad de los PMN de los corderos para fagocitar y destruir eficazmente a *S. aureus* subsp. *anaerobius* pueda ser el principal factor determinante de que la enfermedad llegue o no a desarrollarse.

### V.3. ESTUDIOS EXPERIMENTALES EN ANIMALES.

#### V.3.1. Inoculaciones experimentales en corderos y cabritos.

La patogenicidad experimental de *S. aureus* subsp. *anaerobius* para el ganado ovino y, en mucha menor medida, para el caprino ha sido investigada previamente por distintos autores (Aynaud, 1922, 1923, 1928; Carré, 1923a; Benito y Berkel, 1957; Bianco Leizelier, 1960; Shirlaw y Ashford, 1962; De la Fuente y Suárez, 1985; De la Fuente *et al.*, 1985a; El Sancusi *et al.*, 1989). No obstante, como expusimos en el apartado de objetivos, aun quedan cuestiones por resolver, algunas de las cuales se han abordado en este trabajo.

La enfermedad de los abscesos en ovinos ha sido descrita reiteradamente en distintos países, lo que contrasta con el hecho de que únicamente se hayan diagnosticado dos brotes del proceso en ganado caprino en Italia (Valenti y Bieler, 1984) y Sudán (El Sancusi *et al.*, 1989). Además, De la Fuente y Suárez (1985) y Afnan y Hedjazi (1978) en sendos rebaños mixtos de ovejas y cabras observaron que ninguno de los cabritos ni de las cabras estaban afectados por la enfermedad de los abscesos pese a que una gran proporción de los ovinos jóvenes y algunas ovejas padecían el proceso. Las observaciones de campo, por lo tanto, parecen sugerir que el ganado caprino es más resistente a la infección natural por *S. aureus* subsp. *anaerobius* que los ovinos.

Excluyendo este trabajo, Aynaud (1922, 1923, 1928) y El Sancusi *et al.* (1989) son los únicos autores que han realizado inoculaciones experimentales en caprinos con el agente etiológico

de la enfermedad de los abscesos. Aynaud comprobó que la inoculación del pus procedente de abscesos de ovinos afectados (Aynaud, 1922) o de una suspensión bacteriana (Aynaud, 1923) por vía subcutánea o intramuscular daba lugar a la formación de abscesos en los puntos de inoculación. Asimismo, El Sanousi *et al.* (1989) reprodujeron los abscesos en el punto de inoculación en dos cabras adultas infectadas por vía subcutánea con una suspensión bacteriana a la que añadieron un 2,5% de cloruro cálcico para favorecer la necrosis tisular.

Los resultados de las inoculaciones subcutáneas en cabritos de este estudio coinciden en gran medida con las descritas por Blanco Loizelier (1968) y por De la Fuente y Suárez (1985) en inoculaciones similares realizadas en ganado ovino: formación de abscesos en los puntos de inoculación e infartación mas o menos intensa de los ganglios linfáticos regionales. En lo que se refiere a la afección de los ganglios regionales, hemos de destacar que en uno de los cabritos se encontró un absceso localizado en el ganglio subiliaco del lado inoculado (fig. IV.14), lesión que se corresponde perfectamente con la característica de la enfermedad natural. De la Fuente y Suárez (1985) también encontraron en uno de los animales inoculados por vía subcutánea (una oveja de mas de 3 años) un absceso en el ganglio cervical superficial del lado inoculado. Por el contrario, Aynaud (1922, 1923, 1928) y El Sanousi *et al.* (1989) no hacen en absoluto referencia en sus experimentos a la reacción ganglionar.

La respuesta local a la inoculación intramuscular fue análoga en los dos cabritos estudiados con formación de varios abscesos entre los músculos de la región femoral (fig. IV.14), que fistulizaron alrededor de las 4 semanas, observándose a partir de entonces múltiples fistulizaciones seguidas de cicatrizaciones. Adicionalmente, al realizar la necropsia de uno de los cabritos se encontró un pequeño absceso intraganglionar en uno de los ganglios escrotales. En inoculaciones intramusculares similares realizadas en ganado ovino, De la Fuente y Suárez (1985) observaron una respuesta local muy semejante a la descrita por nosotros, si bien estos autores, además, encontraron en los dos animales inoculados abscesos en el techo de la pelvis relacionados con los ganglios sacrales, que en algunos casos presentaban focos purulentos.

Como en el caso de las inoculaciones subcutáneas, Aynaud (1922, 1923, 1928) describe únicamente la formación de abscesos en los puntos de inoculación y considera que la vía intramuscular es una de las más adecuadas para reproducir los abscesos.

Un hecho destacable de los resultados de este estudio es el contagio natural de la enfermedad sufrido por el cabrito empleado como testigo en el grupo de animales inoculados por vía subcutánea e intramuscular. Hay que tener en cuenta que, a diferencia de lo ocurrido en el grupo de cabritos inoculados practicando incisiones cutáneas, la contaminación microbiana en el establo en que se alojaron los animales era muy elevada como consecuencia de las múltiples fistulizaciones ocurridas en los animales inoculados desde los pocos d.p.i. La elevada carga microbiana en el ambiente junto con el estrecho contacto que mantenían los animales seguramente favorecieron el contagio. Las lesiones halladas en este animal en los ganglios parotídeos y retrofaringeo lateral derechos no difieren en absoluto de las descritas en los casos de enfermedad natural en los ovinos (De la Fuente y Suárez, 1985; De la Fuente *et al.*, 1985a)

En resumen, puede decirse que la respuesta de los cabritos a la inoculación subcutánea e intramuscular con *S. aureus* subsp. *anaerobius* es muy semejante a la observada en ovinos.

En el ganado ovino se ha conseguido reproducir experimentalmente la formación de abscesos por todas las vías de inoculación ensayadas (subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intrapleural e intratesticular) excepto por la oral y la intravenosa (Aynaud, 1922, 1923, 1928; Carre, 1923a; Benito y Berrel, 1937; Blanco Loizelier, 1960; Shirlaw y Ashford, 1962; De la Fuente y Suárez, 1985; De la Fuente *et al.*, 1985a). No obstante, el empleo de todas estas vías, si exceptuamos en parte la subcutánea, tiene una utilidad limitada a la hora de explicar la presentación natural de la enfermedad. En efecto, aunque los abscesos se reproducen con facilidad en los puntos de inoculación empleando las distintas vías, la enfermedad natural, es decir, la formación de abscesos en los ganglios linfáticos superficiales, sólo consigue reproducirse en algunos casos por vía subcutánea. Y, aun en estos casos, la intensa reacción inflamatoria local que se produce en el punto de inoculación se aleja de lo observado en la enfermedad natural. Es probable que los fracasos en la reproducción experimental se deban a que las vías de inoculación



utilizadas hasta ahora no reproducen las condiciones en las que se establece la infección natural.

Teniendo en cuenta, por una parte, la localización de las lesiones en la enfermedad natural y, por otra, la similitud de la enfermedad de los abscesos con parte del cuadro clínico de la linfadenitis caseosa parece razonable pensar que la entrada de la bacteria en el organismo se produce a partir de soluciones de continuidad de la piel.

En la linfadenitis caseosa se ha conseguido reproducir la formación de abscesos en los ganglios linfáticos superficiales infectando con material purulento heridas de esquilao frescas (Nagy, 1976), aplicando sobre la piel recién esquilada pero aparentemente intacta un caldo de cultivo de Corynebacterium pseudotuberculosis o un líquido arsenical empleado para baños y contaminado con el microorganismo (Nairn y Robertson, 1974), inoculando la bacteria en los vasos aferentes de los ganglios linfáticos (Gussard y Watson, 1977; Burrell, 1978) e inoculando suspensiones bacterianas subcutáneamente en la oveja (Pepin et al., 1980, 1981).

Basándonos en los resultados obtenidos con C. pseudotuberculosis hemos diseñado una nueva forma de infectar a los animales con S. aureus subsp. anaropius consistente en impregnar con un cultivo de la bacteria incisiones superficiales practicadas en la piel del labio inferior y en una de las extremidades torácicas por encima de la articulación carpiana. La elección de estos puntos para realizar las incisiones se fundamenta en que los ganglios linfáticos afectados con mayor frecuencia en la enfermedad natural son los de la cabeza (mandibulares, parotídeos y retrofaringeos laterales) seguidos en orden de importancia por los cervicales superficiales (Blanco Leizelier, 1960; De la Fuente y Suárez, 1985; De la Fuente et al., 1985a). Los ganglios mandibulares, parotídeos y retrofaringeos laterales poseen vasos aferentes en la piel de los labios y los cervicales superficiales los tienen, entre otras regiones, en la piel de las extremidades anteriores (Saar y Getty, 1982).

Los resultados obtenidos utilizando este método de infección fueron muy satisfactorios, pues en los tres cabritos y en uno de los dos corderos inoculados se desarrollaron abscesos en los ganglios linfáticos sobre los que drenan las regiones infectadas.

La evolución del proceso en estos cuatro animales fue análoga entre sí y muy similar a la observada en el caso del cordero utilizado como testigo en el grupo de animales inoculados por vía subcutánea e intramuscular y que, como vimos antes, contrajo la enfermedad espontáneamente. Durante los primeros d.p.i. no se detectó alteración alguna, pero alrededor de los 7 d.p.i. comenzó a apreciarse una ligera hipertrofia de los ganglios mandibular y cervical superficial del lado inoculado, que en el caso de los cabritos se acompañó de una ligera elevación de la temperatura corporal, y que fue haciéndose más evidente con el tiempo hasta que al cabo de aproximadamente 3 semanas p.i. se constataba la presencia de abscesos en los ganglios implicados. Las lesiones encontradas al realizar la necropsia de estos animales a las 5 semanas eran análogas tanto macroscópicamente como microscópicamente a las descritas en la enfermedad natural (Shiraiw y Ashford, 1962; De la Fuente y Suarez, 1965; De la Fuente et al., 1985a).

En uno de los dos corderos infectados no se constató alteración alguna a lo largo de toda la experiencia, si bien al realizar la necropsia se encontraron, como única lesión macroscópica destacable, dos focos purulentos muy pequeños en el interior del ganglio mandibular derecho (fig. IV.27). Histológicamente, en la zona paracortical del ganglio se observaron los microabscesos así como macrófagos de cuerpo tingible y en los cordones medulares se detectó la presencia de células plasmáticas. En la linfadenitis caseosa se ha descrito que los macrófagos son un componente muy importante en las lesiones en fase de resolución, mientras que en el resto de las lesiones se encuentran fundamentalmente polimorfonucleares (Jolly, 1965; Batey, 1986a). La presencia de células plasmáticas debe interpretarse como una respuesta antigénica en su fase más avanzada.

El relativo fracaso en la reproducción experimental de la enfermedad en este cordero, en comparación con el resto de los animales, podría explicarse por las diferencias individuales observadas en la capacidad fagocítica y en la actividad bactericida de los PMN de algunos corderos (ver apartado anterior), lo que podría traducirse en una mayor resistencia a la infección. La discrepancia también podría deberse a un fallo en la técnica de inoculación, aunque nos parece poco probable.

Un ligero inconveniente de este método de infección en comparación con las inoculaciones por las vías "clásicas" es que

no puede fijarse con exactitud el número de bacterias que entran en contacto con el hospedador (dosis infectiva) en cada caso. Lo único que cabe hacer, cosa que se ha procurado en este trabajo, es estandarizar al máximo la extensión y profundidad de las incisiones practicadas, la concentración de la suspensión bacteriana empleada y el tiempo que la suspensión se mantiene en contacto con las incisiones.

El periodo de incubación de la enfermedad de los abscesos, de acuerdo con los resultados de las infecciones experimentales cutáneas, es de aproximadamente una semana. Ahora bien, hay que tener en cuenta que las primeras alteraciones detectables en los animales, hipertrofia de uno o más ganglios linfáticos superficiales y ligera elevación de la temperatura, pueden en muchos casos pasar desapercibidas en condiciones de campo. El periodo de incubación empleando otras vías de inoculación (subcutánea, intramuscular...) es mucho más corto (24-48 horas) y, por supuesto, mucho menos ajustado a lo que ocurre en la enfermedad natural.

Los resultados de las infecciones experimentales cutáneas en los cabritos junto con los obtenidos en las inoculaciones subcutáneas e intramusculares confirman que esta especie es sensible a la infección por *S. aureus* subsp. *anaerobius*. Con los resultados de este estudio no puede valorarse la sensibilidad relativa de los corderos y cabritos a la infección experimental. Para ello sería necesario determinar la dosis infectiva 50 (DI<sub>50</sub>) por diferentes vías. En cualquier caso, nuestros resultados parecen indicar que los cabritos son al menos tan sensibles como los corderos a la infección experimental. Este hecho contrasta con las observaciones de campo, que, como indicamos al comienzo de este apartado, parecen sugerir que el ganado caprino es más resistente a la infección natural por *S. aureus* subsp. *anaerobius* que los ovinos.

Bianco Leizelier (1966) sugirió como posibles puertas de entrada de la infección las pequeñas heridas en la piel, los espacios linfáticos del anillo faríngeo o incluso la cicatriz umbilical. Nuestros resultados apuntan como vía de entrada más probable a las soluciones de continuidad de la piel (heridas, erosiones...). Es posible, además, que las bacterias puedan entrar en el organismo a través de alteraciones de la mucosa

bucal como ocurre en la linfadenitis caseosa (Ashfaq y Campbell, 1980; Brown y Olander, 1987; Batey, 1986b).

Las investigaciones sobre la enfermedad de los abscesos realizadas hasta la fecha no se han ocupado de la patogénesis del proceso. Teniendo en cuenta los resultados de las inoculaciones experimentales y los de los estudios de fagocitosis y supervivencia intracelular, consideramos que el modelo de patogénesis propuesto por Batey (1986b) para la linfadenitis caseosa podría ser válido para la enfermedad de los abscesos con las modificaciones que discutiremos a continuación. Según Batey (1986b) el desarrollo de la linfadenitis caseosa implicaría infección primaria de heridas de los animales, diseminación linfática y hematológica e infección secundaria de los ganglios linfáticos y algunas vísceras. A partir de este modelo la infección podría ser eliminada o solamente contenida, desarrollándose en este último caso las características lesiones caseosas.

Una diferencia sustancial entre la linfadenitis caseosa y la enfermedad de los abscesos es que en esta última no se afectan los ganglios linfáticos internos ni las vísceras. Los estudios experimentales confirman que la infección queda localizada en los ganglios linfáticos regionales sobre los que drenan las áreas inoculadas. Por lo tanto, en la enfermedad de los abscesos tras la infección de heridas cutáneas habría una diseminación linfática de la bacteria, bien en forma libre o bien en el interior de fagocitos, hacia los ganglios linfáticos regionales, donde la infección puede progresar dando lugar a las lesiones típicas. En esta enfermedad la diseminación sanguínea o no se produce o los microorganismos son eliminados al pasar al torrente sanguíneo. Los resultados negativos obtenidos inoculando las bacterias por vía intravenosa apoyan esta idea (Aynaud, 1922; Benito y Sorrel, 1957).

En contra de lo descrito por el resto de autores que han investigado la enfermedad, Blanco Leizelier (1980) considera que los abscesos en ocasiones pueden afectar a ganglios linfáticos internos. Tampoco hay unanimidad en la literatura en cuanto a la localización de las lesiones, pues según Aynaud (1922, 1923, 1928) y Shirlaw y Ashford (1962) los abscesos pueden encontrarse en el tejido celular subcutáneo y entre los muscúlos sin afectar a ganglios.

La lesión característica de la enfermedad de los abscesos es de tipo granulomatoso (Aynaud, 1928; De la Fuente y Suárez, 1985; De la Fuente et al., 1985a). Los granulomas infecciosos son lesiones inflamatorias focales inducidas por patógenos persistentes. La inflamación granulomatosa está asociada con muchas enfermedades humanas y animales causadas por bacterias facultativas intracelulares (Hahn y Kaufmann, 1981; Collins y Campbell, 1982).

En la linfadenitis caseosa el desarrollo de la infección en los lugares de localización primaria o secundaria implica fenómenos de fagocitosis, multiplicación intracelular de G. pseudotuberculosis y muerte de las células fagocíticas (Hard, 1969; Batey, 1986b). Las bacterias liberadas son fagocitadas de nuevo por otras células fagocíticas, las cuales sufren de nuevo el proceso de degeneración y muerte mientras que los microorganismos continúan multiplicándose. Este ciclo de fagocitosis, multiplicación bacteriana y degeneración celular es la base del desarrollo de las lesiones crónicas observadas en la linfadenitis caseosa (Batey, 1986b). Se ha sugerido que la capacidad del hospedador para desarrollar una respuesta celular eficaz puede determinar en buena medida el que la infección sea eliminada o progrese (Batey, 1986b; Brown y Olander, 1987).

Los resultados de los estudios de fagocitosis y de supervivencia intracelular, como se describió en el apartado anterior, parecen indicar que también en la enfermedad de los abscesos la mayor o menor eficacia de estos procesos puede ser el principal factor determinante de que la enfermedad llegue o no a producirse. El hecho de que S. aureus subsp. anaerobius sea significativamente más resistente que S. aureus a la fagocitosis y a la actividad bactericida de los PMN de los ovinos jóvenes podría explicar el que S. aureus subsp. anaerobius se comporte como un patógeno persistente para los corderos, capaz de originar la lesión granulomatosa, mientras que S. aureus no muestre esta capacidad. Los resultados de las infecciones experimentales practicando incisiones cutáneas en corderos con S. aureus confirmarían esta idea, pues en los ensayos realizados no se produjo lesión alguna en los animales.

### V. 3. 2. Inoculaciones experimentales en ovejas en lactación.

La patogenicidad de S. aureus subsp. anaerobius por vía intramamaria no ha sido investigada previamente, si bien, como

ya hicimos referencia en la introducción, Blanco Loizelier (1940), afirma haber aislado el microorganismo reiteradamente de la mama de ovejas y Shirlaw y Ashford (1962) encontraron granulomas intramamarios con fistulizaciones y abscesos en dos animales.

La estrecha relación existente entre *S. aureus* subsp. *anacroticus* y *S. aureus* y el hecho de que *S. aureus* sea la causa más frecuente de mastitis en los pequeños ruminantes (Madal, 1983; Watson y Buswell, 1984), en los que produce la mastitis gangrenosa, justifican el interés de esta investigación.

Distintos estudios experimentales demuestran que las ovejas son muy sensibles a la inoculación intramamaria con *S. aureus*, como se desprende del hecho de que menos de 100 bacterias sean suficientes para reproducir la mastitis clínica (Plommet, 1960; La Gall y Plommet, 1965; Watson, 1988).

Los resultados presentados en este trabajo permiten dividir a los animales en dos grupos en función de la respuesta clínica a las inoculaciones y de los resultados microbiológicos. Uno de ellos estaría formado por dos animales (oveja P y B) en los que no se detectaron alteraciones clínicas y solamente se aislaron bacterias de la leche durante las primeras 48 h.p.i. El otro lo integrarían 3 animales (LN, LB y N) en los que se detectó algún grado de alteración clínica. Además, de la leche de estos animales se aislaron bacterias no sólo los días siguientes a la inoculación, sino durante distintos periodos que se intercalaban con otros en los que no había liberación de *S. aureus* subsp. *anacroticus*.

En el ganado ovino no existe un criterio unánime que permita relacionar los recuentos de células somáticas en la leche con el estado más o menos patológico de la mama. Además, según los datos de la literatura parecen existir diferencias en función de la raza de los animales y el momento de la lactación en que se encuentran (Mackie y Rodgers, 1986; Beltrán de Heredia e Iturriza, 1988). Los recuentos considerados fisiológicos (mamas no infectadas) publicados por distintos autores oscilan entre 40.000 y 750.000 células/ml (Outteridge y Lascelles, 1947; Celdits y Watson, 1982; Green, 1984; Mackie y Rodgers, 1986; Beltrán de Heredia e Iturriza, 1988; Pthenakis y Jones, 1990). Algunos autores han propuesto como límite máximo de normalidad  $10^6$  células/ml (Green, 1984; Pthenakis y Jones, 1990).

En función de los recuentos obtenidos en la leche de las mamas no inoculadas, que muy raramente excedieron de 150.000 células/ml, consideramos que en los animales utilizados en este trabajo recuentos por encima de 750.000 células/ml deben asociarse con mamitis subclínica.

En la leche de la mama inoculada de la oveja R se detectaron muy pocas bacterias (120 ufc/ml) únicamente el mismo día de la inoculación y el siguiente. La eliminación de bacterias se acompañó de un incremento moderado de los recuentos de células somáticas en la mama inoculada (fueron ligeramente superiores a  $10^5$  células/ml) durante los días 1 y 2 p.i., lo que demuestra una reacción inflamatoria de la mama muy ligera en comparación con la observada en el resto de los animales. Ello puede explicarse porque el número de bacterias inoculadas a esta oveja fue entre 4.000 y 8.000 veces inferior al empleado en el resto de los animales (tabla III.2). Además, la oveja R fue la única inoculada con bacterias lavadas con solución salina, es decir, el inoculo no incluía los productos extracelulares, lo que puede influir en el desarrollo o no de la infección. En efecto, Watson y Lee (1978) comprobaron que la respuesta de las ovejas variaba en función del inoculo utilizado: las ovejas poco productoras de leche a menudo solo desarrollaban una ligera mamitis tras la inoculación intramamaria con estafilococos lavados, mientras que las de gran producción desarrollaban una mamitis aguda. Sin embargo, en todos los animales, independientemente de su producción láctea, se produjo mamitis aguda cuando se utilizara como inoculo el caldo de cultivo en el que se habían crecido los microorganismos.

Los resultados de los recuentos de células somáticas en la leche de la mama inoculada de la oveja R, que tampoco presentó alteraciones clínicas, fueron elevadísimos (mayores de  $2 \times 10^7$  células/ml) durante los 3 primeros d.p.i. y a lo largo de los 14 días que duró la experiencia prácticamente no descendieron de  $10^6$  células/ml. Estos recuentos celulares indican claramente que el animal sufría una mamitis subclínica, que se acompañó de una disminución importante de la producción láctea, lo que contrasta con los resultados microbiológicos negativos obtenidos a partir de segundo d.p.i. Hay que suponer que la mamitis subclínica fue consecuencia de la inoculación, aunque no puede explicarse por qué se prolongó durante tanto tiempo sin que se detectaran bacterias en la leche.

En el grupo de animales que mostraron algún grado de respuesta clínica y que eliminaron bacterias intermitentemente por la leche a lo largo de la experiencia cabe hacer una diferenciación entre la oveja LN por una parte y las ovejas M y LB por otra.

Clinicamente, en la oveja LN solo se detectó un ligero incremento de la temperatura corporal durante las 48 horas siguientes a la inoculación e infartación a partir de las 48 h.p.i. del ganglio mamario izquierdo, correspondiente a la mama inoculada. Estas ligeras manifestaciones clínicas, al no acompañarse de alteraciones evidentes de la mama ni de disminución de la producción láctea, pasarían desapercibidas en condiciones de campo. Por lo tanto, al igual que en el caso de la oveja B, sería más adecuado hablar de mamitis subclínica, como confirman los resultados de los recuentos celulares que fueron superiores a  $10^6$  células/ml durante prácticamente los 21 días que duró la experiencia.

La única alteración macroscópica encontrada en la necropsia de la oveja LN fue una ligera infartación del ganglio mamario izquierdo. Histológicamente, en el ganglio se observó una moderada activación del cortex, así como abundantes células plasmáticas en los cordones medulares, que ha de interpretarse como una respuesta antigénica en su fase más avanzada. La glándula mamaria mostraba una estructura prácticamente normal, si bien aparecían algunos neutrofilos en la luz alveolar y pequeños grupos de células plasmáticas en el intersticio.

La respuesta a la inoculación de la oveja LB y M fue similar, desarrollándose en ambas una mamitis clínica que se hizo muy evidente al cabo de una semana y media p.i.: los animales mostraban reacción dolorosa a la palpación de la mama inoculada que se apreciaba inflamada e indurada. Lógicamente el proceso se acompañó de elevados recuentos celulares y de disminución brusca de la producción de leche.

Las lesiones encontradas en estos animales al realizar la necropsia a los 21 d.p.i. (oveja LB) y a los 16 d.p.i. (oveja M) fueron similares. Macroscópicamente los ganglios linfáticos mamaricos izquierdos aparecían muy infartados con respecto a los derechos y las glándulas inoculadas estaban aumentadas de tamaño y su consistencia era fibrosa. Al corte se apreciaban múltiples



macrocabezas encapsuladas que contenian un pus espeso y viscoso. Las lesiones histologicas fueron similares a las descritas por El Streby y Abdel-Rahim (1970) en estudios de mastitis experimentales en ovejas con *S. aureus*. La presencia de macrofagos de cuerpo tingible en los cordones medulares de los ganglios linfaticos afectados indicaria que ha habido destruccion o eliminacion de celulas linfoides en estos ganglios.

Los resultados de este estudio indican que la patogenicidad de *S. aureus* subsp. *anarthrosis* por via intramamaria para la oveja es mucho menor que la de *S. aureus*, puesto que se precisan dosis muy altas (del orden de  $10^7$  celulas/ml) para producir mastitis clinica en algunos de los animales. Ademàs, en los casos en los que se produce mastitis clinica, esta tarda en manifestarse alrededor de una semana y no llega a ser tan grave como la mastitis purulenta, que en muchos casos compromete la vida del animal.

El mecanismo de proteccion mas importante de la mama frente a las infecciones es la fagocitosis llevada a cabo por los PMN (Watson, 1977). Si, como los resultados de este estudio sugieren, *S. aureus* subsp. *anarthrosis* es menos patogena que *S. aureus* por via intramamaria, esto podria ser consecuencia de que los PMN que se movilizan a la mama como respuesta al estímulo inflamatorio destruyen con mayor eficacia a la primera bacteria que a la segunda. Los resultados de las inoculaciones intramamarias, al igual que los estudios de correlacion discutidos en el apartado anterior, parecen indicar que deberia haber diferencias significativas en la eficacia fagocitica y/o en la actividad bactericida de los PMN de los rumes adultos frente a estas dos bacterias. Diferencia que no ha podido confirmarse con los experimentos en curso (ver apartado anterior).

Para concluir podemos decir que, aunque los estudios experimentales demuestran que *S. aureus* subsp. *anarthrosis* puede ser patogena para la oveja por via intramamaria, dadas las dosis tan altas requeridas para producir mastitis clinica es poco probable que la bacteria ocasione mastitis en condiciones naturales.

---

## **Conclusiones.**

- Primera. Los estudios realizados en *S. aureus* subsp. *anaerobius* mediante la técnica de electrotransferencia y análisis inmunoenzimático demuestran que esta bacteria no sintetiza ni total ni parcialmente la apoenzima de la catalasa.
- Segunda. La edad de los animales donadores influye decisivamente en la capacidad fagocítica *in vitro* de los PMN, al menos frente a las dos bacterias estudiadas, como lo demuestra el hecho de que los PMN de los ovinos jóvenes fagocitan menos eficazmente que los PMN de los ovinos adultos tanto a *S. aureus* subsp. *anaerobius* como a *S. aureus*.
- Tercera. Las diferencias en la composición y/o en las características fisiológicas y bioquímicas existentes entre las dos bacterias influyen en la menor capacidad fagocítica de los PMN de los animales jóvenes frente a *S. aureus* subsp. *anaerobius*.
- Cuarta. *S. aureus* subsp. *anaerobius* es más resistente que *S. aureus* a la actividad bactericida de los PMN de los animales jóvenes. Además, no se observan diferencias significativas en la capacidad bactericida de los PMN de los corderos y de los animales adultos frente a *S. aureus* subsp. *anaerobius*.
- Quinta. La supervivencia intracelular está altamente correlacionada con la fagocitosis en la mayoría de los casos. Tanto los PMN de los corderos como los de los ovinos adultos muestran siempre una correlación contraria con *S. aureus* subsp. *anaerobius* que con *S. aureus*.
- Sexta. Los resultados de las inoculaciones subcutáneas intramusculares y practicando incisiones cutáneas en los cabritos confirman que la especie caprina es sensible a la infección por *S. aureus* subsp. *anaerobius* y que las alteraciones ocasionadas experimentalmente son muy semejantes a las observadas en los ovinos.
- Septima. A diferencia de otras vías de inoculación, la infección experimental de incisiones cutáneas reproduce muy

eficazmente la enfermedad natural. lo que sugiere que las soluciones de continuidad de la piel son la puerta de entrada más probable de la infección.

Octava. La reproducción experimental de mamitis clínica con *S. aureus* subsp. *aureochius* es posible, pero dada la dosis tan alta requerida parece poco probable que la bacteria ocasione mamitis en condiciones naturales.

---

**Resumen.**

En este trabajo se ha realizado un estudio de la deficiencia respiratoria de *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerophilus*, así como de su acción patógena en las especies ovina y caprina.

*S. aureus* subsp. *anaerophilus* es el agente etiológico de la enfermedad de los abacesos de los corderos. Las peculiaridades distintivas más importantes de esta subespecie con respecto a *S. aureus* son la carencia de actividad catalasa, de citocromos y de menaquinonas, todos ellos componentes de la cadena respiratoria aerobia, lo que hace que esta bacteria sea anaeróbica o microaerofílica.

El primer aspecto de este trabajo, la deficiencia respiratoria, se centra en comprobar si estos mutantes aerotolerantes de *S. aureus* subsp. *anaerophilus* son capaces de sintetizar total o parcialmente el grupo proteico de la catalasa. Para ello se utilizaron técnicas inmunológicas, empleando en la detección anticuerpos policlonales obtenidos por inoculación en conejos de catalasa de *S. aureus* ATCC 12.600 electroforéticamente pura. Estos anticuerpos se aplicaron para la detección del grupo proteico de la catalasa en extractos celulares crudos y parcialmente purificados. La técnica empleada fue la electrotransferencia de proteínas desde geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) a soportes de nitrocelulosa y posterior detección por enzimoensayo. Los resultados obtenidos indican que mediante esta técnica no fue posible detectar en los extractos celulares de *S. aureus* subsp. *anaerophilus* ninguna proteína que reaccionara con las inmunoglobulinas purificadas frente a catalasa de *S. aureus* ATCC 12.600.

En el estudio de la patogenia de la enfermedad de los abacesos se consideró prioritario investigar la eficacia de la fagocitosis y de la actividad bactericida de los PMN ovinos frente a *S. aureus* subsp. *anaerophilus*, siempre en comparación con estirpes clásicas de *S. aureus* aisladas de procesos patológicos humanos. En definitiva se pretendió comprobar si las diferencias fisiológicas y bioquímicas entre estas dos bacterias se traducían en un comportamiento diferente en su interacción con los PMN ovinos. Asimismo, dado que la enfermedad natural afecta fundamentalmente a los corderos jóvenes, también se planteó investigar la influencia de la edad de los ovinos donadores de PMN en la eficacia de estos procesos, comparando dos grupos donadores: uno constituido por corderos de un mes de edad y el otro por animales

adultos de entre dos y cuatro años. Los resultados obtenidos en este estudio indican que la edad de los animales donadores influye decisivamente en la capacidad fagocítica in vitro de los PMN, al menos frente a las dos bacterias estudiadas, como lo demuestra el hecho de que los PMN de los corderos fagocitan menos eficazmente que los PMN de los ovinos adultos tanto a *S. aureus* subsp. *anaerobius* como a *S. aureus*. Sin embargo, estas diferencias no solo serían debidas a la edad ya que las diferencias en la composición y/o en las características fisiológicas y bioquímicas existentes entre las dos bacterias influyen en la menor capacidad fagocítica de los PMN de los corderos frente a *S. aureus* subsp. *anaerobius*. Asimismo, se ha comprobado que la supervivencia intracelular está altamente correlacionada con la fagocitosis en la mayoría de los casos y que tanto los PMN de los corderos como los de los ovinos adultos muestran siempre una correlación inversa con *S. aureus* subsp. *anaerobius* que con *S. aureus*.

Asimismo, se ensayó un nuevo método de inoculación experimental consistente en impregnar con un cultivo de la bacteria lesiones cutáneas practicadas en la piel. A diferencia de otras vías de inoculación, la infección experimental de incisiones cutáneas reproduce muy eficazmente la enfermedad natural, lo que sugiere que las soluciones de continuidad de la piel son la puerta de entrada más probable de la infección. Las inoculaciones subcutáneas, intramusculares y practicando incisiones cutáneas en las carniceras confirman que la especie caprina es sensible a la infección por *S. aureus* subsp. *anaerobius* y que las alteraciones traumáticas experimentalmente son muy semejantes a las observadas en los ovinos.

El último de los aspectos considerados en este trabajo fue la investigación de la patogenicidad de *S. aureus* subsp. *anaerobius* por vía intramamaria en ovejas en lactación. En este caso, aunque fue posible la reproducción experimental de mastitis aguda por inoculación intramamaria de *S. aureus* subsp. *anaerobius*, la dosis requerida fue tan alta que parece poco probable que la bacteria ocasione mastitis en condiciones naturales.

The aim of the present work was to study the respiratory deficiency of *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* and its pathogenicity to sheep and goats.

*Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* is the etiological agent of abscess disease in lambs. The most distinctive characteristics of this subspecies which differentiate it from *Staphylococcus aureus* is the absence of catalase activity, cytochromes and menaquinones, all of which form part of the aerobic respiratory chain. The result of this deficiency is that the bacteria is anaerobic or microaerophilic.

The first aim of this work was to study whether the aerotolerant mutants of *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* are able to synthesize totally or partially the proteic group of catalase, using immunological techniques. Polyclonal antibodies, raised by inoculating rabbits with electrophoretically pure catalase from *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, were used to detect the proteic group of catalase from crude and partially purified cellular extracts. After running polyacrylamide gels (SDS-PAGE), proteins were transferred electrically to nitrocellulose membranes and were detected by an enzymatic reaction. No protein reacting with the purified immunoglobulins against *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 catalase could be detected in cellular extracts from *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius*.

To study the pathogenicity in abscess disease, emphasis was put on studying the efficacy of phagocytosis and bactericidal activity of ovine PMN against *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius*, always comparing it with classical *Staphylococcus aureus* strains isolated from sheep pathological processes. In brief, the aim was to study whether the physiological and biochemical differences between these two bacteria translated into differences in the interaction with PMN. In addition, as the natural disease affects mainly young sheep, we also wanted to determine the role played by the age of the PMN donors on these processes and we compared two groups: (a) lambs younger than one month of age; and (b) adult sheep two to four years old. Results obtained in this study show that the age of the donor animals has a marked influence on the phagocytic and killing ability of PMN at least as respects the two bacteria studied. Thus, PMN from lambs phagocyte less efficiently than those from adults. However, PMN



from lambs phagocytosed S.aureus more efficiently than S.aureus subsp. anaerobius, so, besides age of the donors, the differences seen may also be due to differences in the composition and/or in the physiological and biochemical characteristics. In addition, intracellular survival highly correlates with phagocytosis in most cases and PMN both from lambs and sheep show an inverse relationship with S.aureus subsp. anaerobius and S.aureus.

A new method for experimental inoculation was developed, consisting in impregnating skin cuts with bacteria. This type of experimental infection reproduces natural disease more efficiently than other types, suggesting that skin wounds are the most probable way of entry for the infection. Subcutaneous, and intramuscular inoculations, as well as cutaneous cuts in young goats confirm that caprines are sensitive to the infection by Staphylococcus aureus subsp. anaerobius and that experimental lesions are very similar to those seen in sheep.

The last aspect was to study the pathogenicity of Staphylococcus aureus subsp. anaerobius inoculated by intramammary route in lactating ewes. In this case, though the clinical mastitis could be experimentally reproduced, the required dose was so high that it seems barely possible that the bacteria may produce mastitis in natural conditions.

---

## **Bibliografía.**

- ABDELOM, D. H. 1980a. Basic methods for the study of phagocytosis. *Methods in Enzymology*, **122**: 95-180.
- ABDELOM, D. H. 1980b. Opsonins and opsonophores: an overview. *Methods in Enzymology*, **122**: 241-318.
- AFKARI, M. and M. HADJAZI. 1978. Studies on ~~Mycobacterium~~ strains isolated from an outbreak of Morax's mycobacteriosis in sheep. *Naturvet.*, **11**(1): 1-3.
- ANDERSON, J. C. and M. R. WILLIAMS. 1985. The contribution of a capsule to survival of staphylococci within porcine neutrophils. *J. Med. Microbiol.*, **22**(3): 317-323.
- ASHFAD, M. K. and S. G. CAMPBELL. 1980. A survey of caseous lymphadenitis and its etiology in goats in the United States. *Vet. Med. Small Animal Clinician*, **75**: 1161-1163.
- ASWANKUMAR, S., S. SUBRAMAN, K. SCHIFFMAN, A. R. DAY, R. J. FRISB, M. J. SWANELL, and C. B. PERT. 1977. Demonstration of a receptor on rabbit neutrophils for chemotactic peptides. *J. Gen. Physiol. Res. Commun.*, **15**: 810-817.
- AYAR, S. Y., D. L. OWEN, H. M. DYER, and M. P. MARR. 1990. Lack of feline, dectin-1-like lectin-phenylalanine receptors on porcine neutrophils. *Am. J. Vet. Res.*, **51**(11): 1501-1506.
- AYRAUD, M. 1927. La botryomyxose du mouton. *C. R. Acad. Sci.*, **125**: 1170-1172.
- AYRAUD, M. 1928. La botryomyxose (causation caseuse) du mouton en Alsace. *C. R. Soc. Biol.*, **80**: 219-217.
- AYRAUD, M. 1927. La botryomyxose des bœufs (causation caseuse) en Alsace. *Rev. Med. Vet.*, **14**: 530-536.
- AYRAUD, M. 1928. La botryomyxose du mouton, mouton, mouton, mouton. *Ann. Inst. Pasteur.*, **42**: 390-391.
- BABCOX, B. M. 1978. Oxygen dependent microbes: killing by phagocytes. *M. Eng. J. Med.*, **229**: 659-671.
- BABCOX, B. M. 1984. Oxidants from phagocytes: agents of offense and destruction. *J. med.*, **60**: 959-966.
- BAGGICCI, M. V., M. HERRIGER, M. GENARO, and B. DEARD. 1985. Identification of three types of granules in neutrophils of humans. Ultrastructure of circulating and mature cells. *Lab. Invest.*, **52**: 151-158.
- BALDWIN, J. X. 1973. Sequential degradation of the two types of degranulation granules during phagocytosis of microorganisms. *J. Cell. Biol.*, **32**: 249-265.
- BAUMOC, S. B. FAZKAS and J. TANYI. 1983. Occurrence of Morax's disease with abscess formation in sheep in Hungary. *Magyar Állat-Lep. Ért.*, **103**: 519. *Ann. Vet. Bull.*, 1986, no. 1457.
- BAUMOC, S. B. FAZKAS, and J. TANYI. 1985. An outbreak of Morax's disease (a contagious sheep disease) accompanied by abscess formation in Hungary. *Acta Veterinaria Hungarica*, **33**(1): 9-13.
- BARTLETT, J. S. 1988. Macrophages and antigen processing and presenting. In: *Textbook of Immunology*, The C. V. Mosby Company, St. Louis.
- BATEY, R. G. 1986a. Aspects of pathogenesis in a route mode of infection by *Corynebacterium* ~~sp.~~. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **60**: 237-249.
- BATEY, R. G. 1986b. Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Aust. Vet. J.*, **63**(9): 269-272.
- BEARD, M. and A. B. MOVKOFF. 1968. *J. Histochem. Cytochem.*, **17**: 812.

- BEAMAN, L. B., E. BEAMAN, and D. PARAGAKIS. 1983. Activation of macrophages by lymphokines: enhancement of phagosome lysosome fusion and killing of *Leishmania promastigotes*. Infect. Immun., 37: 1201-1207.
- BEAMAN, L., and L. BEAMAN. 1984. The role of oxygen and its derivatives in microbial pathogenesis and host defense. Ann. Rev. Microbiol., 38: 27-48.
- BEAZILL, T., A. WÄGNER, E. WIESER, M. SCHANZ, G. ADAM, A. HARTIG, and K. RÜDIS. 1991. Negative regulation of transcription of the *Escherichia coli* catalase (CAT) gene by cAMP is mediated by a positive control element. EMBO J., 10(3): 585-592.
- BEYRAN DE HEREDIA, F. y J. TORRITZ. 1988. Recuento de células somáticas en leche de oveja Latxa. Determinación del umbral fisiológico. Med. vet., 3(7): 33-38.
- BOHITO, M. et M. J. BORRERO. 1987. Nouvelle étude sur l'agent causal de la "maladie des abces du mouton et de la chevre". Revue Med. vet., 138: 111-118.
- BORKEN, A., and B. BRACKBEEK. 1988. Properties of antibodies cytotoxic for macrophages. J. Exp. Med., 162: 1-14.
- BERNARDINI, W. E., M. A. WILSON-JEUNES, W. M. L. HENRIKX and G. J. RUTVEGERG. 1991. Serum opsonic activity and neutrophil phagocytic capacity of newborn lambs before and 24-36 h after colostrum intake. Vet. Immunol. Immunopathol., 29: 171-178.
- BERTRAM, J. A., and A. J. LINDSAY. 1982. Mononuclearity of equine neutrophils isolated at different temperatures. Vet. Path., 17: 53-54.
- BERTRAM, J. A. 1985. Neutrophilic leukocyte structure and function in domestic animals. Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine, 31: 97-129.
- BLANCO, J. O. ZELISER, A. 1980. Contribución a estudio de la "maladía caseosa" de algunos linfocitos de los ovejas. Rev. Rionegr. Biol. Anim., 3: 73-87.
- BORCHERT, E., and T. HORNHOFFMANN. 1978. Mutants déficientes aux colonies haïmes de *Escherichia coli* et leur efficacité infectieuse chez des moutons porteurs d'abcesses. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 127: 303-314.
- BOUKHARRAB, M., J. P. GARRERE, M. J. SOLA, G. ANDRE et D. JARROS. 1985. Analyse bactériologique d'un cas de "maladie caseosa" (contaminosus de Morax) chez des ovins atteints de la maladie des abces. Revue Med. vet., 136: 391-397.
- BOYAN, A. 1984. Separation of lymphocytes, granulocytes, and monocytes from human blood using iodinated dextran gradient media. Methods in Enzymology, 118: 88-102.
- BRADY, J. J., and M. J. LANGRISH. 1987. Descriptive epidemiology of goats and sheep: a review. Vet. Rec., 121: 1-12.
- BUCITA, R. 1980. Functions and other cell properties of ovine neutrophils. Vet. Immunol. Immunopathol., 23: 97-112.
- BURKILL, J. K. 1979. Experimental induction of caseous lymphadenitis in sheep by intramuscular inoculation of *Brucella melitensis*. Res. vet. Sci., 31: 269-276.
- CARRUTHER, G. P., and J. LAWRENCE. 1973. Isolation of leukocytes from bovine peripheral blood. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 142: 853-856.
- CARRUTHER, G. P. 1983. La "maladie caseosa" du mouton. C. R. Soc. Biol., 92: 427-428.

- ARRÉ J. 1920 Sur la suppuration causée du mouton. Bull. Soc. Cent. Méd. Vétér. 19: 402-411.
- ARRÉ J. 1927 La suppuration et les microbes propres des petits ruminants. Rev. Cent. Méd. Vét. 39: 1-25.
- BARBERIS J. 1924 Au sujet de la maladie récurrente du mouton. Bull. Soc. Cent. Méd. Vétér. 36: 1-12.
- CLARE A. M., M. DUDIG, D. GARR, J. ARCHIBALD, and J. FRIEDRICH. 1986. Effects of molecular oxygen on detection of superoxide radicals with nitroblue tetrazolium and on activity staining for catalase. *Anal. Biochem.* 156: 532-537.
- CHEN S. E. PICK, and J. OPPENHEIM. 1979. In: The biology of the lymphocytes. Academic Press, San Diego.
- CHEN G. W., RABATZ, and H. RUIS. 1988. Sequence of the *Staphylococcus aureus* 'CAT' gene and amino acid sequence of catalase A derived from it. *Eur. J. Biochem.* 176(1): 159-163.
- CHODURA K., L. F. A. BERTRAM, and N. F. CHEVILLE. 1984. Functional and ultrastructure evaluation of neutrophils from foals and lactating and nonlactating mares. *Am. J. Vet. Res.* 45(11): 895-902.
- COLLIERI G. and D. J. WATSON. 1982. Effect of immunisation on the early influx of neutrophils during sheep bacterial meningitis in ewes. *Res. Vet. Sci.* 33: 148-151.
- COLLIERI, F. M. and S. J. CAMPBELL. 1982. Immunity to intracellular bacteria. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 5: 5-66.
- CRAVEN, M., M. R. WILLIAMS, T. H. FIELD, K. J. BUNCH, S. J. MATER, and F. J. BURRIS. 1986. The influence of extracellular and phagocytosomal pH changes on the bactericidal activity of bovine neutrophils against *Staphylococcus aureus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 11: 97-110.
- CUZANESCU, Z. J., and M. L. HAMILTON. 1985. Bovine neutrophils ingest but do not kill *Mycobacterium fortuitum* in vitro. *Infect. Immunol.* 53(12): 431-436.
- CHUNG, A. L. and A. A. SCHWETT. 1986. Variation in the expression of cell wall proteins of *Staphylococcus aureus* grown on solid and liquid media. *Infect. Immun.* 54: 1061-1063.
- DARSHMAN, M. F., R. W. MORGAN, F. S. JACOBSON, and B. M. AVIS. 1985. Positive control of a response for defenses against oxidative stress and some heat shock proteins in *Staphylococcus aureus*. *Cell* 41: 793-798.
- DAVIS, S. D., R. DULBECCO, M. M. EISEN, H. S. GINSBERG and B. WOOD, ed. 1988. *Estreptococos. En: Tratado de Microbiología*. Salvat Editores, S. A. Barcelona.
- DEVEREE A. 1977. Isolation and identification of *Staphylococcus aureus*. *Am. J. Vet. Res.* 38: 792-793.
- DOUGLAS, S. U. 1983. Development and structure of cells in the immune system. En: "Basic and Clinical Immunology". Ed. Lange medical publications, California.
- DRUZIL and MILLS. 1983. Repair by and infection. En: "Basic and Clinical Immunology". Ed. Lange medical publications, California.
- DULIN, A. M., R. W. PAAP, and S. J. WEINAND. 1984. Determination of phagocytosis of  $^{51}\text{Cr}$  labeled *Staphylococcus aureus* by bovine polymorphonuclear leukocytes. *Am. J. Vet. Res.* 45(4): 786-789.
- EL EBBY, M. F., and M. AGDEH-NABID. 1970. Experimental ovine mastitis: a bacteriologic study. *Path. Vet.* 1: 246-256.
- EL-SAYED, A. S. U., S. J. MATER and D. J. WATSON. 1988. The effect of the SODPH oxidase inhibition diphenyleneiodonium on aerobic and anaerobic micro-oxidase activities of bovine neutrophils. *Biochem. J.* 251: 887-891.

- ELSBACH, P., and J. WEISS. 1981. O<sub>2</sub>-independent bactericidal systems of polymorphonuclear leukocytes. *Adv. Inflamm. Res.*, **2**: 95-113.
- EVERALL, P. H., and P. H. STAGE. 1956. Tare ste-negative *STAPHYLOCOCCUS aureus*. *J. Med. Lab. Technol.*, **11**: 489-490.
- FILICE, G. A., B. J. BEAMAN, J. A. KRICK, and J. S. REMINGTON. 1980. Effects of human neutrophils and monocytes on *BRUCELLA abortus*: failure of killing despite occurrence of the oxidative metabolic burst. *J. Infect. Dis.*, **142**: 432-438.
- FITA, J., and M. G. RODRIGUEZ. 1985. The active center of catalase. *J. Mol. Biol.*, **185**: 21-37.
- FUBSCHMANN, J., G. V. GOLDE, E. H. WEISBART, and J. C. GAISSON. 1986. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances phagocytosis of bacteria by human neutrophils. *Blood*, **68**(5): 708-711.
- FOOTE, C. S., T. E. GOYNE, and R. I. LEHRER. 1983. Assessment of chlorination by human neutrophils. *Nature*, **301**: 715-716.
- FORD HUTCHINSON, A. W., M. A. BRAY, M. V. DOIS, M. E. SHIPLEY, and M. J. H. SMITH. 1980. Leukotriene B<sub>4</sub>, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature*, **286**: 254-255.
- FOX, L. K., J. S. McDONALD, and L. B. CORBELL. 1987. Milk neutrophil phagocytosis of *STAPHYLOCOCCUS aureus* as determined by fluorescent microscopy. *J. Vet. Med. B.*, **36**(7): 549-551.
- FYHEMARIS, G. O., and J. B. T. JONES. 1990. The effect of inoculation of coagulase-negative staphylococci into the ovine mammary gland. *J. Comp. Path.*, **102**: 211-219.
- DE LA PUENTE, R., J. L. RODRIGUEZ-MARIN, E. F. RODRIGUEZ y G. SUAREZ. 1985a. Estudio de la enfermedad de los abscesos de los oviductos y su incidencia en España. *An. L.N.I.A. (serie ganadera)*, **22**(2): 79-94.
- DE LA PUENTE, R., E. F. RODRIGUEZ, G. SUAREZ y J. L. RODRIGUEZ-MARIN. 1985b. Diagnostico diferencial de la enfermedad de los abscesos. *An. L.N.I.A. (serie ganadera)*, **22**(2): 97-101.
- DE LA PUENTE, R., G. SUAREZ, and K. H. SCHLEIFER. 1985c. *STAPHYLOCOCCUS aureus* subsp. *ANATROPICUS* subsp. nov., the causal agent of abscess disease of sheep. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **31**(6): 99-102.
- DE LA PUENTE, R., and G. SUAREZ. 1989. Respiratory deficient *Staphylococcus aureus* as the aetiological agent of "abscess disease". *J. Vet. Med. B.*, **38**: 367-368.
- DE LA PUENTE, R., K. H. SCHLEIFER, F. GÖTZ and H. P. KOST. 1986. Accumulation of porphyrins and pyruvate pigments by *Staphylococcus aureus* 940, *ANATROPICUS* and its aerobic mutant. *FEMS Microbiol. Lett.*, **33**: 83-88.
- DE LA PUENTE, R., F. GÖTZ, and K. H. SCHLEIFER. 1987. Comparative biochemical studies on aerobic mutants of *Staphylococcus aureus* subsp. *ANATROPICUS*. *System. Appl. Microbiol.*, **9**: 29-33.
- DE LA PUENTE, R., G. HENKELMANN and G. SUAREZ. 1987b. Comparison of cellular fatty acid composition between *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus aureus* subsp. *ANATROPICUS*. *Rev. Lat-am. Microbiol.*, **29**: 363-368.
- DABIG, T. G., and B. A. LEFKER. 1986. NADPH oxidase from polymorphonuclear cells. *Methods in Enzymology*, **132**: 335-364.
- LE GALL, A. et M. PLOMME. 1965. Observations sur la croissance des staphylocoques et la réaction leucocytaire au cours des premières heures de la septicémie expérimentale de la brebis. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.*, **5**: 113-130.

- GEHRELL, J. G., R. K. PETERSON, D. J. SCHMELIN, and P. G. GUE. 1982. Effect of staphylococcal elastin on phagocytosis of staphylococci by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.*, **35**: 975-980.
- GERHARD, E., C. SCHWEIDER, G. DE NICOLA, F. CIAN and D. ROMEO. 1978. Biochemical properties of bovine granulocytes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **157**: 342-347.
- GERHARD, E., V. DEWALD, M. U. GÜBLER, and M. SAGGIOLINI. 1983a. A novel type of cytoplasmic granule in bovine neutrophils. *J. Cell. Biol.*, **99**: 1657-1661.
- GERHARD, E., L. DOLZANI, and D. ROMEO. 1983b. Potency of bactericidal proteins purified from the large granules of bovine neutrophils. *Infect. Immun.*, **50**: 684-690.
- GERTZ, E. J., and E. P. AUSTEN. 1975. Purification and synthesis of eosinophilic tetrapeptides of human (swg) tissue: identification as eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**: 4121.
- GERTZ, E. J., and W. C. PICKETT. 1980. The human BMM leukocyte chemotactic activity of complex N-glycosyl eicosatetraenoic acid (NETES). *J. Immunol.*, **125**: 1789-1797.
- GLISSTEIN, I. M. 1983. Phagocytic cells. II. Granulocytes. In: "Basic and Clinical Immunology". Ed. Lange medical publications, California.
- GREEN, T. J. 1984. Use of somatic cell counts for detection of subclinical mastitis in ewes. *vet. Rec.*, **115**: 43.
- GREGORY, E. M., and J. FRIDOVICH. 1974. Visualization of catalase on acrylamide gels. *Anal. Biochem.*, **58**: 57-62.
- GRIFFIN, F. M. 1977. Desensitization. In: *Comprehensive Immunology*, vol. 2, *Biological Amplification Systems in Immunology* (H. X. Day and R. A. Good, eds.), Plenum, New York.
- GRIFFIN, F. M., J. A. GRIFFIN, J. E. LEIDER, and S. C. SILVERSTEIN. 1975. Studies on the mechanism of phagocytosis. 7. Requirements for counterfactual attachment of particle bound ligands to specific receptors on the macrophage plasma membrane. *J. Exp. Med.*, **142**: 1263-1282.
- GUCKIAN, J. C., W. D. CHRISTENSEN, and D. P. FINE. 1978. Trypan blue inhibits complement-mediated phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes. *J. Immunol.*, **120**: 1560-1568.
- GUYOT, J. F. and F. K. COURDOUJLI. 1987. Exploration de quelques fonctions des polynucléaires neutrophiles sanguins du mouton. *Revue Med. vét.*, **138**: 995-998.
- GUYOT, A. J., M. J. PAAPE, B. E. PEARSON, and W. F. WILLIAMS. 1980. Effect of local immunization of the mammary gland on phagocytosis and intracellular kill of *Staphylococcus aureus* by polymorphonuclear neutrophils. *Am. J. Vet. Res.*, **41**(9): 1427-1437.
- HÄHN, K. and S. W. E. KAUFMANN. 1981. The role of cell mediated immunity in bacterial infections. *Rev. Infect. Dis.*, **3**: 1221-1250.
- HARD, G. C. 1969. Electron microscopic study of the differentiation of mouse peritoneal macrophages stimulated by *Coccidioides immitis* infection. *Lab. Invest.*, **21**: 309-319.
- HARTIG, A., and H. BUIS. 1986. Nucleotide sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* C771 gene and deduced amino acid sequence of yeast catalase T. *Eur. J. Biochem.*, **160**: 487-490.
- HAUBER, M. A., M. D. KOBE and J. A. ROTH. 1986. Variation of neutrophil function with age in calves. *Am. J. Vet. Res.*, **47**(1): 152-153.

- HEATY, P. J. 1982. Lysosomal hydrolase activity in leukocytes from cattle, sheep, goats, horse and pigs. Res. vet. Sci., 33: 275-279.
- HERBERT, G. A., P. C. PEHAM, and B. PITHAM. 1973. Determination of the optimal ammonium sulfate concentration for the fractionation of rabbit, sheep, horse and goat antisera. Appl. Microbiol., 25: 26-36.
- HEDJAZI, M. et M. AFKAM. 1973. L'incidence des abces entotoxiques chez les agneaux à la naissance et à l'élevage en Iran. Rev. Med. vet., 112: 679-684.
- KIESCH, J. G., and B. STRAUSS. 1964. Studies on heat-labile opsonin in rabbit serum. J. Immun., 92: 145-154.
- KINGE, C. J., and B. H. GAAT. 1984. Characterization of a protein from normal human polymorphonuclear leukocytes with bactericidal activity against *Pseudomonas aeruginosa*. Infect. Immun., 52(1): 142-148.
- MUSBAID, A. J., and D. L. WATSON. 1977. Immunological events in the popliteal lymph node of sheep following injection of live or killed *Mycobacterium avium* into an afferent popliteal lymphatic duct. Res. vet. Sci., 28: 195-202.
- ITIH, G. T. N., M. F. ISLAM, and J. H. QUASTEL. 1961. Biochemical aspects of phagocytosis. Nature, 192: 535-541.
- JACKETT, P. S., M. R. ABER and D. B. LOWRIE. 1978. Virulence and resistance to superoxide, low pH, and hydrogen peroxide among strains of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Gen. Microbiol., 104: 37-43.
- JAIN, N. C. 1986. Scheel's veterinary hematology. Lea & Febiger, Philadelphia, P. A.
- JENSEN, J. 1963. "Apo-catalase" of catalase-negative staphylococci. Science., 141: 45-46.
- JENSEN, J. A., R. SYDERHAE, and S. E. MERSEWAGEN. 1969. Chemotactic activity, a property of guinea pig C5b-anaphylatoxin. Proceedings of the third international symposium on cellular and humoral mechanisms in anaphylaxis and allergy. Karger, Basel.
- JOHNSON, J. D., J. T. SUMMERSILL, and M. J. RAFF. 1986. The in vitro effects of methotrexate on the phagocytosis and intracellular killing of *Staphylococcus aureus* by human neutrophils. Cancer, 57(12): 2343-2345.
- JOHNSTON, R. B., G. A. COOZIK and Z. A. CDME. 1978. Increased superoxide anion production by immunologically activated and chemically elicited macrophages. J. Exp. Med., 148: 115-127.
- JOLLY, B. D. 1985. Experimental infection of convalescent mice with *Mycobacterium avium*. New Zealand veterinary journal, 13: 148-153.
- JOURNET, L. 1958. Etude bactériologique et systématique de *Mycobacterium abscessus* (Morel 1917). Ann. Inst. Pasteur, 52: 215-218.
- KAMAHARI, M., and S. E. MARTIN. 1985. Catalase and superoxide dismutase activities in virulent and nonvirulent *Staphylococcus aureus* isolates. J. Clin. Microbiol., 21(4): 607-610.
- KARNOVSKI, M. L. and J. A. SADNEY. 1986. Respiratory burst during phagocytosis: an overview. Methods in Enzymology, 133: 353-434.
- KERLIN, R. J., and D. L. WATSON. 1986. Variations in immunoglobulin isotype produced during the antibody response to *Mycobacterium abscessus* and *Staphylococcus aureus* vaccines in sheep. Res. Vet. Sci., 61: 191-195.
- KLEBANOFF, S. J. 1980. Oxygen intermediates and the microbicidal event. In: Van Furth, R. ed. Mononuclear phagocytes; Functional aspects, part 1: The Hague, Netherlands, Martinus Nijhoff.



- ELSBAROFF, K. J. 1982. Oxygen dependent cytotoxic mechanisms of phagocytes. In: Advances in host defense mechanisms II, vol. 1. Ed. Raven Press, New York.
- KRUTZ, B., and F. DOTZ. 1984. Construction of Staphylococcus aureus based vector pCA43 containing neo genes to chloramphenicol, arsenate, arsenite and antimycin. Gene, **31**: 301-304.
- LANGHTE, R. 1976. In: Statistica Biologica: principes fundamentales. Torrey-Masson, S. A. Barcelona.
- LEHRER, R. J., K. M. LAORA and R. B. HAKE. 1973. Infect. Immun., **11**: 1226-1234.
- LEIJN, P. C. J., R. VAN FURTH, and T. L. VAN IJKT. 1986. In vitro determination of phagocytosis and intracellular killing by polymorphonuclear and mononuclear phagocytes. In: Handbook of experimental immunology. Ed. WEIR, D. M. Blackwell scientific publications, Oxford.
- LINDAHL, M., O. HOLMBERG, and P. LONSSON. 1990. Adhesive proteins of haemagglutinating Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis. J. Gen. Microbiol., **134**: 935-939.
- LOEFFLER, O. A., M. T. CREAMY, N. L. NORCROSS, and M. J. PAAPPE. 1988. Enzyme linked immunosorbent assay for detection of leukocidin toxin from Staphylococcus aureus in bovine milk samples. J. Clin. Microbiol., **26**(7): 1331-1334.
- LOEVEN, P. C., and J. SWITALA. 1986. Purification and characterization of catalase NP11 from Escherichia coli K12. Biochem. Cell. Biol., **25**: 638-644.
- LUCAS, P. R., and H. W. BEVER. 1955. A catalase negative Micrococcus pyroaerius var. aureus. J. Bacteriol., **62**: 231.
- MACKIE, D. P., and S. P. RODGERS. 1986. Mastitis and cell content in milk from Scottish Blue-faced ewes. vet. Rec., **118**: 26-27.
- MADILL, A. J. 1983. Mastitis. In: Diseases of sheep. Ed. W. B. Martin. Blackwell Scientific Publications Oxford, U.K.
- MARTEL, G. L. 1979. Catalase, superoxide dismutase, and vitellogenin of Staphylococcus aureus in vitro and in vivo studies with ophagocytosis and staphylococcal-leukocyte interaction. J. Clin. Invest., **83**: 541-546.
- MARASCIO, W. A., J. C. FAHONY, E. J. FREER, and P. A. WARD. 1983. Characterisation of the rat neutrophil formyl peptide chemotaxis receptor. Am. J. Pathol., **122**: 273-281.
- MARODI, L., P. BURJAN and K. ROZDNYI. 1990. Oxygen requirements and surface hydrophobicity of novobiocin-resistant, coagulase negative staphylococci. J. Med. Microbiol., **32**: 19-24.
- MAYER, S. J., W. CRAVEN, P. H. KEEN, and F. J. BOURNE. 1986a. Effect of pH changes on the killing of Staphylococcus aureus and other mastitis pathogens by bovine neutrophil granule extracts. Res. Vet. Sci., **61**: 324-328.
- MAYER, S. J., A. B. WATERMAN, D. M. KEEN, W. CRAVEN, and F. J. BOURNE. 1986b. Oxygen concentration in milk of healthy and mastitic cows and implications of low oxygen tension for the killing of Staphylococcus aureus by bovine neutrophils. J. Dairy Res., **53**: 513-519.
- MELIX-ADAMYAN, M. R., V. V. BARYNIN, A. A. VADIN, V. M. BOZISOV, S. K. VAKHSHTEIN, I. FITA, M. R. M. MAURPHY, and M. G. ROSSMAN. 1986. Comparison of beef tallow and Penicillium chrysogenum catalases. J. Mol. Biol., **188**: 63-72.
- NETZ, F. J. A., J. I. GALLIN, W. M. NAUGHEEF, and R. K. ROOT. 1986. Functions related to membrane fluidity: phagocytosis. In: Laboratory manual of neutrophil function. Ed. Raven Press, New York.

- MICKENBERG, J. D., R. K. ROOT, and S. M. WOLFF. 1970. Leukocyte function in hypogammaglobulinemia. *J. Clin. Invest.*, 49: 1528.
- MILLER, M. E. 1969. Phagocyte function in the neonate: selected aspects. *J. Pediatrics*, 74: 255.
- MOREL, H. G. 1911. Contribution à l'étude de l'adénite caséuse du mouton. *J. Med. Vet. Zootechnie*, 73: 513-520.
- MORDAN, R. W., H. F. CHRISTMAN, F. S. JACOBSON, G. STORRZ, and B. N. AMES. 1986. Hydrogen peroxide-inducible proteins in *Salmonella typhimurium* overlap with heat shock and other stress proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 8059-8063.
- MUCKUR, T. K. S. and F. P. INMAN. 1989. Relative importance of salmonella-specific antibody isotypes in phagocytosis of *Salmonella typhimurium* by ovine mammary neutrophils. *Res. Vet. Sci.*, 46: 153-159.
- MULLAN, N. A., E. A. CARTER, and K. A. T. NGUYEN. 1985. Phagocytic and bactericidal properties of bovine macrophages from non-lactating mammary-glands. *Res. Vet. Sci.*, 38: 160-166.
- MULLAN, N. A., E. A. CARTER, and K. A. T. NGUYEN. 1986. Secretion of hydrogen peroxide by phagocytic cells from bovine non-lactating mammary glands. *Res. Vet. Sci.*, 41: 365-370.
- NAGY, G. 1976. Caseous lymphadenitis in sheep. *Methods of Infection. Journal of the South African Veterinary Medical Association*, 42: 227-232.
- NAIRN, H. E., and J. P. ROBERTSON. 1974. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection of sheep: role of skin and dipping fluids. *Aust. vet. J.*, 50: 537-542.
- NAMAYAR, F., J. DE GRAAFF, and J. VERHOEF. 1976. Virulence of staphylococci (with special reference to experimental infection in neonatal mice, and the phagocytosis by polymorphonuclear cells). *Zbl. Bakt. Suppl.*, 5: 873-878.
- NISHIHARA, S., K. SEKI, and S. MASUDA. 1985. Resistance of a mutant with an extremely low catalase production from *Staphylococcus aureus* Cowan-1 strain to the bactericidal activity of human leukocytes. *Microbiol. Immunol.*, 29(2): 151-155.
- NONNECKE, B. J., and J. A. WARP. 1988. Effects of *Staphylococcus aureus* on bovine mononuclear leukocyte proliferation and viability: modulation by phagocytic leukocytes. *J. Dairy Sci.*, 71(3): 835-842.
- ODEBERG and OLSSON. 1975. Antibacterial activity of cationic proteins from human granulocytes. *J. Clin. Invest.* 55: 1116-1124.
- O'DONELL, L. J., D. D. SHUKLA, and K. M. GOUGH. 1982. Electro-dot radioimmunoassay of virus-infected plant sac-A powerful new technique for detecting plant viruses. *J. Virol. Methods*, 6: 19-26.
- O'DONNELL, R. T. and B. R. ANDERSEN. 1982. Characterization of canine neutrophil granules. *Infect. Immun.*, 36: 351-359.
- OKADA, N., M. WEDA, T. SUGAYA, N. AICHI, S. MOZAFFAR, T. HISHIDA, Y. TERAHISMI, K. OKAZAKI, T. TAKECHI, T. KAMIRYO, and A. TANAKA. 1987. Catalase gene of the yeast *Ganidi tropicalis*. Sequence analysis and comparison with peroxisomal and cytosolic catalases from other sources. *Eur. J. Biochem.*, 170(1/2): 105-110.
- VAN OSS, C. J. 1986. Phagocytosis: an overview. *Methods in Enzymology*, 132: 3-15.

JAN OSS, C. W., W. S. JOEPEL, and S. E. HAPQUART. 1973. Immunoglobulin as specific opsonin: the opsonizing power of fragments of polyclonal and monoclonal immunoglobulin G. Res. J. Reticuloendothel. Soc., 13: 227-239.

WON OSOWSKI, I., W. R. MULVEY, P. A. LECO, A. BORTS, and P. C. LOEWEN. 1991. Nucleotide sequence of *Escherichia coli* katE, which encodes catalase MP11. J. Bacteriol., 173 (2): 514-520.

OUTTERIDGE, P. M., and A. K. LASCELLES. 1967. Local immunity in the lactating mammary gland following the infection of staphylococcal toxicoids. Res. Vet. Sci., 8: 313-320.

PAAPE, W. V., A. J. GUIDRY, S. T. KIRE, and D. J. BOLT. 1975. Measurement of phagocytosis of <sup>32</sup>P-labeled *Staphylococcus aureus* by bovine leukocytes: lysostaphin digestion and inhibitory effect of cream. Am. J. Vet. Res., 36(12): 1737-1743.

PALMER, R. M. J., I. J. STEPREY, G. A. NIGGS, and K. E. SAKINS. 1980. Chemotactic activity of arachidonic acid lipoygenase products in leukocytes from different species. Prostaglandins, 22: 471-478.

PATRICK, C. C., M. B. PLAUNT, S. M. SWEET and G. S. PATRICK. 1990. Defining *Staphylococcus epidermidis* cell wall proteins. J. Clin. Microbiol., 28(12): 2757-2760.

PEPIN, M., P. PARDON, J. MARY and P. LANTIER. 1988. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in adult ewes by inoculation in the external ear. Am. J. Vet. Res., 49(4): 459-463.

PEPIN, M., P. PARDON, P. LANTIER, J. MARY, D. LEVIEUX and M. LAMAND. 1991. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in lambs: kinetics of bacterial dissemination and inflammation. Vet. Microbiol., 26: 381-392.

PETERSON, P. K., S. J. WILKINSON, Y. KIM, O. SCHMELING, and P. G. QUIE. 1978. Influence of encapsulation on staphylococcal opsonization and phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes. Infect. Immun., 22: 943-944.

PHARMACTA. 1986. Phastsystem™ Owners Manual.

REBERT, M. 1960. Marmite staphylococcique de la bradis. Ann. Inst. Pasteur, 92(3): 439-455.

QUIE, P. G., V. D. WHITE, B. HOLMES, and R. A. GOOD. 1967. In vitro bactericidal capacity of human polymorphonuclear leukocytes: diminished activity in chronic granulomatous disease of childhood. J. Clin. Invest., 42(4): 668-679.

QUIE, P. G. 1981. Host determinants in *Staphylococcus aureus* infection. Zbl. Bakt. Suppl., 10: 823-830.

RAUSCH, P. G. and T. G. MOORE. 1975. Granule enzymes of polymorphonuclear leukocytes. A phylogenetic comparison. Blood, 46: 913-919.

REESHAW, M. W., W. P. ECKBLAD, C. L. THACKER and F. W. FRANK. 1976. Antibacterial host defenses: in vitro interaction of bacterial serum factors, and leukocytes from peridrostal dairy calves and their dams. Am. J. Vet. Res., 37(11): 1267-1274.

RESZ, R. F., M. M. COONEY and J. K. SPITZNAGEL. 1978. Bactericidal activity of specific and edgewood-1 granules from human neutrophils: studies with outer membrane mutants of *Salmonella typhimurium* DT-2. Infect. Immun., 19: 131-137.

RODIT, I. M., J. BROSTOFF, and G. K. MALE. 1985. Immunity to viruses, bacteria and fungi. Edn. Immunology. Gower medical publishing, London, New York.

ROOF, R. K., and T. P. STOSSEL. 1974. Myeloperoxidase mediated iodination by granulocytes. Inhibitor: site of operation and some regulating factors. J. Clin. Invest., 53: 1207-1219.

- ROSSE, H., and S. J. KLEBANOFF. 1979. Bactericidal activity of a superoxide anion-generating system: a model for the polymorphonuclear leukocyte. *J. Exp. Med.*, **152**: 27-39.
- RUPPRECHT, M., and K. M. SCHLEIFER. 1979. A comparative immunological study of catalases from coagulase negative staphylococci. *Arch. Microbiol.*, **122**: 53-56.
- SAAR, L. J., and R. JAFFE. 1982. Sistema linfático de los ruminantes. Parte III: ovinos. En: *Anatomía de los animales domésticos*, vol. 7. Salvat Editores, S. A., Barcelona.
- SAMUELS, W. S., D. W. FORD, and R. J. YANCZEK, JR. 1986. Evaluation of a modified bovine neutrophil chemotactic assay using bovine polymorphonuclear neutrophil chemotactic activity intracellular killing assay. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **30**(4): 634-638.
- EL-SANOUSI, S. M., A. A. HAMAD and A. A. GAMESL. 1989. Abscess disease in goats in the Sudan. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, **36**(3): 379-382.
- SASARMAN, A., Y. E. SANDERSON, M. SURDEANU, and T. HORODNICEANU. 1968. Menaphthone-requiring mutants of Staphylococcus aureus. *Rev. Roum. Biol.*, **11**: 333-339.
- SASARMAN, A., Y. E. SANDERSON, M. SURDEANU, and S. SONEA. 1970. Menin-deficient mutants of Staphylococcus aureus. *J. Bacteriol.*, **102** (2): 531-536.
- SCHIFFMAN, H., B. GORDON, and S. M. WALK. 1975. N-Formylmethionyl peptides as chemotactants for leukocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**: 1064-1067.
- SCHLEIFER, K. M., S. A. WEBER, and M. RUPPRECHT. 1979. Relatedness among coagulase-negative staphylococci: deoxyribonucleic acid reassociation and comparative immunological studies. *Arch. Microbiol.*, **122**: 99-101.
- SCHMACKER-PERDESAU, K., G. PETERS, and M. KOCUR. 1981. Chemical and physiological properties of a catalase-negative Staphylococcus aureus strain. *Zb. Bakt. Suppl.*, **10**: 61-65.
- SHIRAKAWA, J. K., and W. A. ASHFORD. 1962. The occurrence of caseous lymphadenitis and Marek's disease in a sheep flock in Kenya. *vet. Rec.*, **74**(38): 1025-1026.
- SILVA, J. G., M. D. JAIN, F. S. FARVER, and J. G. ZIMMEL. 1988. Phagocytic and postphagocytic activities of bovine neutrophils for pure and mixed bacterial cultures. *J. Dairy Sci.*, **71**: 2513-2519.
- STRAHA, A. K. 1972. Colorimetric assay of catalase. *Anal. Biochem.*, **47**: 389-394.
- SMITH, M. C. and W. ROBINSON. 1977. Mastitis and other diseases of the goat's udder. *J. A. V. M. A.*, **121**: 1241-1248.
- STROBERMAN, R., M. S. SHIM, J. K. PHELPS, M. GEMURZI, and S. E. MORGENTHAU. 1969. A neutrophil chemotactic factor derived from CS upon interaction of guinea pig serum with endotoxin. *J. Immunol.*, **103**: 41-53.
- STROBERMAN, R., J. K. PHELPS, and S. E. MORGENTHAU. 1970. Polymorphonuclear leukocyte chemotactic activity in human and guinea pig serum treated with soluble complexes: evidence for CS as the major chemotactic factor. *J. Immunol.*, **105**: 521.
- STROBERMAN, R., J. G. ALTMAN, M. S. HAUSMAN, and S. E. MORGENTHAU. 1972. Human mononuclear leukocyte chemotaxis: a quantitative assay for mediators of humoral and cellular chemotactic factors. *J. Immunol.*, **108**: 287.
- STROBERMAN, R., and M. C. PIKE. 1986. N-Formylmethionyl peptide receptors on equine leukocytes initiate secretion but no chemotaxis. *Science*, **232**: 493-495.

- SARGENT, R., and E. J. FIDMAN. 1980. Demonstration of a rheumatic factor reaction on macbrages. *J. Immunol.* **125**: 2754-2777.
- SCHOMEN, A. V., and C. A. SAN GUERARDI. 1963. Some physiological characteristics of two sets of phage-propagating strains of *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol.* **11**: 56-61.
- SPILLBERG, I., A. GALLACHER, J. WEIN, and B. MANDELL. 1976. Urate crystals induced rheumatic factor, isolation and partial characterization. *J. Clin. Invest.* **58**: 615.
- SPITZER, S. S. and J. M. HADJIN. 1969. *Lab. Invest.* **20**: 468-497.
- STANLEY, M. J., and H. F. DEUTSCH. 1965. Preparation of crystalline arylphosphatase and catalase from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **240**(11): 4299-4305.
- STOESSL, T. P. 1973. Evaluation of opsonic and leukocyte function with spectrophotometric test in patients with infection and phagocytic disorders. *Blood*, **21**: 121.
- STROT, B., and M. S. KLEMPNER. 1985. Modification of interactions between neutrophils and staphylococci by lysosomotropic weak bases. *Infect. Immunol.* **22**(2): 475-479.
- SUJRA, C., P. RAINARD and B. POUTIER. 1990. Phagocytosis of mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* and expression of type 5 capsular polysaccharide are influenced by growth in the presence of milk. *J. Clin. Microbiol.* **28**(10): 2293-2298.
- SWYDOR, W., W. BRISGER, J. ZUCKER-REIMANN, U. ROKA, and S. SHAKDI. 1987. Mechanism of leukotriene generation in polymorphonuclear leukocytes by staphylococcal alpha-toxin. *Infect. Immunol.* **25**(1): 194-199.
- TAUBER, A. L., and B. M. BABIOR. 1977. Evidence for hydroxyl radical production by human neutrophils. *J. Clin. Invest.* **60**: 374-379.
- THOMAS, E. L. and T. M. JUNE. 1978. Oxidation of *Escherichia coli* sulfhydryl components by peroxide-hydrogen peroxidase-halide antimicrobial system. *Agents Chemother.* **13**: 1008-1010.
- THOMAS, E. L. 1979. Myeloperoxidase, hydrogen peroxide, chloride and iodide system: nitrogen chloride derivatives of bacterial components in bactericidal action against *Escherichia coli*. *Infect. Immunol.* **22**: 1117-1121.
- TOBIAS, M. T., STANEKIN, and J. GORDON. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**: 4350-4354.
- TRUSS RAINI, B. L., B. W. DOZIER, M. R. MULVER, P. A. SORBY and P. T. LOEWEN. 1988. Nucleotide sequence of *vanB* encoding vancomycin resistance of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **170**(9): 4475-4479.
- TRU, K. K., and W. A. FALCONE. 1976. Isolation and characterization of a diphtheria negative strain of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **3**(1): 77-78.
- VALENZANO, G. e C. B. ER. 1984. I caratteristiche colturali e biochimico-metaboliche di stadi di "cocco di Maria" responsabili di episodi di "malattia degli ascessi" degli ovini e del "coccidio" "malattia degli ascessi di Maria" nei ricostati fra i caprini di alcuni allevamenti delle vallate del sud-ovest. *Annali della Facoltà di Medicina veterinaria di Torino*, **28**: 286-307. (en vet. Bull., 1983, n° 19087).
- VANDEBROUCKE-GRAUVEON, M., E. M. M. W. THILSEN, and J. VERHOEF. 1985. Phagocytosis of staphylococci by human polymorphonuclear leukocytes is enhanced in the presence of endotoxin. *J. Infect. Immunol.* **23**(1): 250-254.

- VAN DER BROEKER-GRANUS, D. M. J. E., M. M. M. THUISSEN, and G. VERHOEF. 1987. Opsonization of *Staphylococcus aureus* protects endothelial cells from damage by phagocytosing polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immunol.* 55(10): 1453-1460.
- WABEROM, T. 1983. Biological effects of cell damaging toxins. In: *Staphylococci and Staphylococcal Infections*, vol. 2, Academic Press, London.
- WARD, P. J. 1976. Interactions between bovine polymorphonuclear leukocytes and staphylococci. *Int. Bact. Symp.* 5: 837-847.
- WASSERMAN, G. L., M. A. SAYER, D. M. CENTER, and K. F. AUSTEN. 1977. Cold urticaria: recognition and characterization of a neutrophil chemotactic factor which appears in serum during experimental cold challenge. *J. Clin. Invest.* 60: 189-196.
- WATSON, D. L. 1975. Enhancement of in vitro phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by polymorphonuclear leukocytes. *Res. Vet. Sci.* 19: 288-292.
- WATSON, D. L. 1976. The effect of cytophilic Ig G2 on phagocytosis by ovine polymorphonuclear leukocytes. *Immunol.* 11: 159-165.
- WATSON, D. L. 1988. Vaccination against experimental staphylococcal mastitis in ewes. *Res. Vet. Sci.* 58: 10-21.
- WATSON, D. L. and J. F. BURKE. 1984. Modern aspects of sheep mastitis. *Br. Vet. J.* 140(6): 529-534.
- WATSON, D. L. and D. G. LEE. 1978. Immunity to experimental staphylococcal mastitis - comparison of live and killed vaccines. *Aust. Vet. J.* 58: 374-378.
- WATNE, L. G. and G. A. DIAZ. 1988. Detection of a novel late sse in extracts of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium indicus-praeae*. *Infect. Immunol.* 56(4): 936-941.
- WEBER, K., and M. OSBORN. 1969. Proteins and sodium dodecyl sulfate: molecular weight determination on polyacrylamide gels and related procedures. *J. Biol. Chem.* 244: 4408.
- WEISS and HASSER. 1976a. Hypothesis tests for means. In: *Introductory statistics*.
- WEISS and HASSER. 1976b. Regression and correlation. In: *Introductory statistics*.
- WILKINSON, S. J. 1983. In: *Staphylococci and staphylococcal infections*, vol. 2. Eds. G. S. F. Besser & C. Adish. Academic Press, London.
- WILKINSON, S. J., P. K. PETERSON, and P. G. SMITH. 1979. In-vitro peptidoglycan and the antiphagocytic effect of the *Staphylococcus aureus* capsule: model for antiphagocytic effect of bacterial cell surface polymers. *Infect. Immunol.* 21: 902-908.
- WILLIAMS, M. R., and K. J. BUNCH. 1981. Variation among cows in the ability of their blood polymorphonuclear leukocytes to kill *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Res. Vet. Sci.* 31: 298-302.
- WILLIAMS, M. R., K. L. G. HIBBITT, T. R. FIELD, and K. J. BUNCH. 1984. Further studies on the variation among cows, bulls, and calves in the ability of their blood polymorphonuclear leukocytes to kill *Staphylococcus aureus*. *Br. Vet. J.* 140: 307-313.
- WILLIAMS, M. R., M. CRAVEN, T. R. FIELD, and K. J. BUNCH. 1985. The relationship between phagocytosis and intracellular killing of *Staphylococcus aureus* by bovine neutrophils. *Br. Vet. J.* 141(a): 362-371.
- WOLBENHUT, I., and T. G. HOWAN. 1990. Some observations on the effects of age of calves on the phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus* by polymorphonuclear leukocytes. *Br. Vet. J.* 146: 165-170.

URISHI, D. G. 1982. The neutrophil as a secretory organ of host defense. Ed. "Advances in host defense mechanisms". Vol. 1. Ed. Raven Press, New York.

VEJIAN, S., G. GALLO, and M. W. DOUGLASS. 1989. Kanamycin resistant *Staphylococcus aureus* mutant requiring none for growth. J. Bacteriol. **71**: 10-12.

YONEZAWA, O., S. OSAKI, S. ICHIJO, M. KIMURA, S. ARAKI, M. SUZUKI, and E. IMAGURA. 1989. Effects of dicyclohexylphenol on neutrophil functions in calves. Br. vet. J. **145**: 531-537.

YOUNG, S. and P. BEBICK. 1986. A comparison of the oxidative metabolism of neutrophils from a variety of species when stimulated by opsonized zymosan and f-Met-Leu-Phe. J. Comp. Pathol. **96**: 189-196.

ZIMMERMAN, R. J. 1976. Comparative zone electrophoresis of catalase of *Staphylococcus aureus* species isolated from mammalian skin. Canad. J. Microbiol. **22**(12): 1691-1698.