

Proteínas de fase aguda. Nuevas investigaciones en la detección precoz de mastitis

La mastitis es una de las enfermedades económicamente más importantes de la industria láctea. Como agente patógeno ambiental, *S. uberis* es una de las causas más frecuentes de mastitis bovina.

Amiloide sérico A [ASA] en la respuesta de fase aguda de vacas con mastitis experimentalmente inducida por *Streptococcus uberis*

T.K.A. Nguyen^{1,2}, N. Stockhofe-Zurwieden², M.J.M. Toussaint¹,

V. Vivanco¹, E. Guys¹ y T.A. Niewold³

¹-Departamento de Patología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Utrecht, Países Bajos

²-Grupo de Ciencias Animales, División de Enfermedades Infecciosas, Apartado 65, 8200 AB Lelystad, Países Bajos; Tel.: +31 3202 38 238; e-mail: kimahn.nguyen@wur.nl/o nkanh74@yahoo.com www.asg.wur.nl

³-Departamento de Desarrollo de Recursos Animales, Grupo de Ciencias Animales, Wageningen UR, Lelystad, Países Bajos

Introducción

La mastitis es una de las enfermedades económicamente más importantes de la industria láctea. Como agente patógeno ambiental, *S. uberis* es una de las causas más frecuentes de mastitis bovina. Numerosos estudios recientes describen el diagnóstico precoz de esta enfermedad basado en las proteínas de fase aguda. El amiloide sérico A (ASA), un indicador sensible para evaluar la actividad inflamatoria puede resultar muy útil en tal propósito. Hasta el momento no se ha esclarecido la respuesta del ASA en la mastitis causada por *S. uberis*.

Objetivo

1. Estudiar la cinética del ASA en leche y plasma en el marco de la mastitis inducida por *S. uberis* en vacas junto con un aumento del recuento de células somáticas (RCS)
2. Investigar si el ASA se produce localmente en la glándula mamaria
3. Investigar los niveles de ASA, como herramienta de diagnóstico de la mastitis en su fase temprana

Materiales y métodos

Ocho vacas en su primera lactación fueron inoculadas con 103 UFC de *S. uberis*. Se midió la temperatura, el recuento de células somáticas (RCS), el recuento leucocitario (RL) y el volumen de ordeñado. Se recogieron muestras de leche y suero de las vacas en la fase aguda de la mastitis antes y después de la infección cada día a las 10 AM y las 16 PM.

Se tomaron muestras de leche y plasma para determinar la concentración de ASA en tres momentos, según el RCS: T0 (antes de la infección), T1 (muestras tomadas antes del RCS más elevado observado) y T2 (muestras del momento en que el RCS alcanzó el nivel máximo). Todas las muestras se recogieron en la fase aguda de la enfermedad. Se efectuó un ensayo ELISA (ensayo inmunosorbente ligado a enzimas) suministrado por Tridelta Development Limited., Co. Wicklow, para valorar la concentración del ASA. La dilución de las muestras de leche y plasma fue 1:500. La técnica del punto isoeléctrico (IEF) se realizó con el fin de investigar los isotipos del ASA en leche y plasma, utilizando PhastGel Dry IEF de Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia. Después de llevar a cabo el IEF se realizó una transferencia western (Western Blot). El tejido de la ubre se tiñó mediante inmunotinción (ABC de Vecastain). Como anticuerpo primario se utilizó el anti-ASA biotinilado del kit de ELISA.

Resultados

Temperatura: De las 8 vacas, sólo las reses 6716 y 6720 presentaron fiebre después de la infección; las restantes manifestaron cierta fluctuación indicando que el síntoma clínico de ascenso de la temperatura corporal no se produce habitualmente en las vacas con mastitis después de la infección por *S. uberis*.

Recuento de células somáticas (RCS): Durante el período temprano de la infección, el RCS aumentó, alcanzando valores máximos en tres vacas durante la mañana del segundo día posterior a la inoculación, mientras que una res presentó el valor máximo de RCS durante la tarde de ese mismo día. El RCS fue máximo en las restantes tres vacas durante el tercer día posterior a la infección. Una res no manifestó ningún cambio esencial del RCS.

Concentración ASA: La concentración de ASA en plasma aumentó después de la infección, de forma paralela al aumento del RCS. El ASA de la leche también aumentó, pero no de forma muy elevada antes de alcanzar el valor máximo en T2. La concentración plasmática de ASA siempre fue superior al nivel de ASA en leche, en todos los puntos de muestreo.

IEF: después de la IEF se llevó a cabo la transferencia western. La transferencia permitió detectar la existencia de diferencias entre los isotipos presentes en la leche y el plasma. Las muestras de leche ofrecieron bandas alcalinas, mientras que las muestras plasmáticas mostraron tres bandas ácidas. Los isotipos de la leche aparecieron primero, en el punto de muestreo T1.

Tinción: El contenido alveolar mostró tinción positiva para ASA. Se manifestaron ciertos indicios de tinción positiva de la superficie luminal de las células epiteliales de la glándula mamaria.

Conclusiones

El ASA se formó tras las infecciones por *S. uberis* en el plasma y en la leche. El origen celular del ASA no pudo determinarse claramente mediante inmunohistología, pero el resultado del IEF corrobora la teoría de que el ASA puede sintetizarse en la glándula mamaria. El nivel de ASA en leche y plasma puede resultar útil para el diagnóstico de la mastitis en la fase aguda, porque aumenta claramente incluso si las vacas no presentan cambios aparentes, como fiebre, descenso del volumen de leche o en aquellos casos en los que el RCS no aumenta significativamente.

La comprensión de la regulación de la respuesta inmunológica durante las infecciones de la glándula mamaria bovina es importante para la optimización y la mejora de los futuros protocolos terapéuticos.

Evaluación de las proteínas de fase aguda y de la expresión tisular de citocinas en un modelo experimental de mastitis por *Staphylococcus aureus* en vacuno

Young, F.J., 1 Fitzpatrick, J.L., 1 Nolan, A.M., 2 Knight, C.H., 3 McComb, C. 1,4 y Eckersall, P.D1,4

1, 2. Departamentos de Estudios Veterinarios Clínicos¹ y Preclínicos²; Instituto de Medicina Comparada, Universidad de Glasgow, Facultad de Veterinaria, Escocia.

3. Instituto de Investigación Hannah, Ayr. Escocia

4. CIDS, Universidad de Glasgow.

Introducción

La comprensión de la regulación de la respuesta inmunológica durante las infecciones de la glándula mamaria bovina es importante para la optimización y la mejora de los futuros protocolos terapéuticos. En la actualidad, la mastitis es una de las enfermedades de mayor coste económico que afecta al ganado lechero de todo el mundo ya que repercute negativamente en el bienestar y la longevidad del animal y reduce la calidad y cantidad de la leche producida. Con anterioridad, se ha demostrado que la infección y la inflamación de la ubre provocan una respuesta sistémica de fase aguda; más recientemente, también se han identificado en la leche mastítica proteínas de la fase aguda (PFA), el amiloide sérico A mamario (ASAM) y la haptoglobina (HP).

Objetivo

El objetivo del este estudio fue utilizar un modelo experimental de mastitis por *S. aureus* en vacas Holstein—Frisonas para evaluar las PFA y las citocinas asociadas a la inflamación de diferentes tejidos de la ubre y del hígado. También se evaluaron las PFA en leche y en suero en diferentes momentos a lo largo del estudio.

Materiales y métodos

En este estudio, se incluyó un total de 20 animales Holstein-Frisonas. Durante un período de 60 días, se tomaron muestras seriadas de diez animales control (*S. aureus* negativos, animales sanos, sólo con infusión de solución de Ringer) y 10 animales inoculados (*S. aureus* positivos con inoculación de 5 x 10⁴ UFC en 10 ml de solución de Ringer). Todos los animales recibieron las infusiones en los cuarterones AD y PD en el día 0 y en los cuarterones PI y PD en el día 27 (ó 28). El aislamiento del ARN se optimizó para el tejido mamario y hepático utilizando una metodología basada en tiocianato de guanidina. Se diseñaron cebadores y sondas para la haptoglobina, el ASAM, la IL-6 y el TNF-alfa y se empleó la RCP-RT cuantitativa en tiempo real (Taqman®) para evaluar el tejido hepático y el tejido mamario de las vacas de control (AI) y de las vacas con infusión (PI y PD). La evaluación de las concentraciones de ASAM y de haptoglobina en leche y suero se realizó mediante ELISA en los 24 puntos de medición.

Resultados

Los resultados preliminares indican que la RCP-RT a tiempo real identificó diferencias en los niveles de PFA y en la expresión de las citocinas entre los controles y los animales inoculados. En general, los niveles de expresión de ASAM y haptoglobina fueron superiores en el hígado y el tejido mamario (PI, PD) de animales inoculados, en comparación con el hígado y el tejido mamario (AI) de los controles. Por otra parte, los niveles de expresión de IL-6 y TNF-alfa fueron superiores en el tejido hepático y mamario de los controles, que en el hígado y los tejidos mamaros de los animales inoculados.

Conclusiones

Se ha desarrollado un método exitoso (RCP-RT en tiempo real) para cuantificar las PFA localizadas y la expresión de las citocinas asociadas a la mastitis bovina y la inflamación. El análisis inicial indica una diferencia en los niveles de PFA y la expresión de las citocinas entre los controles (animales sanos) y los animales infectados con *S. aureus*. Estos resultados preliminares podrán ampliarse con ulteriores investigaciones y revisiones de los datos, inclusive las comparaciones con otros factores como los resultados de ELISA y el recuento de células somáticas.

Para ver los originales en inglés de las más interesantes comunicaciones y ampliar información, acceda a los siguientes documentos en formato PDF:

- [Serum amyloid A in acute phase response of cows with mastitis experimentally induced by Streptococcus Uberis](#)
- [Immunohistochemical investigation on serum amyloid A \(SAA\) in bovine tissues with inflammatory processes.](#)
- [Serum amyloid A \(SAA\) in blood of dairy cows around drying off and calving](#)
- [Are milk haptoglobin and serum amyloid A indicators of sub-clinical mastitis2](#)
- [The kinetics of serum amyloid A accumulation in milk from cows with experimentally induced E.coli mastitis](#)
- [Assessment of Acute Phase Protein and Cytokine Expression](#)
- [in Tissue in an Experimental model of Staphylococcus aureus Mastitis in Cattle](#)
- [Qualitative and quantitative Haptoglobin mRNA expression in the bovine mammary gland](#)