

**Universidad Cardenal Herrera CEU**

**Producción y Sanidad Animal, Salud Pública Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos**



Estudio de la respuesta inmune local y sistémica en conejas industriales tras la infección de la glándula mamaria por *Staphylococcus aureus* en casos naturales y experimentales

**TESIS DOCTORAL**

Presentada por:  
Dña. Irene Guerrero Giménez

Dirigida por:  
Dr. D. Juan Manuel Corpa Arenas  
Dr. D. David Viana Martín  
Dra. Dña. Laura Selva Martínez

**VALENCIA**  
2015



Este trabajo ha sido financiado por proyectos de investigación de varias entidades: Universidad CEU Cardenal Herrera (Banco Santander/CEU-UCH: Programa Copernicus, Generalitat Valenciana (ACOMP/2009/207 y ACOMP/2010/062) y la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (AGL2008-00273/GAN y AGL2011-30170-CO2-02). Igualmente la doctoranda ha disfrutado de una beca de investigación de la Universidad CEU Cardenal Herrera.



## RESUMEN

La estafilococia es una enfermedad ampliamente distribuida en cunicultura industrial que causa grandes pérdidas económicas, debido a la gran variedad de lesiones que genera. Entre estas lesiones, se incluye la mastitis supurativa crónica, que afecta principalmente a las hembras reproductoras. Sin embargo, todavía no se conoce con exactitud la patogénesis de esta lesión, por ello los objetivos de este trabajo fueron: (1) Caracterizar y relacionar las respuestas inmunes local y periférica, en casos naturales de mastitis estafilocócica (2) Establecer una relación entre las respuestas inmunes local y periférica, en casos naturales de mastitis estafilocócica, con las cepas de *S. aureus* que las provocan (3) Desarrollar un protocolo de infección experimental en glándula mamaria a bajas dosis infectivas (4) Describir las lesiones provocadas por *S. aureus* en glándula mamaria tras una infección experimental (5) Caracterizar y relacionar las respuestas inmunes local y periférica, en casos experimentales de mastitis estafilocócica y (6) Comparar las respuestas inmunes (local y periférica) así como las lesiones desarrolladas por conejas infectadas de forma natural y experimental.

Para conseguir tales objetivos, se realizó un estudio de citometría de flujo de la sangre de 204 conejas con mastitis estafilocócica crónica con el fin de poder ver la respuesta inmune a nivel periférico, estudiándose las poblaciones de linfocitos B,T(CD5<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>,CD8<sup>+</sup> y CD25<sup>+</sup>), macrófagos y granulocitos. Para poder estudiar la respuesta inmune local, se realizaron estudios de inmunohistoquímica en 89 mamas de las 204 glándulas mamarias afectadas. Las mastitis observadas en los 204 casos se clasificaron según el espectro lesional que mostraron siguiendo los criterios establecidos por Viana et al (2011). Además, se realizaron un estudio microbiológico para saber la cepa de la bacteria que aparecía en cada lesión. También se realizó una infección experimental, a bajas dosis infectivas, para poder estudiar la respuesta inmune de la lesión en las primeras fases infectivas dependiendo de la cepa inoculada.

Los resultados estadísticos obtenidos, revelaron que existían diferencias en el número de las células estudiadas (monocitos, granulocitos y linfocitos) dependiendo del tipo de lesión histológica que mostraban las mastitis a nivel tanto periférico como local. La respuesta inmune periférica también varió dependiendo del tipo de cepa que causaba la mastitis, tanto en mastitis naturales como experimentales. Además se observó la existencia de una conexión entre la respuesta inmune local y periférica, sobre todo entre la población de monocitos de la sangre y granulocitos del tejido.

Tras evaluar los resultados se pudo concluir que: (1) Las poblaciones celulares estudiadas en las mastitis naturales, variaron de forma cuantitativa en función del patrón histomorfológico que presentaban, siendo los linfocitos T de la sangre y los macrófagos del tejido, las células más numerosas en las mastitis supurativas con

patrón lobulillar. En cambio, los valores de linfocitos T, tanto a nivel sistémico como local, fueron minoritarios para el grupo de los abscesos compactos. El tipo de fluctuación en el recuento de linfocitos T, que aparece entre las mastitis supurativas con patrón lobulillar y el grupo de los abscesos, hace pensar que forman parte de un mismo proceso lesional. (2) Existe una correlación entre la respuesta inmune local y periférica. (3) El aislado de las cepas bacterianas reveló que en nuestro estudio la cepa ST121 de *S. aureus* fue la más prevalente seguido de la cepa ST96 con un 88,7% frente a un 4,9%, respectivamente. (4) Las dos cepas más prevalentes producen en condiciones de infección natural, una respuesta inmune diferente, de modo que las cepas pertenecientes al linaje clonal ST96 mostraban en sangre más del doble de linfocitos B ( $P < 0,01$ ), T ( $P < 0,001$ ), CD4+ ( $P < 0,001$ ), CD8+ ( $P < 0,01$ ) y CD25+ ( $P < 0,10$ ) y un 35% menos de granulocitos ( $P < 0,01$ ) que los animales infectados con cepas pertenecientes al linaje clonal ST121. (5) La realización de un protocolo experimental de infección intramamaria, a bajas dosis, con cepas cunícolas, es capaz de reproducir la enfermedad de forma muy similar a lo ocurrido en condiciones naturales, tanto que las características microscópicas observadas experimentalmente, pueden ser clasificadas siguiendo los patrones utilizados para agrupar las mastitis naturales. (6) La cepa ST121 en condiciones experimentales, es capaz de reproducir la enfermedad, generando lesiones tanto macroscópicas como microscópica, muy semejantes a las vistas en la naturaleza, observándose características microscópicas típicas de todos los patrones lesionales observados en las mastitis naturales a excepción de las características observadas en los abscesos no encapsulados y compactos, mientras que la cepa ST96, en condiciones experimentales, es incapaz de generar lesión macroscópica. (7) La respuesta inmune en las mastitis experimentales también varía en función de la cepa inoculada, tal como ocurre en las mastitis naturales. Los animales inoculados con la cepa ST121 tienen menos linfocitos que los animales inoculados con la cepa ST96 pero más granulocitos, al final del experimento.





# ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. Origen y evolución de la cunicultura .....	3
1.2. Principales enfermedades infecciosas del conejo.....	4
1.2.1. Principales enfermedades infecciosas digestivas.....	4
1.2.2. Principales enfermedades infecciosas respiratorias.....	8
1.3. Estafilococias .....	11
1.3.1. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	11
1.3.2. <i>Staphylococcus aureus</i> en cunicultura .....	13
1.3.3. Mastitis estafilocócica en el conejo .....	16
1.3.3.1. La glándula mamaria en el conejo .....	18
1.4. El sistema inmunitario .....	21
1.4.1. El sistema inmunitario innato .....	21
1.4.1.1. Neutrófilos.....	22
1.4.1.2. Monocitos y macrófagos .....	23
1.4.2. El sistema inmunitario adaptativo.....	24
1.4.2.1. Linfocitos B .....	28
1.4.2.2. Linfocitos T .....	29
1.4.3. El sistema inmune del conejo.....	31
1.4.4. Respuesta del sistema inmunitario frente a diferentes desafíos.....	32
1.4.4.1. Desafío térmico.....	33
1.4.4.2. Desafío productivo .....	34
1.4.4.3. Desafío infeccioso.....	35
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	37
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	41
3.1. Mastitis naturales .....	43
3.1.1. Animales y granjas.....	43
3.1.2. Estudios mediante citometría de flujo .....	43

3.1.3. Estudios histopatológicos.....	44
3.1.4. Estudios inmunohistoquímicos.....	46
3.1.5. Caracterización de las cepas de <i>S. aureus</i> .....	48
3.1.6. Análisis estadístico .....	50
3.2. Mastitis experimentales .....	51
3.2.1 Animales.....	51
3.2.2. Cepas y dosis infectivas utilizadas.....	51
3.2.3. Preparación del inóculo.....	52
3.2.4. Protocolo de Infección .....	52
3.2.5. Estudio mediante citometría de flujo .....	53
3.2.6. Estudios histopatológicos.....	53
3.2.7. Estudios inmunohistoquímicos.....	53
3.2.8. Estudios microbiológicos.....	53
3.2.9. Análisis estadístico .....	53
3.3. Análisis mediante PCR de factores de virulencia bacterianos .....	54
3.4. Análisis mediante Southern blot de factores de virulencia bacterianos.....	56
<b>IV. RESULTADOS</b> .....	<b>59</b>
4.1. Mastitis naturales .....	61
4.1.1. Caracterización y clasificación histopatológica de mastitis naturales producidas por <i>S. aureus</i> .....	61
4.1.1.1. Mastitis tipo absceso .....	62
4.1.1.2. Mastitis supurativa con patrón lobulillar .....	65
4.1.1.3. Mastitis tipo celulitis.....	65
4.1.1.4. Mastitis tipo mixta .....	67
4.1.1.5. Otros hallazgos histopatológicos .....	67
4.1.2. Caracterización molecular de cepas de <i>S. aureus</i> aisladas de mastitis naturales .....	68
4.1.3. Estudio de la respuesta inmune local en casos naturales de mastitis estafilocócica.....	71
4.1.4. Estudio de la respuesta inmuneperiférica en casos naturales de mastitis estafilocócica y su relación con la cepa de <i>S. aureus</i> .....	78

4.1.5. Correlación entre la respuesta inmune local y la respuesta inmune periférica en casos naturales de mastitis estafilocócicas. ....	79
4.2. Mastitis experimentales .....	82
4.2.1. Selección del inóculo bacteriano.....	82
4.2.2. Estudio de la evolución de la infección.....	83
4.2.3. Estudio microscópico .....	86
4.2.4. Estudio de la respuesta inmune periférica de las mastitis experimentales.....	92
4.2.5. Estudio de la respuesta inmune local en casos experimentales de mastitis estafilocócica.....	100
4.2.6. Relación entre las respuestas inmunes periférica y local en el estudio experimental .....	101
4.3. Comparación mastitis naturales versus experimentales en función de la cepa. ....	102
4.4. Distribución de genes de virulencia entre aislados de <i>S. aureus</i> .....	103
<b>V. DISCUSIÓN</b> .....	109
5.1. Descripción histopatológica y caracterización de las respuestas inmunes local y periférica .....	111
5.2. Relación entre las respuestas inmunes sistémica y local .....	118
5.3. Relación entre la respuesta inmune y la cepa de <i>S. aureus</i> infectante .....	119
5.4. Comparación mastitis naturales versus experimentales en función de la cepa infectante.....	125
5.5. Creación de un protocolo experimental en glándula mamaria a bajas dosis infectivas.....	126
<b>VI. CONCLUSIONES</b> .....	131
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	135



## LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
CfB	Clumping factor B
CD	Antígeno de superficie de diferenciación leucocitaria (cluster of differentiation)
LPS	Lipopolisacárido
H&E	Hematoxilina y eosina
min	Minuto
ml	Mililitro
MLST	Tipado mediante secuenciación multilocus (Multilocus Sequence Typing)
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la metilcilina
MSCRAMM	Componentes de la superficie microbianos que reconocen moléculas de la matriz adhesivas (Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules)
mM	Milimolar
ng	Nanogramo
nM	Nanomolar
pb	Pares de bases
RAPD	Amplificación aleatoria del ADN polimórfico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RFLP	Análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (Restriction Fragment Length Polymorphism)
PBS	Tampón fosfato salino (Phosphate Buffered Saline)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFGE	Electroforesis en gel pulsado
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
ST	Secuencia tipo (sequence type)
TBST	Tampón Tris salino con Tween 20 (Tris buffered saline with Tween 20)
TSA	Medio tripticasa soja agar
TSB	Caldo tripticasa soja

UFC Unidades formadoras de colonia

$\mu$ l Microlitro

$\mu$ g Microgramo

$\mu$ M Micromolar

# **I. INTRODUCCIÓN**



## **1.1. Origen y evolución de la cunicultura**

A principios de siglo se descubrió en Mongolia el esqueleto fosilizado de una criatura similar al conejo (*Gomphos elkema*) que vivió hace 55 millones de años (Meng et al., 2004). Este espécimen, aunque conserva una dentadura y mandíbula primitivas, comparte una serie de características craneoesqueléticas con los conejos y liebres actuales. De hecho, los análisis filogenéticos confirman a *Gomphos elkema* como el progenitor de los lagomorfos (Asher et al., 2005). Es por ello que tanto los conejos europeos silvestres como los domésticos pertenecen a la misma especie, *Oryctolagus cuniculus*, único representante del género *Oryctolagus*.

Las referencias más antiguas sobre la especie cunícola en España se remontan a 1000 años a.C., en la época de los fenicios (Rosell et al., 2000). Parece ser que desde la Península Ibérica se diseminó al sur-oeste de Francia y norte de África (Mitchell-Jones et al., 1999).

Las primeras noticias sobre la domesticación del conejo datan de la época del Imperio Romano. Estos animales eran especialmente apreciados por los ejércitos romanos ya que les proveían de carne y eran fáciles de transportar durante sus campañas militares. De hecho, Plinio el Vecchio escribió cómo esta especie se utilizaba para la preparación de un manjar exquisito a base de fetos de conejos, llamado *laurices* (Cerolini et al., 2008).

No fue hasta la Edad Media cuando se originó la cunicultura tradicional. Ésta tuvo lugar principalmente en los monasterios, donde se establecieron explotaciones con el fin de obtener carne, pelo y piel. Desde España el conejo pasó a América a través de los conquistadores (Echeverry, 2004). Sin embargo, la cría del conejo no arraigó verdaderamente en Europa hasta el siglo XVI. Ya en el siglo XIX, la cría de conejos se convirtió en una actividad practicada por la mayor parte de los europeos y se comenzó a practicar la selección de razas. En este mismo siglo, después de la abolición del privilegio señorial y de los cotos, la cría del conejo en conejeras se desarrolló en toda Europa occidental, tanto en el medio rural como por los obreros de las ciudades. Con la Segunda Guerra Mundial, la cría de conejos se extendió por todo el continente europeo, así como en Japón, proporcionando proteína de origen animal a la población, dada la ausencia de carne procedente de otras especies animales (Lebas et al., 1997).

La cunicultura industrial inició su desarrollo en Europa a finales de los años setenta del siglo XX; aunque fue en la década de los ochenta cuando surgieron toda una serie de técnicas orientadas a mejorar la producción, entre ellos los primeros piensos concentrados. A partir de los noventa y hasta la fecha se ha desarrollado una cunicultura industrial especializada, basada en el empleo de nuevas líneas genéticas de conejos, la

implantación de la inseminación artificial y una mayor profesionalización del sector, con el objetivo de ser más competitiva. En la actualidad, la producción de carne de conejo es la actividad más destacada de este subsector ganadero. Otras prácticas, cuantitativamente menores, incluyen la cría de conejos destinados a la experimentación (por ejemplo, en la industria farmacéutica) la producción de pelo (conejos Angora), de pieles (conejos Rex y Orylag), además de los conejos, como mascotas domésticas (Rosell et al., 2000).

## **1.2. Principales enfermedades infecciosas del conejo**

Como se ha comentado anteriormente, los sistemas de producción de carne de conejo evolucionaron desde sistemas tradicionales a sistemas más intensivos, incrementándose la densidad de conejos en las granjas. La mayor concentración de animales confiere un papel protagonista a las enfermedades infecciosas, puesto que los agentes patógenos tienen una mayor posibilidad de diseminarse entre animales y explotaciones (Hermans et al., 2003).

Las enfermedades digestivas y respiratorias, junto a los desórdenes reproductivos, son la principal causa de morbilidad y mortalidad en las explotaciones. A continuación se realizará una breve revisión de las principales enfermedades digestivas y respiratorias que afectan a la especie cunícola, para posteriormente hacer especial hincapié en las estafilococias, objeto de estudio de esta tesis doctoral.

### **1.2.1. Principales enfermedades infecciosas digestivas**

Las patologías digestivas son la principal causa de morbilidad (aumentando el índice de conversión y disminuyendo la ganancia media diaria) y mortalidad (sobre todo durante el periodo de cebo) en las explotaciones cunícolas. En un estudio realizado por Rosell et al, en el año 2002, se comprobó que el 61% de las visitas veterinarias realizadas se debían a alteraciones digestivas, siendo los animales con mayor riesgo los comprendidos entre los 40 y 50 días de edad. El 39% de las visitas tenían como motivo la Enteropatía Epizootica Cunícola y el 22%, otros motivos que cursaban con enteritis-diarrea. Los principales agentes patógenos relacionados con enfermedades digestivas en conejos fueron los parásitos (principalmente coccidios) y algunas bacterias (principalmente *Escherichia coli* y *Clostridium* spp.) (Rosell et al., 2003).

#### **Enteropatía epizootica cunícola**

La Enteropatía epizootica cunícola, también conocida como Enteropatía mucoide, es un síndrome gastroentérico de curso agudo o sobreagudo caracterizado por un cuadro de disbiosis, que parece afectar tanto a bacterias Gram-positivas como Gram-negativas de

la microbiota intestinal. Este síndrome afecta principalmente a conejos de entre 3 a 10 semanas de edad. Los problemas ocurren normalmente después del destete pero también puede observarse en conejos de más edad, adultos y conejos lactantes, justo antes del destete (Licois et al., 2005). Los signos clínicos más evidentes son una disminución en la ingesta de pienso y agua diaria, deshidratación, pérdida de peso, borborigmos (cuando se mueve al animal suavemente), abultamiento abdominal y deposiciones con moco (Badiola et al., 2005). En la necropsia se observa, sobre todo, una dilatación de la parte craneal del tracto digestivo, incluyendo el estómago, sin un proceso inflamatorio evidente, con presencia de abundante contenido líquido así como compactación del contenido cecal (Marlier et al., 2010) (**Figura 1**).

Esta enfermedad causa graves perjuicios económicos y, sin la intervención de antimicrobianos, muestra una tasa de morbilidad cercana al 100% y una tasa de mortalidad que oscila entre el 30 y el 70% (Badiola et al., 2005; Licois et al., 2005).



**Figura 1:** Dilatación de estómago e intestino delgado y compactación del contenido cecal. Fuente propia.

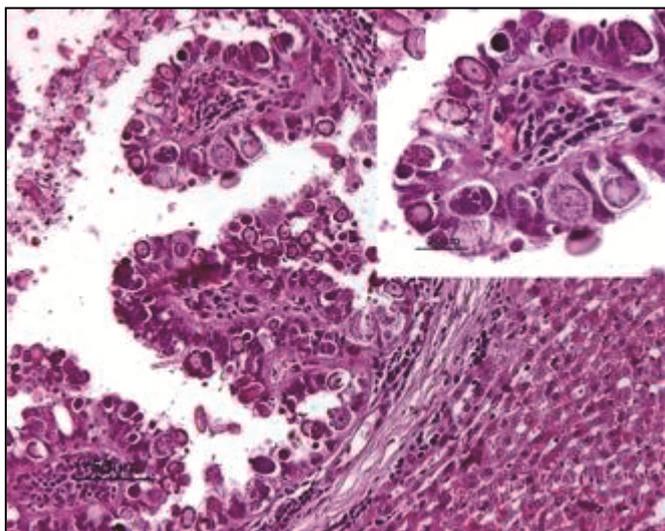
### ***Eimeria* spp.**

Los protozoos del género *Eimeria* son los productores de la coccidiosis. Esta enfermedad se inicia con la ingestión de un ooquiste esporulado, normalmente por conejos jóvenes, en los que se desarrolla el proceso, siendo los animales adultos portadores asintomáticos diseminadores de la enfermedad (Peeters et al., 1984). Las especies que causan coccidiosis en conejos son: *E. magna*, *E. media*, *E. irresidua*, *E. perforans*, *E. coecicola*, *E. piriformis*, *E. exigua*, *E. vejnovsky*, *E. stiedai*, *E. flavescens* y *E. intestinalis*, estas dos últimas son especialmente patógenas (Coudert et al., 1995). La enfermedad puede presentarse de dos formas: hepática (*E. stiedai*) e intestinal (resto de especies) (Bhat et

al., 1996). La mayoría de especies intestinales se desarrollan en el intestino delgado. Sólo *E. flavescens* y *E. piriformis* completan su desarrollo en ciego y colon respectivamente.

Los signos clínicos de la enfermedad incluyen diarrea, deshidratación, aumento del índice de conversión con disminución del consumo de agua y pienso, retraso del crecimiento y mortalidad. Dependiendo de la especie de coccidio, la diarrea aparece entre el 4º y 6º día de infección, produciéndose el pico a los 8-10 días y desapareciendo 3-4 días después. La diarrea es el primer signo clínico visible, junto con la deshidratación cutánea, manifestada por la presencia de pliegues en la piel. La mortalidad tiene lugar durante 3 o 4 días, comenzando de forma abrupta el 9º día de infección (Bhat y Jithendran, 1995; Bhat et al., 1996).

Las lesiones no suelen ser características y desaparecen rápidamente al 12º o 13º día. *E. intestinalis* es el que mayores lesiones macroscópicas produce. El íleon aparece pálido, con manchas blanquecinas y en algunos casos hematomas. Aparece una segmentación



muy clara, sobre todo cerca del ciego. Desde el punto de vista histopatológico, lo más característico es la observación de macrogametocitos y microgametocitos en el interior de enterocitos. La coccidiosis hepática se caracteriza por una colangitis proliferativa y una fibrosis periportal, con un infiltrado inflamatorio mixto (Figura 2)

**Figura2:** Coccidiosis hepática. Hígado. H&E. Fuente propia.

### ***Escherichia coli***

Esta bacteria Gram-negativa produce la enfermedad intestinal conocida como colibacilosis. Se caracteriza por no producir ninguna toxina termoestable o termolábil, ni ser enteroinvasiva (Agnoleti et al., 2004; Bohez et al., 2004; Camarda et al., 2004). En el conejo coloniza, principalmente, el íleon distal y el ciego. Afecta sobre todo a conejos neonatos de entre 7 y 21 días o algo mayores, de entre 4 y 5 semanas. Los conejos adultos rara vez se ven afectados (Licois, 2004).

Cualquier alteración que produzca un desequilibrio en el pH cecal (alteraciones en la dieta; otras enfermedades, como coccidiosis o la enterotoxemia iota; o el tratamiento con

ciertos antibióticos, como la penicilina) produce una mayor proliferación de *E. coli* (Milhaud et al., 1976; Morisse, 1978; Escoula et al., 1981).

Los signos clínicos y las lesiones van a depender del grado de patogenicidad de la cepa infectiva. Por tanto, podremos observar dos cursos del proceso entérico (Escoula et al., 1981).

#### *Cepas altamente patógenas:*

Cursan con una severa pérdida de peso, abundante diarrea líquida, deshidratación y muerte de hasta el 50% o más de los gazapos, entre los 5 y 14 días de vida. En lactantes puede afectarse el epitelio de todo el tracto digestivo, con un contenido cecal acuoso y amarillento. En animales destetados se suele afectar la parte más distal del intestino delgado y todo el intestino grueso, con edema del ciego, ulceración del epitelio, contenido cecal fétido, de color marrón y acuoso. Suelen aparecer vírices en la serosa y puede haber presencia de sangre en las heces. Hay una marcada tumefacción de los nódulos linfáticos mesentéricos.

#### *Cepas moderadamente patógenas:*

Se acompaña de diarrea suave, sin deshidratación, y presencia de líquido en intestino. El retraso en el crecimiento es transitorio y no hay mortalidad.

#### ***Clostridium spp.***

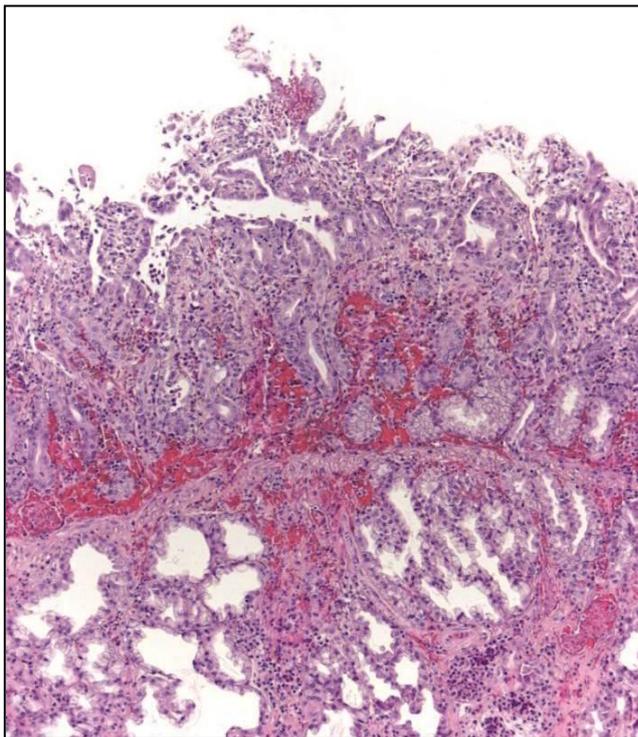
La enterotoxemia es la clostridiosis más importante en conejos y está producida por *Clostridium spiroforme* y/o *Clostridium perfringens* tipo E, junto con las toxinas que estos producen. Estos microorganismos se caracterizan por ser bacilos Gram-positivos, anaerobios y esporulados. *Clostridium spiroforme* es el principal desencadenante de enterotoxemia en conejos, conocida como enterotoxemia iota.

La flora normal del intestino actúa como barrera protectora. Cualquier alteración de esta barrera permite la colonización y proliferación de los clostridios y la posterior producción de toxinas: cambios en la dieta, destete, terapia antibiótica, infecciones concurrentes (Wilber, 1999).

La mortalidad ocurre principalmente en animales de entre 5 y 8 semanas. El desarrollo de la enfermedad es rápido, los animales presentan diarrea y pueden aparecer muertos a las 24-48 horas (Patton et al., 1986).

El intestino aparece dilatado y con un contenido líquido de coloración amarillenta. La pared intestinal puede aparecer congestiva en algunos casos. El contenido del ciego también es líquido, en los casos más graves con contenido sanguinolento. La pared del ciego se muestra engrosada, con congestión y petequias en algunos casos. Los nódulos

linfáticos mesentéricos suelen estar aumentados de tamaño. También puede observarse alteración de los riñones, que aparecen más pálidos.



Microscópicamente las lesiones más evidentes se detectan en el íleon distal, ciego y colon proximal. Puede aparecer necrosis y descamación de células epiteliales y las vellosidades intestinales se acortan (**Figura 3**). La luz contiene un fluido con abundantes restos celulares, sangre y fibrina. También es posible observar edema en la lámina propia y submucosa del ciego, con infiltrados inflamatorios ricos en heterófilos (McDonel y Duncan, 1975; Perkins et al., 1995).

**Figura 3:** Descamación del epitelio, congestión y destrucción de las vellosidades compatible con una infección por *Clostridium spp.* Duodeno. H&E. Fuente propia.

### 1.2.2. Principales enfermedades infecciosas respiratorias

Los trastornos respiratorios generan graves pérdidas económicas debido a su influencia en el rendimiento de todos los eslabones de la cadena productiva, desde los gazapos hasta los adultos, y por el elevado coste que su control exige (Villa et al., 2001). En España y Portugal, las alteraciones del tracto respiratorio suponen la principal causa de muerte en conejas adultas (Sanchez et al., 2012). En general, los agentes etiológicos principalmente involucrados suelen ser bacterianos (*Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Staphylococcus aureus*), aunque no es infrecuente diagnosticar enfermedades víricas (mixomatosis y enfermedad vírica hemorrágica, tanto en su variedad clásica como nueva), parasitarias o fúngicas.

#### ***Pasteurella multocida***

Es una bacteria Gram-negativa, inmóvil, cocobacilar, anaerobia facultativa, que mide 0,2 x 2  $\mu\text{m}$ . No presenta esporas ni flagelos. La principal vía de entrada es la respiratoria y puede ser tanto de forma directa (a través de aerosoles o por contacto), e indirecta (a través de los fómites), siendo la primera la más frecuente (Holmes et al., 1983).

La pasteurelosis tiene su origen en la colonización de las vías respiratorias altas. Algunas cepas pueden invadir otros órganos, dando lugar a diversos signos clínicos (Coudert et

al., 1986), como conjuntivitis, otitis, neumonía, piómetra, orquitis y abscesos subcutáneos. En el caso de que haya colonización nasal por parte de cepas productoras de toxinas puede producirse un cuadro más grave, con alteración de los cornetes nasales, conocido como rinitis atrófica (DiGiacomo et al., 1989).

Macroscópicamente, se observa una bronconeumonía catarral aguda, caracterizada por la presencia de focos de consolidación de color rojo a gris en los lóbulos craneoventrales, con o sin hemorragia. Si el proceso se cronifica, puede dar lugar a una consolidación generalizada, desarrollo de abscesos, pleuritis y pericarditis fibrinosa o supurativa (Percy y Barthold, 2001).

### ***Bordetella bronchiseptica***

Es una bacteria Gram-negativa,  $\alpha$ -hemolítica, no fermentadora, de pequeño tamaño y morfología cocobacilar. Posee flagelos, fimbrias y adhesinas que le permiten adherirse al epitelio ciliado de las vías respiratorias altas dañándolo, pues induce ciliostasis además de perjudicar la función macrófaga, con el consecuente impedimento de limpieza de las vías respiratorias altas y la predisposición a que se produzcan infecciones por *P. multocida* (Bemis y Wilson, 1985). Afecta a animales jóvenes entre las 4 y 12 semanas de vida lo que le hace ser el microorganismo más común en conejos jóvenes, mientras que *P. multocida* lo es en adultos (Lu et al., 1978; DiGiacomo et al., 1983; Duclos et al., 1986; Nakagawa et al., 1986).

La infección por esta bacteria clínicamente provoca estornudos y un exudado nasal seroso o mucopurulento. La lesión más característica es un eritema de la mucosa nasal con adherencia del exudado nasal a la misma. Histológicamente se desarrolla una neumonía intersticial crónica, bronquiolitis crónica y acumulación perivascular y peribronquiolar de linfocitos, células plasmáticas y macrófagos (Deeb y DiGiacomo, 2000).

### **Mixomatosis**

Esta enfermedad está producida por un virus ADN perteneciente a la familia *Poxviridae*, género *Leporipoxvirus* (Krogstad et al., 2005). Este virus es específico de conejos silvestres y domésticos europeos, afectando ocasionalmente a liebres. Existe una mayor incidencia en hembras y gazapos alrededor de los 20 días de edad. La transmisión se produce por contacto directo (vía nasal, oral o conjuntival) o vía indirecta (a través de polvo, aerosoles, personas o aves). El virus, además de las alteraciones clásicas, cutáneas y sistémicas, es capaz de afectar a las vías respiratorias. En algunos casos la afección de vías respiratorias puede ser la dominante, como ocurre en la mixomatosis atípica o amixomatósica. Un efecto de la forma crónica de la mixomatosis es el desarrollo

de infecciones bacterianas secundarias. Se puede observar con cierta frecuencia la aparición de neumonía por *P. multocida* o *S. aureus*, asociada a disnea (Patton y Holmes, 1977).

### **Enfermedad vírica hemorrágica del conejo**

La enfermedad vírica hemorrágica es otra enfermedad vírica con efectos respiratorios aunque, como ocurre con la mixomatosis, el cuadro respiratorio tampoco es el habitual. La enfermedad está relacionada con otro proceso conocido como síndrome de la fiebre parda europea. Ambas enfermedades están producidas por un virus ARN perteneciente a la familia *Caliciviridae*, género *Lagovirus* (Capucci et al., 1991; Ohlinger et al., 1993; Percy y Barthold, 2001). La enfermedad hemorrágica típica afecta exclusivamente a conejos mayores de 2 meses de edad. Tiene como reservorio natural el conejo silvestre y presenta una tasa de morbilidad y mortalidad elevada, entre un 80-90% (Chasey, 1997). La prevalencia global se estima en un 5% de la población. El periodo de incubación de la enfermedad es de tan sólo uno o dos días y la muerte puede sobrevenir en dos o tres días. El virus se excreta por diferentes vías: saliva, heces (donde permanece infectante durante 4 semanas), orina, descargas nasales, etc., y la transmisión puede ocurrir vía directa (fecal-oral, aerógena o conjuntival) o indirecta (contaminación de comida y agua con heces o a través de utensilios) (Percy y Barthold, 2001). Diversos estudios apuntan a las criptas, los hepatocitos y los linfocitos esplénicos como primer sitio de replicación del virus (Gregg et al., 1991). El virus provoca daño endotelial, desencadenando coagulación intravascular diseminada y hemorragias, lo cual conduce a un fallo orgánico múltiple con edema pulmonar, necrosis hepática, alteraciones renales y necrosis adreno-cortical (Chasey, 1997). La mayor concentración de virus se encuentra en el hígado (Gregg et al., 1991, Abrantes et al., 2012).

Los signos clínicos no son específicos de la enfermedad. En la forma aguda de la enfermedad pueden presentarse como signos respiratorios, disnea y epistaxis (Chasey, 1995). Macroscópicamente, se puede observar contenido espumoso en tráquea y bronquios, acompañado de congestión y hemorragias en su mucosa. En el examen histopatológico de hígado y bazo se observa inflamación aguda y signos de apoptosis como consecuencia de la replicación del virus (Campagnolo et al., 2003).

En la actualidad, se ha descubierto una nueva variante del virus semejante en un 80% a la cepa salvaje que cursa con un aumento en la virulencia de la enfermedad afectando a individuos más jóvenes (Calvete et al., 2012) y provocando una disminución del efecto de la vacunación (Comenge y Mora, 2011).

### **1.3. Estafilococias**

Las estafilococias engloban a las enfermedades causadas por bacterias del género *Staphylococcus*. Los estafilococos son bacterias Gram-positivas que pertenecen a la familia *Micrococcaceae*, tienen forma redondeada y se asocian formando agrupaciones irregulares o en forma de racimos de uvas (Biberstein, 1994; Quinn, 1999). Los estafilococos tienen un diámetro de 0,5-1,5 µm. No forman esporas y carecen de flagelo. Son bacterias catalasa positivas, anaerobias facultativas y utilizan los glúcidos tanto por oxidación como por fermentación. Soportan la desecación (sobre todo en los exudados) durante semanas, el calentamiento a temperaturas de incluso 60°C durante 30 minutos, las fluctuaciones de pH entre los valores de 4 y 9,5, y las concentraciones de sal de 7,5% (Biberstein, 1994).

La coagulasa, producida por algunas especies de este género, provoca la coagulación del plasma *in vitro* y permite la distinción entre *Staphylococcus* coagulasa positivos y negativos. Entre los *Staphylococcus* coagulasa positivos se encuentran diferentes especies patógenas: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* y algunas cepas de *Staphylococcus hyicus* (Biberstein, 1994). Los dos *Staphylococcus* coagulasa negativos más comúnmente aislados, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus saprophyticus*, actúan como comensales o se encuentran en el medio ambiente, considerándose hasta hace poco tiempo como no patógenos. Sin embargo, en la última década el número de infecciones por *S. epidermidis* se ha incrementado alarmantemente debido a que junto con *S. aureus* son las especies bacterianas más frecuentemente asociadas a infecciones en implantes médicos (Costerton et al., 1999). Por su parte, *S. saprophyticus* es un patógeno habitualmente responsable de infecciones urinarias, sobre todo en mujeres jóvenes (Ishihara et al., 2001). La especie de *Staphylococcus* con mayor importancia clínica, dada su implicación en diversas patologías infecciosas, es *S. aureus* (Pascual y de Cueto, 2009).

#### **1.3.1. *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, es capaz de persistir y multiplicarse en una gran variedad de entornos y causar un amplio espectro de enfermedades, tanto en los seres humanos como en los animales (Cucarella et al., 2004), debido a la amplia batería de factores de patogenicidad que posee (Dinges et al., 2000). Puede producir más de 30 factores de virulencia que le permiten sobrevivir en condiciones extremas dentro del hospedador y establecer y mantener la infección (Haveri et al., 2008).

Esta bacteria está considerada como hospedador habitual de la piel (Kloos, 1980) y mucosas, principalmente en la mucosa de la cavidad nasal (Peacock et al., 2001; Wertheim et al., 2005). Al colonizar la mucosa nasal del hombre y de animales sanos genera portadores asintomáticos que facilitan así la diseminación bacteriana (Hermans et al., 2000). La tasa de portadores nasales en humanos se estima alrededor del 20 al 30% y cerca del 60% para portadores intermitentes (Kluytsman et al., 1997). De la mucosa nasal puede pasar a cualquier órgano del cuerpo, como las vías respiratorias altas, la piel, las glándulas mamarias, los aparatos genitourinario o intestinal. La existencia de portadores de *S. aureus* a nivel de la piel, facilita que pueda ser diseminada a los alimentos durante su manipulación (Fueyo et al., 2005), al igual que a través del estornudo o la tos, si los manipuladores son portadores nasales (Le Loir et al., 2003).

Desde el punto de vista sanitario está considerado como una de las especies bacterianas de mayor importancia, tanto para el hombre como para los animales (Kloos, 1980). En medicina humana, provoca un amplio espectro de enfermedades, desde infecciones leves de la piel hasta endocarditis, shock tóxico y neumonía necrotizante (Tenover y Gayne, 2000). Es el causante más importante de infecciones nosocomiales (Jones, 2003). Un grave problema, que ha surgido en los últimos años, es la aparición de cepas con nuevas variantes virulentas y la adquisición de resistencia a antibióticos, destacando los aislados resistentes a metilina y otros antibióticos  $\beta$ -lactámicos (Boyce et al., 2005; Sabat et al., 2006; DeLeo et al., 2009; Otter et al., 2010) y a la vancomicina (Appelbaum, 2006). Existen numerosas publicaciones que ponen de manifiesto un creciente aumento de infecciones de piel y tejidos blandos debidas a cepas de *S. aureus* resistentes a la metilina, considerándose una enfermedad emergente (DeLeo, 2010).

*Staphylococcus aureus* también es uno de los mayores patógenos en medicina veterinaria. Afecta a diversas especies animales y provoca graves pérdidas económicas en la industria ganadera de todo el mundo (Mork et al., 2005). Además puede aparecer en la mayoría de los productos de origen animal y suponer un riesgo de zoonosis (Kloos, 1980).

En los animales, *S. aureus* produce principalmente mastitis en rumiantes (Bergonier et al., 2003; Barkema et al., 2006), osteítis en pollos (McNamee et al., 1998) y abscesos, pododermatitis y mastitis en conejos (Hermans et al., 2003; Segura et al., 2007; Corpa et al., 2009).

En el sector bovino las mastitis pueden ser producidas por más de 137 especies bacterianas siendo *S. aureus* el agente causal más importante y frecuente (Lammers et al., 2000; Tollersrud et al., 2000; Fitzgerald et al., 2001; Dos Santos et al., 2002), transmitiéndose entre los animales durante el ordeño (Tenhagen et al., 2006). Las

mastitis producidas por *S. aureus* suelen ser de tipo subclínico, lo que conlleva reducción en la producción de la leche durante un largo período de tiempo y en un elevado número de animales (Ruegg, 2003).

En el caso de los pequeños rumiantes, las mastitis producidas por *S. aureus* también son de gran importancia (Las Heras et al., 1998; Hadimli et al., 2005), pudiendo provocar una disminución en la producción de leche (Aires et al., 2007) o incluso hasta la muerte del 10% de los animales (Radostits et al., 2002; Ebrahimi et al., 2007). En estos casos, se observan mastitis sobreagudas y gangrenosas. Los animales aparecen postrados, con la glándula y tejido perimamario de color azul-verdoso y frías al tacto, cursando con la muerte del animal en 1 o 2 días (Radostits et al., 2002).

En avicultura industrial, *S. aureus* puede producir dermatitis gangrenosas, artritis, tenosinovitis, condronecrosis, osteomielitis y septicemias (Zhu et al, 2001). Además, se han descrito brotes de infecciones por *S. aureus* en pavos que cursan con inflamación unilateral de la región orbital y desviación progresiva del pico. En el estudio anatomopatológico de las cabezas de las aves afectadas se observó sinusitis y blefaritis exudativa, así como osteomielitis crónica de todos los huesos del cráneo y mandíbula (Corrand et al., 2012).

### **1.3.2. *Staphylococcus aureus* en cunicultura**

En el caso de la cunicultura, *S. aureus* afecta a conejos domésticos, conejos silvestres y liebres (Flatt, 1974; Kötsche y Gottschalk, 1974), generando inflamaciones supurativas en prácticamente todos los órganos y localizaciones de los animales, destacando las mastitis y las pododermatitis, pudiendo terminar en una septicemia fatal (Flatt, 1974).

En la especie cunícola se han descrito principalmente dos cuadros patológicos característicos que afectan a un elevado porcentaje de conejos en una misma granja. Por una parte, la estafilococia de los gazapos lactantes, donde se suelen observar pequeños abscesos en piel (**Figura 4**), incluso a veces subcutáneos y en órganos internos, provocando cuadros subagudos y muerte del animal. Por otro lado están los procesos piógenos en maternidad y cebadero, donde la estafilococia se manifiesta en forma de mastitis, pododermatitis, abscesos subcutáneos y en órganos internos, rinitis-conjuntivitis y metritis (**Figura 5**) (Peris y Corpa, 2003), que conducen a una disminución en la producción por infertilidad y muerte (Vancraeynest et al., 2006a).

En un estudio llevado a cabo por Rosell y de la Fuente durante los años 2000 a 2005 en 16 explotaciones, la principal causa de desvieje entre hembras reproductoras fue la baja productividad, seguida de las mastitis, la pobre condición corporal y las pododermatitis (Rosell y de la Fuente, 2009). En esta misma línea, nuestro grupo realizó un seguimiento

en dos granjas cunícolas industriales durante un año, en las que se estudiaron las principales causas de eliminación de conejas adultas. La principal causa, macroscópicamente evidente, de eliminación de los animales fueron procesos purulentos provocados por *S. aureus*, ya que fue el patógeno más frecuentemente aislado, sobre todo de mastitis, abscesos y pododermatitis (Segura et al., 2007). Por lo tanto, puede considerarse que las infecciones provocadas por *S. aureus* serían uno de los principales problemas en las explotaciones cunícolas comerciales.



**Figura 4:** Gazapo lactante con numerosos abscesos en piel originados por *S. aureus*. Fuente propia.

Las cepas de *S. aureus* que afectan a los conejos se han clasificado tradicionalmente en cepas de alta y de baja virulencia (Hermans et al., 2000). A nivel clínico, estos dos tipos de cepas se han diferenciado atendiendo al número de animales afectados que se observan en la explotación y a la tasa de mortalidad. Las cepas de *S. aureus* de baja virulencia (“low virulence”) afectan a un limitado número de animales y poseen baja mortalidad, produciendo por tanto pocos efectos negativos. Sin embargo, las cepas clasificadas como de alta virulencia (“high virulence”) se diseminan a través de la explotación afectando a un gran número de conejos, provocando problemas crónicos y graves perjuicios económicos. Los conejos sanos pueden ser portadores de cepas de *S. aureus* muy virulentas sin mostrar sintomatología. Normalmente, estos microorganismos son introducidos en granjas, sin historial de estafilococias, a través de conejos portadores (Devriese et al., 1981).

Las cepas de *S. aureus* se pueden dividir en varios biotipos, atendiendo a las propiedades bioquímicas de los aislamientos. Algunos biotipos son considerados específicos de especie, mientras que otros pueden colonizar diferentes hospedadores. Así, se han descrito biotipos en humanos, bovinos, ovinos y aves de corral (Devriese, 1984). En el caso de los aislados cunícolas, no hay diferencias en cuanto al biotipo, ya

que todas las cepas de alta virulencia pertenecen al biotipo CV-C mixto al igual que muchas cepas clasificadas como cepas de baja virulencia. Sin embargo, mediante el fagotipado, técnica que usa fagos de la colección internacional de tipado para cepas de *S. aureus* de origen humano (Parker, 1962), todas las cepas de alta virulencia se clasifican en el fagotipo 3A/3C/55/71. Así, según Hermans et al. (1999) las cepas de *S. aureus* clasificadas como cepas de alta virulencia pertenecen al biotipo-fagotipo CV-C mixto 3A/3C/55/71, causante de graves problemas por toda Europa a partir de los años 80 (Vancraeynest et al., 2006a).



**Figura 5:** Presencia de un absceso subcutáneo en la extremidad posterior derecha. Fuente propia.

Además de las propiedades fenotípicas descritas, las cepas de conejo también se han estudiado genotípicamente. Hermans et al., (2000, 2001) emplearon una técnica conocida como amplificación aleatoria del ADN polimórfico (del inglés: “randomly amplified polymorphic DNA”, RAPD), basada en la amplificación de secuencias al azar mediante el empleo de oligonucleótidos cortos. Mediante el empleo de RAPD clasificaron en un mismo tipo a las cepas pertenecientes al fagotipo de alta virulencia (RAPD tipo “a”). Estudios más recientes han clasificado la mayoría de las cepas de alta virulencia en los mismos tipos mediante tipificación por PFGE, MLST y longitud del gen que codifica para la proteína A (*spa*). Por tanto, estos estudios sugirieron un origen clonal de la forma de alta virulencia (Hermans et al., 1999; Vancraeynest et al., 2006b). Estos dos grupos de cepas, atendiendo a características fenotípicas y genotípicas, fueron corroborados *in vivo* mediante una infección experimental en piel (Meulemans et al., 2007).

Por otro lado, nuestro equipo de investigación realizó el tipado de 301 aislados de *S. aureus* obtenidos a partir de conejas con lesiones crónicas procedentes de 30 granjas de la Comunidad Valenciana, junto con 16 cepas provenientes de diferentes países europeos previamente clasificadas en cepas de alta o baja virulencia (Hermans et al., 2000). Para el tipado se usó la amplificación del ADN mediante la reacción en cadena de

la polimerasa (PCR) a partir de 3 genes que presentan repeticiones en tándem dentro del genoma de *S. aureus*: la selección del gen de la coagulasa (*coa*) se debe a que la coagulasa (Coa) está producida por todas las cepas de *S. aureus*, principal motivo para que se emplee como criterio para la identificación de *S. aureus*; el gen *spa*, que codifica la proteína A estafilocócica (Spa) es uno de los factores de virulencia más importantes de *S. aureus* (Gao y Stewart, 2004) poseyendo un importante papel a la hora de eludir la fagocitosis (Gomez *et al.*, 2006) y actuando por tanto sobre la respuesta inmune del hospedador y el gen clumping factor B (*clfB*), que codifica una proteína MSCRAMM que se une al fibrinógeno y a la queratina (Ni Eidhin *et al.*, 1998), este factor varía entre cepas (McDevitt y Foster, 1995), lo que le convierte en un excelente candidato para el tipado molecular de *S. aureus* (Koreen *et al.*, 2005).

Tras el tipado se observó que cepas caracterizadas fenotípicamente como de baja virulencia, obtuvieron el mismo genotipo que cepas aisladas de lesiones crónicas que llevaron al cierre de la explotación, debido a los graves efectos negativos ocasionados (asumiendo que, por lo tanto, eran cepas de “alta virulencia”) (Viana *et al.*, 2007).

### **1.3.3. Mastitis estafilocócica en el conejo**

Las mastitis pueden desarrollarse tanto en animales no lactantes como en lactantes (Viana *et al.*, 2011). En estos casos, puede producirse en cualquier momento durante el periodo de lactación de las conejas (Adlam *et al.*, 1977). Cuando la mastitis aparece al comienzo de la lactación, las camadas suelen perderse. Las hembras que se recuperan de la enfermedad, con frecuencia se niegan a aparearse de nuevo (en el caso de monta natural) o no quieren amamantar a nuevas camadas. Es una enfermedad que ya en 1976 afectaba a las granjas cunícolas con porcentajes que oscilaban entre el 4 y el 19% de los animales en lactación (Adlam *et al.*, 1976). Es un proceso que tiene un gran impacto económico negativo en las granjas derivado, entre otros, de la mortalidad de los conejos lactantes, del retraso en su crecimiento, así como del tratamiento y eliminación de las hembras reproductoras (Marcato y Rosmini, 1986; Quevedo *et al.*, 2003)

*Staphylococcus aureus* suele penetrar a través del pezón o de heridas en la piel que recubre a la glándula, lesionando el tejido mamario. Es capaz de adherirse al tejido mamario y colonizarlo, estableciéndose la infección (Menzies, 2003) a través de proteínas de superficie tales como la proteína A y los componentes microbianos de superficie que se adhieren a moléculas tisulares (MSCRAMMs, por sus siglas en inglés: microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules). Dentro de éstos se encuentran: el factor de agregación A y B (ClfA y ClfB), proteínas A y B de unión a fibrinógeno (FnBPA y FnBPB), proteínas de unión al colágeno (Cna), proteínas de unión a elastina (EbpS), proteína de unión a laminina (Eno), y proteínas de unión a

fibrinógeno (Fib) (Corrigan et al., 2007). Otro factor de patogenicidad importante en las mastitis estafilocócicas es la producción de biofilm, factor responsable de las infecciones crónicas y/o persistentes, puesto que facilita la adherencia y la colonización de *S. aureus* al epitelio de la glándula mamaria, ayudando a evadir el sistema inmunitario del huésped (Fox et al., 2005). Adicionalmente, protege a la bacteria de la acción de los agentes antimicrobianos (Dhanawade et al., 2010) lo que hace muy difícil su eliminación dentro de la explotación.

Las mastitis estafilocócicas en conejos pueden afectar a una o varias mamas y pueden ser de curso agudo o crónico (Adlam et al., 1976). En la forma aguda o gangrenosa, una o más glándulas mamarias se presentan calientes, enrojecidas e hinchadas, afectándose zonas de alrededor del pezón o más alejadas y tienden a volverse cianóticas durante el curso de la infección (Flatt, 1974; Adlam et al., 1976). Esta lesión se conoce como "mama azul" donde el tejido mamario se vuelve edematoso y hemorrágico. Las conejas presentan fiebre, disminución del apetito, letargia, depresión y polidipsia. Este tipo de mastitis puede propagarse rápidamente a través de la nave. Las camadas afectadas suelen morir de inanición ya que el dolor hace que las madres se vean incapaces de amamantarlas (Zumpt, 1976; Adlam et al., 1977; Holliman y Girvan, 1986). La hembra puede morir en cuestión de horas, o sobrevivir con cambios crónicos en las glándulas mamarias afectadas (Zumpt, 1976). La forma crónica o purulenta se caracteriza por un engrosamiento o induración del tejido mamario alrededor o cerca de uno o más pezones. Los animales infectados desarrollan abscesos en el tejido mamario de 2 a 10 cm de diámetro durante un periodo de 2 a 3 semanas. Estos abscesos pueden descargar el material purulento o continuar como lesiones crónicas que a menudo contienen material caseoso estéril. Los conejos aparecen aletargados y, a veces, son incapaces de amamantar a sus crías (Adlam et al., 1976). Se ha descrito una tercera forma que afecta al tejido mamario, donde la piel que rodea al pezón aparece con una inflamación de tipo exudativo a supurativo y que puede llegar a afectar a los tejidos más profundos (Okerman et al., 1984).

En mastitis agudas experimentales se ha observado cómo histológicamente la lesión gangrenosa aguda muestra una involución alveolar con células epiteliales descamadas y una banda de células mononucleares, aunque en ocasiones pueden aparecer grupos de bacterias dentro de los alveolos sin células inflamatorias. Conforme la lesión avanza se acumulan las células polimorfonucleares en el espacio interalveolar (Adlam et al., 1976; Corpa et al., 2009).

Viana et al. (2011) realizaron una detallada descripción histopatológica de las lesiones mamarias observadas en 178 casos de mastitis crónicas naturales cunícolas provocadas por *S. aureus*. Las lesiones mamarias se clasificaron en diferentes tipos:

(a) Abscesos (66,3% de los casos), que se diferenciaron, según su grado de maduración, en abscesos bien encapsulados; abscesos rodeados de una cápsula laxa, infiltrada por heterófilos, linfocitos, células plasmáticas y macrófagos; o abscesos con una cápsula muy fina de tejido conectivo.

(b) Mastitis supurativa con un patrón lobulillar (7,9% de los casos) que mostraban áreas de inflamación no encapsuladas, con necrosis y presencia de colonias bacterianas en lobulillos y tejido glandular.

(c) Celulitis (19,7% de los casos), caracterizadas por presentar una amplia banda de tejido inflamatorio, formado por heterófilos, macrófagos y células plasmáticas, rodeando a la glándula mamaria. Cuando ésta quedaba completamente rodeada sufría una necrosis por coagulación y se observaban numerosas bacterias Gram-positivas.

(d) Lesiones mixtas formadas por combinaciones de las anteriores. Por otro lado, no se pudo llegar a correlacionar las lesiones descritas con determinadas cepas de *S. aureus*, por lo que se concluyó que todas las cepas descritas podrían dar lugar a cualquier tipo de lesión.

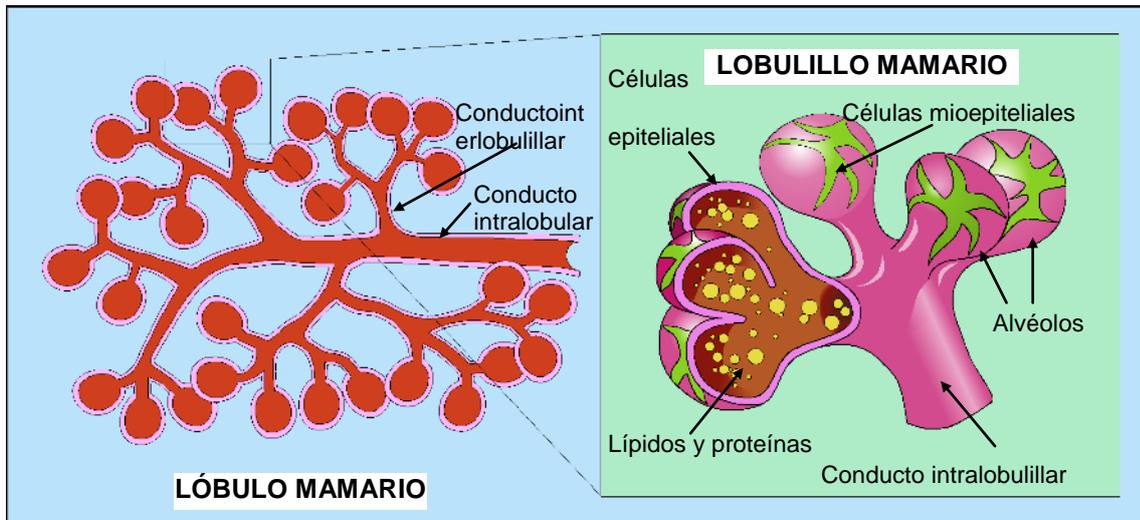
#### **1.3.3.1. La glándula mamaria en el conejo**

Las glándulas mamarias se originan a partir de la parte ectodérmica del tejido embrionario. Son glándulas sudoríparas modificadas que se han desarrollado en los mamíferos constituyendo la característica fundamental de la clase Mammalia. Se encuentra presente tanto en hembras como en machos, solo que en estos últimos no llegan a desarrollarse después del nacimiento, permaneciendo como un órgano rudimentario (Fawcett, 1997). En casi todos los mamíferos la vida del recién nacido depende de la capacidad de su madre para amamantarlo, por lo tanto, una lactancia adecuada es esencial para completar el proceso de la reproducción y la supervivencia de la especie. En la especie cunícola el número de glándulas mamarias es variable, vienen determinadas externamente por el número de pezones. Lo más habitual es que presenten dos filas con 4-5 pezones pero hay veces que pueden tener hasta seis (Rosell et al., 2000) (**Figura 6**) En las últimas décadas la presión selectiva que se ha realizado sobre el carácter de prolificidad en las conejas ha favorecido la aparición de animales con un mayor número de pezones (politelia) debido a la gran heredabilidad de este carácter (Szendrő et al., 1992).



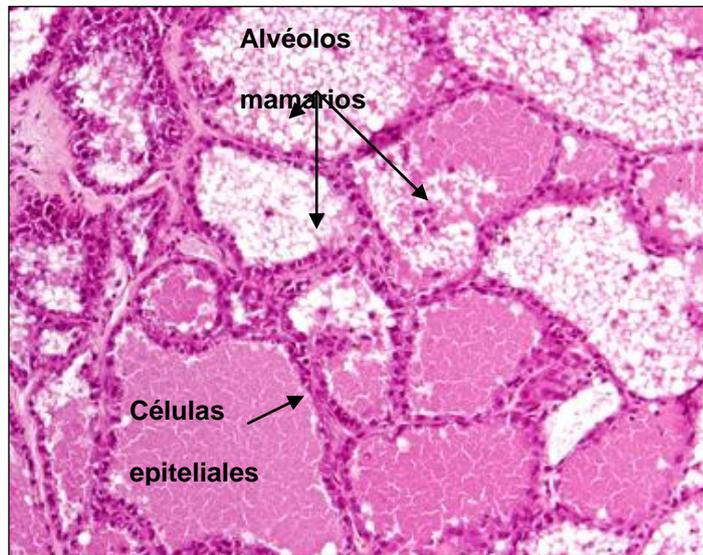
**Figura 6.** Coneja lactante, situada en decúbito supino, donde pueden distinguirse cinco pares de glándulas mamarias bajo la piel (izquierda) o, más claramente, una vez separada la piel (derecha). Fuente propia.

La mama es una glándula tubuloalveolar, de arquitectura arboriforme, que está formada por numerosas unidades secretoras que se agrupan para formar lóbulos mamarios separados entre sí por tejido conjuntivo. Dentro de cada unidad secretora se pueden distinguir dos zonas, una parte secretora o alvéolos glandulares, donde se produce la leche, y el sistema de conductos excretores, por donde se conduce la leche hasta el exterior (Dellman, 1994; Fawcett, 1997; Gazquez y Blanco, 2004) (**Figura 7**).



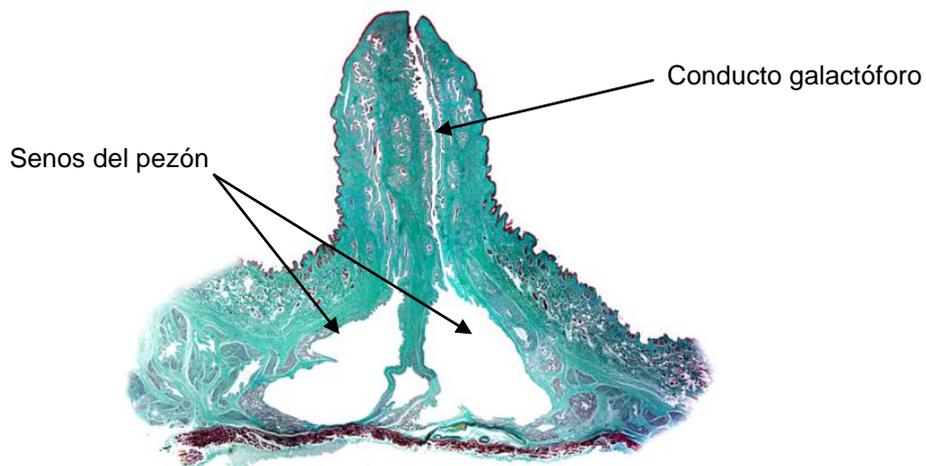
**Figura 7:** Estructura microscópica tipo arboriforme de los lóbulos mamarios (izquierda). A la derecha, un lobulillo mamario con varios alveolos. Las células mioepiteliales son las encargadas de contraerse y provocar así la eyección de la leche. Fuente propia.

Los alvéolos glandulares son estructuras huecas, con forma de esfera, tapizadas por una sola capa de células glandulares de altura variable según la fase secretora en la que se encuentra, entre estas células se disponen células mioepiteliales con el fin de contraerse (gracias a la secreción de oxitocina neurohipofisaria) y ayudar a la excreción de la leche desde las unidades secretoras hasta el sistema de conductos (Dellman, 1994; Gazquez y Blanco, 2004). (**Figura 8**).



**Figura 8.** Alvéolos mamarios dilatados con presencia de abundante secreción láctea conteniendo numerosas gotas lipídicas. Glándula mamaria lactante. H&E. Fuente propia.

El sistema de conductos comienza a continuación del alveolo, con el conducto intralobulillar que lleva la leche de 1 o 2 alvéolos hasta el conducto interlobulillar, formando el conducto excretor primario de un lobulillo. El conducto interlobulillar desemboca en un conducto intralobular y éste a su vez en el conducto lobular o galactóforo (conducto excretor primario de cada lóbulo). Estos conductos galactóforos son los que se comunican con el exterior a través del pezón, de forma separada en 8 o 10 canales externos o conductos galactóforos, aunque previamente existen unas dilataciones denominadas senos del pezón (Dellman, 1994; Gazquez y Blanco, 2004) (**Figura 9**).



**Figura 9:** Corte longitudinal de un pezón donde se observan varios conductos galactóforos que desembocan al exterior, y en su base unas dilataciones llamadas senos del pezón. Tricrómico de Masson. Fuente propia.

El estroma es el tejido conjuntivo que rodea el parénquima secretor, proporcionando a la mama un importante sostén. En él están presentes los nervios, vasos sanguíneos y linfáticos, linfocitos y células plasmáticas, que son muy numerosas en el periodo

posparto, ya que están especializadas en la síntesis de inmunoglobulinas que pasan a la leche, constituyendo el calostro, primera alimentación de la descendencia que aporta una primera inmunidad pasiva (Welsch, 1999; Cunningham, 2003).

#### **1.4. El sistema inmunitario**

El sistema inmunitario es un mecanismo defensivo presente en los seres vivos, que ha evolucionado para proteger al huésped contra ataques externos de microorganismos, potencialmente patógenos. Lo hace gracias al reconocimiento de antígenos expresados por dichos microorganismos, que desencadena una respuesta inmunitaria cuyo objetivo final es su destrucción y eliminación (O`Garra y Vieira, 2004). Estos mecanismos de defensa difieren significativamente en la escala filogenética, con una tendencia hacia una mayor complejidad en las especies más evolucionadas. Los animales invertebrados únicamente poseen un sistema inmunitario innato, formado por componentes celulares (células fagocíticas) y componentes solubles o humorales; mientras que los vertebrados tienen además un sistema inmunitario adaptativo o adquirido, integrado por linfocitos (T y B) y anticuerpos. Ambos sistemas son los responsables de generar una respuesta inmune que se clasifica en dos categorías principales: la respuesta inmune innata (o no adaptativa) y la respuesta inmune adaptativa (o adquirida), respectivamente; cuyo propósito es mantener la integridad biológica de los individuos (Roitt et al., 2006).

##### **1.4.1. El sistema inmunitario innato**

El sistema inmunitario innato es un arcaico sistema defensivo de amplio espectro, que se encuentra en todos los seres eucariotas (McCann et al., 2012).

En los seres vertebrados, este sistema está formado por células inflamatorias y mediadores solubles que comprenden la primera línea de defensa contra la infección microbiana y, lo más importante, desencadenan la respuesta de las células T y B, específicas de antígeno, que conducen a una inmunidad duradera (Oberbarnscheidt et al., 2011). Se considera, por lo tanto, que genera una respuesta temporal hasta que se activa y establece la respuesta inmune adaptativa (Akira, 2012).

Los receptores del sistema innato se ajustan con precisión para detectar la presencia de agentes patógenos comunes, que se presentan en la vida diaria, como virus, bacterias, hongos y parásitos. También poseen receptores capaces de detectar la muerte de las células huéspedes por agentes patógenos no habituales (Sompayrac, 2012).

La inmunidad innata está constituida por diferentes líneas de defensa, tales como barreras anatómicas (por ejemplo, la piel, los epitelios mucosos, los cilios), barreras fisiológicas (por ejemplo, el pH del estómago, la temperatura corporal), barreras químicas

como citocinas y quimiocinas, además de la fagocitosis celular y la respuesta inflamatoria (Snyder, 2012). La fagocitosis es un tipo de endocitosis que consiste en la captura de partículas microscópicas y/o microorganismos patógenos, mediante la emisión de pseudópodos, formando grandes vesículas llamadas fagosomas. Normalmente, la fagocitosis se lleva a cabo por células especializadas, como los monocitos sanguíneos, neutrófilos y macrófagos tisulares (Kindt et al., 2007).

#### **1.4.1.1. Neutrófilos**

Los neutrófilos son células fagocitarias generadas en la médula ósea, que constituyen la mayor parte de los leucocitos sanguíneos. Están equipadas con un completo arsenal de gránulos internos que contienen proteínas de acción letal tanto para los microorganismos como para los propios tejidos. Los neutrófilos circulan en la sangre como células latentes (Borregaard, 2010).

En conejos, estas células reciben el nombre de heterófilos y contienen en su citoplasma gránulos acidófilos, aunque desarrollan funciones similares a las de los neutrófilos del resto de mamíferos (Lester et al., 2005). Estas células, una vez activadas, juegan un importante papel en la inmunidad innata del huésped contra los microorganismos invasores (Saffarzadeh et al., 2012). Pueden ser activados por diversos estímulos, como moléculas derivadas de patógenos y multitud de sustancias quimiotácticas (Walther et al., 2000; Tiffany et al., 2001; Sabroe et al., 2003; Kobayashi, 2008), incluyendo varias quimiocinas que regulan las actividades de los neutrófilos.

Los neutrófilos son reclutados en las áreas de infección o en los sitios de lesión en función de un gradiente quimioatrayente (Borregaard, 2010; Kumar y Sharma, 2010). Después del reclutamiento, los neutrófilos reconocen específicamente a los patógenos invasores a través de sus receptores de membrana y posteriormente los atacan mediante la liberación de péptidos antimicrobianos y enzimas líticas junto con la producción de especies reactivas de oxígeno, seguido de la fagocitosis (Decoursey y Ligeti, 2005; Nathan, 2006). La fagocitosis de las bacterias normalmente acelera la apoptosis de los neutrófilos, que promueve en última instancia, la resolución de la infección (Kennedy y DeLeo, 2009) con la consecuente eliminación de los neutrófilos apoptóticos por los macrófagos (Kobayashi et al., 2005).

En las infecciones por *S. aureus*, estas células fagocíticas son esenciales para controlar al patógeno en fases iniciales de la infección (Schmaler et al., 2011), donde los neutrófilos constituyen la primera línea defensiva del hospedador y son críticos para determinar el resultado de las infecciones estafilocócicas (Veldkamp et al., 1997). Son células que disponen de una gran cantidad de elementos para enfrentarse frente a *S.*

*aureus* tales como la producción de radicales libres de oxígeno, ácido hipocloroso, péptidos antimicrobianos como catelicidinas y lisocimas, además de proteinasas e hidrolasas ácidas que degradan las proteínas y componentes bacterianos (Segal, 2005). Además, en su citoplasma se encuentra un complejo proteico llamado calprotectina, que inhibe el crecimiento de *S. aureus* a través de quelantes de  $Mn^{2+}$  y  $Zn^{2+}$ , si este llegara a penetrar dentro del neutrófilo (Corbin et al., 2008). En infecciones de piel experimentales en ratones se pudo ver que un déficit de estas células en las fases iniciales de la infección conlleva un sobrecrecimiento de la bacteria. Además, un aumento posterior de estas células ya no tiene efecto sobre el control de la enfermedad, asentándose el proceso infeccioso (Molne et al., 2000; Ziegler et al., 2011).

#### **1.4.1.2. Monocitos y macrófagos**

Estas células realizan una amplia gama de funciones, contribuyendo a la inmunidad, inflamación, remodelación y reparación de los tejidos (Snyder, 2012). En la sangre reciben el nombre de monocitos y en los tejidos se denominan macrófagos. Tanto en la sangre como en el tejido son células necesarias para efectuar y regular el proceso de inflamación y la respuesta inmune innata (Geissmann et al., 2010).

Los monocitos son las células del sistema mononuclear fagocitario que derivan del linaje mieloide de la médula ósea que vinculan la inflamación y la respuesta inmune innata a la inmunidad adaptativa (Pollard, 2009; Snyder, 2012). Estas células migran a través de los vasos sanguíneos en diversos órganos y sistemas de tejidos, donde se convierten en macrófagos tisulares, siendo muy eficaces en la presentación de antígenos a los linfocitos T (Gómez-Lucia et al., 2007). Sus dos funciones principales son eliminar determinados antígenos mediante fagocitosis y procesarlos para presentarlo a las células T. La activación clásica de los macrófagos se produce por el IFN $\gamma$ , sintetizado por los linfocitos Th1 activados, lo que desencadena una respuesta pro-inflamatoria severa necesaria para eliminar patógenos intracelulares. Tras ser activados secretan citoquinas tales como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL18 y FNT- $\alpha$ , modulando la actividad de otras células del sistema inmunitario (Gómez-Lucia et al., 2007; Pixley, 2012), actuando como células o elemento puente entre la inmunidad innata y adaptativa (Shapiro et al., 2011).

Los macrófagos pueden ser de dos tipos dependiendo de la forma, el escenario y el sitio de la lesión (Mosser y Edwards, 2008; Biswas y Mantovani, 2010). El tipo 1 o M1 que promueve la muerte de patógenos microbianos y parásitos intracelulares, estando también implicado en la destrucción de células cancerígenas. El tipo 2 o M2 participa en la reparación y control de tejido afectado con macroparásitos, a través de la encapsulación de estos (Mantovani et al, 2004; Martínez et al., 2009; Willem y Fieren, 2012).

En las infecciones por *S. aureus* estas células, al igual que los neutrófilos, aumentan en número en las primeras fases de la infección, ya que la entrada de *S. aureus* activa la respuesta inmune innata que envuelve la producción de citoquinas que atraen a los macrófagos (vonKöckitz-Blickwede et al., 2008; Ziegler et al., 2011). En estudios de infecciones experimentales en ratón (Ziegler et al., 2011) se ha podido comprobar como las primeras fases de infección con *S. aureus*, están dominadas por las células de la inmunidad innata, tanto macrófagos como neutrófilos, donde el aumento de estas células es esencial para combatir la enfermedad, mientras que en las fases más tardías es la inmunidad adaptativa dirigida por los linfocitos T la que hace frente a la bacteria (Ziegler et al., 2011). El problema de estas células es que *S. aureus* tiene la capacidad de eludir la muerte una vez que está dentro de los macrófagos a través de su  $\alpha$ -toxina, impidiendo también la muerte por apoptosis de los macrófagos, facilitándose la propagación de la bacteria dentro del huésped (koziel et al., 2015).

#### **1.4.2. El sistema inmunitario adaptativo**

La respuesta inmune adaptativa es más sofisticada que la inmunidad innata y puede reconocer y reaccionar frente a un gran número de agentes infecciosos. Además, después de la exposición a estos agentes, cada exposición sucesiva a un mismo agente aumenta su intensidad defensiva (Gómez-Lucia et al., 2007).

En la respuesta inmune adaptativa interviene la inmunidad celular, que está mediada por células (principalmente linfocitos T), que actúan frente a patógenos intracelulares (como los virus), aunque también puede evitar la aparición y proliferación de células tumorales. Igualmente interviene la inmunidad humoral, mediada por linfocitos B, diseñada para enfrentarse a agentes patógenos y toxinas extracelulares (Snyder, 2012).

El sistema inmunitario adaptativo genera receptores en los linfocitos T y B capaces de reconocer cualquier antígeno no propio. Durante este proceso aleatorio también se producen receptores contra moléculas propias. Por ello, el sistema inmunitario adaptativo tiene que aprender a discriminar entre células propias y no propias con el fin de evitar una reacción autoinmune (González et al., 2011). Para facilitar esta discriminación se emplean los receptores de membrana de las células y las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (Wu et al., 2009).

El sistema linfático se organiza de forma similar entre mamíferos (Drouet-Viard y Fortun-Lamothe, 2002). En primer lugar, los folículos linfoides comienzan a formarse a la edad de 2 semanas. Posteriormente, durante la maduración, el número de folículos aumenta (Thorbecke, 1960; Jeklova et al., 2007) y, además, la distribución de linfocitos en el bazo, los nódulos linfáticos y la sangre periférica experimenta un desarrollo notable (Drouet-

Viard y Fortun-Lamothe, 2002). Los órganos linfáticos, al igual que en otras especies, se clasifican como órganos primarios o secundarios (Roitt et al., 2006).

Los órganos primarios son **la médula ósea**, encargada de producir glóbulos rojos y blancos, incluyendo los linfocitos T y B (Del Fattore et al., 2010) y **el timo**, lugar donde se capacitan las células T para identificar células extrañas en el cuerpo y marcarlas para la destrucción por otras células del sistema inmunitario (Dorko et al., 2011). Este órgano sufre su máximo desarrollo al nacer (Varga et al., 2011), pero comienza a disminuir después de la madurez sexual. Sin embargo, se piensa que la generación de células T en el timo continúa en la vida adulta, aunque a una menor velocidad (Roitt et al., 2006)

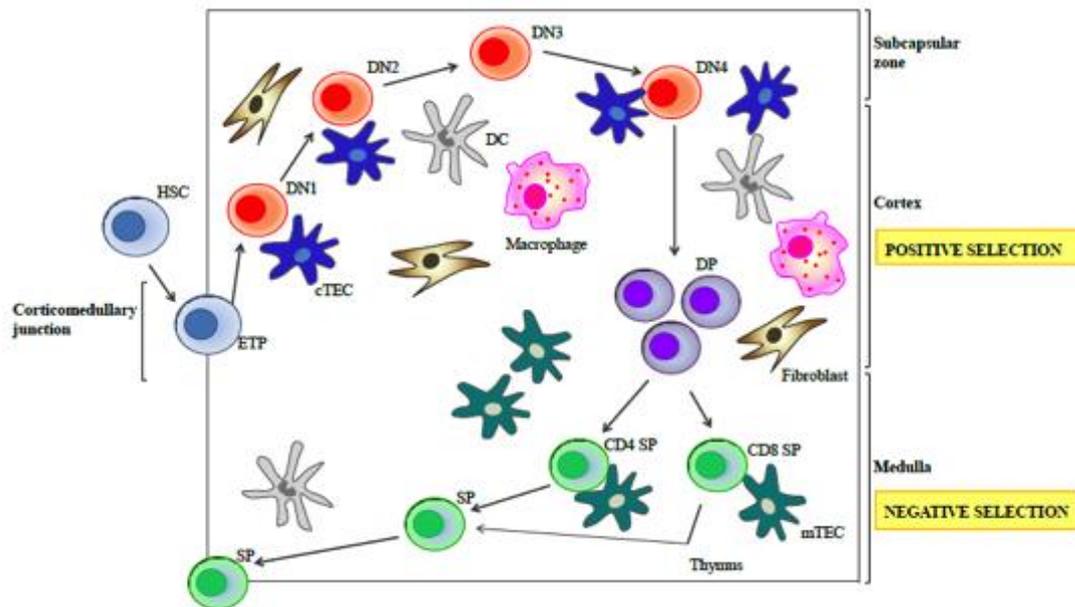
El proceso por el cual se producen los linfocitos se conoce como linfopoyesis. Mientras que los linfocitos T migran al timo para su desarrollo final, las células B permanecen en la médula ósea durante su maduración. Una vez las células B se han desarrollado completamente, se liberan a la circulación y la mayoría pasan a localizarse en los órganos linfáticos secundarios (Snyder, 2012).

Los linfocitos T generados en la médula ósea, llegan al timo por la circulación y entran en la zona subcapsular a través de la unión corticomedular para completar su desarrollo (Fry y Donald McGavin, 2012).

El desarrollo intratímico de las células T se compone de varias fases que requieren una re-ubicación dinámica de los linfocitos en maduración dentro de las múltiples estructuras arquitectónicas de este órgano (Romano et al., 2012). En la zona subcapsular, las células progenitoras linfoides comienzan los procesos de diferenciación y selección, y se convierten en linfocitos T vírgenes, más maduros a medida que atraviesan la corteza tímica hacia la médula. En la corteza, a los linfocitos T que reconocen auto-moléculas (es decir, las moléculas del MHC) pero no los antígenos propios, se les permite madurar por un proceso denominado selección positiva. Las células que no reconocen las principales moléculas del MHC se eliminan por apoptosis (Fry y Donald McGavin, 2012).

El desarrollo, en el interior del timo de los linfocitos T, está definido por tres patrones inmunofenotípicos particulares: la etapa CD4-CD8-, doble negativos (DN); la etapa CD4+ CD8+, doble positivos (DP) y la etapa CD4- CD8+ o CD4+ CD8-, un positivo (SP) (Romano et al., 2012). En la **Figura 10** se muestran, de forma detallada, estos pasos: (1) la entrada de células progenitoras linfoides en el timo; (2) la generación de timocitos CD4+ CD8+ doble positivos (DP), en la corteza; (3) selección positiva de timocitos DP en la corteza y, finalmente, (4) la interacción de los timocitos medulares seleccionados positivamente con las células epiteliales tímicas para completar la maduración de los timocitos y, eventualmente, exportar células T maduras del timo (Romano et al., 2012). Después de la maduración en el timo, los linfocitos T vírgenes maduros abandonan el

timo a través de las vénulas postcapilares de la región corticomedular, entran en la circulación y llegan a los tejidos linfoides secundarios, donde la mayor parte de ellos permanecen para madurar a linfocitos T inmunocompetentes (Fry y Donald McGavin, 2012).



**Figura 10:** Pasos del desarrollo de células T en humanos en el timo. La célula progenitora linfóide entra en el timo a través de la unión corticomedular. Los timocitos DN (CD4-CD8-) migran a través de la región subcapsular y luego a la corteza exterior. La interacción entre las células DN y con las cTECs genera timocitos DP (CD3+ CD4+ CD8+). Los timocitos seleccionados positivamente interactúan con las mTECs para completar el proceso de maduración. En la médula, se eliminan los timocitos autorreactivos, también se generan células SP (CD3+ CD4+ o CD8+ CD3+) y, finalmente, las células T maduras del timo migran fuera del mismo.

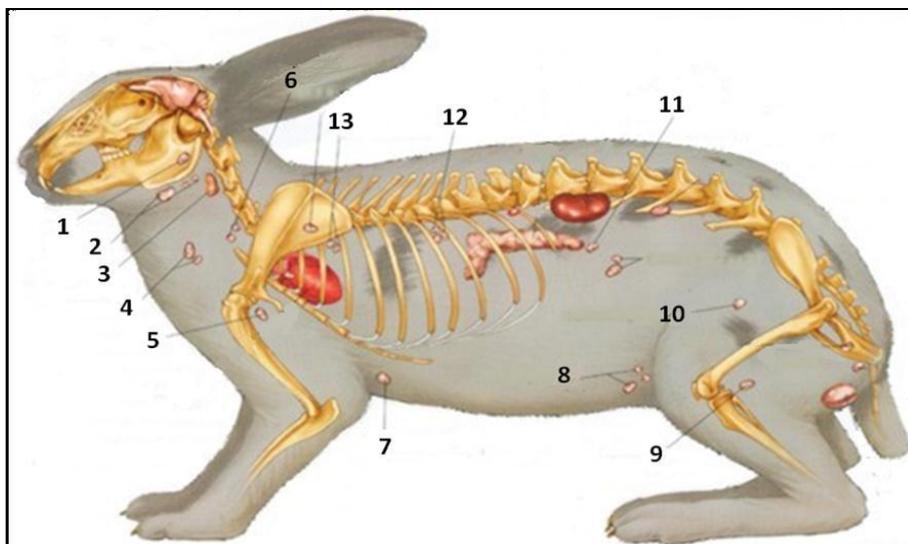
cTECs: células epiteliales corticales del timo, DC: células dendríticas; DN: doble negativo; DP: doble positivo; ETP: progenitor del timo temprana; HSC: células madre hematopoyéticas; mTECs: células epiteliales medulares del timo, SP: único positivo (Adaptado de Romano et al., 2012).

Después de la maduración y diferenciación de los linfocitos, éstos migran desde los órganos linfáticos primarios a los órganos linfáticos secundarios, que incluyen el bazo, los nódulos linfáticos y los tejidos linfoides asociados a mucosas (Drouet-Viard y Fortun-Lamothe, 2002; Weih y Camaño, 2003).

El **bazo** es el mayor órgano linfático secundario, posee una estructura especialmente diseñada para filtrar la sangre y detectar antígenos circulantes (Randall et al., 2008). Esta función depende de la pulpa blanca, que rodea las arteriolas centrales (Cesta, 2006). Su especial estructura permite el desarrollo tanto de una respuesta innata frente a la invasión de microorganismos, como adaptativa, gracias a la interacción de las células que reconocen y presentan los antígenos, involucrando a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (Tiron y Vasilescu, 2008).

Los **nódulos linfáticos** tienen una arquitectura bien organizada con diferentes compartimentos anatómicos para albergar subconjuntos específicos de linfocitos (Graw y Regoes, 2012). Su estructura está constituida por un estroma, que incluiría una cápsula de tejido fibroso y un retículo de sostén; la zona cortical, con una parte exterior que contiene los linfocitos B y otra profunda que contiene linfocitos T; y la médula, donde se distinguen los cordones medulares, que contienen macrófagos, linfocitos y células plasmáticas, que rodean senos medulares, vasos y las células del sistema monocito-macrófago (Fry y Donald McGavin, 2012).

Los nódulos linfáticos están estratégicamente ubicados en los animales (**Figura 11**). Su principal función consiste en filtrar la linfa procedente de las diferentes partes del organismo para facilitar la detección y eliminación de partículas y microorganismos, mediante la interacción con los linfocitos B y T (Koning y Mebius, 2012); además también producen linfocitos B (Fry y Donald McGavin, 2012). Los antígenos presentes en la linfa se filtran en el nódulo linfático antes de volver, de nuevo, a la circulación linfática. Al igual que en el bazo, los macrófagos y las células dendríticas son los encargados de presentar los antígenos a las células T y B, desencadenándose una respuesta inmunológica.



**Figura 11:** Nódulos linfáticos principales (NL) en conejos: 1. NL parotídeo; 2. NL mandibular; 3. glándula tiroides; 4. NL cervical profundo; 5. NL axilar; 6. NL cervical superficial; 7. NL axilar accesorio; 8. NL epigástrico; 9. NL poplíteo; 10. NL inguinal; 11. NL pancreático; 12. NL gástrico; 13. NL aórtico (Koning y Mebius, 2012)

El **tejido linfoide asociado a mucosas** (MALT, en inglés) está compuesto por agregados de tejido linfoide organizado, no encapsulados, dispersos por la superficie de todos los tejidos mucosos (Elmore, 2006). Su organización es similar a la de los nódulos linfáticos, con folículos de células B y células T en las zonas interfoliculares (Elmore,

2006). En ellos se detectan y procesan los antígenos, y es desde donde las células linfoides, junto con el antígeno, fluyen por los vasos linfáticos aferentes a los nódulos linfáticos regionales (Fry y Donald McGavin, 2012). La función primaria del MALT es detectar a los antígenos en las superficies mucosas, jugando un papel fundamental como lugares inductivos de la inmunidad específica (Okada et al., 2011). Por ello, está estratégicamente situado para actuar como centinelas, aunque también puede convertirse en una puerta de entrada para algunas bacterias como ocurre, por ejemplo, a partir de las placas de Peyer (Fry y Donald McGavin, 2012).

#### **1.4.2.1. Linfocitos B**

Los linfocitos B, como ya se ha citado anteriormente, son las células encargadas de la respuesta humoral a través de la producción de anticuerpos. Para poder llevar a cabo esta tarea, los linfocitos B necesitan tener en su membrana diversos receptores conocidos como receptores de células B (BCR) o inmunoglobulinas (Ig), capaces de reconocer de forma específica a los epítomos antigénicos (LeBien y Tedder, 2008; Anelli y van Anken, 2013). Estos receptores son adquiridos en la médula ósea. Hay BCR que son constantes en todos los linfocitos B, que les permite reconocer antígenos exógenos y libres en los fluidos extracelulares y otros BCR particulares de cada población de linfocitos B, que les confiere una respuesta específica. El BCR que forma el heterodímero CD79, es el implicado en la transducción de la señal de activación de estas células (Roitt et al., 2006; Gomez-Lucia et al., 2007).

Los linfocitos B se pueden encontrar en los tejidos linfoides primarios, tales como hígado fetal, médula ósea y en los tejidos linfoides secundarios, tales como el bazo, los ganglios linfáticos, las amígdalas, y las placas de Peyer (Snyder, 2012). También se pueden encontrar en bajo número circulando por la sangre (Tizard, 2009).

La maduración de los linfocitos B comienza en el hígado fetal y continúa en la médula ósea de ahí salen y completan su desarrollo en la etapa de madurez, determinada por la aparición de IgD, además de IgM en la superficie celular. Toda esta fase se produce en ausencia de contacto con el antígeno exógeno, siendo una fase independiente de antígeno (LeBien y Tedder, 2008; Bonilla y Oettgen, 2010). Posteriormente migran al bazo, donde maduran definitivamente a linfocitos B. Más tarde, a través de un proceso de reorganización de genes, estos linfocitos se especializan en la producción de una sola clase de inmunoglobulinas IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. Si una célula B interactúa con un antígeno para el que posee un anticuerpo específico de membrana, la célula comienza su expansión clonal y diferenciación, lo que resulta en una población de células B de memoria y células plasmáticas (Bergstrom y Antia, 2006).

Los linfocitos B pueden comportarse de dos formas al reconocer a un antígeno:(1) unirse a él y convertirse en una célula plasmática productora de anticuerpos específicos frente a ese antígeno (patógeno), o bien, (2) funcionar como células presentadoras de antígeno (APC), fagocitando al patógeno, y como fuente de citoquinas (Gómez-Lucia et al., 2007; Tobón et al., 2013).

Las células plasmáticas son células diferenciadas, no se dividen y rara vez se encuentran en la circulación, sino que residen en órganos linfoides secundarios y en los sitios donde se activa la respuesta inmune. Son las mediadoras principales de la inmunidad humoral y secretan las principales clases de inmunoglobulinas: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE (McHeyzer-Williams y McHeyzer-Williams, 2005; Shapiro-Shelef y Calame, 2005; Radbruch et al., 2006; Fairfax et al., 2008).

Las células B que no se unen al antígeno o no reciben suficiente ayuda de las células T mueren *in situ* mediante apoptosis y sus restos eliminados por los macrófagos (Bende et al., 2009; Hoek et al., 2010; Hart et al., 2011).

Los linfocitos B se encargan de producir los anticuerpos frente a *S. aureus* cuando éste penetra en el huésped. Estos anticuerpos son de gran importancia en la opsonización de la bacteria mediada por anticuerpos y en la ingestión de las bacterias por parte de los macrófagos y los neutrófilos (Holtfreter et al., 2010). Los anticuerpos que se generan frente a la bacteria son de varios tipos, incluyendo anticuerpos contra las toxinas, contra factores de virulencia, frente a proteínas de la pared celular, y frente a elementos no proteicos (por ejemplo, antígenos polisacáridos capsulares, ácido lipoteicoico, y peptidoglicano) (Holtfreter et al., 2010). El problema de este mecanismo de defensa es que la proteína A que posee *S. aureus*, es capaz de unirse al fragmento Fc de los anticuerpos alterar la conformación de este, permitiendo a *S. aureus* no ser reconocido (Rooijackers et al., 2005; Foster et al., 2014). Sin embargo, se ha demostrado que la actuación de los linfocitos B en infecciones contra *S. aureus* no juegan un papel importante (Spellberg et al., 2008; Ziegler et al., 2011), ya que los estudios realizados en humanos con deficiencia en este tipo celular indican que tienen el mismo riesgo de infectarse con *S. aureus* que el resto de individuos (Rich et al., 2001) siendo las células T las que sí juegan un papel fundamental en la contención de la infección.

#### **1.4.2.2. Linfocitos T**

El desarrollo de las células T es similar al de las células B, con algunas diferencias. Las células T expresan un único receptor llamado TCR durante toda su vida que, por lo general, reacciona sólo con péptidos de antígenos extraños unidos a las principales proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Este TCR está formado por

dos cadenas polipeptídicas heterodímeras que difieren entre sí. Las cadenas pueden ser de 4 tipos TCR  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  ó  $\gamma$  y se pueden unir de forma específica entre ellas. El TCR  $\alpha$  siempre va junto al TCR  $\beta$ , dando lugar a los linfocitos T $\alpha\beta$  (los más numerosos); mientras que la unión de las cadenas  $\delta$  y las cadenas  $\gamma$ , dan lugar a los linfocitos T  $\gamma\delta$  (Janeway et al., 2001; Roitt et al., 2006; Gomez-Lucia et al., 2007; Yin et al., 2011). Estas cadenas poseen una fracción constante, con poca variabilidad entre los aminoácidos y una porción variable, que difiere mucho entre receptores, responsable de la unión a su antígeno. Además, el receptor TCR necesita de una segunda estructura, el complejo CD3 (marcador específico de los linfocitos T), que consta de la unión de varias cadenas para crear tres subunidades de señalización encargadas de transmitir las señales al interior de la célula para activarse e inducir proliferación.

Las células T juegan un papel crítico en la defensa del huésped contra infecciones por *S. aureus* (Cho et al., 2010). La activación de estas células, a través del reconocimiento de los antígenos específicos que posee la bacteria, son esenciales y necesarias para controlar las infecciones estafilocócicas cuando la infección ya está establecida (Ziegler et al., 2011). Cuando hay un déficit de estas células, como por ejemplo en personas afectadas con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), estas infecciones aparecen de forma recurrente (Popovich et al., 2010). Además, estudios realizados en ratones demostraron que los modelos con deficiencia en células T  $\alpha\beta$  tenían una mayor formación de abscesos y de neutrófilos defectuosos que los ratones normales (McLoughlin et al., 2006). Sin embargo, *S. aureus* ha desarrollado diferentes estrategias para interferir con la respuesta inmune adaptativa del hospedador. Puede alterar la función de los linfocitos T a través de varios mecanismos. Dispone de numerosos superantígenos para activar las células T (Lina et al., 2004; Parker et al., 2014). Tras la exposición a los superantígenos se activan un gran número de células T, llegando a niveles por encima de lo normal y provocando un estado hiporeactivo en los linfocitos T (Schwartz, 2003). Por tanto, la activación permanente de las células T debido a la presencia de antígenos estafilocócicos durante largo tiempo puede conducir a una respuesta inmunológica menor (Ziegler et al., 2011).

Otros mecanismos que actúan sobre los Linfocitos T, son las toxinas del síndrome de shock tóxico (TSST), que producen una alteración en el receptor de células T (TCR) y en la vía de activación (Llewelyn y Cohen, 2002), y la proteína adherente extracelular (EAP) que tiene capacidad para interferir con la presentación de antígenos mediada por el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (Lee et al., 2002).

Los **linfocitos T CD4<sup>+</sup>**, también conocidos como linfocitos colaboradores o Th (*helper*), son un subconjunto de células aparentemente bien definidos que dan lugar a un linaje

celular, aunque también son muy sensibles a señales ambientales que pueden modificarlos (Mucida y Cheroutre, 2010). Estas células son capaces de reconocer los antígenos presentados por las células presentadoras de antígeno (normalmente las células dendríticas) que están asociados al CMH de clase II. Existen varias subpoblaciones de linfocitos Th dependiendo de las señales recibidas y de los patrones de TCR: células Th0 que dan lugar a Th1, Th2, Th9 (Lu et al., 2012) y Th17 (Kemeny, 2012), además de otros subconjuntos funcionales incluyendo las células T de memoria.

Dentro de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> existe otra población importante, diferenciados en el timo, y que además de expresar el CD4 expresan el CD25 junto con el factor de transcripción FOXP3; son los linfocitos T CD25 reguladores (Treg) que están involucrados en el mantenimiento de la tolerancia periférica y en la prevención de las enfermedades autoinmunes. También son esenciales para la regulación de la respuesta inmune observados en la alergia, el trasplante, el cáncer y las enfermedades infecciosas (Siri et al., 2012; Whiteside et al., 2012).

Las células T CD4<sup>+</sup> juegan un papel muy importante en las infecciones por *S. aureus* ya que controlan la producción local de quimiocinas de tipo cis-x-cis (CXC), el reclutamiento de neutrófilos al sitio de la infección, y la replicación bacteriana posterior (McLoughlin et al., 2006). Son las células encargadas de controlar la patogénesis de la infección por *S. aureus* mediante la modulación de los niveles de neutrófilos (McLoughlin et al., 2006).

Los **linfocitos T CD8<sup>+</sup>** o citotóxicos (Tc), tienen como principal función eliminar las células infectadas por virus o células cancerosas (Gómez-Lucia et al., 2007). Las células Tc se activan al reconocer los péptidos unidos a moléculas del MHC de clase I o por las citoquinas liberadas por los linfocitos Th. Después de la activación, los linfocitos Tc se expanden debido a la IL-2 segregada por las células Th1, lo que aumenta el número de células efectoras contra un antígeno particular (Gómez-Lucia et al., 2007). Para ejercer su función citotóxica, liberan linfoxinas, que causan la lisis celular.

### **1.4.3. El sistema inmune del conejo**

El sistema inmune de los conejos tiene ciertas particularidades con respecto al resto de mamíferos. Los conejos, al nacer, son fisiológicamente inmaduros, no tienen pelo, no abren los ojos hasta los 10 días de vida y sus órganos linfoides no están completamente desarrollados (Sterzl y Silverstein, 1967).

En los fetos, el desarrollo de las células T se produce en el timo y las células B en el hígado fetal. En conejos, junto con el hígado fetal, hay otro órgano linfático primario, que pertenece al intestino, situado en el extremo del ciego. Es un apéndice vermiforme

responsable de la producción y maduración de las células B durante las primeras semanas de vida (Reynaud y Weill, 1996; Pospisil y Mage, 1998).

En los gazapos, el apéndice vermiforme desarrolla un papel principal como órgano linfático mientras que, en los animales en crecimiento, interviene en la inducción de respuestas inmunes específicas como un órgano linfático secundario (Drouet-Viard y Fortun-Lamothe, 2002). Las células B, que se diferencian en el apéndice en contacto con la flora intestinal, migran a otras partes del intestino, en particular a las placas de Peyer (Fuschiotti et al., 1997; Lanning et al., 2000). El apéndice es esencial para la diversificación del repertorio de anticuerpos y para el desarrollo del sistema inmunitario de la mucosa (Dasso y Howell, 1997; Vajdy et al., 1998).

Otro órgano secundario importante, exclusivo de los conejos, es una estructura anatómica situada en la última parte del íleon, el *sacculus rotundus*. Esta estructura intestinal contiene una gran cantidad de tejido linfoide y sus funciones son similares a otros MALTs: muestreo de antígenos del contenido intestinal (procedentes de la comida ingerida por los conejos) e identificación de antígenos patógenos, que requieren una respuesta inmune (como las bacterias nocivas) (Delaney-Johnson, 2006).

#### **1.4.4. Respuesta del sistema inmunitario frente a diferentes desafíos**

La salud del conejo es uno de los puntos más importantes a tener en cuenta en las granjas comerciales. Es importante determinar como los animales reaccionan a diferentes situaciones de estrés que pueden alterar su respuesta inmune. No solo las enfermedades actúan de forma negativa sobre la salud de las conejas, hay muchos otros puntos que se dan en la industria cunícola que pueden alterar la salud y la respuesta inmune de los animales, y por tanto alterar el carácter productivo de estos animales. El estrés por calor o las condiciones reproductivas a las que están sometidas las conejas, junto con las enfermedades infecciosas, son tres aspectos que pueden alterar la respuesta inmune y el estado de salud de estos animales, por eso en este apartado se quiere hacer una pequeña revisión sobre la respuesta inmune de los conejos frente a estos tres aspectos, siendo el último de ellos objeto de estudio en esta tesis.

La salud de los conejos se considera un pilar fundamental en la producción animal, que repercute directamente sobre la rentabilidad económica de las granjas cunícolas. Por ello, es muy importante caracterizar el sistema inmunológico de los animales y conocer cómo responde al enfrentarlo a determinadas situaciones de estrés, que suelen presentarse habitualmente en las granjas industriales, como temperaturas elevadas, diferentes modelos productivos o la aparición de patologías.

La mejora genética ha sido muy útil para fijar y optimizar diferentes caracteres productivos en los animales. No obstante, estas ventajas han conllevado el debilitamiento de otros factores fisiológicos e inmunológicos (Burkhart et al., 1983; Schinkel et al., 1999; Ravagnolo y Miztal, 2000; Rauw et al., 2002). La intensificación de la producción (facilitada por los programas de genética), el manejo reproductivo y los sistemas de alimentación podrían haber contribuido a un paulatino deterioro de la condición corporal de las hembras reproductoras, disminuyendo su vida útil y, en ocasiones, perjudicando su salud (Rosell y de la Fuente, 2009; Pascual, 2010).

En conejas, los programas de selección genética para los caracteres implicados en la reproducción se han centrado principalmente en mejorar el tamaño de camada (Pascual, 2010). Esto puede haber afectado a la capacidad de los conejos para responder a los desafíos inmunológicos (Ferrian et al., 2012). De hecho, en otras especies hay evidencia de que la capacidad inmunológica puede ser diferente en función del origen genético de los animales (Rauw et al., 1998; Siegel y Honaker, 2009).

#### **1.4.4.1. Desafío térmico**

La temperatura juega un papel importante en el bienestar animal y la salud. La relación entre la temperatura alta y la mortalidad está bien establecido en las personas que viven en zonas urbanas, pero ha sido poco investigado en el ganado (Crescio et al., 2010).

Los conejos son animales muy sensibles al estrés por calor (Castello, 1984; Finzi et al., 1994). Las temperaturas elevadas son capaces de producir una serie de cambios drásticos en las funciones biológicas que pueden traducirse en alteraciones productivas y reproductivas (Marai et al., 2002a, b; 2004).

En conejas comerciales, el estrés por calor se puede traducir en: una disminución en la tasa de concepción, alteración del desarrollo embrionario, disminución en el tamaño y peso de la camada y una mayor mortalidad pre y post-destete (Marai et al., 2002a).

En esta línea, nuestro grupo comparó las poblaciones linfocitarias de conejas seleccionadas por tamaño de camada al destete (Línea V) y de conejas seleccionadas por su longevidad reproductiva (Línea LP), sometidas a un estrés térmico (25° - 36°C). Los resultados obtenidos determinaron que en condiciones normales, los animales no mostraban diferencias entre sus poblaciones linfocitarias, mientras que en condiciones de estrés térmico se observó que las poblaciones de linfocitos totales y de linfocitos CD5<sup>+</sup> de la línea LP oscilaron a lo largo del experimento, mientras que en la línea V se mantuvieron invariables. Estos resultados pusieron de manifiesto que las conejas seleccionadas por su longevidad reproductiva mostraron la capacidad de modular sus

poblaciones linfocitarias bajo condiciones de estrés térmico, hecho que no ocurrió con el otro grupo (Ferrián et al., 2012).

#### **1.4.4.2. Desafío productivo**

En cunicultura industrial la intensificación de los ritmos reproductivos conducen a un aumento de los requisitos por parte de las conejas. Un déficit de estos puede afectar la condición corporal de los animales, la esperanza de vida y la salud general en la granja. Algunos trabajos sugieren un posible efecto del estado de salud de los animales con la aparición de problemas digestivos durante el período de crecimiento en sus lotes (Quevedo et al., 2003; García et al., 2005)

Tanto la reproducción (tamaño de la camada, la producción de leche, la fertilidad, etc.) como la supervivencia (salud, bienestar, vida útil, etc.) son situaciones que requieren un gran aporte energético. En los mamíferos, las reservas corporales están estrechamente implicadas en la reproducción y en el mantenimiento del animal y, por lo tanto, en la supervivencia (Theilgaard, 2006). Por lo que, la condición corporal de las conejas comerciales tiene un papel importante al abarcar la asociación entre la reproducción, la salud y la supervivencia, y por lo tanto puede ser un factor a tener en cuenta en los programas de selección genética (Pascual et al., 2013).

Se ha demostrado que conejas seleccionadas por su longevidad reproductiva (Sánchez, 2006) mostraron una mayor robustez y mayor capacidad para soportar retos medioambientales y productivos por la mayor capacidad a utilizar su mayor soma para superar situaciones exigentes (Theilgaard et al., 2007), frente a una línea seleccionada por tamaño de camada al destete. Este hecho podría explicar su mayor esperanza de vida en las granjas (Sánchez et al., 2008).

Por otra parte, se ha observado que el mantenimiento a lo largo de la vida productiva de la coneja con dietas pobres, junto a retrasos en el destete de las camadas (lactaciones prolongadas), pueden ocasionar un mayor desgaste fisiológico, con una disminución en la salud de las hembras reproductoras (Martínez-Vallespín et al., 2011). Para confirmar, bajo un punto de vista inmunológico, estos hallazgos, se compararon dos ritmos reproductivos diferentes: uno que consistía en un destete a 28 días post parto (dpp) y el otro a 42 dpp. Los resultados obtenidos evidenciaron que las hembras con destete más tardío (42 dpp) mostraron un número de linfocitos totales, CD5<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> menor, comparadas con las de destete a 28 dpp. Además, el número de linfocitos totales, B y CD5<sup>+</sup> en conejas de destete a los 42 dpp se correlacionó con su condición corporal (+0,60 a 0,82;  $P < 0,05$ ), contrariamente a lo observado en conejas de destete a los 28 dpp. Por tanto, se concluyó que una lactación prolongada puede llevar a padecer una

linfopenia, con una menor capacidad de modulación de las poblaciones linfocitarias durante el ciclo gestación - lactación de las madres (Guerrero et al., 2011).

#### **1.4.4.3. Desafío infeccioso**

Una forma común para simular o inducir desafíos inmunológicos es la infusión de lipopolisacárido (LPS) de la pared bacteriana de algunos patógenos, tales como *Escherichia coli* enteropatógena. El LPS bacteriano es capaz de inducir un estado séptico y producir la liberación de varias citoquinas pro-inflamatorias (Marca et al., 2009).

En conejos se han realizado numerosos estudios utilizando como producto infectivo LPS para estudiar la respuesta inmunológica que desencadena este patógeno bacteriano (Mashburn et al, 1984, Mackiewicz et al., 1988; Kimura et al., 1994; Mo et al., 1999; Shibata et al., 2005; Huang et al., 2008; Shao et al., 2011; Sitina et al., 2011).

Utilizando este tipo de infección nuestro equipo investigador participó en un estudio donde se infectaron conejas seleccionadas por distintos criterios productivos (longevidad y tamaño de la camada o el tamaño de la camada al destete), para evaluar la respuesta inmune frente al lipopolisacárido. Como conclusión se dedujo que el mejor estado corporal de las hembras antes de la infección, producía un impacto menos agudo del LPS (menor aumento de la temperatura rectal y menor liberación de glucosa a plasma) teniendo una mejor respuesta después de la inoculación de LPS a través de proteínas de fase aguda (Ferrian et al., 2013).

Las infecciones experimentales en conejos con *S. aureus* también son numerosas. En ocasiones, el conejo se emplea como modelo experimental para estudiar las infecciones estafilocócicas de otras especies, como en humanos (Kobayashi et al. 2011) o rumiantes (Adlam et al., 1976; Amorena et al., 1991). En otras ocasiones, los trabajos están enfocados al estudio de la patogenia de la enfermedad en el conejo. Así, se han realizado estudios para poder definir los niveles de células inflamatorias que genera esta bacteria tras una infección en piel (Reinoso et al., 2002), también se han realizado estudios experimentales para ver el desarrollo de los abscesos en la piel dependiendo del tipo de cepa infectiva (Meulemans et al., 2007) o estudiar la diferencia entre la respuesta aguda e hiperaguda producida por distintas cepas de *S. aureus* (Meulemans et al., 2011).



## **II. OBJETIVOS**



*Staphylococcus aureus* es un microorganismo versátil y oportunista capaz de persistir y multiplicarse en una gran variedad de ambientes y causar un amplio espectro de enfermedades tanto en humanos como en animales (Cucarella et al., 2004). En el caso de la cunicultura afecta a multitud de explotaciones (Corpa et al., 2009) involucrando a animales de diferentes edades, colonizando la piel, invadiendo el tejido subcutáneo (Okerman et al., 1984) y provocando diferentes patologías como dermatitis supurativas, mastitis, abscesos multisistémicos o pododermatitis, con una cierta predisposición según la edad de los animales (Hagen, 1963; Vancraeynest et al., 2004; Segura et al., 2007; Corpa et al., 2009). En el caso de las hembras reproductoras, las mastitis producidas por *S. aureus* se convierten en una de las principales causas de eliminación de las granjas (Segura et al., 2007; Rosell y de la Fuente, 2009). Sin embargo, existen escasos trabajos científicos donde se estudie con detalle y en profundidad la respuesta inmunológica a la infección estafilocócica.

**El primer objetivo de esta tesis doctoral es caracterizar las lesiones y relacionar las respuestas inmunes local y periférica, en casos naturales de mastitis estafilocócica.**

En la especie cunícola se han identificado varios genotipos de *S. aureus*, aislados de diferentes tipos de lesiones, siendo la cepa A1/II1/δ (ST121) la más extendida (Viana et al., 2007). A partir de los años 80, del siglo XX, se describieron biotipos de alta virulencia como los responsables de graves problemas por toda Europa (Vancraeynest et al., 2006a). Estas cepas de *S. aureus* muestran una divergencia genética en factores de virulencia específica para cada genotipo, observándose cómo un mismo genotipo puede producir diversos tipos de lesión y cómo un mismo individuo puede estar colonizado por distintas cepas de *S. aureus* (Viana et al., 2011). A pesar de que todas las cepas de *S. aureus* se aíslan de lesiones naturales, las cepas aisladas de conejo se clasifican tradicionalmente en cepas “poco virulentas”, que afectan a un número reducido de conejos, y cepas “muy virulentas”, que causan una elevada morbilidad y mortalidad en las granjas (Hagen, 1963; Okerman et al., 1984; Holliman y Girvan, 1986; Hermans et al., 1999). Sin embargo, hasta la fecha no se ha podido conocer qué factor o factores relacionados con la bacteria pueden ser los responsables de esta diferente virulencia. Por otra parte, los factores relacionados con el hospedador y que pueden predisponer a sufrir una infección por *S. aureus* están poco caracterizados (Gordon y Lowy, 2008).

**En el segundo objetivo se pretende establecer una relación entre las respuestas inmunes local y periférica, en casos naturales de mastitis estafilocócica, con las cepas de *S. aureus* que las provocan.**

El estudio de las fases iniciales de la infección estafilocócica se ve facilitado por la realización de infecciones experimentales. En la bibliografía consultada son numerosos

los estudios donde, en distintas especies animales, se inocula esta bacteria (Marples y Kligman, 1975; Adlam et al., 1976; Leitner et al., 2000; Cremonesi et al., 2012). Aunque las concentraciones de los inóculos utilizados son variables, en el caso de las infecciones realizadas en conejos suelen ser muy elevadas. Amorera et al. (1991), utilizaron un inóculo de  $5 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias (ufc), debido a que empleando concentraciones inferiores no provocaban mastitis. En otro estudio reciente, en piel de conejos, emplearon concentraciones de  $10^4$ ,  $10^6$  y  $10^8$  ufc donde únicamente en el caso de la más elevada llegaban a producir abscesos subcutáneos (Meulemans, 2011). Estas elevadas dosis provocan lesiones severas pero se alejan de lo que debe ocurrir en la naturaleza, donde un número muy reducido de bacterias debe invadir el organismo y establecerse una lucha con su sistema inmune. De hecho Adlam et al. (1976) curiosamente señalan que las cepas apatógenas, en la naturaleza, se vuelven patógenas en el laboratorio, cuando realizan infecciones experimentales a elevadas dosis infectivas.

Por ese motivo, **el tercer objetivo de este trabajo es desarrollar un modelo de infección a bajas dosis con *S. aureus*** para intentar simular, en la medida de lo posible, las condiciones de infección naturales.

El hecho de que tradicionalmente se hayan utilizado elevadas dosis infectivas en conejos, empleando cepas de *S. aureus* procedentes de otras especies animales, y que se haya utilizado esta especie animal como modelo experimental extrapolable a otras especies, como la ovina o la bovina (Adlam et al., 1976; Amorera et al., 1991), ha generado ciertas incongruencias en cuanto a las lesiones ocasionadas. Por ello, con el **cuarto objetivo se pretende describir pormenorizadamente las lesiones provocadas en glándula mamaria tras una infección experimental por *S. aureus***. Y en el **quinto objetivo, caracterizar las lesiones y relacionar las respuestas inmunes local y periférica, en casos experimentales de mastitis estafilocócica**. Finalmente, en el **sexto objetivo se pretende comparar la respuesta inmune y las lesiones desarrolladas por las conejas infectadas de forma natural y experimental**.

### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**



### **3.1. Mastitis naturales**

#### **3.1.1. Animales y granjas**

En este trabajo se estudiaron 345 conejas adultas con mastitis supurativas crónicas, procedentes de 27 granjas comerciales, 22 de la Comunidad Valenciana, 2 de la provincia de Barcelona y 3 de la provincia de Albacete.

#### **3.1.2. Estudios mediante citometría de flujo**

Con el fin de poder evaluar la respuesta inmune periférica y así poder conseguir parte de los objetivos uno, dos y seis planteados en esta tesis, se realizó un estudio de las poblaciones leucocitarias a través de la citometría de flujo, en las 345 conejas que sufrían mastitis estafilocócica.

Se obtuvieron muestras de sangre de la arteria central de la oreja utilizando catéteres intravenosos de calibre 24 G (0,7mm), recogidas por goteo en tubos con ácido etilaminotetraacético (EDTA) de 1 mL, para evitar su coagulación. Las muestras se tomaron aproximadamente a la misma hora de la mañana, para minimizar la influencia de los ritmos circadianos, procesándose antes de una hora tras su extracción.

En primer lugar, se realizó un recuento de poblaciones sanguíneas totales y se obtuvo el porcentaje de leucocitos de cada muestra utilizando para ello un contador celular (MEK-6410, Nihon Kohden, Japón). Después de mezclar la sangre volteando el tubo con cuidado para no producir lisis celular, se pipetearon 50 µL de sangre entera en tubos de polipropileno para citometría de flujo. Se añadieron los anticuerpos primarios monoclonales (**Tabla 1**), siguiendo las recomendaciones del fabricante, y fueron incubadas durante 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Los leucocitos fueron aislados tras lisar los eritrocitos añadiendo 1 mL de solución de lisis de cloruro de amonio (8'02 g NH<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>, 0'84 g NaHCO<sub>3</sub> y 0'37 g EDTA por litro de agua bidestilada autoclavada). Después de una incubación de 5 minutos en oscuridad, las muestras fueron centrifugadas a 400 g durante 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se eliminó cuidadosamente y el pellet fue lavado con 1 mL de fosfato salino tamponado (PBS). Después de otro lavado (tal como se ha descrito anteriormente), se añadieron los anticuerpos secundarios (Rat anti-mouse IgG2a+b Phycoerythrin [VMRD, Inc. α-exalpha] y Goat anti-mouse IgM: R-Phycoerythrin –human adsorbed- [AbDSerotec]). Éstos fueron incubados durante 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, se añadió 1 mL de PBS, obteniendo las suspensiones de leucocitos finales. Estas muestras fueron analizadas mediante un citómetro de flujo, utilizando el modelo Cytomics FC500 (Beckman Coulter, Brea, CA). Se diseñó un protocolo de adquisición de datos específico para leucocitos de conejos utilizando el software CXP (Beckman Coulter, Brea, CA). La

expresión del antígeno leucocitario común CD14<sup>+</sup> y CD45<sup>+</sup> se utilizó para ajustar la zona de estudio linfocitaria (“lymphogate”), como describieron Jeklova et al. (2007). Las áreas de estudio de cada tipo leucocitario se ajustaron con un control isotipo negativo. Todas las muestras fueron procesadas por duplicado.

**Tabla 1:** Anticuerpos monoclonales utilizados en citometría de flujo para la identificación de las diferentes poblaciones y subpoblaciones linfocitarias.

Anticuerpos	Especificidad	Marcaje celular	Clon	Referencias	Compañía
Mouse anti-rabbit T lymphocytes: FITC <sup>*</sup>	CD5	Células T	KEN-5	Kotani et al., 1993a	AbdSerotec
Mouse anti-rabbit α-pan B	IgM	Células B	MRB143A	Davis y Hamilton, 2008	VMRD, Inc.
Mouse anti-rabbit CD4	CD4	Subpoblación de células T	KEN-4	Kotani et al., 1993a	AbdSerotec
Mouse anti-rabbit α- CD8	CD8	Subpoblación de células T	ISC27A	Davis and Hamilton, 2008	VMRD, Inc.
Mouse anti-rabbit CD25	CD25	Células T activadas	KEI-α1	Kotani et al., 1993b	AbdSerotec
Mouse anti-human CD14: FITC	CD14	Monocitos y granulocitos	TÜK 4	Jacobsen et al., 1993	AbdSerotec
Mouse anti-rabbit α- CD45	CD45	Todos los leucocitos	ISC76A	Davis y Hamilton, 2008	VMRD, Inc.

\*El clon KEN-5 reconoce los linfocitos T de conejo e inmunoprecipitados, pero no se une a los CD5 transfectantes. Los anticuerpos CD5 conocidos de conejo también se pueden unir a la mayoría de linfocitos B, que no son marcados por este clon (información proporcionada por el fabricante).

### 3.1.3. Estudios histopatológicos

Una vez realizada la citometría, y con el fin de poder abordar parcialmente el objetivo uno expuesto en esta tesis, se procedió al sacrificio de los animales mediante una sobredosis intravenosa de barbitúrico (Dolethal®). Se les realizó la necropsia de forma sistemática, completa y ordenada y se tomaron muestras de las glándulas mamarias afectadas, así como de todos aquellos tejidos lesionados.

Las muestras de tejido se conservaron en formol tamponado al 10% (Panreac) para su fijación, manteniéndose un máximo de 36 horas, tras las cuáles se procedió a su tallado. Las muestras, una vez talladas, se incluyeron en parafina mediante un procesador automático de tejidos (Histolab ZX-110), en el que las muestras fueron deshidratadas, mediante sucesivos pases por alcoholes en gradación creciente y xilol puro (Panreac), y finalmente incluidas en parafina con un punto de fusión de 58°C (Panreac). El montaje definitivo de los bloques se realizó en una unidad formadora de bloques (MYR 2500-III). De cada uno de los bloques se obtuvieron secciones de 3 μm de grosor mediante un microtomo de rotación (Microm HM 310), utilizando cuchillas desechables (Accu-Edge,

LPB). Las secciones fueron recogidas en portaobjetos de cristal (Marienfelb, Alemania) y secadas durante, al menos, 24 horas en una estufa a 37°C. Posteriormente se realizó la técnica convencional de tinción de Hematoxilina-Eosina (Panreac) y la tinción de Gram (Diaphad) para diagnosticar bacterias del tipo Gram-positivas. La observación de las muestras se realizó en un microscopio óptico (Nikon Eclipse E600) y las fotografías se tomaron con cámara digital (Nikon DXM 1200).

La clasificación de las mastitis se realizó en función a sus características histomorfológicas en todos aquellos animales que, tras el estudio microbiológico, resultaron ser positivos para *S. aureus*. Para ello, se siguieron criterios previamente establecidos por nuestro grupo (Viana et al., 2011), definiéndose 4 tipos diferentes de mastitis: mastitis tipo absceso, mastitis supurativa con patrón lobulillar, mastitis tipo celulitis y mastitis mixta.

Las **mastitis tipo absceso** se caracterizaron por presentar uno o varios abscesos de tamaño variable. En función del grado de delimitación de los abscesos se clasificaron, a su vez, en abscesos compactos, no compactos y no encapsulados. Los *abscesos compactos* se caracterizaron por estar delimitados por una gruesa cápsula fibrosa; los *abscesos no compactos* por estar rodeados de una delgada cápsula fibrosa, infiltrada por células inflamatorias; y los *abscesos no encapsulados* por no presentar tejido conjuntivo alrededor del absceso.

Las **mastitis supurativas con patrón lobulillar** se caracterizaron por presentar áreas de inflamación supurativa, no encapsuladas, que afectaban a los lobulillos mamarios, provocando la necrosis de las células epiteliales de los alveolos mamarios.

Las **mastitis tipo celulitis** se caracterizaron porque la inflamación se localizaba normalmente entre la piel y la glándula mamaria, rodeándola. En estos casos la glándula mamaria podía mostrar una inflamación moderada (celulitis incompleta) o, si la inflamación rodeaba completamente a la mama, se desencadenaba una necrosis por coagulación (celulitis completa).

Las **mastitis tipo mixta** presentaron características comunes a las mastitis tipo absceso y celulitis.

Para poder realizar un estudio más detallado de las poblaciones leucocitarias estudiadas, en función del tipo de lesión que aparecía, se realizaron otras dos clasificaciones, basadas en la patogenia del proceso inflamatorio. Una primera clasificación que pretendía describir de forma subjetiva y en función de sus características histológicas, el nivel de control del absceso por parte del hospedador evaluado, de forma subjetiva,

según las características histológicas de las mastitis, y una segunda que describía el nivel de propagación de la lesión.

En el nivel de control se incluyeron todas las lesiones con características compatibles de absceso, así en dicho análisis se incluyeron los abscesos compactos, los abscesos no compactos y los abscesos no encapsulados. Este último grupo englobó también a las mastitis supurativas con patrón lobulillar. Aunque las mastitis supurativas con patrón lobulillar presentaron mayor número de focos de necrosis que los abscesos no encapsulados, al igual que en estos últimos los focos de necrosis no estaban rodeados de tejido conjuntivo.

El nivel de propagación de la lesión se creó en función de la diseminación de la lesión, estableciéndose tres niveles:

1. Lesiones unifocales (cuando sólo aparecía un foco de necrosis).
2. Lesiones multifocales (cuando aparecía más de un foco de necrosis).
3. Lesiones con patrón lobulillar (áreas de necrosis rodeadas de pequeños focos satélites de necrosis, correspondientes a las mastitis supurativas con patrón lobulillar).

#### **3.1.4. Estudios inmunohistoquímicos**

Para poder cumplir el objetivo uno y parte del objetivo dos y seis de esta tesis se realizó un estudio de la respuesta inmune local, se tiñeron, mediante técnicas inmunohistoquímicas, los linfocitos T y B, células plasmáticas y macrófagos de 89 muestras procedentes de las glándulas mamarias infectadas con *S. aureus*, seleccionándolas en función de la cepa bacteriana que mostraban.

Las secciones de tejido empleadas en este estudio, tras procesarse de forma similar a lo descrito en el punto anterior, se recogieron en portaobjetos tratados con polysine® (Menzel-Glaser, Alemania) y tras secarse durante, al menos, 24 horas a 37°C, se desparafinaron e hidrataron para después sumergirlas en una solución de buffer citrato 10 mM (pH 6,0) (Biogenex). Se sometieron a calor y presión durante 20 minutos (Decloaking Chamber, Biocare); tras dejar enfriar durante 20 minutos más, las muestras se lavaron con agua destilada durante 5 minutos (2 veces) y luego con solución salina tamponada con Tris y Tween 20 (TBST) (Dako) durante otros 5 minutos (2 veces). Posteriormente se pasaron a una solución de peróxido de hidrógeno (Fisher Scientific) al 3% durante 10 minutos, para bloquear la acción de la peroxidasa endógena. Transcurrido este tiempo, se lavaron nuevamente con agua destilada y TBST, como en el paso anterior, y se les añadió 200 µL de solución de bloqueo preparado con 10 mL de TBS-albúmina más 3 gotas de suero de caballo (ABC Kit, ATOM, pk-6102), dejándolas durante

10 minutos a 37 °C. Pasado este tiempo, y sin lavar, se aplicaron 250 µL del anticuerpo primario correspondiente (**Tabla 2**). Al finalizar el proceso de incubación con el anticuerpo primario se lavaron durante 8 minutos con TBST, a temperatura ambiente, para aplicar 250 µL de anticuerpo secundario (**Tabla 2**), durante 20 minutos a 37°C. De nuevo, se lavaron con TBST durante 8 minutos a temperatura ambiente, para posteriormente aplicar 250 µL de la solución Vectastain® Elite ABC (Vector), también durante 20 minutos a 37°C. Tras lavar con TBST durante 8 minutos a temperatura ambiente, se aplicaron 250 µL de Nova Red substrate Chromogen (revelador), durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se lavaron las muestras dos veces con agua destilada y se tiñeron durante 2 minutos con Hematoxilina de Mayer's, realizándose el color mediante la aplicación, durante un minuto, de una solución tamponada (Shandon Bluing Reagent®, Richard-Allan Scientific).

La positividad estuvo caracterizada por la coloración marrón-rojiza del citoplasma de las células en estudio. En cada prueba se utilizó un control positivo (nódulo linfático) y un control negativo (una sección del tejido en estudio en el que se sustituyó el anticuerpo primario por suero no inmune). El cómputo de células positivas se llevó a cabo mediante el programa de análisis de imagen NIS-Elements D 2.30 (Nikon), realizando un recuento de 20 campos alrededor de la zona de necrosis, a 400 aumentos, lo que supuso una superficie de 1.6 mm<sup>2</sup>.

**Tabla 2:** Anticuerpos utilizados en los estudios inmunohistoquímicos para la identificación de las diferentes poblaciones y subpoblaciones linfocitarias.

Anticuerpo primario (Dilución)	Casa comercial	Anticuerpo secundario	Casa comercial	Reactividad	Tiempo de incubación del anticuerpo primario (Temperatura)
CD79αcy (HM57) (1:50)	Dako, M7051	anti-mouse IgG	Vectastain® Elite ABC (Vector)	Linfocitos B	1 hora (37°C)
CD3 (1:10)	UC Davis	anti-rat IgG (H+L)	Vectastain® Elite ABC (Vector)	Linfocitos T	Toda noche (4°C)
RAM11 (1:100)	LabVision Corporation	anti-mouse IgG	Vectastain® Elite ABC (Vector)	Macrófagos	1 hora (37°C)
Anti-rabbit IgG:HRP (1:100)	Stressgen, SAB-300	Conjugado primario		Células plasmáticas	1 hora (37°C)

### 3.1.5. Caracterización de las cepas de *S. aureus*

Con el fin de poder conocer la relación entre la respuesta inmune periférica y local con respecto a las cepas de *S. aureus* que las provocan y poder así, conseguir el objetivo dos de esta tesis, se realizó la caracterización genotípica de las cepas de *S. aureus* que provocaban la lesión.

En la totalidad de las mamas afectadas se obtuvieron muestras de material purulento, mediante torundas estériles, para su posterior estudio microbiológico. Las muestras se sembraron en placas de agar sangre y se dejaron a 37°C, durante aproximadamente 24 horas, para verificar que las características que mostraban las colonias eran compatibles con *S. aureus* (colonias blancas o amarillentas, con bordes bien definidos).

La presencia de *S. aureus* se confirmó mediante un genotipado específico para la bacteria. Para ello, se realizó la purificación del ADN genómico, siguiendo los métodos utilizados habitualmente en la bibliografía para extracción de ADN de los microorganismos Gram-positivos (Sambrook et al., 1989). Para la obtención de ADN genómico se inoculó un tubo estéril con medio TSB (caldo de triptona y soja, Scharlau) a partir de una única colonia del aislado y se dejó crecer a 37°C durante una noche. El ADN cromosomal de *S. aureus* se extrajo mediante el kit Genelute Bacteril Genomic DNA (Sigma), siguiendo el protocolo del fabricante, excepto por la adición de 12,5 µg/mL de lisostafina durante una hora a 37°C antes de la purificación del ADN para lisar la pared celular. Posteriormente, se realizó el tipado molecular basado en el análisis de la amplificación de las regiones polimórficas de los genes *coa*, *spa* y *clfB* de forma análoga al método utilizado por Viana et al. (2007). Para ello se utilizó un termociclador modelo TechneProgene. La mezcla de reacción contenía 2 mM de ión Mg<sup>2+</sup>, 200 µM de cada uno de los nucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP. Amersham Pharmacia), 200 nM de cada uno de los cebadores, 0,5 unidades de ADN polimerasa (Netzyme), 40 a 80 ng de ADN purificado y agua hasta un volumen final de 25 µL.

La amplificación mediante PCR del gen de la coagulasa se realizó utilizando los oligonucleótidos *coa*-1m y *coa*-2c (**Tabla 3**). Las condiciones de PCR consistieron en una etapa de desnaturalización inicial a 94°C durante 4 minutos, seguida de 30 ciclos a 94°C durante 20 segundos, 57°C durante 15 segundos y 72°C durante 50 segundos, con una etapa final a 72°C durante 5 minutos.

Para la amplificación mediante PCR del gen de la proteína A se utilizaron los oligonucleótidos *spa* -1m y *spa* -2c (**Tabla 3**). Las condiciones de PCR consistieron en una etapa de desnaturalización inicial a 94°C durante 4 minutos, seguida de 40 ciclos a 94°C durante 20 segundos, 50°C durante 20 segundos y 72°C durante 90 segundos, con una etapa final a 72°C durante 5 minutos.

Por último, para amplificar la región variable del gen *clfB* se emplearon los oligonucleótidos *clfB*-1m y *clfB*-2c (**Tabla 3**). Las condiciones de PCR consistieron en una etapa de desnaturalización inicial a 94°C durante 4 minutos, seguida de 35 ciclos a 94°C durante 20 segundos, 56°C durante 20 segundos y 72°C durante 60 segundos, con una etapa final a 72°C durante 5 minutos.

**Tabla 3:** Oligonucleótidos empleados en la caracterización de las cepas de *S. aureus*.

Cebadores	Secuencia (5'-3')	Programa PCR
coa-1m	ATA GAG ATG CTG GTA CAG G	94°C 4'; 30 (94°C 20'', 57°C
coa-2c	GCT TCC GAT TGT TCG ATG C	15'', 72°C 50''); 72°C 5'
spa-1m	GAT TTT AGT ATT GCA ATA CAT AAT TCG	94°C 4'; 40 (94°C 20'', 50°C
spa-2c	CCA CCA AAT ACA GTT GTA CCG	20'', 72°C 90''); 72°C 5'
clfB-1m	CAG CAG TAA ATC CGA AAG ACC C	94°C 4'; 35 (94°C 20'', 56°C
clfB-2c	CAC CTT TAG GAT TTG ATG GTG C	20'', 72°C 60''); 72°C 5'

Una alícuota de 5 µL del producto de PCR de cada gen fue analizada por electroforesis en un gel de agarosa (Molecular Netline, Need) al 2% en presencia de bromuro de etidio (Mercury, EEUU) y fueron fotografiados bajo luz UV.

Posteriormente, después de analizar los productos de PCR de los genes de la coagulasa y proteína A, se realizó un análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción de dichos genes (Hookey et al., 1998) Para ello, aproximadamente 500 ng del producto de PCR precipitado con etanol/acetato se digirieron con 5 U del enzima de restricción *CfoI* (Roche) a 37°C durante 2 horas. El resultado de la digestión se analizó por electroforesis en un gel de agarosa (Molecular Netline, Need) al 3% en presencia de bromuro de etidio (Mercury, EEUU) y fueron fotografiados bajo luz UV.

La combinación de tamaños obtenidos antes y después de la digestión de cada uno de los genes sirvió para definir los distintos patrones o tipos.

Los genotipos o cepas determinados por los genes *coa/spa/clfB* se identificaron mediante un código alfabético (latino y griego) y uno numérico (arábigo y romano). La identificación de cada genotipo se compuso de dos pares de signos: una letra latina y un número arábigo para el producto de PCR del gen *coa* y el resultado de su digestión respectivamente, un número romano y un número arábigo para el producto de PCR del gen *spa* y el resultado de su digestión respectivamente, y finalmente, una letra del alfabeto griego para el producto de PCR del gen *clfB* (Viana et al., 2007).

Adicionalmente, como complemento, se realizó una comparación entre la caracterización genotípica basada en los genes *coa*, *spa* y *clfB* y otro método de tipado denominado

Multilocus Sequence Typing (MLST) (Enright et al., 2000). Este método permite discernir entre diferentes líneas clonales mediante la detección de variaciones en siete locus o genes polimórficos. Se llevó a cabo la amplificación mediante PCR de siete genes que codifican para enzimas metabólicos (“house keeping genes”): *arc* (Carbamate kinase), *aro* (Shikimate dehydrogenase), *glp* (Glycerol kinase), *gmk* (Guanylate kinase), *pta* (Phosphate acetyltransferase), *tpi* (Triosephosphate isomerase) e *yqi* (Acetyl coenzyme A acetyltransferase). Los productos de PCR se purificaron y se secuenciaron mediante secuenciación clásica. Como resultado se obtuvieron cada una de las secuencias de los *loci*, pudiéndolas comparar con las ya existentes en la base de datos centralizada “saureus.mlst.net”, obteniendo un perfil alélico o secuencia tipo (ST). Las condiciones de PCR así como la secuencia de cebadores se encuentran disponibles en la página web saureus.mlst.net.

### 3.1.6. Análisis estadístico

Como se ha explicado con anterioridad, con el objetivo de comprender mejor la patogenia de las mastitis se agruparon algunas de las lesiones anteriormente descritas para su estudio estadístico. Por una parte, se asumió que los abscesos encapsulados constituían un proceso más controlado y organizado, al menos histológicamente, que los abscesos no compactos y más aún que los abscesos no encapsulados. En esta última categoría se incluyeron también, las mastitis supurativas con patrón lobulillar ya que histológicamente aparentaban lesiones en expansión y, por lo tanto, aparentemente sin control. Igualmente se estudiaron los diferentes tipos lesionales en función de su diseminación, clasificando las lesiones en unifocales, cuando sólo aparecía un foco de necrosis, o multifocales, cuando aparecía más de un foco de necrosis. Las mastitis tipo celulitis fueron excluidas de los estudios de control y diseminación al no tratarse de mastitis puras propiamente dichas. Los datos de los parámetros controlados mediante inmunohistoquímica se analizaron con el procedimiento GLM del Statistical Analysis System (SAS, 2009). Se utilizó un modelo inicial que sólo incluyó un efecto fijo, el tipo de lesión (absceso compacto, absceso no compacto, absceso no encapsulado, mastitis supurativa con patrón lobulillar, celulitis, celulitis con mastitis necrotizante y mixta). Las variables se presentan como medias por mínimos cuadrados (del inglés, least-square means (lsmeans)) seguidas por sus errores estándar. La comparación de las lsmeans se realizó mediante una prueba de t-Student. Por otra parte se utilizó otro modelo, que incluyó como efectos fijos el nivel de control del absceso (compacto, no compacto y no encapsulado), y el nivel de difusión de la lesión (patrón unifocal, multifocal y lobulillar) para determinar contrastes de interés. Los contrastes entre niveles de control o difusión se obtuvieron como A-B, evaluando su diferencia significativa respecto a0 ( $P < 0,05$ ).

Los datos relativos a las poblaciones de linfocitos obtenidos por citometría de flujo no seguían una distribución normal, por lo que se aplicó una transformación a  $\log_{10}$  antes de usar el análisis por el procedimiento GLM de SAS (2009). Un modelo inicial incluyó como efecto fijo el tipo de lesión (compacto, no compacto, no encapsulado, mastitis supurativa con patrón lobulillar, sólo celulitis, celulitis con mastitis necrotizante y mixta). Las variables se presentan como lsmeans seguidas por sus errores estándar, y la comparación de lsmeans se realizó mediante una prueba de t de Student. De nuevo, se utilizó otro modelo que incluía como efectos fijos el nivel de control del absceso (compacto, no compacto y no encapsulado), el nivel de difusión de la lesión (patrón unifocal, multifocal y lobulillar) y la secuencia tipo de *S. aureus* (121 y 96) para realizar de contraste de interés. En dicho caso debido a la transformación logarítmica los contrastes entre niveles de control o difusión dieron lugar a una tasa  $A/B = 10^{\log_{10}(a/b)} = 10^{[\log_{10}(a) - \log_{10}(b)]}$ , evaluando su diferencia significativa respecto a 1 ( $P < 0,05$ ).

Con el fin de testar la posible relación entre los parámetros de inmunohistoquímica analizados en la lesión, y las poblaciones de linfocitos por citometría de flujo de la sangre periférica, se obtuvieron coeficientes de correlación de Pearson ( $\rho$ ) usando PROC CORR de SAS (2009).

## **3.2. Mastitis experimentales**

### **3.2.1. Animales**

Para llevar a cabo el protocolo de infección experimental en la glándula mamaria se utilizaron 89 conejas múltiparas en lactación, de las cuales 65 se destinaron para realizar y poner a punto el protocolo experimental y el resto (24 animales) se utilizaron para realizar el estudio experimental definitivo.

El protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Bienestar Animal de la Universidad CEU Cardenal Herrera (Referencia 11/003), cumpliendo así con el R.D. 1201/2005 sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

### **3.2.2. Cepas y dosis infectivas utilizadas**

Con el fin de poder desarrollar un modelo de infección en glándula mamaria a bajas dosis infectivas con *S. aureus* (objetivo tres de esta tesis) se realizaron, para decidir el número más apropiado de ufc empleadas en el inóculo experimental final, tres experimentos preliminares, en los que se llevó a cabo un estudio macroscópico y microscópico de las mamas infectadas utilizando cepas ST121 y ST96.

Se realizaron infecciones con dosis crecientes de bacterias, tal y como se describe en el apartado siguiente (3.2.3), con cada una de las cepas (**Tabla 4**).

**Tabla 4:** Número de animales empleados en la puesta a punto de las infecciones experimentales según la cepa y la dosis de *S. aureus* empleada.

	100 ufc	1.000 ufc	10.000 ufc	TOTAL
<b>ST121</b>	11	10	10	31
<b>ST96</b>	11	13	10	34
<b>TOTAL</b>	22	23	20	65

### 3.2.3. Preparación del inóculo

Para realizar los inóculos, se cultivaron cinco colonias de cada cepa (ST121 y ST96) en dos matraces con 5 mL de TSB cada uno, dejándolas crecer a 37°C durante 6 horas. Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS para eliminar todos los productos bacterianos. Por último, se calculó la concentración final de 100, 1.000 y 10.000 ufc en 100 µL, midiendo la absorbancia de una dilución 1/10 (DO<sub>600nm</sub>) y aplicando la fórmula:  $DO_{600nm} \times 4,9 \times 10^9 = \text{ufc/ml}$ .

El inóculo se empleaba inmediatamente después de su preparación, realizándose un cultivo del mismo en TSA para comprobar su concentración bacteriana.

### 3.2.4. Protocolo de infección

El protocolo de infección experimental se basó en protocolos de infecciones previamente descritos en la bibliografía, con algunas modificaciones (Adlam et al., 1976; Amorena et al., 1991).

Las glándulas mamarias se desinfectaron previamente a la inoculación, con clorhexidina al 2%, y se extrajo una muestra de leche para su posterior cultivo microbiológico y confirmar la ausencia de *S. aureus*.

Las conejas se infectaron dos días después del parto, manteniendo a los gazapos con la madre. La inoculación se efectuó con una aguja hipodérmica (25G) en la base del pezón de la segunda mama izquierda, con un ángulo de 45°, con el objetivo de introducir el inóculo en el seno del pezón. En los animales empleados como control negativo se introdujeron 100 µL de PBS estéril, siguiendo la misma metodología.

Tras la infección, se valoró el estado general de cada animal, la temperatura rectal y la evolución macroscópica de la inflamación de la glándula mamaria cada 24 horas durante 6 días. Las conejas se sacrificaron el séptimo día post infección como se describe en el apartado 3.1.3.

### **3.2.5. Estudios mediante citometría de flujo**

Con el fin de evaluar la respuesta inmune periférica, planteada en el objetivo cinco y seis de esta tesis, se realizaron estudios de las poblaciones leucocitarias mediante citometría de flujo, siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.1.2.

Las muestras se tomaron antes de la inoculación de la bacteria (día 0) y cada 24 horas post infección durante 6 días, tomándose a la misma hora para minimizar la influencia de los ritmos circadianos.

### **3.2.6. Estudios histopatológicos**

Tras el sacrificio, se realizó la necropsia de los animales de forma sistemática, completa y ordenada. Con este estudio histopatológico se abordó el objetivo cuatro y seis planteados en esta tesis. Para ello se tomaron muestras de las glándulas mamarias inoculadas para clasificar histomorfológicamente las lesiones y poder estudiar el objetivo cuatro propuesto, de forma similar a lo descrito en el apartado 3.1.3.

### **3.2.7. Estudios inmunohistoquímicos**

Para poder estudiar la respuesta inmune local, y poder así esclarecer el objetivo cinco y seis de esta tesis, se realizaron estudios inmunohistoquímicos siguiendo el mismo procedimiento que en los casos de mamitis de campo descritos en el apartado 3.1.4.

### **3.2.8. Estudios microbiológicos**

Tras el sacrificio de los animales, una vez finalizada la toma de muestras y el tiempo del experimento, se tomaron muestras con hisopos de las mamas infectadas para corroborar la persistencia de las bacterias inoculadas en el tejido mamario. Las muestras de los hisopos se sembraron en agar sangre a 37°C durante 48 horas. De las bacterias que se aislaron se realizó un tipado molecular, del mismo modo que el descrito en el apartado 3.1.5 para confirmar que eran las cepas inoculadas en cada caso.

### **3.2.9. Análisis estadístico**

Para analizar la evolución de la temperatura corporal y poblaciones de leucocitos en la sangre de conejo durante la infección, se ha utilizado un modelo mixto (PROC MIXED; SAS, 2002), de acuerdo con un diseño de medidas repetidas, que tiene en cuenta la variación entre los animales y la covarianza dentro de ellos. Las estructuras de covarianza fueron comparadas objetivamente utilizando los criterios más severos (criterio bayesiano de Schwarz), según lo sugerido por Littell et al., (1998). El modelo incluyó como efectos fijos, la cepa inoculada (placebo, ST 96 y ST121), los días después de la

infección (dpi) (0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 dpi), su interacción y el lote (1 y 2). En el modelo se incluyó como términos aleatorios efecto permanente del animal ( $\rho$ ) y el término de error ( $e$ ). Las variables se presentaron como lsmeans con sus errores estándar a través de gráficos de barras. Se realizó un análisis de contrastes para evaluar el efecto de cada cepa (cuándo era diferente al valor antes de la infección), las diferencias entre las cepas (cuándo eran diferentes en cada día después de la infección) y el contraste de la cepa ST121 respecto a las otras [cepa 121 - (0,5 Control + 0,5 cepa 96)].

El modelo utilizado para analizar los datos de los leucocitos en el estudio de inmunohistoquímica realizado al final del desafío fue un modelo lineal generalizado (PROC GLM; SAS, 2002) que incluyó la cepa inoculada (placebo, ST96 y ST121) y los lotes (1 y 2) como efectos fijos. Las variables se presentaron como lsmeans seguidas por sus errores estándar.

Por último, para estudiar la relación entre el recuento de las poblaciones leucocitarias de la sangre (en el día de sacrificio o en diferentes días dependiendo de cuándo aparece macroscópicamente la mastitis) y el recuento de leucocitos observados mediante inmunohistoquímica en la glándula mamaria de las conejas, se obtuvieron coeficientes de correlación de Pearson ( $\rho$ ) usando el PROC CORR del SAS (2002).

### **3.3. Análisis mediante PCR de factores de virulencia bacterianos**

Con la finalidad de estudiar los posibles factores de virulencia de cada cepa se examinaron, mediante PCR, un total de 30 cepas de *S. aureus*, en las que se analizaron 34 determinantes bacterianos de los más comunes dentro de las cepas de *S. aureus*, de los cuales 30 eran factores de virulencia de la bacteria y cuatro eran genes reguladores accesorios (*agr*).

La secuencia de cebadores, las condiciones del termociclador, los controles positivos y las referencias se resumen en la **Tabla 5**. Para el diseño de los cebadores se emplearon secuencias disponibles en el GenBank y se obtuvieron de Invitrogen.

En cada amplificación se usaron 100 ng de ADN, 100 pmol de cada cebador, 200  $\mu$ M (de cada) de deoxinucleosidotrifosfato (dATP, dGTP, dCTP, y dTTP), 1X buffer (Netzyme), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, y 1 U de ADN polimerasa termoestable (Netzyme). Se añadió agua hasta un volumen final de 25  $\mu$ L. Para determinar el tamaño del producto de PCR se analizaron 5  $\mu$ L por electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

Como controles positivos de los diferentes determinantes bacterianos se emplearon las siguientes cepas: Newman (Duthie y Lorenz, 1952), NCTC 8325 (Novick, 1967), MSSA476 (Holden et al., 2004), RF122 (Fitzgerald et al., 2000), N315 (Kuroda et al.,

2001), V329 (Cucarella et al., 2001), COL (Gill et al., 2005), FRI1151m (Jaulhac et al., 1991), FRI326 (Jaulhac et al., 1991), RN6390 (Peng et al., 1988), RN6734 (Vojtov et al., 2002), RN6607 (Ji et al., 1997), RN8465 (Ji et al., 1997), RN4850 (Jarraud et al., 2000) y la cepa 2020, un aislado humano proporcionado por el laboratorio de J.R. Fitzgerald.

**Tabla 5:** Determinantes bacterianos examinados en este estudio. Cebadores y programas de PCR para la amplificación de los genes.

Cebador	Secuencia (5'-3')	Control +	PCR <sup>a</sup>	Referencia
<i>ClfA</i>				
clfA-1m	GTA GGT ACG TTA ATC GGT T	Newman	1	Peacock et al., 2002
clfA-2c	CTC ATC AGG TTG TTC AGG			
<i>FnbA</i>				
fnbA-1m	CAC AAC CAG CAA ATA TAG	8325	2	Peacock et al., 2002
fnbA-2c	CTG TGT GGT AAT CAA TGT C			
<i>FnbB</i>				
fnbB-1m	GTA ACA GCT AAT GGT CGA ATT GAT ACT	8325	4	Tristan et al., 2003
fnbB-2c	CAA GTT CG ATA GGA GTA CTA TGT TC			
<i>Cna</i>				
cna-1m	AGT GGT TAC TAA TAC TG	MSSA-476	2	Peacock et al., 2002
cna-2c	CAG GAT AGA TTG GTT TA			
<i>SdrC</i>				
sdrC-1m	ACG ACT ATT AAA CCA AGA AC	Newman	3	Peacock et al., 2002
sdrC-2c	GTA CTT GAA ATA AGC GGT TG			
<i>SdrD</i>				
sdrD-1m	GGA AAT AAA GTT GAA GTT TC	Newman	3	Peacock et al., 2002
sdrD-2c	ACT TTG TCA TCA ACT GTA AT			
<i>SdrE</i>				
sdrE-1m	ATC AAG TAC TCA AAA ACA GC	Newman	3	Viana, 2011
sdrE-2c	TGG CTT GTT TCT TTA CCT GC			
<i>icaA</i>				
icaA-1m	CCA GAA AAT TCC TCA CCC GTA TTAG	N315	4	Viana, 2011
icaA-2c	GTG TCT GAC TTC GCT TTA ATA CAG CC			
<i>Tst</i>				
tsst-1m	CTA ATC AAA TAA TCA AAA CTG C	N315	3	Viana, 2011
tsst-2c	TTT CCA ATA ACC ACC CGT TT			
<i>Sea</i>				
sea-1m	AAA GTC CCG ATC AAT TTA TGG CTA	MSSA-476	4	Akineden et al., 2001
sea-2c	GTA ATT AAC CGA AGG TTC TGT AGA			
<i>Seb</i>				
seb-1m	TCG CAT CAA ACT GAC AAA CG	COL	4	Akineden et al., 2001
seb-2c	GCA GGT ACT CTA TAA GTG CC			
<i>Sec</i>				
sec-1m	GAC ATA AAA GCT AGG AAT TT	N315	4	Akineden et al., 2001
sec-2c	AAA TCG GAT TAA CAT TAT CC			
<i>Sed</i>				
sed-1m	CTA GTT TGG TAA TAT CTC CT	FRI1151m	4	Akineden et al., 2001
sed-2c	TAA TGC TAT ATC TTA TAG GG			
<i>See</i>				
see-1m	TAG ATA AGG TTA AAA CAA GC	FRI326	4	Akineden et al., 2001
see-2c	TAA CTT ACC GTG GAC CCT TC			
<i>Seg</i>				
seg-1m	AAT TAT GTG AAT GCT CAA CCC GAT C	N315	4	Akineden et al., 2001
seg-2c	AAA CTT ATA TGG AAC AAA AGG TAC TAG TTC			
<i>Seh</i>				
seh-1m	CAA TCA CAT CAT ATG CGA AAG CAG	MSSA-476	4	Akineden et al., 2001
seh-2c	CAT CTA CCC AAA CAT TAG CAC C			
<i>Sei</i>				
sei-1m	CTC AAG GTG ATA TTG GTG TAG G	N315	4	Akineden et al., 2001
sei-2c	AAA AAA CTT ACA GGC AGT CCA TCT C			
<i>Selk</i>				
selk-1m	ATG GCG GAG TCA CAG CTA CT	COL	4	Holtfreter et al., 2004
selk-2c	TGC CGT TAT GTC CAT AAA TGT T			

<i>Sell</i>					
sell-1m	CAC CAG AAT CAC ACC GCT TA	N315	4	Holtfreter et al., 2004	
sell-2c	TCC CCT TAT CAA AAC CGC TAT				
<i>Selm</i>					
selm-1m	CTA TTA ATC TTT GGG TTA ATG GAG AAC	N315	4	Jarraud et al., 2001	
selm-2c	TTC AGT TTC GAC AGT TTT GTT GTC AT				
<i>Seln</i>					
seln-1m	ACG TGG CAA TTA GAC GAG TC	N315	4	Jarraud et al., 2001	
seln-2c	GAT TGA TCT TGA TGA TTA TGA G				
<i>Selo</i>					
selo-1m	GAG AGT TTG TGT AAG AAG TCA AGT G	N315	4	Smyth et al., 2005	
selo-2c	GAT TCT TTA TGC TCC GAA TGA GAA				
<i>Selu</i>					
selu-1m	TAA AAT AAA TGG CTC TAA AAT TGA TGG	N315	4	Letertre et al., 2003	
selu-2c	ATC CGC TGA AAA ATA GCA TTG AT				
<i>Eta</i>					
eta-1m	CTA GTG CAT TTG TTA TTC AA	2020	4	Akineden et al., 2001	
eta-2c	TGC ATT GAC ACC ATA GTA CT				
<i>Etb</i>					
etb-1m	ACG CGT ATA TAC ATT CAA TT	2020	4	Akineden et al., 2001	
etb-2c	TCC ATC GAT AAT ATA CCT AA				
<i>lukS,F-PV</i>					
pvl-1m	ATC ATT AGG TAA AAT GTC TGG ACA TGA TCC	RN6390	4	Lina et al., 1999	
pvl-2c	A GCA TCA AGT GTA TTG GAT AGC AAA AGC				
<i>Hlg</i>					
hlg-1m	GCC AAT CCG TTA TTA GAA AAT GC	Newman	4	Lina et al., 1999	
hlg-2c	CCA TAG ACG TAG CAA CGG AT				
<i>SspA</i>					
ssp-1m	CAA GTG CTG CAG GTC AAG TTG	COL	4	Viana, 2011	
ssp-2c	CCG TGC GTA GCA TCT ACG ACG TG				
<i>cap5</i>					
cap5-1m	CAT AAT TCG AGG GTT TGG TC	Newman	4	Viana, 2011	
cap5-2c	CTA ATT GCC GCT GGA ACT GCC				
<i>cap8</i>					
cap8-1m	GTT TGG TCT TGT TAT TTG TGG	RF122	4	Viana, 2011	
cap8-2c	CTT CTA ACG AAT GAC TCT TCC G				
<i>AgrI</i>					
agrI-1m	CAC TTA TCA TCA AAG AGC C	RN6734	3	Strommenger et al., 2004	
agrI-2c	CCA CTA ATT ATA GCT GG				
<i>AgrII</i>					
agrII-1m	GTA GAG CCG TAT TGA TTC	RN6607	3	Strommenger et al., 2004	
agrII-2c	GTA TTT CAT CTC TTT AAG G				
<i>AgrIII</i>					
agrIII-1m	TAT ATA AAT TGT GAT TTT TTA TTG	RN8465	3	Peacock et al., 2002	
agrIII-2c	TTC TTT AAG AGT AAA TTG AGA A				
<i>AgrIV</i>					
agrIV-1m	GTT GCT TCT TAT AGT ACA ATG TT	RN4850	3	Peacock et al., 2002	
agrIV-2c	CTT AAA AAT ATA GTG ATT CCA ATA				

Programa PCR <sup>a</sup>: **1:** 94°C durante 3 min; 35 ciclos de 94°C durante 30 s, 45°C durante 30 s, y 72°C durante 120 s; 72°C durante 5 min. **2:** 94°C durante 3 min; 35 ciclos de 94°C durante 30 s, 50°C durante 30 s, y 72°C durante 120 s; 72°C durante 5 min. **3:** 94°C durante 3 min; 35 ciclos de 94°C durante 30 s, 50°C durante 30 s, y 72°C durante 60 s; 72°C durante 5 min. **4:** 94°C durante 3 min; 35 ciclos de 94°C durante 30 s, 55°C durante 30 s, y 72°C durante 60 s; 72°C durante 5 min.

### **3.4. Análisis mediante Southern blot de factores de virulencia bacterianos**

Los resultados obtenidos mediante PCR fueron corroborados mediante el análisis Southern blot. Para la hibridación Southern blot se digirió el ADN mediante 5 U del enzima de restricción *HindIII* (Roche) a 37°C durante toda la noche. Tras someter el ADN digerido a electroforesis en gel de agarosa, se realizó un proceso de depurinización en medio ácido (HCl 0,25 M) y se transfirió a membranas de nylon cargadas positivamente

(Hybond-N; 0.45 mm pore-sizefilters; Amersham LifeScience) utilizando el método de capilaridad inversa en medio alcalino (NaOH 0,4 M) (Sambrook et al., 1989). La hibridación de la sonda y el ADN se puso de manifiesto según el protocolo proporcionado por el kit PCR- digoxigenina DNA-labeling y por detección de quimioluminiscencia (Roche).

Todas las sondas utilizadas en este estudio fueron marcadas con digoxigenina al mismo tiempo que se sintetizaban por PCR. Para ello se sustituyó parte del dTTP por dUTP - digoxigenina (Roche Molecular Biochemicals), de forma que la concentración final fue 200  $\mu$ M de dATP, dCTP y dGTP, 190  $\mu$ M de dTTP y 10  $\mu$ M de dUTP-digoxigenina. Las sondas se desnaturalizaron por calor antes de cada uso. La detección se realizó con un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina que se reveló por quimioluminiscencia, utilizando como sustrato CSPD-ready-to-use<sup>®</sup> (Roche Molecular Biochemicals).



## **IV. RESULTADOS**



## **4.1. Mastitis naturales**

Durante los cuatro años que duró este trabajo se analizaron 345 conejas que mostraban mastitis purulentas. Una vez realizados los análisis microbiológicos oportunos se obtuvo que de las 345 mastitis, en 223 casos se aisló *S. aureus* de la glándula mamaria. De los 107 animales restantes, 87 mostraron colonias con características compatibles con *Pasteurella spp* y en 35 casos, el cultivo en agar sangre resultó ser negativo para este método.

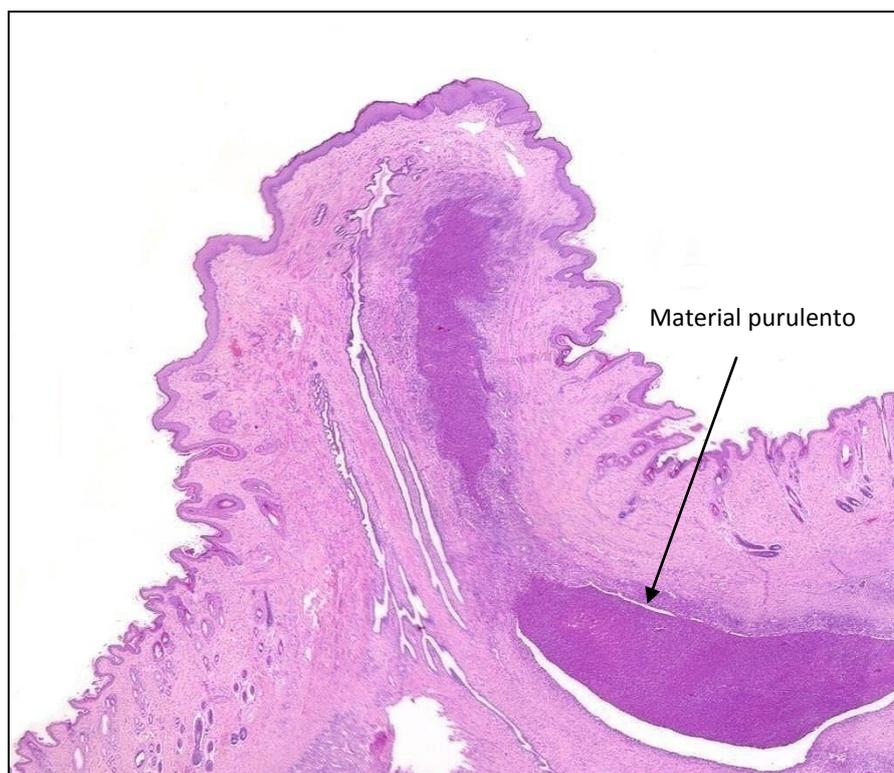
En la necropsia de los animales positivos a *S. aureus*, se contabilizaron además, 66 casos de animales con pododermatitis o mal de patas, 20 animales con parásitos intestinales (*Passalurus ambiguus*) y otros hallazgos en menor número, como ascitis o neumonías.

De los 223 animales con mastitis por *S. aureus*, se seleccionaron 204 casos para un estudio molecular e histopatológico completo, descartándose los animales que provenían de granjas con un número bajo de mastitis estafilocócicas, donde se obtuvieron casos individuales. A continuación, se muestra la caracterización y clasificación histopatológica de los 204 casos de mastitis naturales producidas por *S. aureus* aisladas de 22 granjas cunícolas.

### **4.1.1. Caracterización y clasificación histopatológica de mastitis naturales producidas por *S. aureus***

Macroscópicamente, en los 204 animales seleccionados, las mamas afectadas aparecieron aumentadas de tamaño, enrojecidas y de consistencia firme. Al corte de las mismas, destacaba la presencia de material purulento. En ocasiones aparecían lesiones en la piel que facilitaban que este contenido purulento saliera al exterior.

Microscópicamente, lo más característico fue encontrar gran cantidad de células inflamatorias. Era por lo tanto, frecuente observar heterófilos alrededor de todo el tejido afectado, sobre todo dentro de los espacios alveolares y también invadiendo el tejido sano adyacente a la lesión. Los macrófagos también fueron células muy numerosas que sobre todo solían aparecer rodeando los focos de material necrótico y restos celulares. Este material necrótico podía detectarse tanto en el tejido de la glándula mamaria, propiamente dicho, como en los senos galactóforos (**Figura 12**). Otras células que aparecían en gran número, infiltrando el intersticio, eran linfocitos y células plasmáticas. También fue frecuente encontrar la presencia de bacterias, agrupadas en las zonas de necrosis.



**Figura 12:** Pezón con material purulento en el interior de los conductos galactóforos, presencia de células redondas y heterófilos en el tejido intersticial. H&E

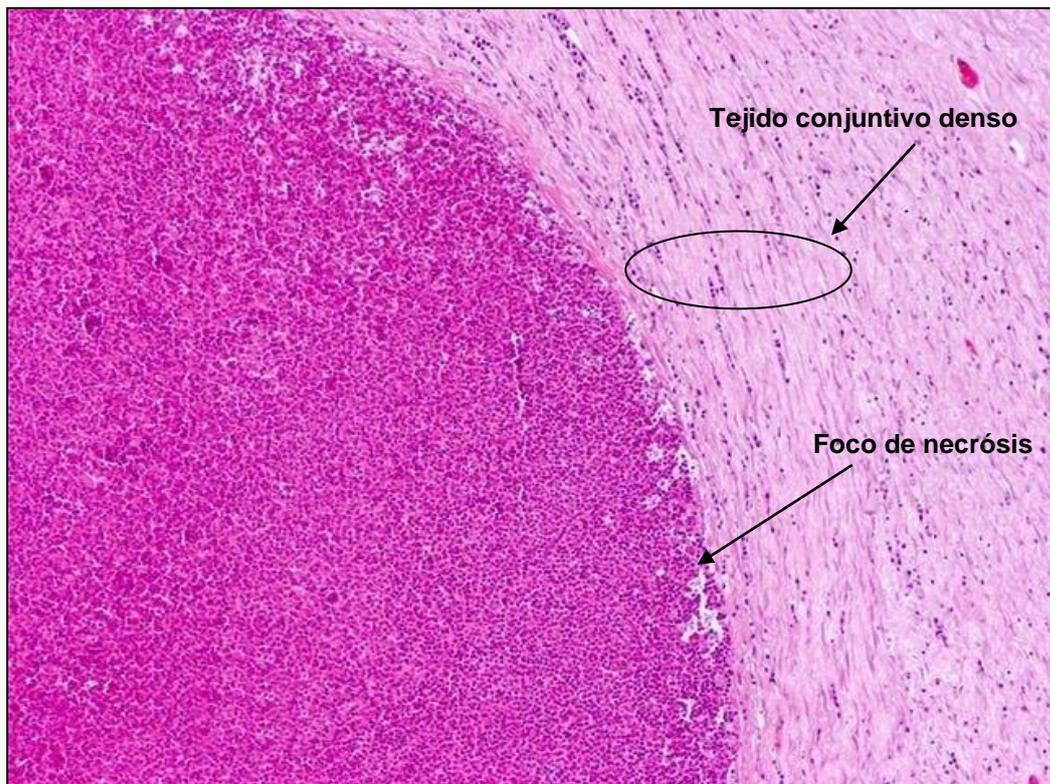
Dependiendo de las características microscópicas que presentaban las lesiones se definieron cuatro tipos diferentes de mastitis: mastitis tipo abscesos, mastitis supurativa con patrón lobulillar, mastitis tipo celulitis y mastitis tipo mixto.

#### 4.1.1.1. Mastitis tipo abscesos

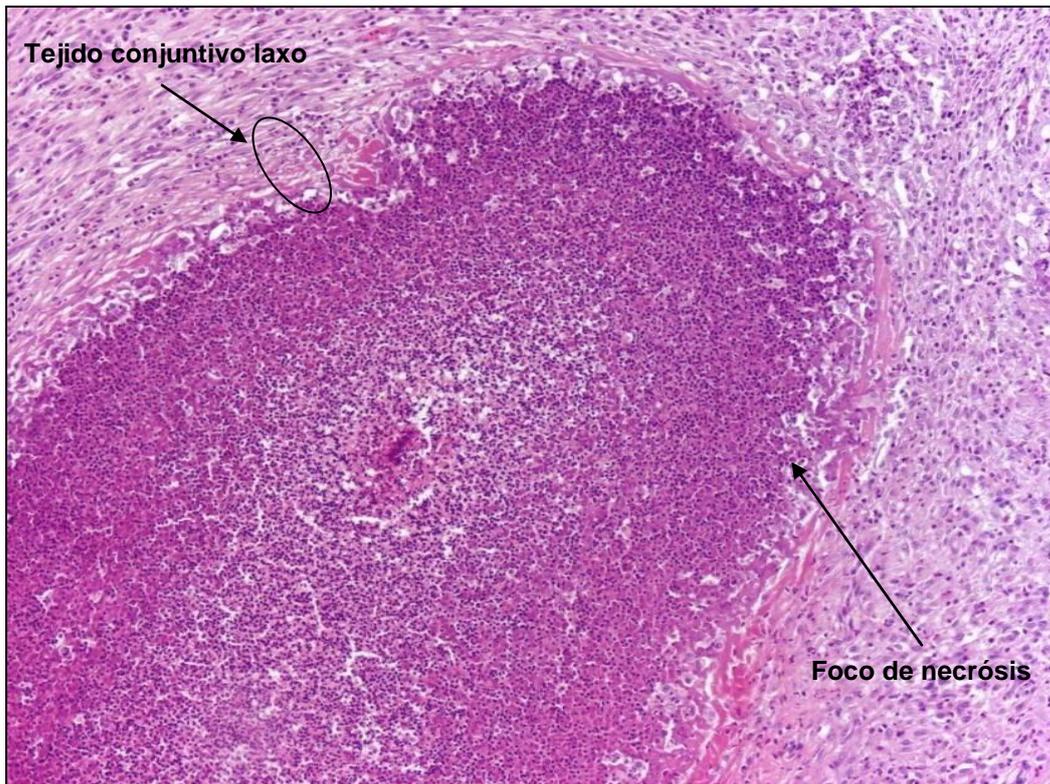
Este tipo de mastitis fue la más frecuente, observándose en 97 casos de los 204 animales (47,55%). De estos 97 casos, en 82 aparecían varios abscesos de diferente tamaño y en 15 casos, se trataba de un único absceso. Dentro de las mastitis tipo abscesos se hizo una segunda clasificación en base al tipo de tejido conjuntivo que rodeaba los focos necróticos. En 29 casos, se vio que los abscesos estaban bien delimitados por una gruesa cápsula fibrosa, con abundante tejido conjuntivo denso y maduro, con fibras muy unidas entre sí, formando una barrera de separación muy gruesa entre el material necrótico y el tejido adyacente (**Figura 13**). Sin embargo, en 52 casos, el tejido conjuntivo que rodeaba los abscesos no era tan compacto, la cápsula parecía estar formada por un tejido conjuntivo más laxo, con fibras más separadas entre sí, infiltradas por linfocitos, células plasmáticas, macrófagos, fibroblastos y vasos sanguíneos hiperémicos (**Figura 14**). En base a esto se definieron 2 tipos de mastitis, las **mastitis tipo abscesos encapsulados compactos** (si mostraba una cápsula fibrosa compacta y gruesa) o **mastitis tipo absceso encapsulado no compacto** (cuando presentaba una cápsula conjuntiva laxa infiltrada por células inflamatorias).

En los 16 casos restantes, los abscesos no presentaban cápsula, el material necrótico aparecía rodeado de una banda eosinófila de necrosis aguda en su cara interna (**Figura 15**). Estas mastitis se clasificaron como **mastitis tipo abscesos no encapsulados**. En este tipo de mastitis, fue frecuente ver en la zona central de los focos necróticos, abundantes bacterias Gram-positivas.

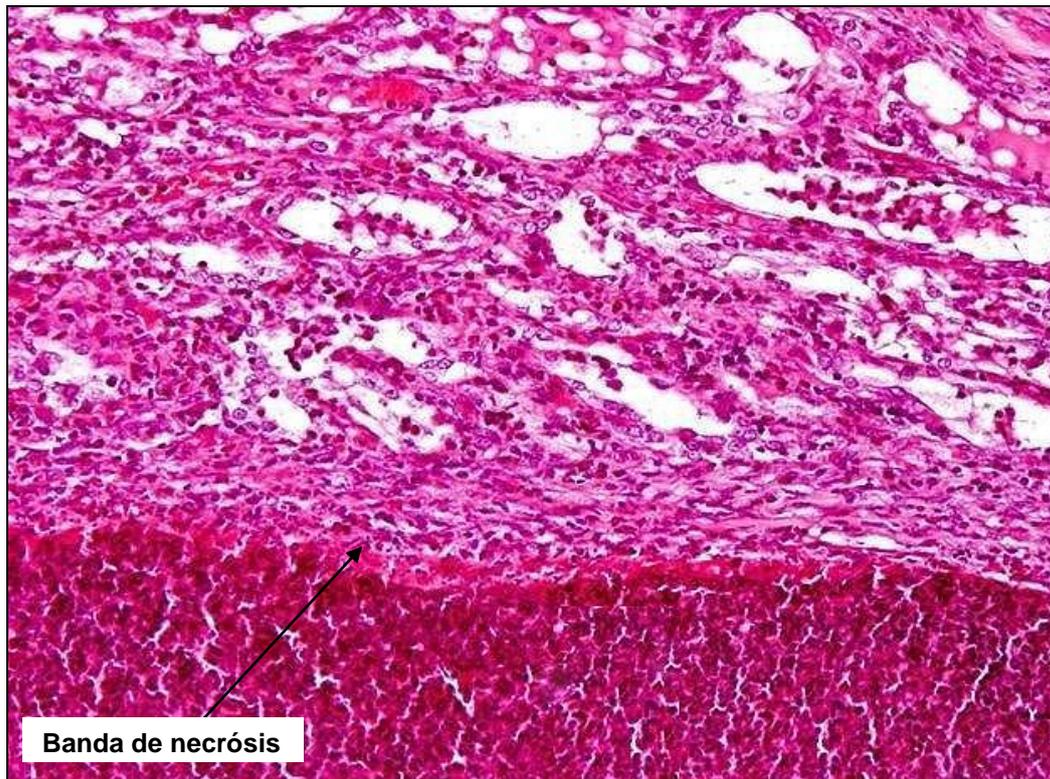
El tejido que rodeaba los abscesos aparecía atrófico, infiltrado por abundante tejido fibroso. Las luces de los alveolos mamarios aparecían disminuidas de tamaño y ocluidas por heterófilos y macrófagos. Otras características comunes entre los tres tipos de abscesos fue la presencia de hiperemia, hemorragias y formación de neovasos.



**Figura 13:** Absceso encapsulado compacto rodeado por una densa capa de tejido conjuntivo.H&E.



**Figura 14:** Absceso encapsulado no compacto, rodeado de tejido conjuntivo laxo. .H&E



**Figura 15:** Absceso no encapsulado delimitado por una fina banda eosinófila de necrosis aguda en su cara interna. . H&E

#### 4.1.1.2. Mastitis supurativa con patrón lobulillar

Este tipo de mastitis, al igual que las mastitis tipo absceso no encapsulado, se caracterizaba por la aparición de áreas de necrosis no delimitadas por una banda de tejido conjuntivo. La diferencia entre un tipo u otro fue que, en este caso, en la periferia de las áreas de material necrótico aparecían otros focos secundarios más pequeños, como si fueran zonas satélites de las anteriores, delimitados por el propio epitelio alveolar, en diferentes fases de necrosis (**Figura 16**). Esos focos satélites presentaban gran cantidad de heterófilos y macrófagos. El tejido intersticial que los rodeaba presentaba también gran cantidad de heterófilos y, en menor medida, un infiltrado linfoplasmocitario difuso. Como en el tipo descrito anteriormente, cuando la inflamación progresaba hacia la periferia, también pudo observarse infiltrado inflamatorio en la dermis y el tejido subcutáneo. Este tipo de lesión se observó en 14 animales (6,86%).

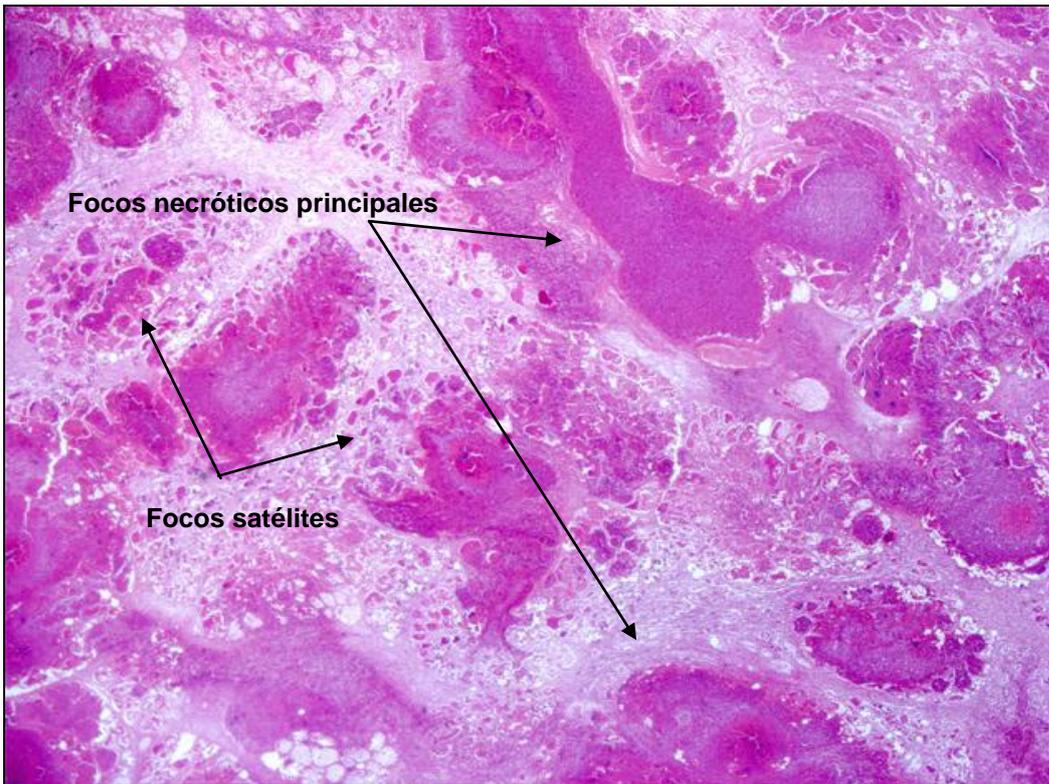
#### 4.1.1.3. Mastitis tipo celulitis

En contraste a los grupos vistos anteriormente, este tipo de lesión se caracterizó por presentar una gran inflamación que rodeaba al tejido mamario, apareciendo histológicamente una gruesa banda basófila de necrosis que separaba el tejido mamario de la piel. Esta necrosis podía abarcar el tejido subcutáneo e incluso afectar a la capa muscular. Lo habitual era que la glándula mamaria propiamente dicha no estuviera afectada de forma directa, sino indirecta, debido a la acumulación de material purulento entre el tejido subcutáneo y el tejido glandular. Este tipo de mastitis se observó en 63 de los 204 animales (30,88%).

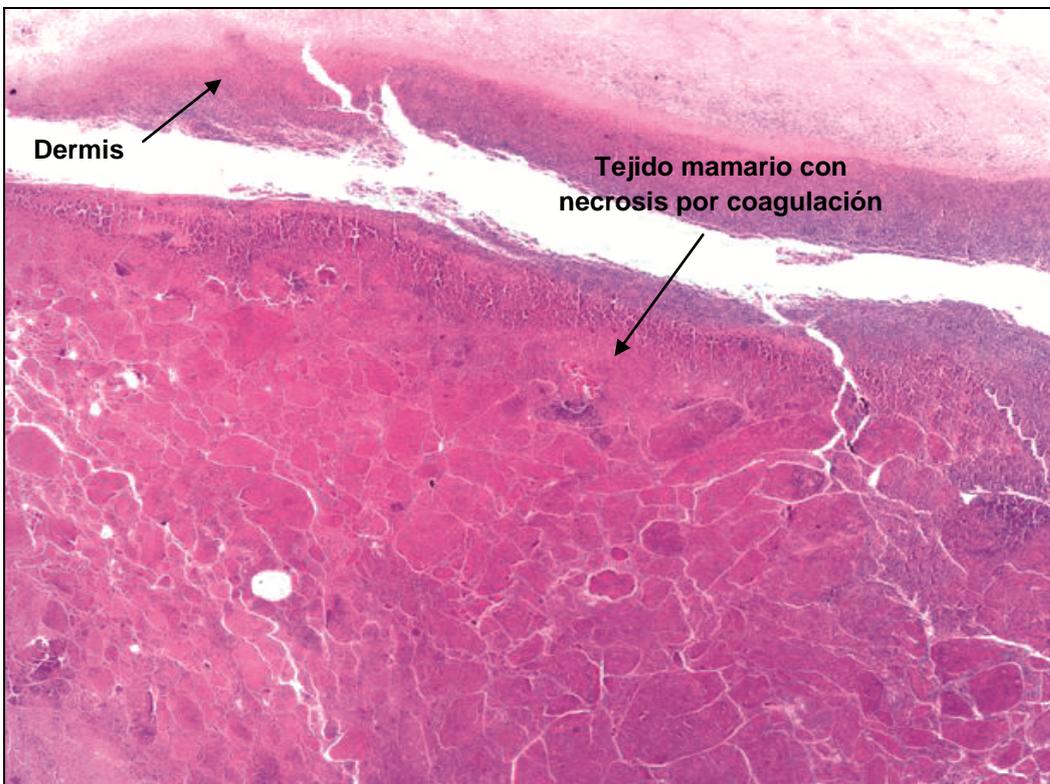
Treinta y seis de estos casos presentaban una **celulitis con mastitis necrotizante (Figura 17)** que se caracterizaba por una necrosis por coagulación donde las células del tejido mamario carecían de núcleo, tan solo aparecía la estructura característica del tejido mamario, y estaban acompañadas de abundantes bacterias Gram-positivas.

En los 27 casos restantes la mama propiamente dicha únicamente apareció afectada ligeramente, sobre todo en la periferia, o bien, con un infiltrado intersticial linfoplasmocitario o heterofílico, y la luz de los alveolos con abundantes heterófilos. Este tipo de lesión se clasificó como **celulitis (Figura 18)**.

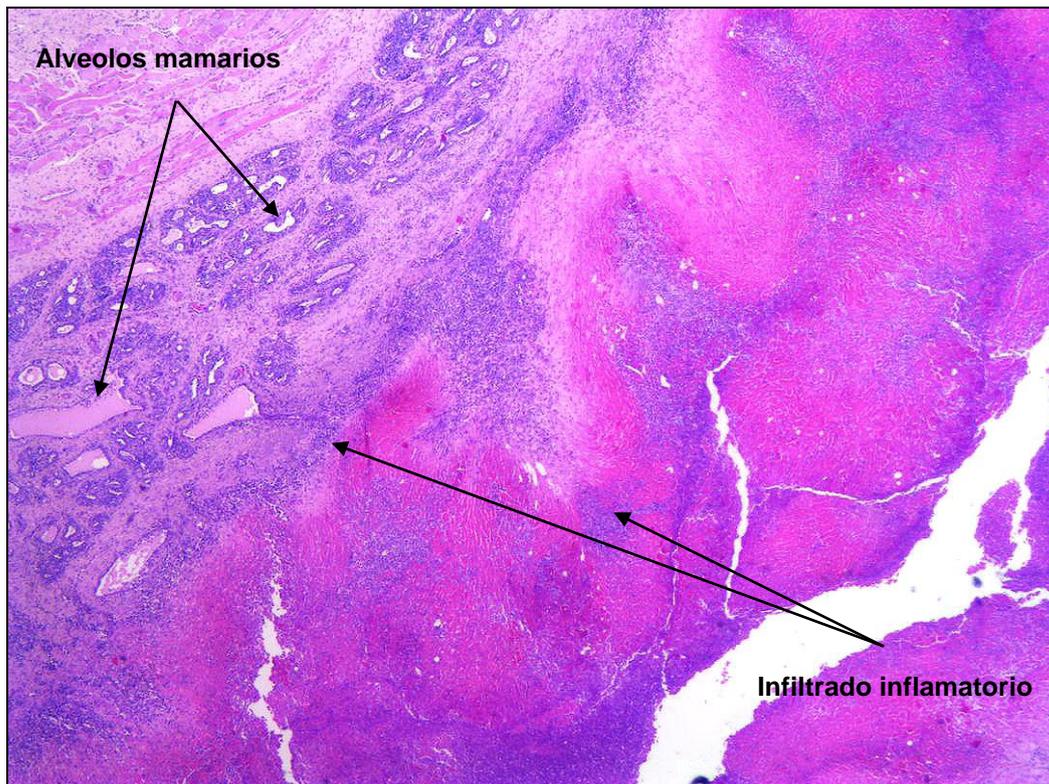
En general, tanto en un caso como en otro, el infiltrado celular estaba compuesto de heterófilos, macrófagos y células plasmáticas.



**Figura 16:** Mastitis supurativa con patrón lobulillar, donde se observan grandes áreas de necrosis por licuefacción rodeados por pequeños focos de necrosis, afectando a los alvéolos mamarios. H&E.



**Figura 17:** Celulitis con mastitis necrotizante. Se observa separación entre la dermis y el tejido mamario debido a la zona de inflamación severa. El tejido mamario presenta necrosis por coagulación. H&E.



**Figura 18:** Mastitis tipo celulitis. Se observa un infiltrado inflamatorio severo perimamario que comprime el tejido mamario, pero sin provocar necrosis por coagulación en el mismo. H&E.

#### 4.1.1.4. Mastitis tipo mixta

En 30 casos, las glándulas mamarias estudiadas presentaban características histopatológicas de dos de los tipos descritos anteriormente en diferentes combinaciones. En 17 casos se observaron características tanto de abscesos compactos como de mastitis supurativa con patrón lobulillar. De estos 17, en diez predominó la mastitis supurativa con patrón lobulillar y en siete, el absceso tipo compacto. En 11 casos aparecieron simultáneamente características de la mastitis tipo celulitis y abscesos no compactos. De éstos, en siete predominó la lesión tipo celulitis y en cuatro el absceso no compacto. Por último, en dos ocasiones se observó tanto características típicas de abscesos no encapsulados como de celulitis, predominando en ambos casos los abscesos no encapsulados.

En la **Tabla 6** se muestra un resumen del número de casos obtenido para cada tipo de mastitis.

#### 4.1.1.5. Otros hallazgos histopatológicos.

Otros hallazgos observados en las glándulas mamarias analizadas fue la presencia de células gigantes multinucleadas, principalmente relacionadas con material mineralizado y *corpora amilacea*. Estas células se observaron en 33 casos: en 15 mastitis tipo abscesos

(4 abscesos compactos, 6 no compactos y 5 no encapsulados), en 14 mastitis tipo celulitis (3 casos de celulitis sin necrosis por coagulación y en 11 casos con ella) y en 4 casos de mastitis mixtas (1 con predominio del tipo celulitis, al igual que del tipo absceso compacto y 2 con predominio del patrón lobulillar). También se detectó la presencia de leche dentro de la luz de los alveolos en 94 casos: 42 de ellos en mastitis tipo absceso (11 abscesos compactos, 24 abscesos no compactos y 7 abscesos no encapsulados), 33 en mastitis tipo celulitis (11 celulitis sin necrosis por coagulación y 22 con ella), 5 en mastitis con patrón lobulillar y 14 en mastitis mixtas.

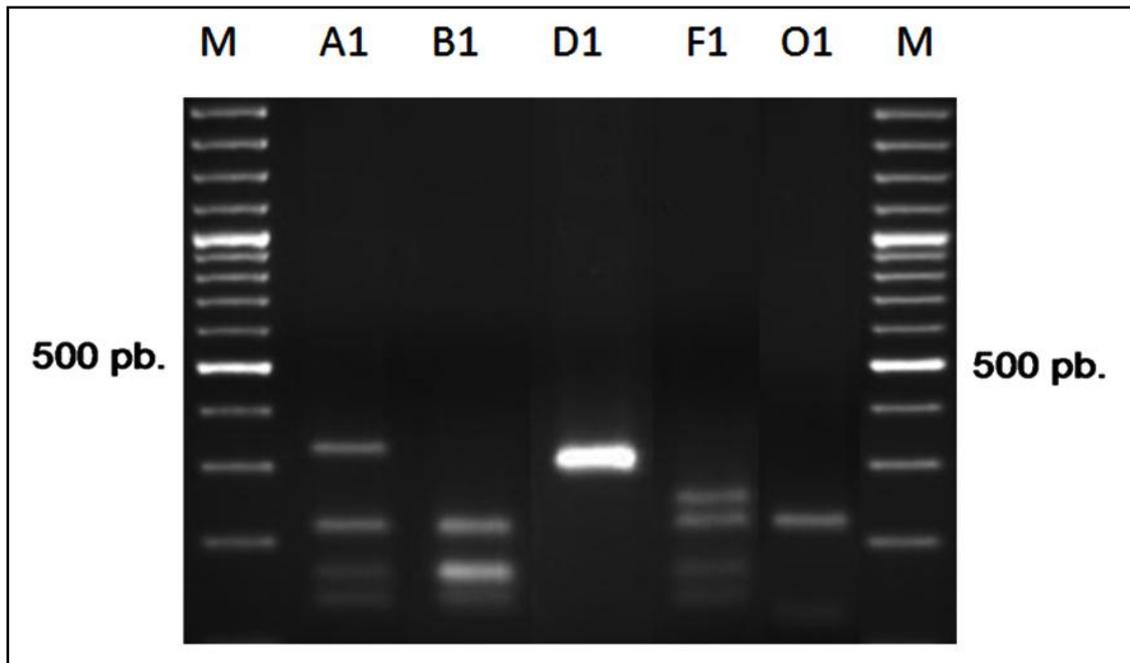
Además se valoró la presencia de lesiones en la piel. Así de los 204 animales, 97 presentaron solución de continuidad en la piel (13 casos de absceso compacto, 17 abscesos no compactos, 7 abscesos no encapsulados, 38 para el grupo de las celulitis, 3 del tipo mastitis supurativa con patrón lobulillar y 19 del tipo mixta, sin predominar ningún subgrupo).

**Tabla 6:** Tabla resumen con el número de casos por tipo de lesión microscópica.

	<b>Tipo de lesión</b>	<b>Nº de casos</b>
Abscesos	Compacto	29
	No compacto	52
	No encapsulado	16
Mastitis supurativa con patrón lobulillar		14
Celulitis	Celulitis	27
	Celulitis con mastitis necrotizante	36
Mixtas		30

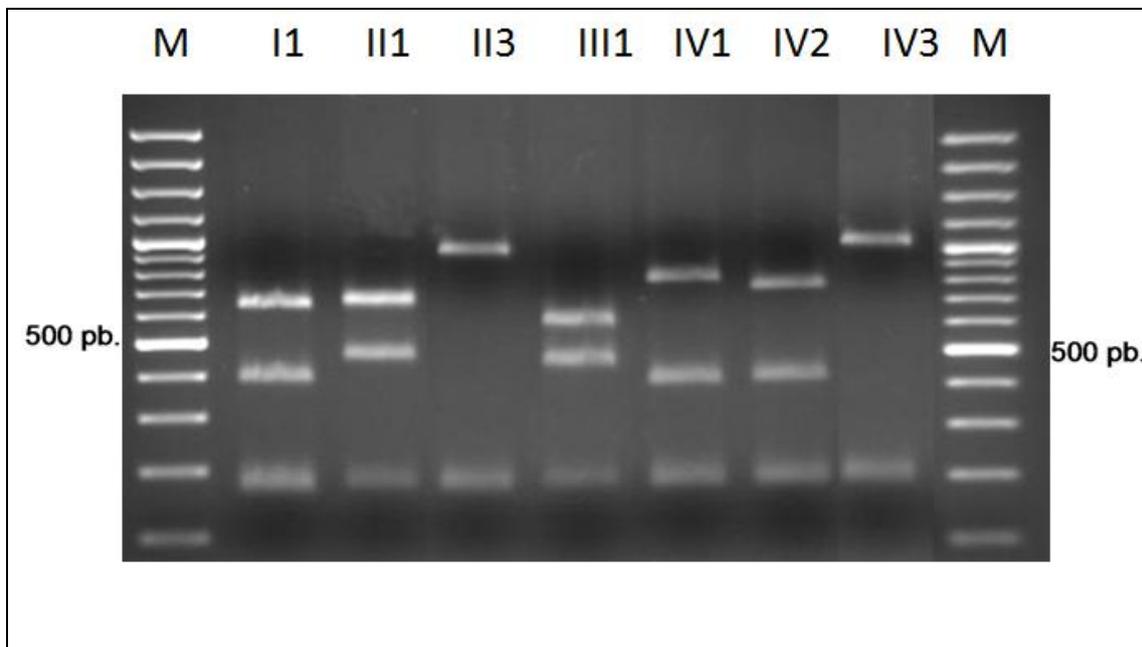
#### **4.1.2. Caracterización molecular de cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis naturales**

En este apartado se muestran los resultados obtenidos en la caracterización molecular de las 204 cepas de *S. aureus* aisladas de las mastitis naturales descritas anteriormente. El tipado molecular se basó en el análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción de los genes *coa* y *spa* (PCR-RFLP) y en el análisis mediante PCR del gen *clfB* (Hookey et al., 1998; Koreen et al., 2005). Se utilizó un código alfabético y numérico para identificar los diferentes patrones de *coa*, *spa* y *clfB*, como se describe en Viana et al. (2007). El polimorfismo en el tamaño del producto de amplificación del gen *coa* permitió clasificar los 204 aislados en 5 tipos: A, B, D, F y O. Tras la posterior digestión del producto de PCR con *CfoI*, se obtuvieron de nuevo 5 patrones: A1, B1, D1, F1 y O1 (**Figura 19**).



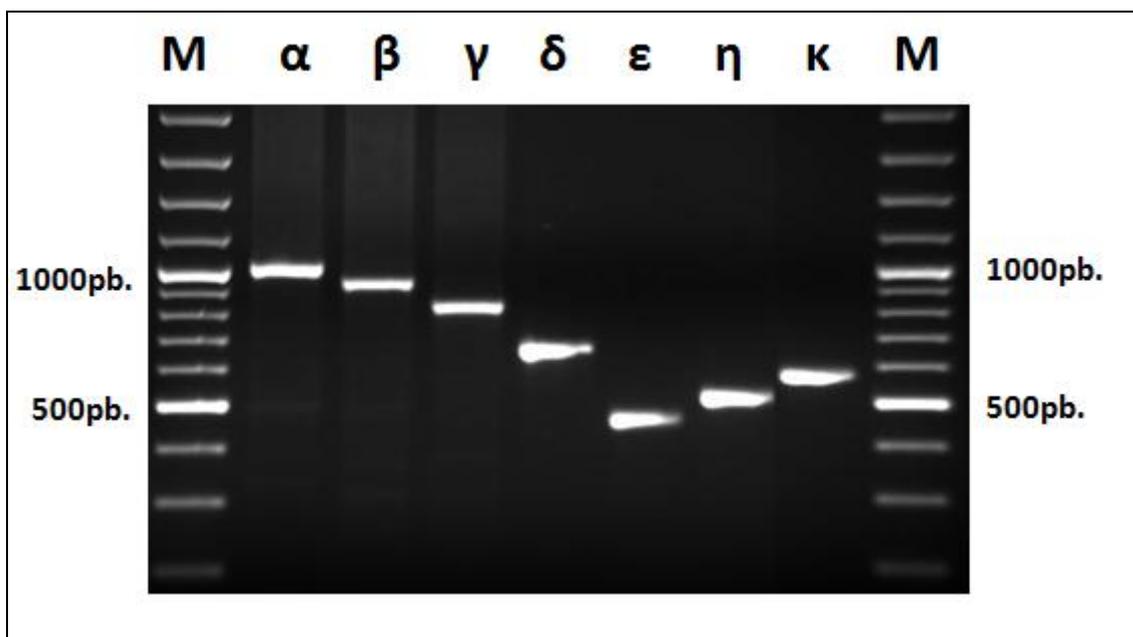
**Figura 19:** Patrones electroforéticos resultantes de la digestión del producto de PCR de *coa* con *Cfol*. M: marcador 100 pb (Fermentas).

El análisis por PCR del gen *spa* generó 4 amplificados de distinto tamaño que se denominaron: I, II, III y IV. La digestión del producto de PCR con *Cfol*, dio lugar a 7 patrones diferentes: I1, II1, II3, III1, IV1, IV2 y IV3, ya que el tipo II y el tipo IV originaron 2 y 3 patrones diferentes respectivamente (**Figura 20**).



**Figura 20:** Patrones electroforéticos resultantes de la digestión del producto de PCR de *spa* con *Cfol*. M: marcador de 100 pb (Fermentas).

En último lugar, el estudio de los aislados de conejo mediante PCR del gen *clfB* dio lugar a 7 tipos diferentes:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  y  $\kappa$  (**Figura 21**)



**Figura 21:** Análisis del producto de PCR del *c/fB* por electroforesis en gel de agarosa. M: marcador de 100 pb (Fermentas).

En definitiva, la combinación de tamaños obtenidos antes y después de la digestión, así como la combinación del análisis de los tres genes (*coa/spa/c/fB*), dio lugar a 17 cepas diferentes en los 204 aislados analizados (**Tabla 7**).

En cuanto al número de aislados de cada cepa, la cepa más frecuentemente aislada fue con diferencia la A1/II1/δ, identificada en 94 aislados (46,07%). La cepa A1/II1/κ fue la segunda en número de aislados con 40 casos (19,6%). Las cepas A1/II1/η, A1/II1/ε y A1/III1/δ fueron tercera, cuarta y quinta en número de aislados, con 18 (8,82%), 15 casos (7,35%) y 13 casos (6,37%) respectivamente. El 11,09% restante correspondió con el resto de cepas aisladas (**Tabla 7**).

Adicionalmente al tipado mediante los genes *coa/spa/c/fB* se realizó un tipado mediante secuenciación multilocus (Multilocus Sequence Typing, MLST). En estudios previos de nuestro grupo se comprobó que aislados pertenecientes al mismo genotipo mediante el tipado *coa/spa/c/fB* pertenecían al mismo tipo por MLST, por tanto se realizaron 17 secuenciaciones por MLST, de las que se obtuvieron 6 tipos de cepas. Así, se obtuvieron cepas tipo ST121, para las cepas A1/II1/δ, A1/II1/ε, A1/II1/η, A1/II1/κ, A1/III1/δ y A1/III1/ε; cepas tipo ST96 para las cepas B1/I1/α, B1/I1/ε, B1/IV1/α y B1/IV2/γ; cepas tipo SLV96 para la cepa B1/I1/δ, cepas tipo ST879, para las cepas D1/IV2/α y D1/IV2/κ; cepas tipo ST398 para las cepas D1/II3/δ, F1/IV3/δ y F1/IV3/κ y cepa tipo SLV9 para la cepa O1/IV1/β. Con estos resultados, y tal como se observa en la **Tabla 7**, de los 6 tipos de ST resultantes, los aislados pertenecientes a la cepa ST121 fueron los más frecuentes (88,7%), seguidos de los aislados pertenecientes a la cepa ST96 con un 4,9%.

El genotipado a partir de los genes *coa/spa/clfB*, es capaz de discriminar genotipos con un mismo ST. Por lo tanto, una misma secuencia alélica podía contener distintos genotipos mediante el análisis de los genes *coa/spa/clfB*.

**Tabla 7:** Cepas cunícolas determinadas por los genes *coa/spa/clfB* y por MLST.

<b>Coa</b>	<b>Spa</b>	<b>clfB</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Nº aislados</b>	<b>% aislados</b>	<b>MLST</b>
A1	II1	δ	A1/II1/δ	94	46,07	121
		ε	A1/II1/ε	15	7,35	121
		η	A1/II1/η	18	8,82	121
		κ	A1/II1/κ	40	19,6	121
	III1	δ	A1/III1/δ	13	6,37	121
		ε	A1/III1/ε	1	0,49	121
	B1	I1	α	B1/I1/α	6	2,94
δ			B1/I1/δ	3	1,47	SLV 96
ε			B1/I1/ε	2	0,98	96
IV1		α	B1/IV1/α	1	0,49	96
IV2		γ	B1/IV2/γ	1	0,49	96
D1	II3	δ	D1/II3/δ	2	0,98	398
	IV2	α	D1/IV2/α	4	1,96	879
		κ	D1/IV2/κ	1	0,49	879
F1	IV3	δ	F1/IV3/δ	1	0,49	398
		κ	F1/IV3/κ	1	0,49	398
O1	IV1	β	O1/IV1/β	1	0,49	SLV 9

#### **4.1.3. Estudio de la respuesta inmune local en casos naturales de mastitis estafilocócica.**

Con el objeto de determinar la respuesta local del hospedador en el desarrollo de los diferentes tipos de mastitis, se realizó una caracterización inmunopatológica, utilizando cuatro anticuerpos que marcaban: macrófagos (RAM11<sup>+</sup>), linfocitos T (CD3<sup>+</sup>), linfocitos B (CD 79<sup>+</sup>) y células plasmáticas (IgG<sup>+</sup>). Para ello se seleccionaron 89 lesiones (10 abscesos compactos, 20 abscesos no compactos, 10 abscesos no encapsulados, 10 mastitis supurativas con patrón lobulillar, 13 celulitis, 15 celulitis con mastitis necrotizantes, y 11 mixtas) producidas por las cepas más prevalentes en este estudio

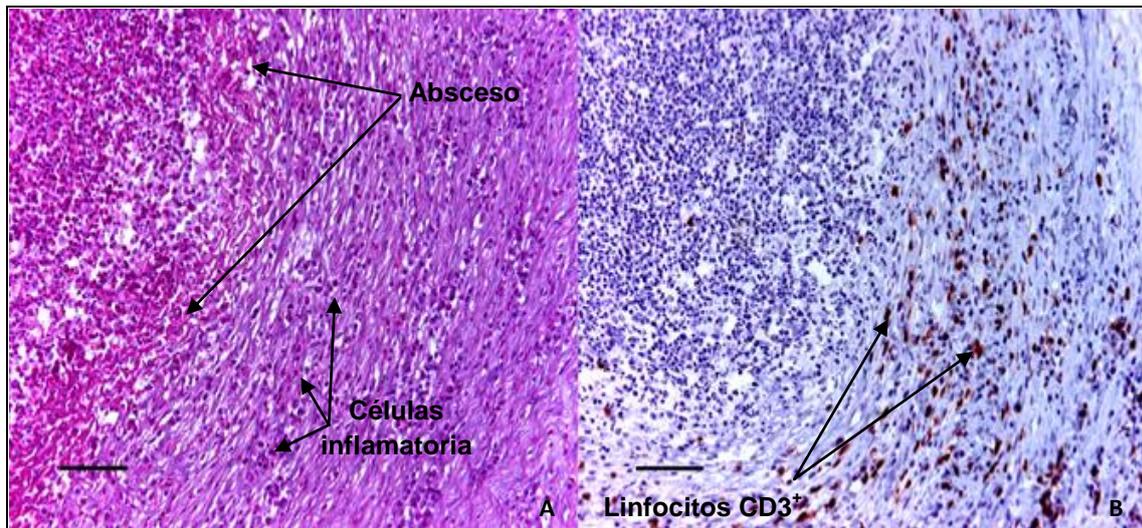
(A1/II1/δ, A1/II1/κ, A1/II1/η y A1/II1/ε) todas ellas pertenecientes a la cepa ST121. En experimentos previos realizados por nuestro grupo investigador, se vio que no existía una relación entre lesión y genotipo (Viana et al., 2011) por eso se decidió realizar este estudio con las cepas más prevalentes, todas ellas pertenecientes a la cepa tipo ST121 (**Tabla 8**).

**Tabla 8:** Número de animales seleccionados según su clasificación y la cepa correspondiente sobre los que se realizó el estudio inmunocitoquímico.

Clasificación	Cepa	Nº animales por genotipo	Nº animales por clasificación
Abscesos compactos	A1 II1 δ	10	10
Absceso no compacto	A1 II1 δ	18	20
	A1 II1 κ	1	
	A1 II1 ε	1	
Absceso no encapsulado	A1 II1 δ	6	10
	A1 II1 κ	3	
	A1 II1 η	1	
Mastitis supurativa con patrón lobulillar	A1 II1 δ	8	10
	A1 II1 η	2	
Celulitis	A1 II1 δ	10	13
	A1 II1 κ	1	
	A1 II1 η	2	
Celulitis con mastitis necrotizante	A1 II1 δ	9	15
	A1 II1 κ	4	
	A1 II1 η	2	
Mixtas	A1 II1 δ	6	11
	A1 II1 κ	4	
	A1 II1 η	1	
<b>Total</b>		<b>89</b>	<b>89</b>

Con este estudio se pretendía analizar el tipo de células que predominaba en cada tipo lesional y como se distribuían realizando un análisis cuantitativo.

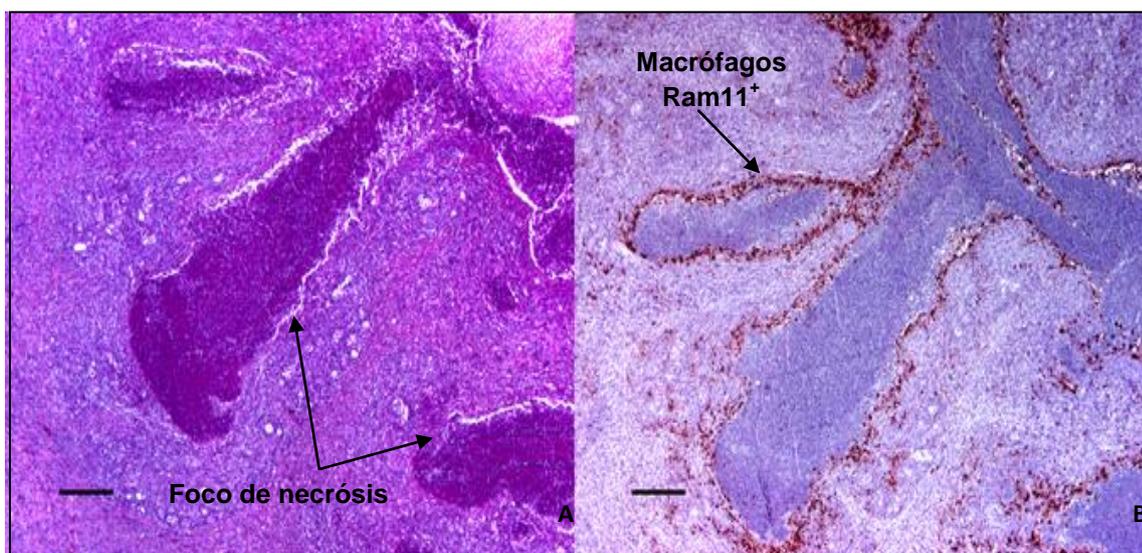
Las mastitis tipo absceso se caracterizaron por presentar en general, abundantes células inflamatorias pero con variaciones en la cantidad dependiendo del sub-tipo de absceso del que se tratara. Los linfocitos T (CD3+), aparecían alrededor de la zona de necrosis, tanto en los abscesos no encapsulados como no compactos, en número muy similar, infiltrándose entre las fibras de tejido conectivo laxas (**Figura 22**). En el tipo lesional absceso compacto el número de linfocitos que se observaba era menor, y no infiltraban el tejido conjuntivo sino que se localizaban alrededor de la cápsula fibrosa.



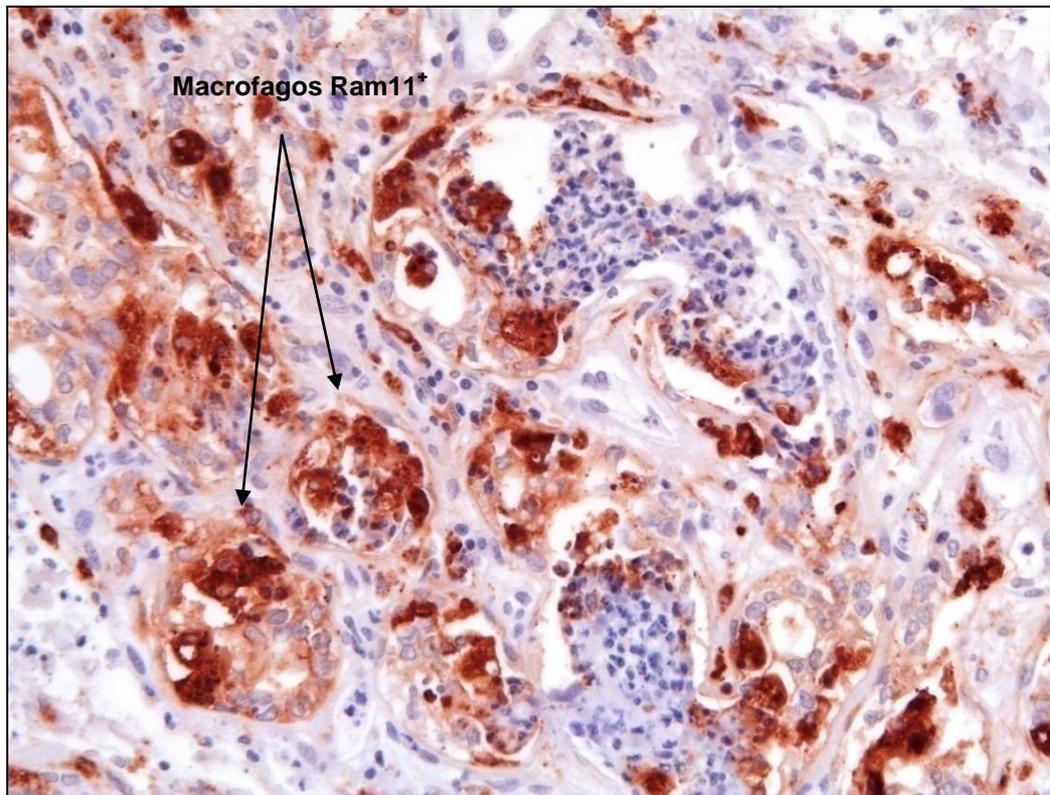
**Figura 22:** Las imágenes **A** y **B** muestran un absceso encapsulado no compacto. **A:** Entre las fibras de tejido conjuntivo aparecen infiltrados heterófilos, linfocitos, células plasmáticas y macrófagos, H&E. La imagen **B** muestra numerosos linfocitos T ( $CD3^+$ ) entre las fibras de tejido conectivo rodeando la capsula del absceso. Anticuerpo utilizado: Anti-canine CD3 monoclonal antibody. Avidin-biotin peroxidase complex (ABC).

Los macrófagos ( $RAM 11^+$ ) de los abscesos, aparecían delimitando el tejido necrótico del resto del tejido, creando como una empalizada de células en la cara interna de la cápsula, en número considerable. En el caso de las mastitis supurativas con patrón lobulillar, estas células aparecían también rodeando las áreas de necrosis (**Figura 23**), pero en este caso los pequeños focos satélites estaban completamente repletos de macrófagos (**Figura 24**).

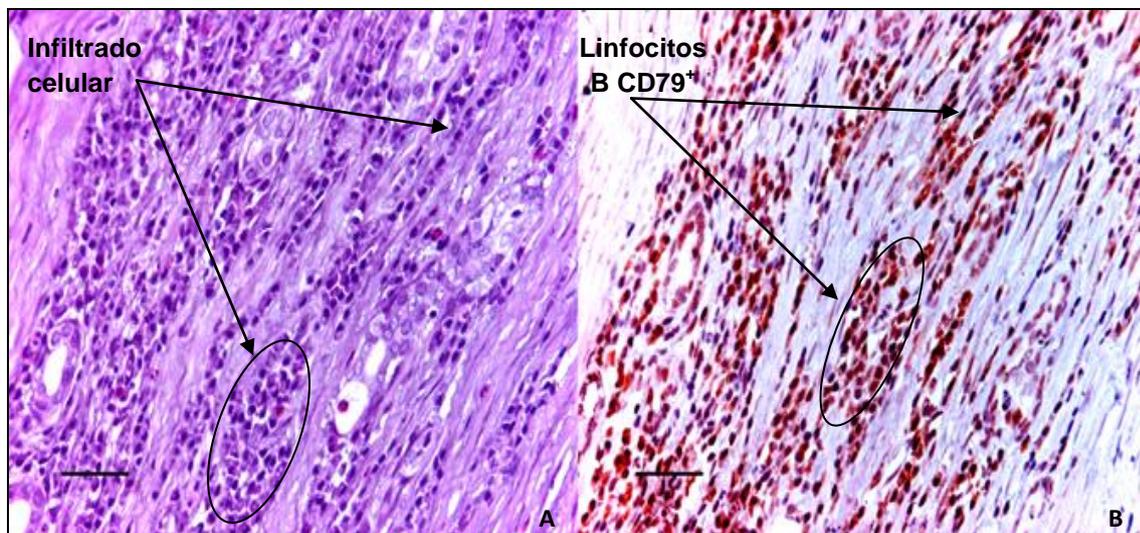
Los linfocitos B ( $CD79^+$ ), tendían a aparecer más alejados del borde de necrosis formando pequeños cordones entre ellos, independientemente del tipo de absceso (**Figura 25**).



**Figura 23:** Mastitis supurativa con patrón lobulillar. Se observan focos de necrosis sin capsula que mantienen la estructura glandular. H&E. La imagen **B** corresponde a una inmunohistoquímica para marcar macrófagos ( $RAM11^+$ ). Anti-rabbit Ab-5 monoclonal antibody. Avidin-biotin peroxidase complex (ABC).



**Figura 24:** Pequeños focos satélites correspondientes con una mastitis supurativa con patrón lobulillar. El interior de los alveolos está repleto de macrófagos marcados. Anti-rabbit Ab-5 monoclonal antibody. Avidin-biotin peroxidase complex (ABC).



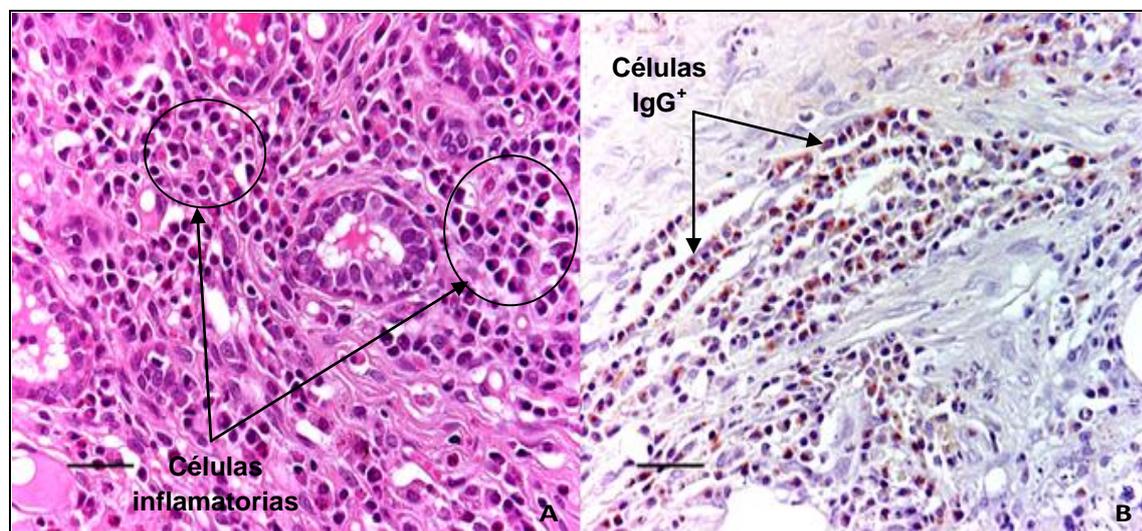
**Figura 25:** Proliferación de linfocitos en el intersticio mamario. H&E. La imagen **B** muestra como el infiltrado celular observado en la figura **A** está principalmente compuesto por linfocitos B CD79<sup>+</sup> dispuestos en línea, formando cordones. Anti-human CD79 $\alpha$  monoclonal antibody. Avidin-biotin peroxidase complex (ABC).

Las células plasmáticas (IgG<sup>+</sup>), que predominaron en todas las mastitis tipo abscesos y en las mastitis supurativas con patrón lobulillar, aparecían entre el tejido conjuntivo adyacente a los focos necróticos y en el intersticio mamario (**Figura 26**).

En el caso de las celulitis, la característica más llamativa fue que apenas presentaban celularidad con respecto al resto de grupos. Los recuentos de células en el análisis

inmunopatológico fueron muy bajos, predominando las células RAM11<sup>+</sup>, que aparecían alejadas de la zona de necrosis, distribuidas en el espacio intersticial y en alveolos mamarios cuando el tejido glandular estaba afectado.

El grupo mixto presentó características muy variables, relacionadas con los tipos de mastitis que presentaba.



**Figura 26:** Área periférica de una mastitis supurativa con patrón lobulillar **(A)**. Se observan abundantes células inflamatorias en el intersticio. H&E. **(B)** La mayor parte de las células inflamatorias observadas en la figura **A** resultaron ser células plasmáticas (IgG<sup>+</sup>). Anti rabbit-IgG polyclonal antibody. Avidin-biotin peroxidase complex (ABC).

En la **Tabla 9** aparecen reflejadas las medias, junto con su error estándar, de las diferentes poblaciones celulares estudiadas mediante técnicas inmunohistoquímica. En base al tipo de lesión se observaron diferencias en el número de linfocitos T (CD3<sup>+</sup>) y B (CD79<sup>+</sup>), macrófagos (RAM11<sup>+</sup>) y células plasmáticas (IgG). Los abscesos compactos presentaron los recuentos de células CD3<sup>+</sup> más bajos respecto al resto de tipos lesionales (260 células/mm<sup>2</sup>; P<0,05). Las glándulas mamarias que presentaron lesiones tipo celulitis y celulitis con mastitis necrotizante, también mostraron un número bajo de linfocitos T CD3<sup>+</sup> (383 células/mm<sup>2</sup> y 302 células/mm<sup>2</sup>, respectivamente). Las glándulas mamarias que sufrían mastitis supurativa con patrón lobulillar presentaron el mayor número de macrófagos RAM11<sup>+</sup> (678 células/mm<sup>2</sup> ; P<0,05), mientras que las lesiones tipo celulitis con mastitis necrotizante presentaron los recuentos más bajos (390 células/mm<sup>2</sup>, P < 0,05). Por último, el número de células plasmáticas (IgG<sup>+</sup>) también resultó ser menor para las lesiones tipo celulitis con mastitis necrotizante respecto a las mastitis supurativas con patrón lobulillar (- 99células/mm<sup>2</sup>; P<0,05).

Con objeto de realizar un estudio más detallado de las poblaciones leucocitarias, que permitiera conocer mejor la patogenia del proceso inflamatorio se estableció, como se indica en el apartado 3.1.3 del Material y métodos, el “nivel de control” de las lesiones

englobadas como abscesos (incluyendo las mastitis supurativas con patrón lobulillar). Así en la **Tabla 9** se puede comprobar que las cantidades de linfocitos T y B, variaban dependiendo del grado de maduración y control de la lesión. Los abscesos compactos (rodeados de una gruesa y compacta cápsula de tejido conectivo y, por lo tanto, *a priori* más crónicos y aparentemente más controlados) mostraban un menor número de linfocitos T CD3<sup>+</sup> (325 células/mm<sup>2</sup>) frente a los abscesos no compactos (492 células/mm<sup>2</sup>; P<0,05) y los abscesos no encapsulados (que englobaban a los abscesos no encapsulados y las mastitis supurativas con patrón lobulillar) (490 células/mm<sup>2</sup>; P<0,10). Por otro lado, los abscesos no encapsulados tuvieron menor número de linfocitos B CD79<sup>+</sup> que los abscesos no compactos (-174 células/mm<sup>2</sup>; P<0,10).

Con el “nivel de propagación” se pretendía conocer si existían diferencias estadísticas para las células leucocitarias estudiadas, en función de que las lesiones fueran unifocales (un solo foco de necrosis), multifocales (más de un foco de necrosis) o tuvieran un patrón lobulillar (que englobaba las mastitis supurativas con patrón lobulillar). Las glándulas mamarias con lesiones unifocales presentaron menor número de linfocitos B (CD79<sup>+</sup>) y macrófagos (RAM11<sup>+</sup>) que aquellas glándulas con un patrón multifocal (-315 y -201 células/mm<sup>2</sup>, respectivamente; P<0,001) o lesiones con patrón lobulillar (-254 y -210 células/mm<sup>2</sup> respectivamente; P<0,05).

A modo de resumen, podemos decir que los abscesos compactos fue el grupo que menos celularidad mostró después del grupo de las celulitis, al contrario que las mastitis supurativas con patrón lobulillar.

**Tabla 9:** Efecto del tipo de lesión, nivel de control del absceso y propagación de la lesión sobre el número de células inflamatorias, estudiadas mediante técnicas inmunohistoquímicas (células/mm<sup>2</sup>).

	CD3 <sup>+</sup>	CD79 <sup>+</sup>	RAM11 <sup>+</sup>	IgG <sup>+</sup>
	media ± SE	media ± SE	media ± SE	media ± SE
<i>Tipo de lesión</i>				
Absceso Compacto	260 ± 65 <sup>a</sup>	405 ± 84	539 ± 59 <sup>abcd</sup>	277 ± 35 <sup>ab</sup>
Absceso no compacto	448 ± 46 <sup>b</sup>	381 ± 59	522 ± 42 <sup>bc</sup>	230 ± 25 <sup>ab</sup>
Absceso no encapsulado	500 ± 65 <sup>b</sup>	326 ± 84	634 ± 59 <sup>cd</sup>	284 ± 35 <sup>ab</sup>
Supurativa (patrón lobulillar)	497 ± 65 <sup>b</sup>	323 ± 84	678 ± 59 <sup>d</sup>	308 ± 35 <sup>b</sup>
Mixta	485 ± 62 <sup>b</sup>	401 ± 80	522 ± 56 <sup>ab</sup>	261 ± 33 <sup>ab</sup>
Celulitis	383 ± 57 <sup>ab</sup>	294 ± 74	426 ± 52 <sup>ab</sup>	253 ± 31 <sup>ab</sup>
Celulitis y mastitis necrotizante	303 ± 53 <sup>a</sup>	328 ± 68	390 ± 48 <sup>a</sup>	209 ± 28 <sup>a</sup>
P-Valor	0,0244	0,9191	0,0035	0,3562
<i>Contraste (a-b)<sup>1</sup></i>				
<i>Nivel de control del absceso</i>				
Compacto vs. No compacto	-168 ± 73 <sup>+</sup>	-6 ± 86	34 ± 61	27 ± 37
Compacto vs. No-encapsulado	-165 ± 88 <sup>+</sup>	168 ± 103	-19 ± 73	16 ± 44
No compacto vs. No encapsulado	2,5 ± 82	174 ± 97 <sup>+</sup>	-54 ± 69	-12 ± 41
<i>Nivel de propagación de la lesión</i>				
Unifocal vs. Multifocal	-106 ± 69	-315 ± 81 <sup>***</sup>	-201 ± 58 <sup>***</sup>	-129 ± 35
Unifocal vs. patrón lobulillar	-98 ± 108	-254 ± 127 <sup>+</sup>	-209 ± 90 <sup>+</sup>	-123 ± 54
Multifocal vs. patrón lobulillar	5 ± 89	61 ± 104	-8 ± 74	5 ± 44

<sup>abc</sup> Medias para los diferentes tipos de lesión en una misma columna. Al no compartir superíndice son significativamente diferentes (P <0,05).

<sup>1</sup> Contraste ortogonal (a-b) significativamente diferente para 0. <sup>+</sup> P<0,10, \* P<0,05, \*\* P<0,01, \*\*\* P<0,001. SE: Error estándar.

#### 4.1.4. Estudio de la respuesta inmune periférica en casos naturales de mastitis estafilocócica y su relación con la cepa de *S. aureus*.

Para profundizar en la respuesta inmune sistémica de los animales objeto de este trabajo se estudiaron varias poblaciones leucocitarias sanguíneas, mediante citometría de flujo, en función del tipo de mastitis y la cepa de *S. aureus*.

En la **Tabla 10** aparecen reflejadas las medias, junto con su error estándar, de las diferentes poblaciones celulares estudiadas mediante citometría de flujo (en escala logarítmica), en base al tipo de lesión.

Los linfocitos T (CD5<sup>+</sup>) fueron las células más abundantes en los animales con mastitis supurativa con patrón lobulillar y en las celulitis. Los animales con mastitis tipo absceso compacto, por el contrario, mostraron los recuentos más bajos para este tipo celular. Comparado con las mastitis supurativas con un patrón lobulillar, los abscesos compactos tenían, de media,  $-427 \cdot 10^6$  linfocitos T/L ( $P < 0,05$ ).

Los animales con mastitis supurativa con patrón lobulillar presentaron los recuentos más altos de linfocitos CD4<sup>+</sup>, seguidos de los abscesos no encapsulados. Mientras que los animales con mastitis tipo absceso compacto presentaron menor número de CD4<sup>+</sup> en comparación con los otros dos tipos lesionales (de media,  $-280 \cdot 10^6$  CD4<sup>+</sup>/L).

El número más elevado de linfocitos CD8<sup>+</sup> lo mostraron los animales con mastitis tipo celulitis, junto con el grupo mixto, en comparación con los abscesos compactos, que presentaron los niveles más bajos (de media  $-110 \cdot 10^6$  CD8<sup>+</sup>/L;  $P < 0,05$ ).

Los animales con mastitis mixtas tuvieron los recuentos más altos de linfocitos CD25<sup>+</sup>, principalmente al compararlos con los abscesos no encapsulados, que fueron los que obtuvieron los valores estadísticamente más bajos.

Los animales que sufrían celulitis con mastitis necrotizante y lesiones mixtas tuvieron menor número de granulocitos en sangre, que los animales con abscesos no compactos (de media,  $-1,35 \cdot 10^6$  granulocitos/L;  $P < 0,05$ ).

Por último, no hubo diferencias estadísticamente significativas en el número de monocitos entre los diferentes grupos de animales.

El nivel de control del absceso afectó principalmente a los recuentos de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y, en menor medida, a los CD8<sup>+</sup>. Los animales con abscesos no encapsulados presentaron los recuentos más altos de CD4<sup>+</sup>, tanto frente a los abscesos compactos (+79%,  $P < 0,05$ ) como frente a los abscesos no compactos (+51%,  $P < 0,10$ ). Los animales con abscesos no compactos presentaron un mayor número de linfocitos CD8<sup>+</sup> que los abscesos compactos (+51%,  $P < 0,10$ ).

El nivel de propagación de la lesión afectó principalmente a los recuentos de monocitos y de linfocitos CD25<sup>+</sup>. Los animales con mastitis de patrón lobulillar presentaron niveles significativamente más altos de monocitos y linfocitos CD25<sup>+</sup> que aquellos que presentaron lesiones con una propagación multifocal (+43 y +165%, respectivamente) y, en especial, que las lesiones con una propagación unifocal (+102 y +332%, respectivamente).

Se llevó a cabo un tercer contraste entre las muestras de sangre de animales cuyas glándulas mamarias estaban infectadas con cepas de *S. aureus* pertenecientes a las cepas ST121 y ST96. En este último contraste los datos revelaron que los animales infectados por cepas ST96 mostraron en su sangre más del doble de linfocitos B (P<0,01), T (P<0,001), CD4<sup>+</sup> (P<0,001), CD8<sup>+</sup> (P<0,01) y CD25<sup>+</sup> (P<0,10) y un 35% menos de granulocitos (P<0,01) que los animales infectados con cepas ST121.

#### **4.1.5. Correlación entre la respuesta inmune local y la respuesta inmune periférica en casos naturales de mastitis estafilocócicas.**

Una vez estudiadas las respuestas inmunes local y periférica de forma individual, se quiso comprobar si existía alguna correlación entre las poblaciones leucocitarias de la sangre y de la glándula mamaria de los animales en los que se realizó el estudio inmunohistoquímico (mastitis provocadas por cepas ST121).

En la **Tabla 11** se muestran los coeficientes de correlación simple entre los resultados obtenidos en glándula mamaria mediante inmunohistoquímica y las poblaciones linfocitarias sanguíneas estudiadas mediante citometría de flujo.

Se observó una correlación positiva (P<0,05) entre las células RAM 11<sup>+</sup> del tejido y los monocitos (r = +0,38), granulocitos (r = +0,25) y linfocitos T CD4<sup>+</sup> (r = +0,24) sanguíneos. Igualmente, el número de células plasmáticas (IgG<sup>+</sup>) tisulares se correlacionaron positivamente con los monocitos (r = +0,27) y linfocitos T CD4<sup>+</sup> (r = +0,25) de la sangre. De esta forma, cuanto mayor era el recuento de RAM11<sup>+</sup> (macrófagos tisulares), mayor era el recuento total de monocitos, granulocitos y de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de la sangre y cuanto mayor era el recuento de células IgG<sup>+</sup> del tejido (células plasmáticas), mayor era el recuento de linfocitos T CD4<sup>+</sup> sanguíneos. En las mastitis supurativas, se puede observar esta correlación positiva, ya que presentó el mayor número de células Ram11<sup>+</sup> y de IgG<sup>+</sup> en tejido y de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en la sangre

**Tabla 10:** Efecto del tipo lesional, nivel de control de los abscesos y nivel de propagación de las lesiones en las poblaciones leucocitarias sanguíneas analizadas mediante citometría de flujo.

	Linfocitos								
	Monocitos (log <sub>10</sub> 10 <sup>6</sup> /L)	Granulocitos (log <sub>10</sub> 10 <sup>6</sup> /L)	Total (log <sub>10</sub> 10 <sup>6</sup> /L)	Lin B (log <sub>10</sub> 10 <sup>6</sup> /L)	Lin T (log <sub>10</sub> 10 <sup>6</sup> /L)	CD4 <sup>+</sup> (log <sub>10</sub> 10 <sup>6</sup> /L)	CD8 <sup>+</sup> (log <sub>10</sub> 10 <sup>6</sup> /L)	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> (log <sub>10</sub> 10 <sup>6</sup> /L)	CD25 <sup>+</sup> (log <sub>10</sub> 10 <sup>6</sup> /L)
	Media ± SE	Media ± SE	media ± SE	media ± SE	media ± SE	media ± SE	media ± SE	media ± SE	media ± SE
<i>Tipo de lesión</i>									
Absceso compacto	3,16 ± 0,05	3,95 ± 0,04 <sup>ab</sup>	3,24 ± 0,05	1,82 ± 0,10	2,92 ± 0,05 <sup>a</sup>	2,42 ± 0,07 <sup>a</sup>	2,15 ± 0,07 <sup>a</sup>	1,13 ± 0,03 <sup>abc</sup>	1,48 ± 0,13 <sup>ab</sup>
Absceso no compacto	3,19 ± 0,04	4,04 ± 0,03 <sup>b</sup>	3,26 ± 0,04	1,75 ± 0,08	3,00 ± 0,04 <sup>ab</sup>	2,48 ± 0,05 <sup>ab</sup>	2,31 ± 0,05 <sup>ab</sup>	1,07 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,51 ± 0,10 <sup>ab</sup>
Absceso no encapsulado	3,11 ± 0,07	3,94 ± 0,06 <sup>ab</sup>	3,28 ± 0,07	1,77 ± 0,14	3,05 ± 0,07 <sup>ab</sup>	2,71 ± 0,09 <sup>c</sup>	2,33 ± 0,10 <sup>ab</sup>	1,17 ± 0,04 <sup>bc</sup>	1,11 ± 0,17 <sup>a</sup>
Supurativa (patron lobulillar)	3,29 ± 0,08	3,99 ± 0,06 <sup>ab</sup>	3,33 ± 0,08	1,72 ± 0,15	3,12 ± 0,07 <sup>b</sup>	2,76 ± 0,10 <sup>c</sup>	2,30 ± 0,11 <sup>ab</sup>	1,22 ± 0,04 <sup>c</sup>	1,54 ± 0,19 <sup>ab</sup>
Mixta	3,21 ± 0,05	3,93 ± 0,04 <sup>a</sup>	3,26 ± 0,05	1,73 ± 0,10	3,03 ± 0,05 <sup>ab</sup>	2,56 ± 0,07 <sup>abc</sup>	2,36 ± 0,07 <sup>b</sup>	1,10 ± 0,03 <sup>ab</sup>	1,62 ± 0,13 <sup>b</sup>
Celulitis	3,20 ± 0,06	4,00 ± 0,04 <sup>ab</sup>	3,33 ± 0,06	1,66 ± 0,11	3,08 ± 0,05 <sup>b</sup>	2,65 ± 0,07 <sup>bc</sup>	2,44 ± 0,08 <sup>b</sup>	1,09 ± 0,03 <sup>ab</sup>	1,46 ± 0,13 <sup>ab</sup>
Celulitisnecrotizante	3,13 ± 0,05	3,89 ± 0,04 <sup>a</sup>	3,25 ± 0,05	1,72 ± 0,09	3,01 ± 0,05 <sup>ab</sup>	2,59 ± 0,06 <sup>abc</sup>	2,30 ± 0,07 <sup>ab</sup>	1,14 ± 0,03 <sup>abc</sup>	1,43 ± 0,12 <sup>ab</sup>
<i>P-value</i>	0,5843	0,1023	0,8764	0,9743	0,2475	0,0244	0,2267	0,0467	0,4291
<i>Nivel de contraste(a/b)<sup>1</sup></i>									
<i>Nivel de control de los abscesos:</i>									
Compacto/no-compacto	0,980	0,877	0,931	0,998	0,814	0,843	0,694 <sup>+</sup>	1,119	0,800
Compacto/no-encapsulado	1,026	1,050	0,959	1,031	0,777	0,559 <sup>*</sup>	0,772	0,859	1,731
No-compacto/no-encapsulado	1,047	1,197	1,031	1,033	0,955	0,663 <sup>+</sup>	1,112	0,768 <sup>*</sup>	2,165
<i>Nivel de propagación de la lesión:</i>									
Unifocal/multifocal	0,706 <sup>+</sup>	1,018	0,846	1,064	0,971	1,166	0,878	1,283 <sup>*</sup>	0,799
Unifocal/patrón lobulillar	0,494 <sup>**</sup>	0,941	0,774	0,911	0,823	1,010	0,750	1,234	0,301 <sup>*</sup>
Multifocal/patrón lobulillar	0,700 <sup>+</sup>	0,925	0,915	0,856	0,848	0,866	0,854	0,962	0,377 <sup>*</sup>
<i>Cepa 96/121</i>	1,065	0,642 <sup>**</sup>	2,237 <sup>***</sup>	2,672 <sup>**</sup>	2,101 <sup>***</sup>	2,290 <sup>***</sup>	2,583 <sup>**</sup>	0,939	2,28 <sup>+</sup>

<sup>1</sup> Contraste ortogonal: log<sub>10</sub>(a) - log<sub>10</sub>(b) = log<sub>10</sub>(a/b). Nivel de contraste: 10<sup>log<sub>10</sub>(a/b)</sup> = a/b. Nivel de contraste significativamente diferente para <sup>+</sup> P<0,10, <sup>\*</sup> P<0,05, <sup>\*\*</sup> P<0,01, <sup>\*\*\*</sup> P<0,001. <sup>abc</sup>Medias en la misma columna y que no comparten el mismo superíndice son significativamente diferentes para P<0,05. SE: error estándar.

**Tabla 11:** Coeficientes de correlación simple (*P*-valor entre paréntesis; n=89) entre los parámetros controlados por inmunohistoquímica y las poblaciones linfocitarias de conejas reproductivas obtenidas por citometría de flujo ( $\log_{10}10^6/L$ ).

	Monocitos	Granulocitos	Linfocitos totals	Lin B	Lin T	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> /CD8	CD25 <sup>+</sup>
CD3 <sup>+</sup>	+0,1962 (0,0654)	+0,1025 (0,3394)	-0,0276 (0,7976)	-0,0493 (0,6465)	+0,0304 (0,7772)	+0,1036 (0,3342)	+0,0906 (0,3985)	-0,0480 (0,6551)	-0,1377 (0,2149)
CD79 <sup>+</sup>	+0,0853 (0,4268)	-0,0556 (0,6047)	-0,0606 (0,5726)	-0,1239 (0,2474)	+0,0026 (0,9804)	+0,0712 (0,5070)	+0,0269 (0,8021)	-0,0146 (0,8920)	+0,0224 (0,8351)
RAM11 <sup>+</sup>	<b>+0,3804</b> <b>(0,0002)</b>	<b>+0,2513</b> <b>(0,0175)</b>	-0,0449 (0,6758)	-0,1561 (0,1440)	+0,1385 (0,1954)	<b>+0,2426</b> <b>(0,0220)</b>	+0,1358 (0,2044)	-0,0023 (0,9830)	+0,0727 (0,4986)
IgG <sup>+</sup>	<b>+0,2656</b> <b>(0,0119)</b>	+0,1056 (0,3248)	+0,0957 (0,3719)	-0,0790 (0,4614)	+0,1684 (0,1147)	<b>+0,2527</b> <b>(0,0169)</b>	+0,0524 (0,6257)	+0,1447 (0,1760)	+0,0529 (0,6222)

## **4.2. Mastitis experimentales**

A diferencia del apartado anterior donde se estudiaron mastitis crónicas naturales, en este apartado se llevaron a cabo procedimientos experimentales, con el fin de estudiar mejor la respuesta inmune en las primeras fases de la infección y comprobar el desarrollo de las lesiones en función del tipo de cepa infectante.

Para ello, inicialmente se realizaron una serie de experimentos preliminares con objeto de seleccionar una concentración bacteriana que simulara, en la medida de lo posible, las infecciones y lesiones naturales. Una vez elegida la dosis infectiva, se procedió a realizar el experimento principal, para alcanzar los objetivos propuestos.

### **4.2.1. Selección del inóculo bacteriano**

Como ya se citó en el apartado 3.2.2, se utilizaron 65 animales, para decidir qué concentración de inóculo era la más idónea: 31 conejos se inocularon con la cepa ST121 y 34 con la cepa ST96.

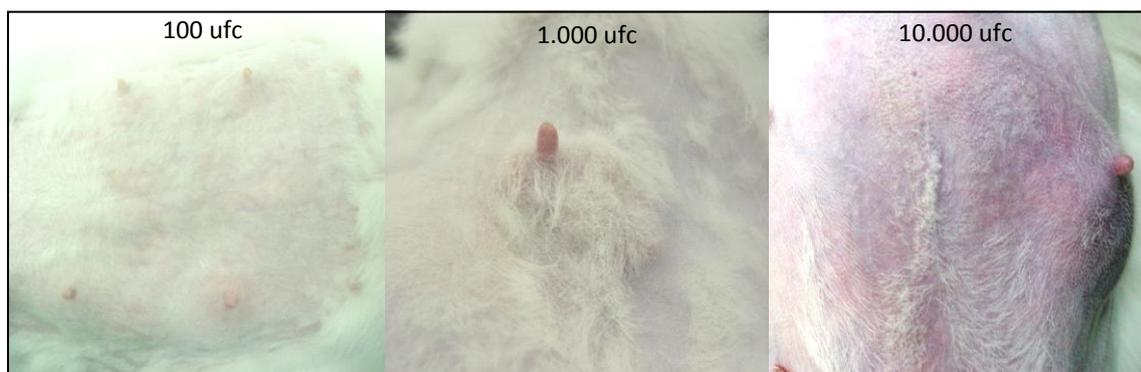
De los 31 animales inoculados con la cepa ST121, 25 conejas (80,6%) desarrollaron lesiones: 8 de 11 inoculados con 100 ufc (72,7%); 7 de 10 inoculados con 1.000 ufc (70%) y 10 de 10 inoculados con 10.000 ufc (100%).

Las mastitis producidas por el inóculo de 100 ufc resultaron ser más leves, y similares a las mastitis naturales, que con el resto de inóculos (1.000 ufc y 10.000 ufc). Histológicamente mostraban características similares a las descritas en los casos naturales: mastitis supurativas con patrón lobulillar, en cuatro ocasiones, abscesos no compactos, en dos, y las dos restantes se asemejaban al grupo de celulitis.

Se observaron diferencias al comparar la aparición y evolución de las lesiones macroscópicas en función del número de bacterias (ufc) inoculadas. Las lesiones mamarias provocadas por el inóculo de 10.000 ufc fueron visibles entre las 24 y las 48 horas postinoculación (p.i.), mientras que las lesiones provocadas por el inóculo de 100 ufc tardaron más en desarrollarse, entre 48 y 72 horas p.i. Además, los nódulos generados con 10.000 ufc fueron más grandes (de entre 4 a 11 cm de diámetro) al final del experimento (día 7 post infección), que los obtenidos con 100 ufc (de entre 2 a 5 cm de diámetro).

A nivel microscópico, una importante diferencia entre las lesiones provocadas por ambos inóculos fue la presencia de una necrosis por coagulación en 7 de los 11 animales infectados con 10.000 ufc, mientras que sólo se observó en dos animales

inoculados con 100 ufc. Las lesiones provocadas por los inóculos de 1.000 y 100 ufc fueron muy similares. **(Figura 27)**



**Figura 27:** Mastitis experimentales generadas por tres inóculos de distinta concentración (100, 1.000 y 10.000 ufc) con la cepa ST121 de *S. aureus*.

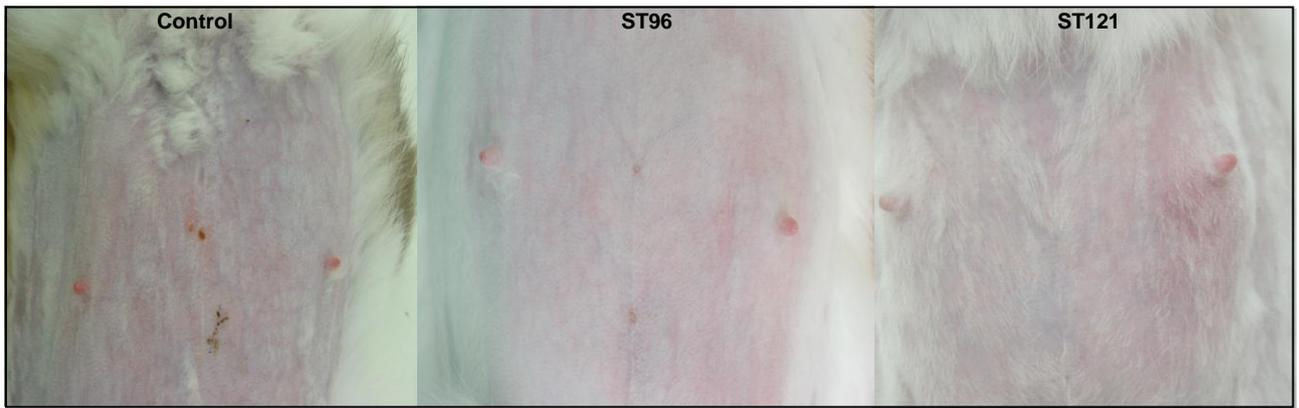
En el caso de los 34 animales infectados con la cepa ST96, tan solo se observó reacción inflamatoria, a nivel microscópico, en 3 de los 10 animales infectados con el inóculo de 10.000 ufc. El resto de animales inoculados con dosis de 100 ufc y 1.000 ufc, no mostraron ningún tipo de lesión, ni a nivel macroscópico ni microscópico.

#### **4.2.2. Estudio de la evolución de la infección**

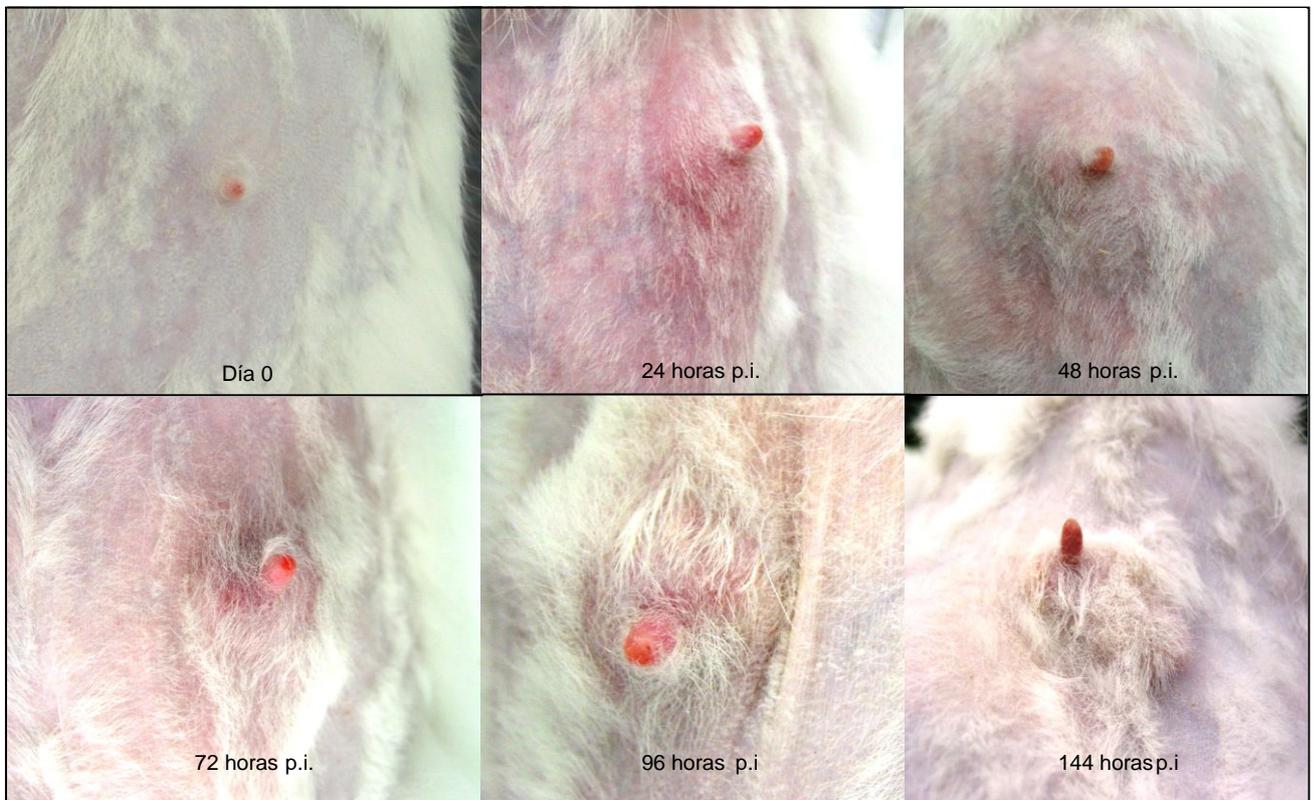
Anteriormente se ha demostrado como, en condiciones naturales, los animales infectados por cepas ST96 presentaban diferentes recuentos celulares respecto a los infectados con cepas ST121. Por ello, el objetivo de este apartado fue comparar la respuesta inmunitaria ocasionada en la glándula mamaria por cepas ST121 y ST96 de *S. aureus* en los primeros estadios de la infección. Para ello, se llevó a cabo una infección experimental con inóculos de 10.000 ufc, por ser la dosis más baja capaz de producir inflamación con el inóculo de la cepa ST96.

De los 24 animales empleados, 11 fueron inoculados con una cepa tipo ST121 de *S. aureus*, 9 fueron inoculados con una cepa tipo ST96 de *S. aureus* y los 4 restantes se utilizaron como controles, en los que se inoculó PBS, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.2.4.

Tras la inoculación se hizo una evaluación diaria de la temperatura corporal y de las lesiones observadas en las glándulas mamarias infectadas **(Figura 28 y 29)**.



**Figura 28:** Aspecto macroscópico de las glándulas mamarias, momentos antes del sacrificio (144 horas p.i.), correspondientes a un animal representativo en cada grupo estudiado (control, ST96 y ST121).

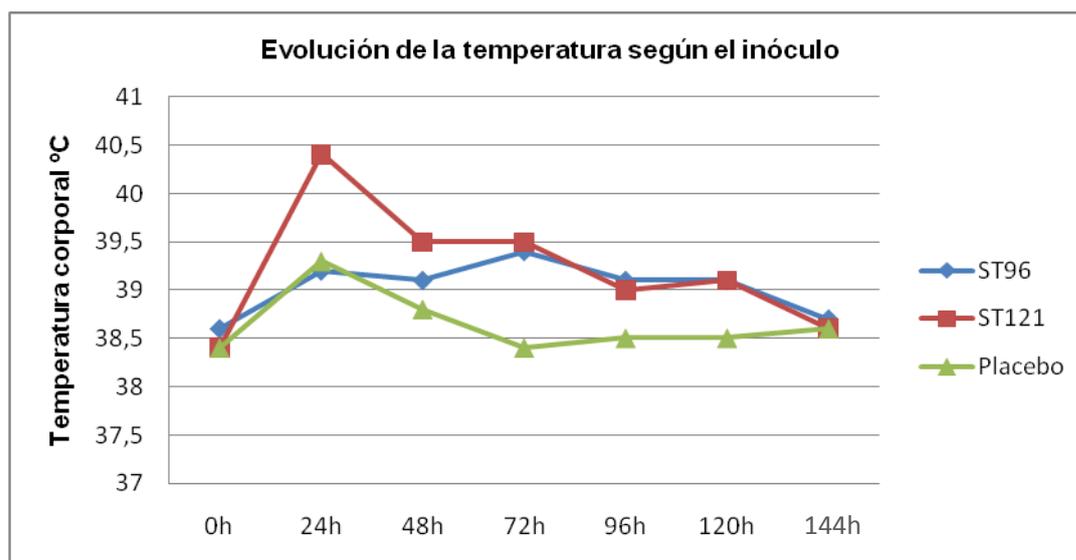


**Figura 29:** Evolución de una de las mamas infectadas con una cepa ST121 a las 0, 24, 48, 72, 96 y 144 horas post infección (p.i.)

Las mediciones de la temperatura corporal revelaron que únicamente dos animales inoculados con la cepa ST96 mostraron fiebre ( $40,5^{\circ}\text{C}$ ) a las 24 horas p.i. Esta temperatura se fue normalizando a las 48 horas p.i., manteniéndose, al igual que el resto del grupo y hasta el final del experimento, entre los  $38^{\circ}\text{C}$  y los  $39,5^{\circ}\text{C}$ .

Por otro lado, ocho de los once animales infectados con la cepa ST121, presentaron fiebre a las 24 horas (temperatura corporal igual o superior a los  $40,5^{\circ}\text{C}$ ). Esta temperatura volvió a un rango de normalidad ( $38,5^{\circ}\text{C}$  –  $39,5^{\circ}\text{C}$ ) a las

48 horas p.i. Cabe destacar la evolución de la temperatura corporal que mostraron los tres animales inoculados con la cepa ST121 que cursaron con una mastitis severa y que fueron sacrificados antes de terminar el desafío. En los 3 casos las conejas alcanzaron una temperatura corporal cercana a los 41°C a las 24 horas y un descenso brusco alrededor de los 38,5°C a las 36 horas en un caso y a las 60 horas en los otros 2 animales, momento tras el cual se procedió a su sacrificio. En la **Figura 30** se muestra una gráfica de la evolución de la temperatura media de cada grupo a lo largo de la infección.



**Figura 30:** Evolución de la temperatura corporal media de el función de la cepa inoculada (ST96, ST121, placebo) a lo largo de la infección.

En cuanto a las lesiones observadas macroscópicamente se establecieron tres niveles de lesión en función de la gravedad: lesiones leves, moderadas y severas (**Figura 31**).

Los once conejos infectados con la cepa ST121 desarrollaron mastitis clínica, aunque en distinto momento. Nueve animales mostraron lesiones a las 24 horas p.i., un animal a las 48 horas p.i. y otro animal a las 72 horas p.i. De los once conejos, tres presentaron lesiones mamarias graves, caracterizadas por una intensa hiperemia, aumento de temperatura al tacto y color cianótico, con exudación de líquido sanguinolento, por lo que se procedió a su sacrificio. Cinco individuos desarrollaron mastitis clasificadas como moderadas, donde los nódulos mamarios fueron aumentando de tamaño a lo largo del experimento. En los cinco casos, la mastitis fue visualmente apreciable a las 24 horas p.i. aunque el tamaño de la lesión fue variable (oscilando entre los 2x1cm y los 6,5x4 cm de diámetro), con una tendencia a incrementarse a lo largo del experimento llegando, en el momento del sacrificio, a alcanzar los 6x4 cm de diámetro (en el menor de los casos) y los 11x4

cm de diámetro (en el mayor). Estas mamas también mostraron hiperemia, más moderada en comparación con los casos graves, con un aumento de la temperatura al tacto en las zonas afectadas. Los animales que presentaron una mastitis más leve fueron tres. En dos de ellos, se pudieron distinguir pequeños nódulos mamarios palpables a las 24 horas p.i., de 1x1 cm de diámetro en ambos casos, que fueron aumentando ligeramente en un caso, hasta llegar a los 4x2,5 cm de diámetro. En el tercer animal, el nódulo fue visible a los tres días p.i., con un tamaño de 4x3 cm de diámetro manteniéndose así hasta finalizar el experimento. En estos casos la hiperemia de las mamas era muy ligera, tan solo un aumento de coloración con respecto al resto de tejido.



**Figura 31:** Imágenes correspondientes a los tres niveles de lesión en función de la gravedad. La imagen de la izquierda corresponde al caso más leve y el de la derecha al caso más severo.

De los 9 animales infectados con la cepa ST96, se observó en tres casos una leve zona de hiperemia, coincidiendo con el punto de inoculación. En el transcurso del desafío, esta hiperemia desapareció. Únicamente en un caso se palpó un pequeño nódulo, en glándula mamaria, de 0,5 cm de diámetro, a los 4 días p.i., manteniéndose así hasta el día del sacrificio (**Tabla 12**).

Los cuatro animales control mantuvieron su temperatura corporal en los rangos normales y no mostraron lesiones en la glándula mamaria.

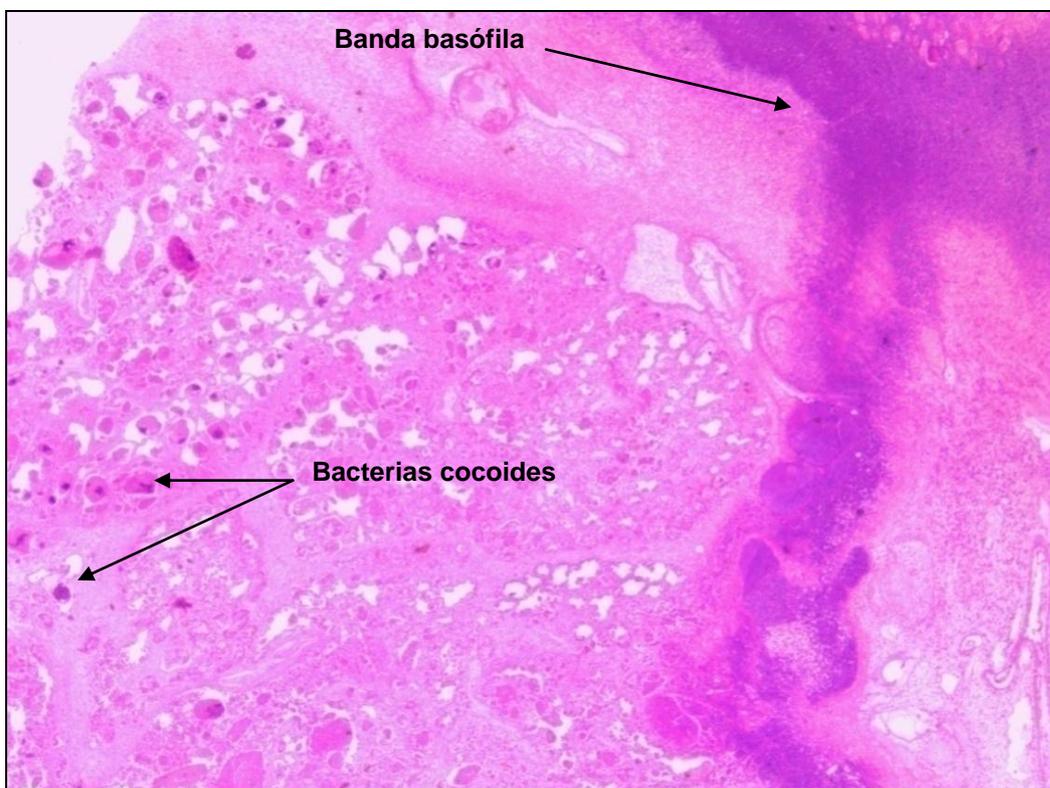
#### **4.2.3. Estudio microscópico**

Análogamente a lo realizado en el estudio de las mastitis naturales, se llevó a cabo un examen microscópico de las glándulas mamarias. Para ello todas las mamas infectadas se procesaron de forma rutinaria tal como se explica en el apartado 3.1.3.

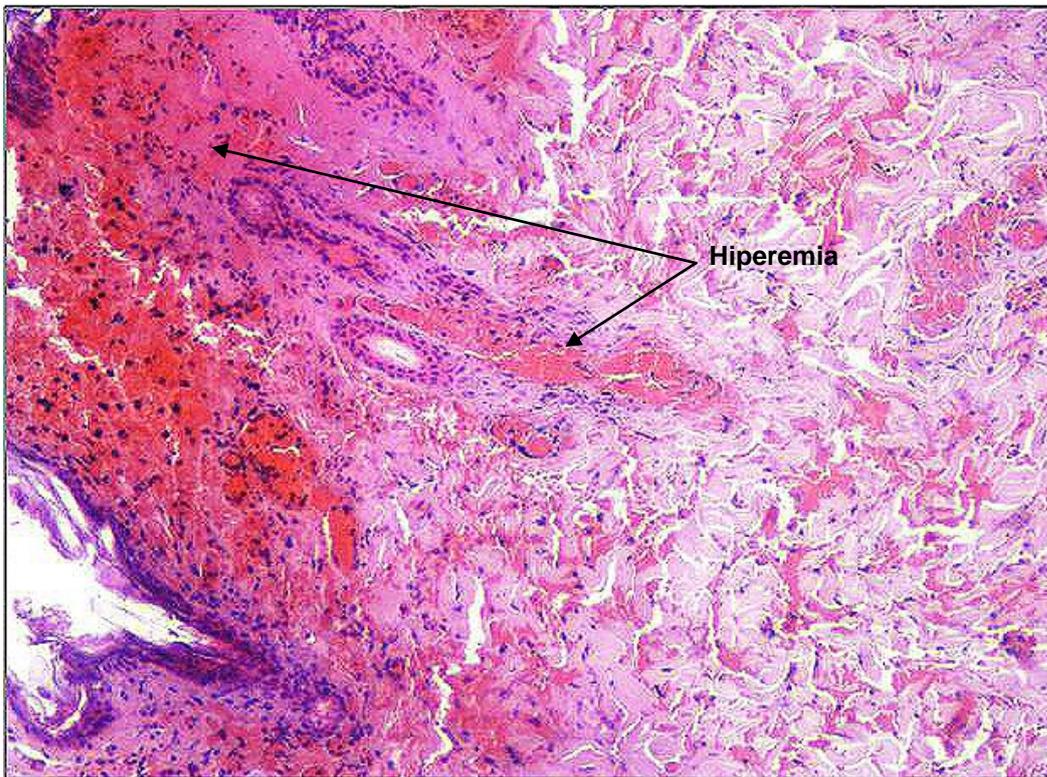
Las lesiones microscópicas se correspondían con las lesiones macroscópicas descritas con anterioridad de tal forma que microscópicamente, las lesiones más graves, se caracterizaron histológicamente por presentar extensas áreas de

necrosis por coagulación, afectando a la mayor parte del tejido mamario. En zonas periféricas a la necrosis se observaban zonas con una intensa hiperemia, numerosos heterófilos en intersticio y luces alveolares, donde era frecuente encontrar restos celulares y abundantes bacterias cocoides (**Figuras 32 y 33**).

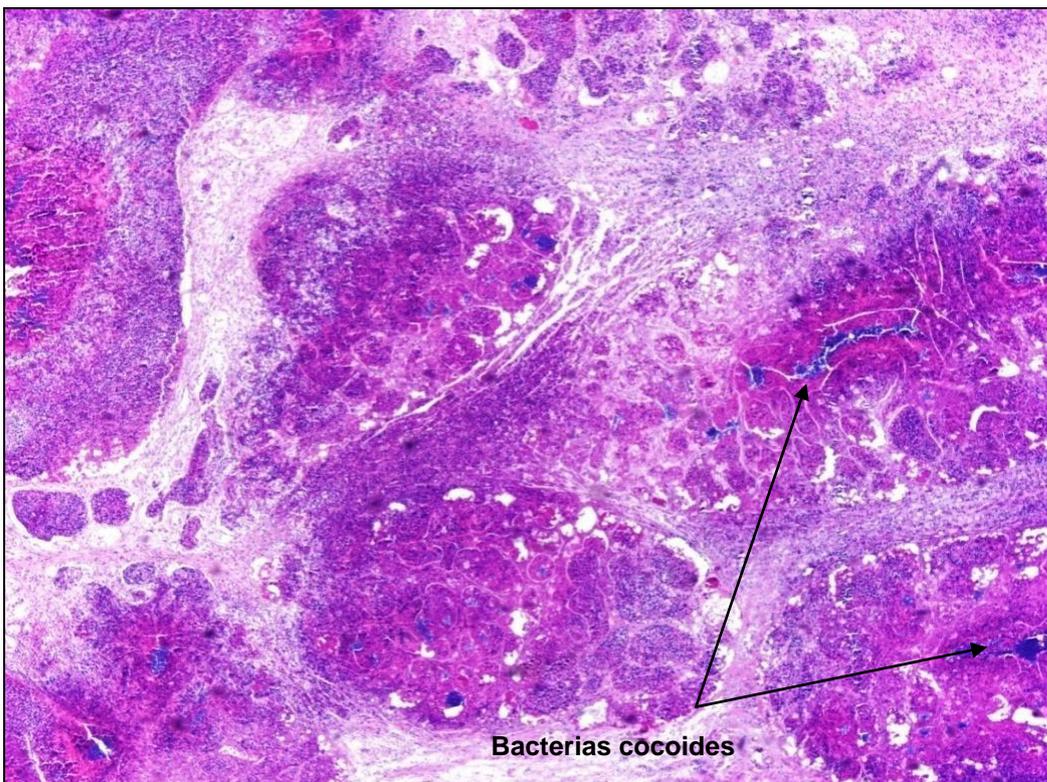
Las mastitis clasificadas macroscópicamente como moderadas, se caracterizaron por presentar numerosos focos de necrosis rodeados de heterófilos, linfocitos y macrófagos. Estas células también aparecían en las luces alveolares del tejido mamario circundante a los focos de necrosis. Se observaron numerosas bacterias cocoides en el tejido necrótico y luces alveolares en 4 de los 5 animales que presentaron este tipo de lesión (**Figuras 34 y 35**).



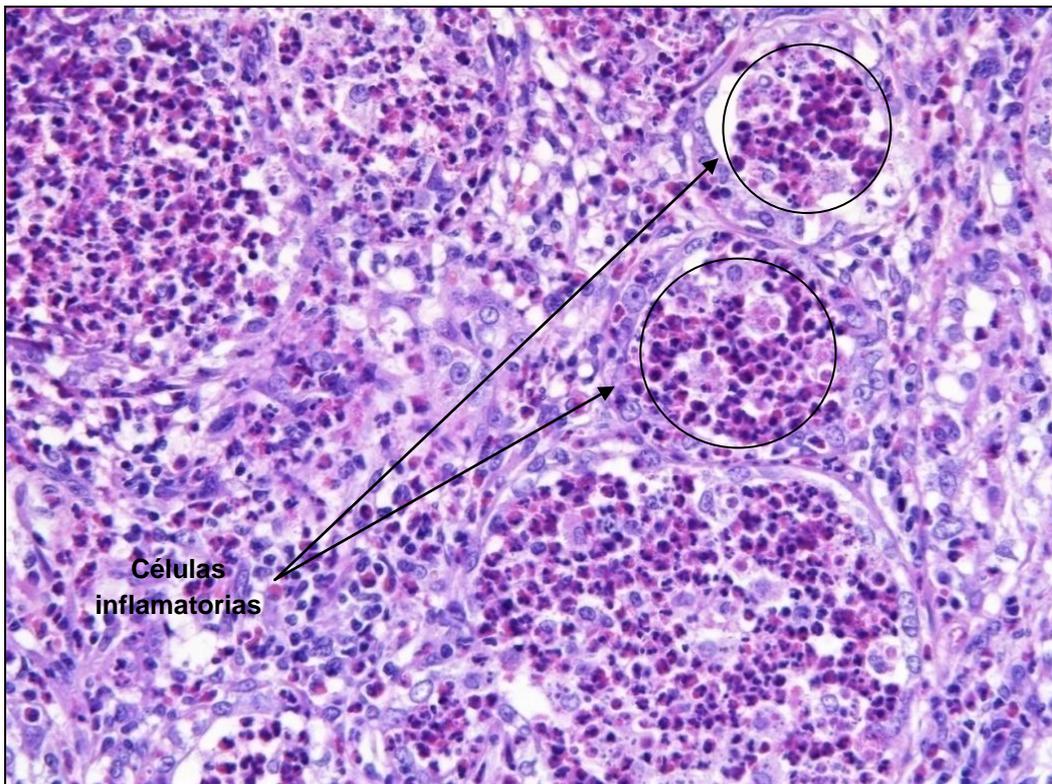
**Figura 32:** Mastitis severa. Cepa inoculada: ST121. En la imagen se observa una banda basófila que limita extensas áreas de necrosis por coagulación y acumulación de bacterias cocoides en el interior de los alveolos H&E.



**Figura 33:** Mastitis severa. Cepa inoculada: ST121. Intensa hiperemia correspondiente a la zona de las mamas que presentaban enrojecimiento a nivel macroscópico. H&E

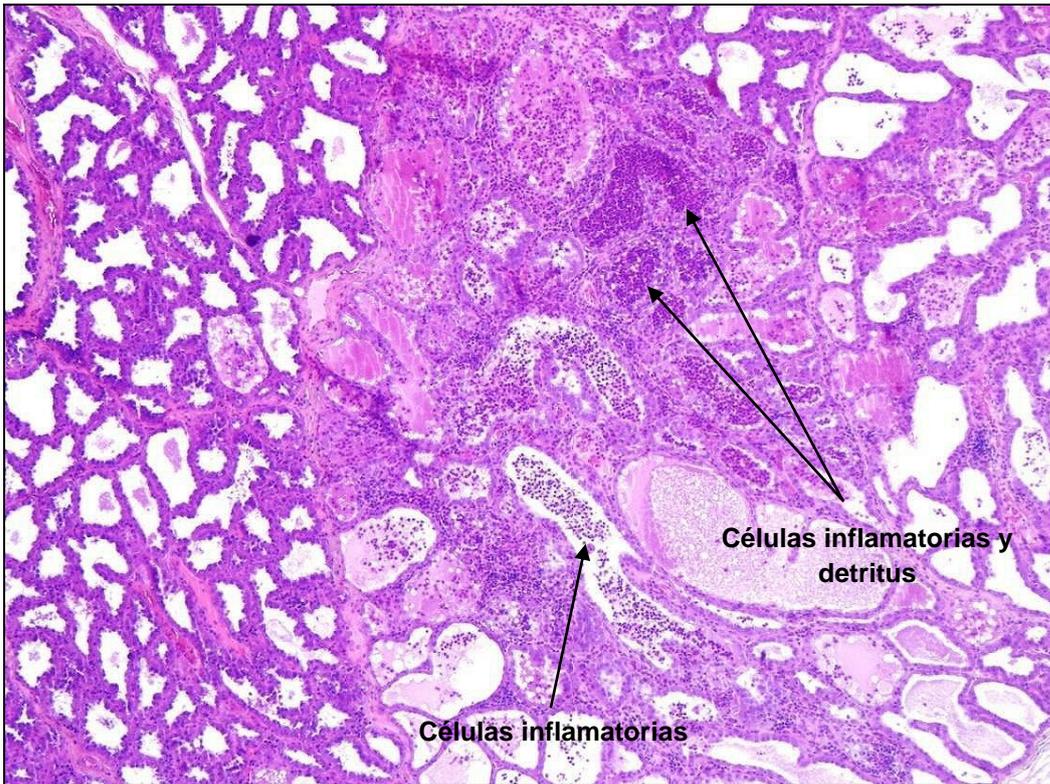


**Figura 34:** Mastitis moderada. Cepa inoculada: ST121. Presencia de numerosos focos de necrosis, con bacterias cocoides en su interior y gran cantidad de células inflamatorias. H&E.

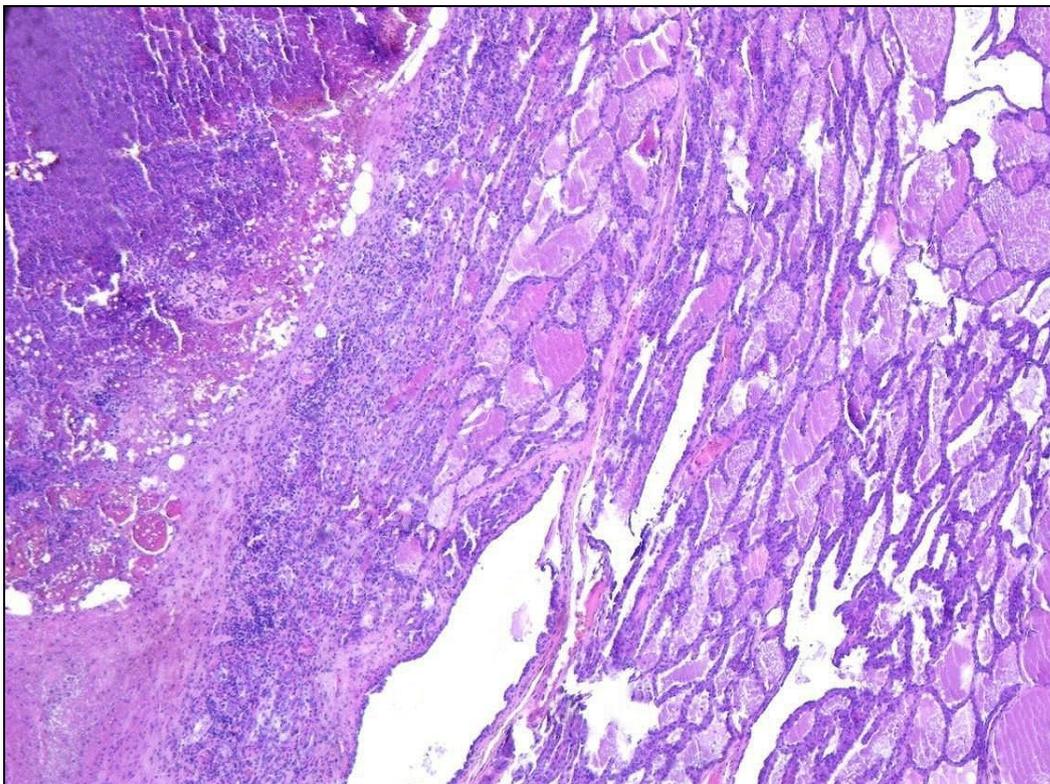


**Figura 35:** Mastitis moderada. Cepa inoculada: ST121. Detalle, a mayores aumentos, de los alveolos mamarios repletos de células inflamatorias, principalmente heterófilos. H&E

En 2 de las mamas clasificadas macroscópicamente como leves (3 casos) se observaron escasos y pequeños focos de necrosis con restos celulares en su parte central y heterófilos a su alrededor. Algunos alveolos estaban repletos de heterófilos y no pudo observarse, en ningún caso, bacterias (**Figura 36**). En cambio el tercer caso presentó gran número de pequeños focos de necrosis alrededor de un gran foco central de mayor tamaño, con gran cantidad de heterófilos alrededor de ellos y escasos acúmulos de bacterias en el centro de los alveolos, esto no se vio de forma generalizada sino solamente en una pequeña área de la preparación (**Figura 37**).



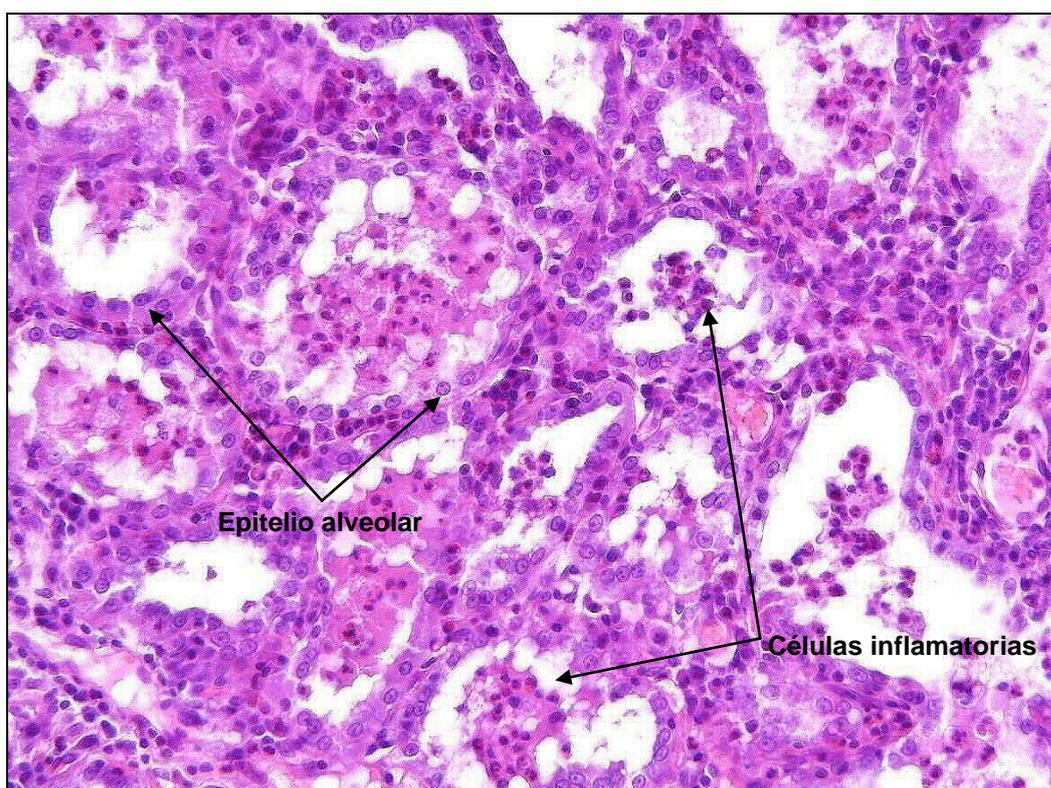
**Figura 36:** Mastitis leve donde se observa a nivel microscópico como algunos alveolos mamarios están repletos de detritus y células inflamatorias. El resto del tejido presenta características de normalidad. H&E.



**Figura 37:** Mastitis leve. Cepa inoculada: ST121. Presencia de un foco necrótico alrededor de una única área de necrosis por coagulación. H&E.

Únicamente tres animales infectados con la cepa ST96 mostraron lesiones mamarias a nivel microscópico. Entre ellos se encuentra el único animal que presentaba un pequeño nódulo mamario en el momento de su sacrificio. Las lesiones fueron muy leves y se caracterizaron por la presencia de zonas con aumento en el número de heterófilos, hiperemia y pequeños focos de necrosis **(Figura 38)**.

Ninguna de las cuatro glándulas mamarias control, mostró alteraciones histológicas.



**Figura 38:** Mastitis supurativa leve. Cepa inoculada: ST96. Incremento en el número de células inflamatorias (principalmente heterófilos) tanto a nivel intersticial como en aleolos mamarios. H&E

Todas las lesiones microscópicas fueron clasificadas utilizando criterios previamente descritos por nuestro grupo (Viana et al., 2011) y que se han complementado en el presente trabajo. Cuatro casos (nº1, 3, 7 y 10) fueron clasificados como mastitis tipo celulitis con necrosis por coagulación, otros cuatro (nº 2, 6, 8 y 11) mostraron características compatibles con mastitis mixtas con predominio del patrón lobulillar en 3 casos y del patrón absceso no encapsulado en uno. También se observó un caso (nº 4) compatible con una mastitis supurativa con patrón lobulillar y otro (nº9) del tipo absceso no encapsulado.

Las otras 4 lesiones observadas (los 3 correspondientes con la cepa 96 y el caso más leve de la cepa 121) se clasificaron únicamente como mastitis supurativas leves. **(Tabla 12)**.

**Tabla 12:** Resumen de las lesiones mamarias (macro y microscópicas) que presentaban las conejas inoculadas experimentalmente con las cepas de *S. aureus* ST121 y ST96 y PBS.

Animales	Cepa	Lesión macroscópica*	Clasificación histológica**
1	ST121	Moderada	Celulitis con mastitis necrotizante
2	ST121	Moderada	Mixta (No encapsulado)
3	ST121	Severa	Celulitis con mastitis necrotizante
4	ST121	Moderada	Mastitis supurativa con patrón lobulillar
5	ST121	Leve	Mastitis supurativa leve
6	ST121	Moderada	Mixta (patrón lobulillar)
7	ST121	Severa	Celulitis con mastitis necrotizante
8	ST121	Moderada	Mixta (patrón lobulillar)
9	ST121	Leve	Absceso no encapsulado
10	ST121	Severa	Celulitis con mastitis necrotizante
11	ST121	Leve	Mixta (patrón lobulillar)
12	ST96	Leve	Mastitis supurativa leve
13	ST96	Leve	Mastitis supurativa leve
14	ST96	Sin lesión	
15	ST96	Leve	Mastitis supurativa leve
16	ST96	Sin lesión	
17	ST96	Sin lesión	
18	ST96	Sin lesión	
19	ST96	Sin lesión	
20	ST96	Sin lesión	
21	Control	Sin lesión	
22	Control	Sin lesión	
23	Control	Sin lesión	
24	Control	Sin lesión	

\* Leve, moderada, severa, sin lesión; \*\* Según Viana et al., 2011.

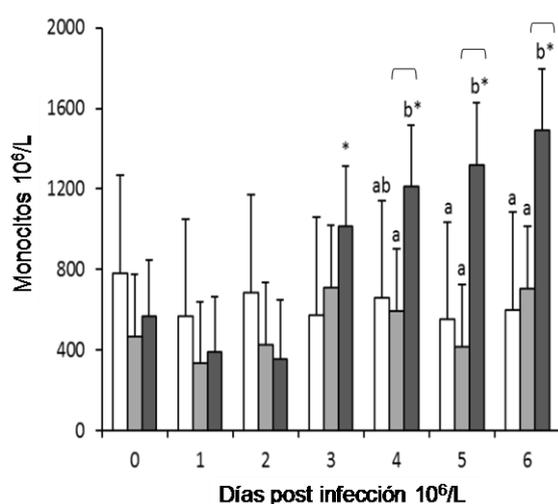
#### 4.2.4. Estudio de la respuesta inmune periférica de las mastitis experimentales.

Con el fin de estudiar el efecto de la infección mamaria con dos cepas de *S. aureus* (ST121 y ST96) sobre la respuesta inmune a nivel sistémico se tomaron, al igual que en los casos naturales, muestras de sangre periférica y se analizaron mediante citometría de flujo.

A continuación se muestra la evolución de las principales poblaciones leucocitarias sanguíneas a lo largo de todo el periodo de infección, en función de la cepa inoculada (**Figuras 39-42**). Las barras con un asterisco muestran los resultados con diferencias estadísticamente significativas respecto al día 0 ( $P < 0,05$ ). En las mismas gráficas se muestra un estudio de contrastes entre la cepa 121 y el resto de animales (animales control y animales infectados con la cepa 96) representados

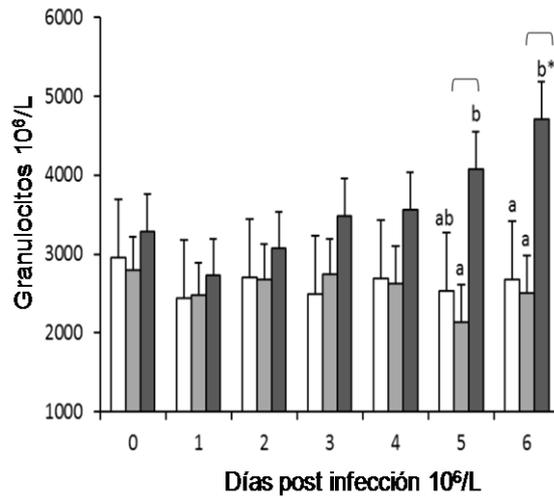
con el símbolo “∩” que aparece sobre las barras correspondientes en el momento que este contraste fue estadísticamente significativo.

La **Figura 39** representa la evolución del número de monocitos a lo largo del periodo estudiado. En ella se puede observar como a partir del día 3 esta población celular aumenta de forma significativa, respecto al día 0, para los animales infectados con la cepa ST121, hasta el final del desafío. Incluso, a partir del día 5, este aumento se hace estadísticamente significativo ( $P < 0,05$ ) frente a los niveles de monocitos en sangre del resto de animales (infectados por la cepa ST96 y controles). Estas diferencias se hacen patentes antes (4 dpi) entre los grupos ST121 y ST96.



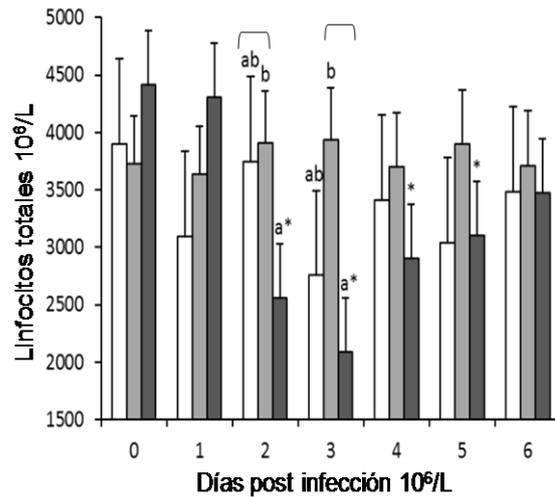
**Figura 39:** Variación del número de monocitos sanguíneos durante los 6 días de infección en función de la cepa inoculada: □ control, ■ ST96 y ■ ST121. \* Significativamente diferente ( $P < 0,05$ ) con el valor antes de la infección (tiempo 0). ∩ Contraste [cepa ST121 - (0,5 Control + 0,5 cepa ST96)] significativas a  $P < 0,05$ . <sup>a, b</sup> Los valores representados en barras correspondientes a los diferentes grupos (Control, ST96, ST121), en el mismo día, que no comparten la misma letra son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

La **Figura 40** representa la evolución de la población de granulocitos sanguíneos para cada grupo experimental. En el caso de los animales control e inoculados con la cepa ST96, no se produjo importantes fluctuaciones en el recuento de granulocitos a lo largo de la infección. Por el contrario, en el grupo ST121 el número de granulocitos fue en ascenso, siendo en el día 6 p.i estadísticamente significativo su número con respecto al día 0. Al comparar entre grupos, podemos observar que el grupo de animales infectados con la cepa ST121 presentaban más granulocitos que el resto de animales al final del experimento (día 6) y que el grupo ST96 desde el día 5 p.i., de forma similar a lo que ocurría con los monocitos, aunque con un desfase de 24 horas.

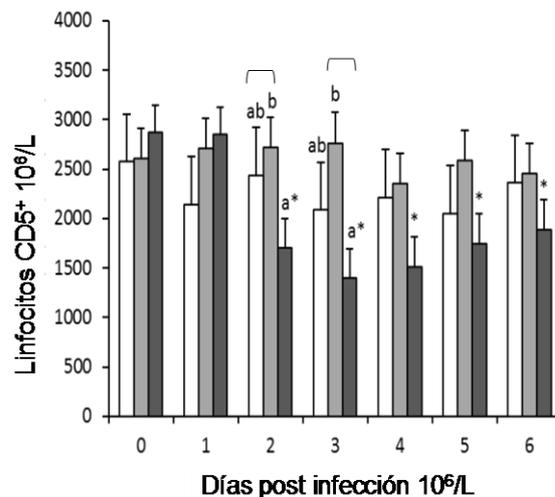


**Figura 40:** Variación del número de granulocitos sanguíneos durante los 6 días de infección en función de la cepa inoculada: □ control, ■ ST96 y ■ ST121. \* Significativamente diferente ( $P < 0,05$ ) con el valor antes de la infección (tiempo 0). ◡ Contraste [cepa ST121 - (0,5 Control + 0,5 cepa ST96)] significativas a  $P < 0,05$ . <sup>a, b</sup> Los valores representados en barras correspondientes a los diferentes grupos (Control, ST96, ST121), en el mismo día, que no comparten la misma letra son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

En cuanto a la evolución de los linfocitos totales y de los linfocitos T CD5<sup>+</sup> (**Figuras 41 y 42**) cabe destacar, en ambos casos, una brusca caída del número de estas células en los animales inoculados con la cepa ST121 en los días 2 y 3 p.i. respecto al día 0 y también en comparación con los resultados obtenidos por los otros dos grupos en conjunto. A partir del día 3 p.i., los recuentos en ambos tipos de células fueron aumentando de forma progresiva. Los recuentos de linfocitos totales, al final del experimento, alcanzaron niveles más elevados (no estadísticamente diferentes del valor inicial), no ocurriendo lo mismo con los recuentos de linfocitos T CD5<sup>+</sup> que, aunque también fueron aumentando, en todo momento fueron estadísticamente inferiores a los iniciales.



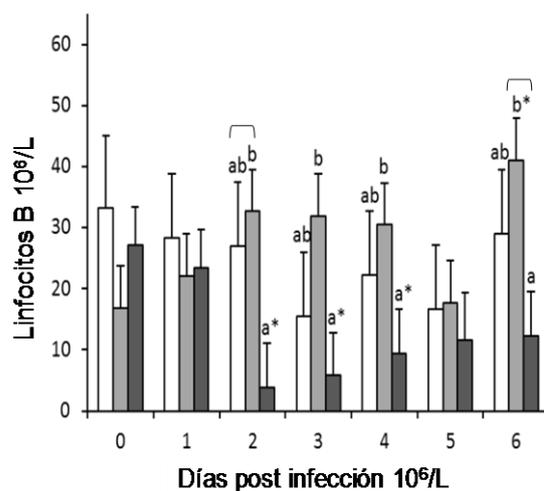
**Figura 41:** Variación del número de linfocitos totales sanguíneos durante los 6 días de infección en función de la cepa inoculada: □ control, ■ ST96 y ■ ST121. \* Significativamente diferente ( $P < 0,05$ ) con el valor antes de la infección (tiempo 0). ∩ Contraste [cepa ST121 - (0,5 Control + 0,5 cepa ST96)] significativas a  $P < 0,05$ . <sup>a, b</sup> Los valores representados en barras correspondientes a los diferentes grupos (Control, ST96, ST121), en el mismo día, que no comparten la misma letra son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).



**Figura 42:** Variación del número de linfocitos T CD5<sup>+</sup> sanguíneos durante los 6 días de infección en función de la cepa inoculada: □ control, ■ ST96 y ■ ST121. \* Significativamente diferente ( $P < 0,05$ ) con el valor antes de la infección (tiempo 0). ∩ Contraste [cepa ST121 - (0,5 Control + 0,5 cepa ST96)] significativas a  $P < 0,05$ . <sup>a, b</sup> Los valores representados en barras correspondientes a los diferentes grupos (Control, ST96, ST121), en el mismo día, que no comparten la misma letra son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

La evolución en el número de linfocitos totales y T CD5<sup>+</sup>, representadas en las dos figuras anteriores, se repite para los recuentos de linfocitos B. En la **Figura 43** se puede constatar que en el día 2 de infección se produce una caída brusca de linfocitos B para los animales inoculados con la cepa ST121. Esta caída es significativa respecto al valor del día 0 y respecto a los niveles obtenidos por los

animales inoculados con la cepa ST96. A partir de este momento la población de linfocitos B, en este grupo, fue aumentando ligeramente, dejando de ser significativamente distintos al día 0 a partir del quinto día p.i.; en ese punto los recuentos de esta población celular entre los animales inoculados con la cepa ST121 y la cepa ST96 se asemejan. Al final del experimento (día 6 p.i.), la población de linfocitos B de los animales inoculados con la cepa ST96 sufre una elevación, volviendo a aparecer diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ST96 y ST121.



**Figura 43:** Variación del número de linfocitos B sanguíneos durante los 6 días de infección en función de la cepa inoculada: □ control, ■ ST96 y ■ ST121. \* Significativamente diferente ( $P < 0,05$ ) con el valor antes de la infección (tiempo 0). ◡ Contraste [cepa ST121 - (0,5 Control + 0,5 cepa ST96)] significativas a  $P < 0,05$ . <sup>a, b</sup> Los valores representados en barras correspondientes a los diferentes grupos (Control, ST96, ST121), en el mismo día, que no comparten la misma letra son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

En resumen, se puede decir que los animales infectados con la cepa ST121 mostraron una evolución creciente y un mayor número de monocitos y granulocitos que el grupo ST96, alcanzando valores máximos a los 6 días p.i. Sin embargo presentaron una disminución del número de linfocitos a los 2-3 días p.i. para luego irse elevando paulatinamente. Este comportamiento fue más intenso en el caso de los linfocitos B, que mantuvieron valores menores en comparación con el grupo ST96 hasta el final del experimento. Por lo tanto, los animales inoculados con la cepa ST121 mostraron unos recuentos sanguíneos de linfocitos totales, linfocitos CD5<sup>+</sup> y linfocitos B más bajos que los conejos infectos con la cepa ST96 y los animales control.

Los conejos infectados con la cepa ST96 no presentaron diferencias, estadísticamente significativas, con el grupo control en ningún momento del experimento.

Respecto a la evolución de las poblaciones celulares estudiadas a lo largo del experimento, todas las células de los animales infectados con la cepa ST121 mostraron, en algún momento, diferencias respecto al tiempo 0. Este hecho contrasta con los animales infectados con la cepa ST96 que únicamente presentaron un incremento en el número de linfocitos B al final del estudio.

Para profundizar en el conocimiento de la respuesta inmune sistémica también se estudió el comportamiento de las subpoblaciones de linfocitos T CD5<sup>+</sup>: CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y CD25<sup>+</sup> (**Figuras 44 - 46**).

El día 2 p.i. se produce una disminución de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en los animales inoculados con la cepa ST121 (**Figura 44**). Esta caída era estadísticamente significativa respecto al valor obtenido al inicio del estudio (día 0). La diferencia se mantuvo a lo largo de todo el experimento.

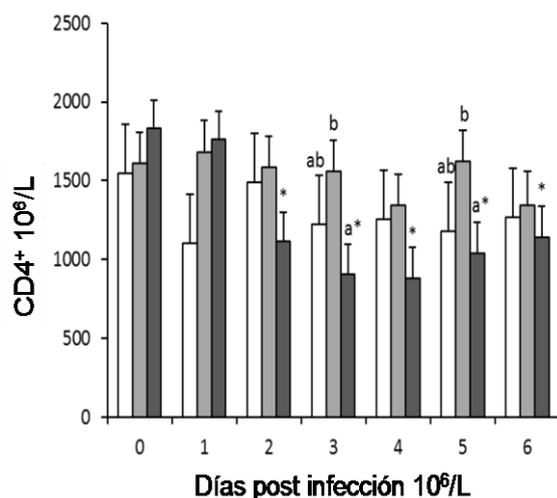
Al comparar los recuentos celulares entre los grupos inoculados con las cepas ST121 y ST96 se observó que el grupo ST121 presentaba menor número de linfocitos T CD4<sup>+</sup> a partir de los 2 días p.i. y hasta el final del estudio, aunque estas diferencias únicamente eran estadísticamente significativas a los 3 y 5 días p.i.

El comportamiento de la población de linfocitos T CD8<sup>+</sup> (**Figura 45**) fue análogo al de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, se produjo una disminución en su número que se inició el día 2 p.i. y se mantuvo hasta el día 4 p.i., momento que comenzó a recuperarse hasta finalizar el desafío. Las diferencias observadas fueron estadísticamente significativas respecto a los valores iniciales (día 0), desde el día 2 p.i. hasta el final. Estos valores tan bajos hicieron que en los días 3 y 4 p.i. aparecieran diferencias estadísticas entre ambos grupos de animales infectados (ST121 vs. ST96), apareciendo también reflejadas en el estudio de comparación.

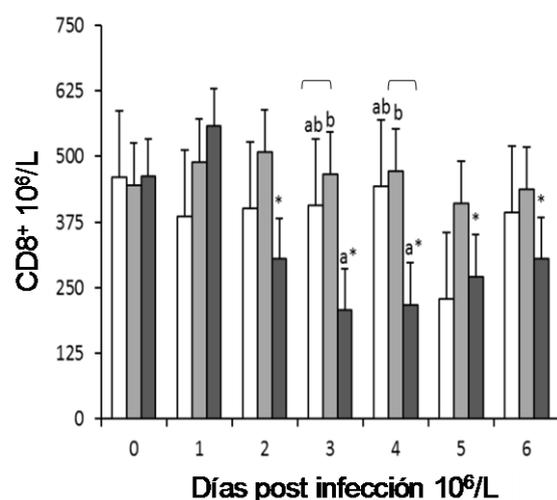
Con respecto a la población de linfocitos T CD25<sup>+</sup> (**Figura 46**), tan solo se observó un aumento significativo, con respecto al día 0, para los animales infectados con la cepa ST96. El aumento se detectó ya el día 1 p.i., manteniéndose con fluctuaciones durante toda la infección, siendo estadísticamente significativo los días 1, 4, 5 y 6 p.i.

En resumen, los resultados indican una disminución en el número de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> los días 2 y 3 p.i., en los individuos infectados con la cepa ST121, que justificaría la bajada de recuentos en linfocitos T CD5<sup>+</sup>, ya que cabe recordar que, tanto los linfocitos CD4<sup>+</sup> como los linfocitos CD8<sup>+</sup> son también células CD5<sup>+</sup>. Esto implica que cualquier variación en estas subpoblaciones, se traducirá en una

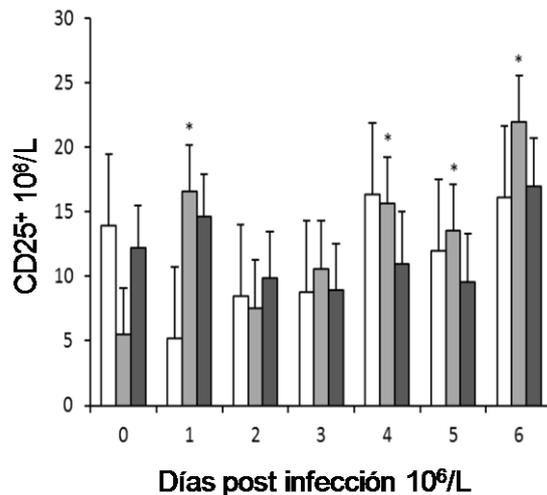
variación en la población de linfocitos T CD5<sup>+</sup>, y a su vez esta repercutirá en el valor de los linfocitos totales de la sangre. Este hecho, sumado con la caída de los linfocitos B en ese mismo momento (día 2 p.i), provoca que los animales infectados con la cepa ST121 muestren, como ya se ha descrito, una disminución de linfocitos totales a los 2-3 días p.i. y una posterior recuperación, con recuentos más bajos que los conejos infectados por la cepa ST96.



**Figura 44:** Evolución del número de las subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> sanguíneos durante los 6 días de infección en función de la cepa inoculada: □ control, ■ ST96 y ■ ST121<sup>a, b</sup>. Los valores representados en barras correspondientes a los diferentes grupos (Control, ST96, ST121), en el mismo día, que no comparten la misma letra son significativamente diferentes (P<0,05).



**Figura 45:** Evolución del número de las subpoblaciones de linfocitos T CD8<sup>+</sup> sanguíneos durante los 6 días de infección en función de la cepa inoculada: □ control, ■ ST96 y ■ ST121. <sup>a, b</sup>Contraste [cepa ST121 - (0.5 Control + 0.5 cepa ST96)] significativas a P < 0,05. <sup>a, b</sup> Los valores representados en barras correspondientes a los diferentes grupos (Control, ST96, ST121), en el mismo día, que no comparten la misma letra son significativamente diferentes (P<0,05).



**Figura 46:** Evolución del número de las subpoblación de linfocitos T CD25<sup>+</sup> sanguíneos durante los 6 días de infección en función de la cepa inoculada: □ control, ■ ST96 y ■ ST121.<sup>a, b</sup> Los valores representados en barras correspondientes a los diferentes grupos (Control, ST96, ST121), en el mismo día, que no comparten la misma letra son significativamente diferentes (P<0,05).

Por último en la **Tabla 13** se muestra los valores medios obtenidos durante los 6 días que duró el desafío para cada población estudiada dependiendo de la cepa inoculada. Se puede confirmar que los individuos inoculados con la cepa ST121 mostraron un mayor recuento de monocitos y granulocitos en sangre que aquellos inoculados con la cepa ST96, pero menor de linfocitos B si la comparamos con el resto de grupos (ST96 y control).

**Tabla 13:** Efecto de la cepa inoculada sobre la media obtenida durante todo el desafío de las poblaciones leucocitarias sanguíneas con respecto al día 0 (media ± SE).

	Cepa <sup>1</sup>			P-value
	Control	ST96	ST121	
Nº de observaciones	28	63	64	
Nº de Leucocitos (10 <sup>6</sup> /L):				
Linfocitos totales	3348 ± 587	3787 ± 364	3263 ± 336	0,5661
Linfocitos T CD5 <sup>+</sup>	2266 ± 391	2599 ± 242	1995 ± 222	0,2019
Linfocitos T CD4 <sup>+</sup>	1296 ± 255	1537 ± 159	1241 ± 145	0,3872
Linfocitos T CD8 <sup>+</sup>	388,3 ± 102,4	460,8 ± 63,6	332,4 ± 58,0	0,3394
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	4,93 ± 0,93	3,94 ± 0,58	5,54 ± 0,54	0,1463
Linfocitos T CD25 <sup>+</sup>	11,56 ± 3,23	13,03 ± 2,01	11,90 ± 1,91	0,8951
Linfocitos B	24,58 ± 5,20 <sup>a</sup>	27,53 ± 3,16 <sup>a</sup>	13,41 ± 3,16 <sup>b</sup>	0,0120
Monocitos	631,4 ± 149,4 <sup>ab</sup>	521,4 ± 92,5 <sup>a</sup>	907,7 ± 89,0 <sup>b</sup>	0,0120
Granulocitos	2642 ± 491 <sup>ab</sup>	2567 ± 303 <sup>a</sup>	3558 ± 287 <sup>b</sup>	0,0580

<sup>1</sup>Cepas: Control (PBS); ST 96; ST 121.

#### 4.2.5. Estudio de la respuesta inmune local en casos experimentales de mastitis estafilocócicas

Con el fin de poder valorar el efecto de la infección con ambas cepas de *S. aureus* (ST121 y ST96) sobre la respuesta inmune local en tejido mamario, se llevó a cabo, al igual que se hizo en el estudio de las mastitis naturales, un estudio inmunocitoquímico al final de la infección (**Tabla 14**).

Únicamente se observaron diferencias, estadísticamente significativas, en el número de macrófagos (Ram 11<sup>+</sup>) y células plasmáticas (IgG<sup>+</sup>) por mm<sup>2</sup>. De tal forma que los animales inoculados con la cepa ST121 presentaban un mayor número de células Ram 11<sup>+</sup> e IgG<sup>+</sup> (células plasmáticas) que el resto de grupos, aunque estas diferencias sólo fueron estadísticamente representativas con el grupo control (P<0.05). Aunque los valores de recuentos para las poblaciones de linfocitos T (CD3<sup>+</sup>) y linfocitos B (CD 79<sup>+</sup>) fueron superiores para los tejidos de conejos inoculados con la cepa ST121 (P<0,10), no se observaron diferencias significativas en función de la cepa administrada.

**Tabla 14:** Efecto de la cepa inoculada en el recuento de células inflamatorias detectadas mediante técnicas inmunohistoquímicas al final del desafío.

	Cepa			P-value	Contraste
	Control	ST96	ST121		
Nº de animales	4	9	11		
Leucocitos (células/mm <sup>2</sup> ):					
CD3 <sup>+</sup>	23,44 ± 67,30	91,67 ± 44,87	165,51 ± 40,58	0,1843	+108,0±57,3 <sup>+</sup>
CD79 <sup>+</sup>	15,00 ± 56,20	53,75 ± 37,47	128,24 ± 33,89	0,1707	+93,9±47,8 <sup>+</sup>
Ram11 <sup>+</sup>	25,16 ± 68,24 <sup>a</sup>	145,00 ±45,49 <sup>ab</sup>	237,56 ± 41,15 <sup>b</sup>	0,0406	+152,5±58,1 <sup>*</sup>
IgG <sup>+</sup>	15,00 ± 27,73 <sup>a</sup>	47,01 ± 18,49 <sup>ab</sup>	97,27 ± 16,72 <sup>b</sup>	0,0525	+61,3±23,6 <sup>*</sup>

<sup>ab</sup>Medias en la misma columna que no comparten el mismo superíndice son significativamente diferentes para P<0,05. <sup>1</sup>Contraste [cepa ST121 – (0,5 Control + 0,5 cepaST96)]. + P<0,10 y \* P<0,05.

#### 4.2.6. Relación entre las respuestas inmunes periférica y local en el estudio experimental.

Con el objetivo de comprobar si existía alguna conexión entre las respuestas inmunes periférica y local generadas tras la infección experimental, se realizó un estudio de correlaciones que se encuentra representado en la **Tabla 15**.

Los resultados obtenidos mostraron la existencia de una correlación positiva entre el número de granulocitos sanguíneos y todas las poblaciones leucocitarias estudiadas en la glándula mamaria (de +0,57 a +0,70;  $0,001 < P < 0,01$ ).

Por otro lado, la cantidad de células CD79<sup>+</sup> tisulares presentaba una correlación negativa con los linfocitos totales sanguíneos, especialmente los T, pero positiva con los granulocitos ( $P < 0,001$ ). Es decir, a más células CD79<sup>+</sup> presentes en glándula mamaria, menor número de linfocitos en sangre pero mayor número de granulocitos.

**Tabla 15:** Correlación simple entre el número de leucocitos sanguíneos evaluados mediante citometría de flujo el día del sacrificio y el número de leucocitos tisulares evaluados mediante inmunocitoquímica en glándula mamaria

	Leucocitos tisulares			
	CD3 <sup>+</sup>	CD79 <sup>+</sup>	Ram11 <sup>+</sup>	IgG <sup>+</sup>
Leucocitos sanguíneos				
Linfocitos totales	-0,3416	-0,5478**	-0,3107	-0,2589
Linfocitos B	-0,3012	-0,3498	-0,3060	-0,3379
Linfocitos T CD5 <sup>+</sup>	-0,3056	-0,5358**	-0,3978	-0,3128
CD4 <sup>+</sup>	-0,2226	-0,4806*	-0,3373	-0,2422
CD8 <sup>+</sup>	-0,2059	-0,4335*	-0,3346	-0,2839
CD25 <sup>+</sup>	+0,0276	-0,2595	+0,1056	+0,0876
Monocitos	+0,1642	+0,3275	+0,4150*	+0,3082
Granulocitos	+0,5701**	+0,7000***	+0,6690***	+0,6885***

Correlaciones significativas presentadas como: \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ .

Con el fin de conocer si existía alguna conexión entre la respuesta inmune local, en el momento del sacrificio y la respuesta inmune sistémica a lo largo de la infección, se realizó otro estudio de correlación. Para realizarlo, se tomó como momento 0 el día en que fue posible detectar macroscópicamente la mastitis (DAMM). De modo que, los días anteriores a DAMM se numeraban con un signo negativo (-1, -2, -3,...), mientras que los días posteriores a DAMM se numeraban de forma positiva (1, 2, 3, ...). De esta forma se podía conocer en qué momento respecto a DAMM aparecía la correlación.

La **Tabla 16** muestra los coeficientes de correlación simple entre el recuento de leucocitos tisulares y el recuento de los leucocitos sanguíneos, observados en diferentes días respecto al día de aparición de la mastitis de forma macroscópica (DAMM). Puesto que los únicos animales que mostraron lesión fueron los infectados con la cepa ST121, en esta tabla la “n” máxima es igual a 11.

En ella se puede comprobar que existe una claracorrelación negativa ( $P < 0,01$ ) entre la población de macrófagos tisulares ( $Ram\ 11^+$ ) con los linfocitos totales sanguíneos, un día antes de que la mastitis se detectara visualmente. En ese momento también apareció una correlación positiva entre el ratio de  $CD4^+/CD8^+$  con la población de linfocitos T ( $CD3^+$ ) ( $P < 0,01$ ) y con la población de linfocitos B ( $CD79^+$ ) ( $P < 0,01$ ) tisulares.

Un día después de la aparición de la mastitis, se observa una correlación positiva entre los granulocitos de la sangre y los  $CD3^+$  y  $CD79^+$  del tejido ( $P < 0,05$ ). Los linfocitos B tisulares ( $CD79^+$ ) se correlacionaron positivamente con las poblaciones de linfocitos totales sanguíneas los días 4 y 5 post DAMM ( $P < 0,01$ ) y con los linfocitos T  $CD5^+$  ( $P < 0,001$ ) en día 5.

**Tabla 16:** Coeficiente de correlación simple entre el recuento de leucocitos tisulares, evaluados mediante técnicas inmunocitoquímicas, y el recuento de leucocitos sanguíneos, evaluados mediante citometría de flujo, en distintos días respecto al día de aparición de la mastitis (DAMM).

Leucocitos sanguíneos	n	DAMM	Leucocitos tisulares			
			$CD3^+$	$CD79^+$	$Ram11^+$	$IgG^+$
Linfocitos totales	11	- 1	-	-	<b>-0,8006**</b>	-
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	11	- 1	<b>+0,7280**</b>	<b>+0,7217**</b>	-	-
Granulocitos	9	+1	+0,7091*	+0,7450*	-	-
Linfocitos totales	7	+4	-	+0,8678**	-	-
Linfocitos totales	6	+5	-	+0,9421***	-	-
Linfocitos T $CD5^+$	6	+5	-	+0,8669***	-	-

Correlación significativa representada por: \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ .

### **4.3. Comparación mastitis naturales versus experimentales en función de la cepa de *S. aureus*.**

Tras realizar la infección experimental y una vez obtenidos los resultados se procedió a realizar una comparación entre las respuestas inmunes (local y periférica) así como de las lesiones desarrolladas en casos experimentales y naturales.

Macroscópicamente, tanto las mastitis naturales como experimentales (excluyendo a los tres casos clasificados como mastitis severas), las mamas afectadas

aparecieron aumentadas de tamaño, enrojecidas y de consistencia firme. En ambos casos, destacaba la presencia de material purulento dentro de las mamas afectadas.

A nivel macroscópico la cepa ST96 en condiciones naturales produjo mastitis clínica con iguales características que las mastitis generadas por las cepas ST121, mientras que en condiciones experimentales, no se obtuvo ninguna mastitis clínica producida por la cepa ST96.

A nivel microscópico y tal como está expuesto en el apartado 4.2.3. las mastitis experimentales generadas por la cepa ST121 mostraron características microscópicas compatibles con las mastitis naturales por lo que se pudieron clasificar utilizando los criterios previamente descritos por nuestro grupo (Viana et al., 2011). La diferencia es que mientras que en la clasificación de las mastitis naturales el grupo más prevalente fue el de las mastitis con abscesos no compactos (52 casos de 204) seguidos del tipo celulitis con mastitis necrotizante (36 casos de 204). En las mastitis experimentales predominaron las celulitis con mastitis necrotizante y las mastitis leve (4 casos de 14 respectivamente) seguidas de las mastitis mixtas con predominio del patrón lobulillar (3 casos de 14 casos).

A nivel de la respuesta inmune periférica de las mastitis naturales (punto 4.1.4) los datos revelaron que los animales infectados por cepas ST96 mostraron en su sangre más del doble de linfocitos B ( $P < 0,01$ ), T ( $P < 0,001$ ),  $CD4^+$  ( $P < 0,001$ ),  $CD8^+$  ( $P < 0,01$ ) y  $CD25^+$  ( $P < 0,10$ ) y un 35% menos de granulocitos ( $P < 0,01$ ) que los animales infectados con cepas ST121. En los datos obtenidos en la mastitis experimental los animales inoculados con la cepa ST96 también mostraron niveles superiores para estas poblaciones linfocitarias frente a la cepa ST121. Al igual que la respuesta de la cepa ST121 se caracterizó por presentar a lo largo de la infección niveles bajos de linfocitos totales, T,  $CD4^+$  y  $CD8^+$ , pero altos niveles de granulocitos, tal y como ocurre en la respuesta periférica de esta cepa en condiciones naturales.

#### **4.4. Distribución de genes de virulencia entre aislados de *S. aureus***

Una vez obtenidos los resultados de citometría de flujo y tras observar la existencia de una respuesta inmune diferente entre los aislados pertenecientes a la cepa ST121 y los pertenecientes a la cepa ST96, y visto que la cepa ST96 no generó apenas lesión en los animales infectados con ésta, se quiso ver si existía alguna diferencia en cuanto a la virulencia de una y otra cepa. Para ello se seleccionaron

40 aislados bacterianos previamente estudiados, 30 pertenecientes a cepas ST121 y 10 a cepas ST96.

A modo de recuerdo, de los 34 factores de virulencia estudiados, ocho eran adhesinas implicadas en la adhesión a las células del hospedador (*fnbA*, *clfA*, *sdrC*, *icaA*, *Cna*, *SdrD*, *SdrE*, *fnbB*), ocho factores de virulencia eran enterotoxinas o toxinas gastroentéricas (*sea*, *seb*, *sec*, *see*, *sed*, *seg*, *seh*, *sei*), seis factores de virulencia que codifican toxinas no gastroentéricas (*selk*, *sell*, *selm*, *seln*, *selo*, *selu*), dos factores que codifican polisacáridos capsulares (Cap5 y Cap8), 2 factores que codifican para toxinas que actúan sobre la migración y la actividad fagocitaria de los leucocitos (*hlgC*, *lukS*, *F-PV*), dos factores que codifican toxinas exfoliativas (*eta* y *etb*), un factor que codifica para la toxina productora del síndrome tóxico (*tst*) y otro que codifica para una proteasa (*sspA*). Además se estudiaron 4 genes accesorios reguladores (*AgrI*, II, III y IV).

Siete determinantes de virulencia resultaron ser positivos tanto para la cepa ST121 como para la cepa ST96. Cinco factores de virulencia fueron adhesinas (*cna*, *fnbA*, *clfA*, *sdrC*, *icaA*), uno de los factores de virulencia resultó ser una toxina (*hlgC*) y otro factor de virulencia fue el de la proteasa A (*sspA*). Por otro lado, diez factores de virulencia no pudieron ser detectados utilizando los cebadores de oligonucleótidos disponibles, ya que ninguno de los dos tipos de ST codificaban para, *tst*, *sea*, *seb*, *sec*, *see*, *seh*, *sell*, *eta*, *etb* y *lukS*, *F-PV*. Con respecto a los factores que codificaban para los polisacáridos capsulares, los dos tipos de cepas codificaron para Cap8.

En la **Tabla 17** aparecen reflejados los porcentajes obtenidos en función del tipo de cepa ST correspondiente para los factores de adhesión y para el grupo agr. Un resultado llamativo fue que, mientras que la cepa ST121 presentaba en un 100% como gen regulador el *agrIV*, la cepa ST96 lo hacía para *agrIII*. Por otro lado, aunque los dos tipos de cepas presentaban *sdrE*, la cepa ST121 lo hacía en un porcentaje mucho mayor (97% frente a 60%).

**Tabla 17:** Porcentaje de adhesinas y *agr* dependiendo del tipo de cepa ST.

ST	Nº aislados	<i>sdrD</i>	<i>sdrE</i>	<i>fnbB</i>	<i>agrI</i>	<i>agrII</i>	<i>agrIII</i>	<i>agrIV</i>
121	30	93%	97%	50%	-	-	-	100%
96	10	90%	60%	100%	-	-	100%	-

En función de los aislados correspondientes a cada cepa ST también aparecieron diferencias, la **Tabla 18** muestra como las adhesinas *sdrD*, *sdrE* y *fnbB* fueron variables para dos aislados pertenecientes a la cepa ST121 (cepa A1/II1/δ y cepa A1/II1/η). La cepa B1/IV2/γ carecía tanto de *sdrD* como de *sdrE*. Todos los aislados estudiados pertenecientes a la cepa ST96 presentaron la adhesina *fnbB* mientras que tan solo la mitad de los aislados estudiados de la cepa ST121 la mostraron.

**Tabla 18:** Porcentaje de adhesinas y *agr* dependiendo del tipo de ST y del genotipado de cada ST.

Cepa	ST	Nº aislados	<i>sdrD</i>	<i>sdrE</i>	<i>fnbB</i>	<i>agrI</i>	<i>agrII</i>	<i>agrIII</i>	<i>agrIV</i>
A1/II1/δ	121	20	91%	95%	41%	-	-	-	100%
A1/II1/ε	121	2	100%	100%	100%	-	-	-	100%
A1/II1/η	121	6	100%	100%	50%	-	-	17%	83%
A1/III1/δ	121	2	100%	100%	100%	-	-	-	100%
B1/IV1/α	96	1	100%	-	100%	-	-	100%	-
B1/I1/δ	96	2	100%	-	100%	-	-	100%	-
B1/I1/α	96	6	100%	100%	100%	-	-	100%	-
B1/IV2/γ	96	1	-	-	100%	-	-	100%	-

Los genes de *S. aureus* que codificaban para enterotoxinas y que fueron variables dependiendo del tipo de ST que mostraba la bacteria aparecen en la **Tabla 19**. Al igual que en la tabla anterior los datos aparecen reflejados en porcentajes. Como se puede ver, la cepa ST121, presentó de forma general, las enterotoxinas *seg*, *sei*, *selm*, *seln*, *selo*, *selu* y en menor porcentaje *selk*, mientras que la cepa ST 96 carecían de ellas. Tan solo presentó la enterotoxina *sed* en un 80% y en menor medida *selu* en un 30%.

Los diferentes aislados estudiados y la presencia de genes para las diferentes enterotoxinas se muestran en la **tabla 20**. Con algunas excepciones, *sed*, *seh*, *selk*, *sell* y *selu* fueron variables en seis aislados diferentes (A1/II1/δ, A1/II1/η, A1/III1/δ, B1/I1/α, B1/I1/δ y B1/IV1/α). La cepa B1/IV2/γ carecía de enterotoxinas. Como se puede ver, los aislados pertenecientes a la cepa ST121, presentaron de forma general, las enterotoxinas *seg*, *sei*, *selm*, *seln*, *selo*, *selu* y en menor porcentaje *selk*, mientras que los aislados pertenecientes a la cepa ST 96 carecían de ellas y tan solo presentaron la enterotoxina *selu*, a excepción de la cepa B1/IV1/α, que también mostró las enterotoxinas *sed* y *seh*.

**Tabla 19:** Porcentaje de enterotoxinas en función del tipo de ST.

<b>ST</b>	<b>N°aislados</b>	<b>sed</b>	<b>seg</b>	<b>sei</b>	<b>selk</b>	<b>selm</b>	<b>seln</b>	<b>selo</b>	<b>selu</b>
121	30	3%	100%	100%	30%	100%	100%	100%	100%
96	10	80%	-	-	-	-	-	-	30%

**Tabla 20:** Porcentaje de enterotoxinas en función del genotipado de cada ST.

<b>ST</b>	<b>Genotipo</b>	<b>N°aislados</b>	<b>sed</b>	<b>seg</b>	<b>sei</b>	<b>selk</b>	<b>selm</b>	<b>seln</b>	<b>selo</b>	<b>selu</b>
121	A1/II1/δ	20	-	100%	100%	<b>14%</b>	100%	100%	100%	100%
	A1/II1/ε	2	-	100%	100%	-	100%	100%	100%	100%
	A1/II1/η	6	-	100%	100%	83%	100%	100%	100%	100%
	A1/III1/δ	2	<b>50%</b>	100%	100%	<b>50%</b>	100%	100%	100%	100%
96	B1/I1/α	6	100%	-	-	-	-	-	-	<b>50%</b>
	B1/I1/δ	2	<b>50%</b>	-	-	-	-	-	-	-
	B1/IV1/α	1	<b>100%</b>	-	-	-	-	-	-	-
	B1/IV2/γ	1	-	-	-	-	-	-	-	-





## **V. DISCUSIÓN**



## **5.1. Descripción histopatológica y caracterización de las respuestas inmunes local y periférica**

### **Mastitis naturales**

La infección natural por *S. aureus* en la glándula mamaria de conejas, como ya se ha indicado previamente, puede mostrar dos tipos de presentación: una mastitis gangrenosa, de curso agudo; o una mastitis supurativa, de carácter crónico (Viana et al., 2007; Corpa et al., 2009). Las mastitis naturales, presentadas en este trabajo, mostraban características típicas de mastitis supurativas de curso crónico, es decir, presentaban abscesos en diferentes fases de desarrollo en la glándula mamaria, debajo o cerca del pezón, en ocasiones, de forma similar a lo que ya describían Adlam et al. en 1976. Por lo tanto, ninguno de los 204 animales estudiados presentó características típicas de la forma aguda o gangrenosa, en la que es habitual observar edemas, hemorragias y focos de necrosis en el tejido mamario (Flatt et al., 1974; Adlam et al., 1977; Corpa et al., 2009; Viana et al., 2011).

En el momento del muestreo, no se observaron mastitis agudas en ninguna explotación. El hecho de que todas las mastitis naturales de este trabajo fueran de curso crónico podría ser debido al tipo de manejo que utilizaban las granjas estudiadas. Como suele ocurrir en la mayoría de las explotaciones cunícolas, la palpación minuciosa de las conejas (y sus glándulas mamarias) se realiza en el momento de la inseminación artificial y a los 10-15 días tras la misma (momento en el que se visitaban las granjas) para comprobar si el animal está gestante o no. Los animales que, en el momento de la inseminación, sufrían una mastitis poco evidente podían pasar desapercibidos hasta 10-15 días después (momento de la palpación abdominal). En el caso de detección de mastitis clínica en el momento de la inseminación artificial, las conejas eran retiradas y, dependiendo del estado del animal, sacrificadas o mantenidas hasta nuestra próxima visita a la granja.

La cronicidad observada en las lesiones está en consonancia con el hecho de que *S. aureus* tiene gran capacidad para persistir en el hospedador. Numerosos estudios relacionan dicha persistencia con su capacidad para sintetizar factores de virulencia, tales como la proteína A, componentes microbianos de superficie y biofilm que pueden proteger a la bacteria de la opsonofagocitosis y del efecto de los antibióticos, facilitando que la enfermedad sea de curso crónico, ya que el sistema inmune tarda más tiempo en actuar (Cucarella et al., 2002; Corrigan et al., 2007; Otto, 2008; Dhanawade et al., 2010).

En cualquier caso, puesto que todas las mastitis naturales de este estudio fueron de tipo crónico, los 204 casos se pudieron agrupar siguiendo la clasificación histológica

publicada por Viana et al. (2011). Las lesiones que se observaron con mayor frecuencia fueron los abscesos con un 47,6% de los casos, seguido de las celulitis con un 19,7% y las mastitis mixtas, con un 14,7% de los animales. Las lesiones menos frecuentes fueron las mastitis supurativas con patrón lobulillar, presentes únicamente en un 6,9% de los casos. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Viana et al. (2011), donde se observó que la lesión tipo absceso era la lesión más habitual, presentando un porcentaje mayor, incluso, que en este trabajo (66,3%), seguida de las celulitis (19,6%). Sin embargo, la diferencia con el actual estudio estaría en los porcentajes de las mastitis supurativas con patrón lobulillar (7,9%) y las mastitis mixtas (6,2%), ya que estas últimas eran el grupo menos numeroso y no las mastitis supurativas con patrón lobulillar, como ocurre en el presente trabajo. Puesto que las lesiones mixtas son aquellas que muestran características conjuntas de dos tipos de lesión, si únicamente consideramos las lesiones simples (abscesos, mastitis supurativa lobulillar y celulitis), nuestros resultados consolidarían la clasificación establecida por Viana et al. (2011). También podríamos añadir que tanto la clasificación como la proporción de las lesiones se mantienen en el tiempo, al menos en las granjas estudiadas, ya que en nuestro estudio se han observado las mismas lesiones y en proporciones semejantes a las descritas por Viana et al. (2011) con casi un lustro de diferencia.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo mediante estudios inmunohistoquímicos y de citometría de flujo pueden servir para complementar resultados publicados previamente por nuestro grupo. Si bien el espectro lesional asociado a casos de mastitis crónicas producidas por infecciones estafilocócicas en conejas ya ha sido descrito con anterioridad, la caracterización celular específica de cada lesión, la relación entre las células inmunitarias sanguíneas y tisulares y el papel que juegan las bacterias infectantes en la patogenia de la infección estafilocócica aún no habían sido descritos.

Viana et al. (2011) sugieren una posible evolución de los abscesos, basándose en las características histológicas de este tipo lesional. De esta forma se describen los abscesos compactos, con una gruesa cápsula fibrosa y poca celularidad, como la lesión más madura. Los abscesos no encapsulados constituirían la lesión más inmadura o menos evolucionada, donde predominan las células inflamatorias y en la que prácticamente no se aprecia tejido conectivo y los abscesos no compactos serían una lesión intermedia entre las dos anteriores, en la que ya pueden apreciarse fibroblastos y fibras de tejido conectivo infiltrado por numerosas células inflamatorias.

Como se ha citado anteriormente, las mastitis tipo absceso fueron la lesión que se observó con mayor frecuencia (47,6%). El 30% se correspondía con abscesos de tipo

compacto, el 53,6% con abscesos con cápsula laxa o no compactos y el 16,4% restante con abscesos no encapsulados.

La correcta formación de los abscesos en las mastitis estafilocócicas es un proceso crítico para la contención eficaz de la replicación de *S. aureus* y viene determinada por la activación y reclutamiento de linfocitos T (Tzianabos et al., 2000; Ziegler et al., 2011).

Las lesiones aparentemente más inmaduras atendiendo a sus características histológicas (abscesos no encapsulados y mastitis supurativas con patrón lobulillar), mostraron los recuentos de linfocitos T sanguíneos más altos. Por el contrario, los abscesos compactos mostraron los niveles más bajos de linfocitos T, tanto a nivel sistémico (linfocitos CD8<sup>+</sup> y, sobre todo, linfocitos CD4<sup>+</sup>) como en glándula mamaria (linfocitos CD3<sup>+</sup>). Los linfocitos T, en particular los linfocitos T CD4<sup>+</sup> juegan un papel muy importante en las infecciones por *S. aureus* ya que controlan la producción local de quimioquinas (CXC), el reclutamiento de neutrófilos al sitio de la infección, y la replicación bacteriana posterior (McLoughlin et al., 2006). Por lo tanto, son las células encargadas de controlar la patogénesis de la infección por *S. aureus* ya que, mediante la intervención de los linfocitos Th17, se consigue la regulación de los niveles de neutrófilos (McLoughlin et al., 2006). Los linfocitos Th17 logran esta regulación mediante la secreción de varias citoquinas entre las que destaca, por su efecto sobre los neutrófilos, la interleuquina 17A que interviene en la respuesta inmune innata reclutando neutrófilos al sitio de inflamación (Decraene et al., 2010; Yeaman et al., 2014). En definitiva, los linfocitos T, en general, son de gran importancia frente a la infección por *S. aureus*, además de ser las células que promueven la formación del absceso al ser activadas por la capsula bacteriana de *S. aureus* (Tzianabos et al., 2001; Ziegler et al., 2011). Por ello, los linfocitos T jugarían un papel fundamental en las fases iniciales de la formación de los abscesos y, a medida que el absceso madura y el foco inflamatorio va siendo rodeado por una densa cápsula fibrosa, el protagonismo de estas células se vuelve menos relevante, traduciéndose en una disminución en su número. Por lo tanto, las mastitis supurativas con un patrón lobulillar, por sus características histomorfológicas e inmunocitoquímicas, podrían representar una etapa temprana de la formación de los abscesos, previa al desarrollo de la cápsula fibrosa característica de las fases más maduras. De esta forma, los tres sub-tipos de abscesos (compactos, no compactos y no encapsulados), junto a la mastitis supurativa con patrón lobulillar podrían ser considerados como diferentes etapas de un mismo proceso patológico. Viana et al. (2011) sugieren, además, que las mastitis supurativas con patrón lobulillar podrían reflejar la incapacidad del sistema inmunitario para rodear y controlar el proceso inflamatorio. No obstante, el

comportamiento de la respuesta inmune en estos casos, caracterizada (como se ha indicado anteriormente) por elevados recuentos de linfocitos T, sobre todo de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, sugieren más la primera opción. En el caso de que el sistema inmune no fuera capaz de controlar la infección cabría esperar una inmunosupresión; hecho que no ocurre en los animales estudiados. Si bien es cierto que, se ha visto que *S. aureus* es capaz de generar una hiperfuncionalidad con aumento de estos linfocitos CD4<sup>+</sup> en fases iniciales de infecciones pulmonares que cursan con un mal pronóstico de la enfermedad, ya que conlleva a una sobre producción de citoquinas que altera el tejido, promoviendo en este caso la patogenia de las neumonías estafilococicas (Parker et al., 2014). Por lo que, para poder afirmar que la respuesta inmune observada en las mastitis supurativas con patrón lobulillar es adecuada, cabría realizar pruebas de funcionalidad sobre este tipo celular para saber que su función no está alterada.

Por otra parte, las mastitis supurativas con un patrón lobulillar constituyen el tipo lesional que muestra un mayor número de macrófagos en tejido. Se ha descrito que, en la glándula mamaria, los macrófagos son las células residentes responsables de la detección de bacterias invasivas. En su presencia, los macrófagos secretan leucotrieno B<sub>4</sub>, que atrae a los heterófilos (neutrófilos) a la zona que sufre la infección (McGaving et al., 2001). En las infecciones por *S. aureus*, estas células juegan un papel importante en la patogenia de la lesión, ya que una característica clave de los macrófagos activados es que producen un cambio en el metabolismo de L-arginina, causada por IL-4 (Hesse et al., 2001) que favorece la formación de granulomas y fibrosis (Cole et al., 2014) y, por lo tanto, de los abscesos. Así, Cheng et al. (2010), describieron que los abscesos que produce *S. aureus*, en las primeras fases de infección, se caracterizan histológicamente por presentar una necrosis masiva de neutrófilos rodeados por una capa de macrófagos, tal y como se observan en los focos necróticos de las mastitis supurativas con patrón lobulillar del presente trabajo. Puesto que los macrófagos son las células que atraen a los neutrófilos al lugar de la infección, cabría esperar, por lo tanto, que en este tipo lesional (mastitis supurativas con un patrón lobulillar) el número de granulocitos en sangre fuese superior al resto. Los resultados observados en este estudio mostraron mayores recuentos de granulocitos en el grupo de las mastitis supurativas con patrón lobulillar que en el resto de grupos, aunque estos valores no fueron estadísticamente significativos. El reclutamiento precoz de neutrófilos sanguíneos al lugar de la infección es fundamental para el control eficaz de la multiplicación bacteriana en fases tempranas de la infección por *S. aureus*, siendo las células dominantes en esos momentos (Veldkamp et al., 1997; Verdrengh y Tarkowski, 1997; Molne et al., 2000; von Kockritz-Blickwede et al., 2008). Por el contrario, la falta de neutrófilos funcionales o las disfunciones de éstos se asocia con un mayor riesgo de infección por *S. aureus* (Holland et al., 2007; Quilty et al

2009; Swati et al., 2010; Roos et al., 2014). Debido a que es un proceso que se desarrolla en las primeras fases infectivas, y puesto que las mastitis naturales presentadas en este estudio son procesos ya crónicos, podría justificar que las mastitis supurativas con un patrón lobulillar no muestren niveles tan elevados de granulocitos a nivel sistémico como *a priori* se esperaría.

Con respecto a la relación entre los diferentes tipos lesionales y las posibles diferencias en las poblaciones de linfocitos B, no se obtuvo ningún dato estadísticamente significativo. Por el contrario, sí se detectaron diferencias en los recuentos de células plasmáticas en tejido mamario, siendo su número superior en el grupo de los animales con mastitis supurativas con patrón lobulillar. No obstante, en los últimos años se ha descrito que los linfocitos B y las células plasmáticas juegan un papel poco importante en respuesta a infecciones por *S. aureus* (Spellberg et al., 2008; Ziegler et al., 2011). Las células B no son esenciales para una contención eficaz frente a *S. aureus* durante la infección persistente ya que esta bacteria es capaz de sobrevivir dentro de los animales infectados en presencia de altos niveles de anticuerpos antígeno-específicos, generados durante el curso de la infección. Por lo tanto, se considera que la respuesta inmune humoral no protege contra la infección estafilocócica (Ziegler et al., 2011). Además, no se ha observado una mayor susceptibilidad a infectarse con *S. aureus* en aquellos individuos que padecían procesos patológicos que cursaban con un déficit de linfocitos B. Es decir, el riesgo de estos pacientes a infectarse con *S. aureus* era igual que en el resto de individuos (Rich et al., 2001). Este hecho se ha demostrado, bajo un punto de vista práctico, en pacientes a los que se estimulaba una respuesta inmune humoral, mediante la aplicación de vacunas, siendo totalmente ineficaces contra la infección por *S. aureus* (Bagnoli et al., 2012; Spellberg y Daum, 2012). Estos trabajos justificarían, por lo tanto, que, en la lucha frente a *S. aureus*, únicamente es eficaz la respuesta inmune celular.

En lo que respecta al estudio de comparación entre el nivel de control de los abscesos, el tipo lesional más inmaduro (mastitis supurativa con patrón lobulillar) y aparentemente menos controlado, bajo un punto de vista inmunológico, mostró recuentos más altos de células CD25<sup>+</sup> (linfocitos T reguladores) que las lesiones unifocal o multifocal ( $P < 0,05$ ). Las células CD25<sup>+</sup> son linfocitos T CD4<sup>+</sup> que expresan, además, el receptor CD25 (Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>), que es un receptor para la interleuquina 2. Se pueden encontrar tanto en timo como en sangre periférica y están involucradas en los mecanismos activos de tolerancia periférica de células T autorreactivas; es decir, las que han escapado de la selección tímica y no reconocen lo propio (Maloy y Powrie, 2001; Shevach et al., 2001). Se ha descrito que este tipo de células desempeñan un papel de homeostasis vital en el sistema inmunológico, principalmente

regulando, a la baja, los efectos de la respuesta de los linfocitos T (Jonuleit et al., 2003), por lo que actúan como linfocitos supresores de inmunidad y de la inflamación. Esta función la realizan mediante la producción de citoquinas inmunosupresoras y anti-inflamatorias IL-4, IL-10 y TGF- $\beta$  que regulan la respuesta inmune (Miller et al., 1999; Ziegler et al., 2011), evitando el daño tisular que podría generarse por una reacción exacerbada de los linfocitos T (Belkaid et al., 2002). Hay que recordar que las mastitis supurativas con patrón lobulillar fueron el tipo lesional que mostró el mayor número de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, por lo que si las células CD25<sup>+</sup> son reguladoras de los linfocitos T, no parece descabellado encontrar un número elevado de estas células, que estén modulando el efecto de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>.

Se ha sugerido que la patogenia de las lesiones tipo celulitis podría ser diferente al resto de tipos lesionales, posiblemente debido a una distinta vía de entrada de la bacteria (Viana et al., 2011). La principal vía de entrada de *S. aureus* a la glándula mamaria es por el canal del pezón, aunque también es posible la vía percutánea (Foster, 2006; Schlafer, 2007). Los traumatismos en la glándula mamaria pueden causar una solución de continuidad en la piel y provocar una mayor susceptibilidad a las infecciones (Mitchell-Jones, 1999).

Los resultados obtenidos en el presente estudio parecen apoyar la hipótesis de que las mastitis tipo celulitis se originasen a partir de soluciones de continuidad en la piel (probablemente debidas a laceraciones en la piel ejercidas por los gazapos durante la lactación o asociadas a traumatismos provocados por elementos de las jaulas o el material de los nidales, aunque no ha sido demostrado). Se observaron lesiones dérmicas en 97 animales, 41 de los cuales desarrollaron celulitis y celulitis con patrón necrotizante. En ambos casos, el tejido mamario que no solía estar afectado aparecía atrófico. Esto podría deberse a la obstrucción del flujo de la leche ejercido por el tejido de granulación y la fibrosis circundante, conllevando la consiguiente involución de la glándula mamaria (Ni Eidhin et al., 1998).

Cuando la inflamación rodeó completamente a la glándula (celulitis con mastitis necrotizante) se observó necrosis por coagulación de la misma, probablemente como consecuencia de un proceso de isquemia. Esta necrosis del tejido mamario podría ser la responsable de que en este tipo lesional se detectaran recuentos de macrófagos y células plasmáticas tisulares más bajos que en el resto de grupos lesionales, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente representativas. Además, como se ha citado con anterioridad, los macrófagos son células importantes en la patogenia de la enfermedad y en la formación de los abscesos (Hesse et al., 2001; Cheng et al. 2010; Cole et al., 2014). El reducido número de macrófagos podría justificar que, en este tipo

de lesión, la patogenia sea distinta y no se genere un absceso al uso, como ocurre en los otros tipos lesionales.

La necrosis coagulativa, característica de las celulitis con mastitis necrotizante, podría estar relacionada no sólo con la vía de entrada de las bacterias (percutánea) sino también con el tipo y cantidad de toxinas producidas por las mismas al multiplicarse en el tejido. En humanos, una de las cepas más patógenas (USA300) produce graves lesiones necrotizantes en la piel debido a la expresión de toxinas citolíticas como la  $\alpha$ -toxina o PVL (Panton-Valentine leucocidina) (Wang et al., 2009; David y Daum, 2010; Kennedy et al., 2010). La  $\alpha$ -toxina, tras su unión a las membranas celulares, provoca efectos citotóxicos, hemolíticos y además es dermonecrótica (Bhakdi et al., 1991). Además, destruye los heterófilos, liberándose al tejido sus componentes citolíticos e impidiendo que se lleve a cabo la respuesta inmune (Adlam et al., 1976) produciendo necrosis del tejido. Otras toxinas de importancia en humanos son las toxinas exfoliativas *eta* y *etb*, causantes de la enfermedad de Ritter o síndrome de la piel escaldada (enfermedad que cursa con la aparición de ampollas llenas de líquido estéril por toda la piel) (Bukowski et al., 2010), y la toxina *tst* (causante del sock tóxico, que es capaz de unirse a las células epiteliales e internalizarse rápidamente, cruzando la barrera epitelial) (Breshears et al., 2012). En los tres casos son estas toxinas y no la bacteria, las causantes de la patología. A destacar que los resultados obtenidos en nuestro estudio sobre los factores de virulencia presentes en las cepas tipo ST121 y ST96 revelaron que tanto un tipo como otro carecían de las toxinas *eta*, *etb*, *tst* y del *F*-PV, por lo que podemos decir que las cepas cunicolas de *S. aureus* del tipo ST121 y ST96 carecen de estas toxinas, pero sí tienen en ambos casos la toxina (*hlgC*).

### Mastitis experimentales

Una de las razones que motivaron la realización de la infección experimental en este trabajo fue caracterizar y clasificar las lesiones iniciales de la infección estafilocócica, con objeto de confirmar si efectivamente los tres sub-tipos de abscesos y las mastitis supurativas con patrón lobulillar constituían diferentes fases evolutivas de un mismo proceso y así poder estudiar la patogenia en sus primeras fases infectivas.

Tras la infección experimental se pudieron observar tres grados lesionales macroscópicamente: mastitis leves, mastitis moderadas y mastitis severas. Este último tipo de lesión se vió en tres animales inoculados con 10.000 ufc de la cepa ST121. En el resto de animales inóculados con dosis más bajas (100 ufc y 1000 ufc) no se observaron estas características macroscópicas. Tan solo se observaron estas características en aquellos animales inoculados con un elevado número de ufc, por lo que, la cantidad de bacterias presente en el inicio de la infección, es un factor

determinante para que el proceso se decante hacia un curso u otro de la enfermedad, ya que a mayor número de bacterias, mayor número de factores de virulencia y de toxinas habrá en el tejido. En estudios realizados para ver el efecto patógeno de la toxina PVL se vió que dependiendo de la concentración de esta toxina, el efecto que producía en el hospedador era distinto, así cuando la concentración de toxina era baja inducía la apoptosis de los neutrófilos, mientras que, a mayores concentraciones, inducía necrosis tisular (Genestier et al., 2005). Otro estudio realizado por Labandeira et al., (2007) demostró que al inocular ratones con cantidades crecientes equimolares de PVL, la patogenia de la enfermedad era distinta de modo que concentraciones inferiores o iguales a 3 µg se observaron lesiones necróticas en el tejido y pérdida de peso mientras que concentraciones superiores a 3 µg provocaban altas tasas de mortalidad. Estos resultados demostraron que se requiere una infección bacteriana activa para causar morbilidad grave.

La regulación por parte de la bacteria de sus factores de virulencia juega un papel central en la patogénesis, ya que dependiendo de las condiciones que encuentre la bacteria los expresará de una forma u otra y en un momento u otro para reducir las demandas metabólicas indebidas (Gordon y Lowy, 2008). pudiera ser que en estos tres casos donde hemos observado una reacción de tipo sobreagudo, las condiciones fisiológicas de los animales fueran las óptimas para una buena multiplicación de la bacteria junto con una generación y expresión de sus factores de virulencia.

## **5.2. Relación entre las respuestas inmunes sistémica y local**

### **Mastitis naturales**

Uno de los objetivos que se pretendía conseguir en este trabajo era estudiar la posible relación entre la respuesta inmune sistémica y local. Se confirmó que existía una relación estadística entre ciertos tipos celulares sanguíneos y del tejido mamario. Así, los resultados establecieron una relación entre la población de macrófagos del tejido y los monocitos, granulocitos y linfocitos T CD4<sup>+</sup> de la sangre y también entre las células plasmáticas del tejido y los monocitos de la sangre. Siendo esta correlación más fuerte entre los macrófagos del tejido y los monocitos de la sangre. Quizás la más previsible, pero no por ello despreciable, fue la relación existente entre los monocitos sanguíneos y los macrófagos tisulares.

Los monocitos están involucrados tanto en inmunidad innata como en adaptativa (Pollard, 2009; Snyder, 2012) y durante la respuesta inmune, que tiene lugar en ambas, migran a aquellos tejidos donde se requiere su presencia, transformándose en macrófagos tisulares, siendo las células encargadas de fagocitar, procesar y presentar

los antígenos a los linfocitos T (Gómez-Lucía et al., 2007). Por tanto, parece lógico que exista una correspondencia entre el número de macrófagos tisulares en glándula mamaria y los monocitos sanguíneos, sobre todo cuando todavía existe un proceso inflamatorio activo que requiere la presencia de células fagocitarias para su resolución. Este hecho confirmaría que, a pesar de ser lesiones de curso crónico, se mantiene un vínculo entre las células tisulares y sanguíneas, que conllevaría una respuesta inmunitaria sostenida en el tiempo (Ruiz-Alcaraz et al., 2011).

#### Mastitis experimental

Al igual que en los casos naturales, se realizó el mismo estudio de correlación entre la respuesta inmune local y periférica en las mastitis experimentales. En esta ocasión también se observó una relación positiva entre las células del tejido y de la sangre, pero no fue entre los macrófagos y los monocitos, sino entre los granulocitos sanguíneos y los macrófagos y linfocitos del tejido mamario. Como se ha dicho con anterioridad, los linfocitos T producen quimioquinas locales que tienen como finalidad atraer a los granulocitos al lugar de la infección, modulando sus niveles en función de las necesidades (McLoughlin et al., 2006) y estableciéndose así una relación entre la respuesta inmune innata y adaptativa (Decraene et al., 2010; Yeaman et al., 2014). Por otro lado, los macrófagos también secretan otras citoquinas como el leucotrieno B4, que atrae a los neutrófilos a la zona invadida (McGaving et al., 2001). Además, si recordamos lo dicho con anterioridad, los neutrófilos son la primera línea defensiva frente a *S. aureus* principalmente en fases tempranas de infección (Ziegler et al., 2011), por lo que no parece sorprendente que, en los momentos de análisis de este estudio (fase subaguda de la infección), exista una intensa interacción entre células características de la inflamación aguda (neutrófilos) y crónica (macrófagos y linfocitos), sobre todo mientras la respuesta inflamatoria sigue activa, como es nuestro caso.

### **5.3. Relación entre la respuesta inmune y la cepa de *S. aureus* infectante**

#### Mastitis naturales

En el presente estudio se ha observado una gran diferencia en el número de animales infectados por cepas de *S. aureus* ST121 y el número de animales infectados por otras cepas (181 *versus* 23), de modo que de los 204 aislados estudiados se obtuvieron 17 cepas diferentes, de las cuales 6 pertenecieron la cepa ST121 (A1/III1/δ, A1/III1/ε, A1/III1/η, A1/III1/κ, A1/III1/δ y A1/III1/ε), estas 6 cepas fueron las más numerosas dentro del estudio dando lugar a 181 aislados de los 204(88,7%). Por otro lado, 4 de las 17 cepas obtenidas correspondieron a cepas tipo ST96 (B1/I1/α, B1/I1/ε, B1/IV1/α y B1/IV2/γ) obteniéndose 10 aislados de los 204 estudiados (4,9%). Estos dos tipos de

cepas ST fueron los más destacados en nuestro estudio. También se obtuvieron cepas pertenecientes a otros tipos de cepas ST pero con porcentajes muy bajos para las cepas ST SLV9 (variante de la cepa ST9) (0,49%), 398 y SLV96 (variante de la cepa ST96) con un 1,96% y ligeramente superior para la cepa ST879 (2,45%), sumando entre los tres grupos 13 aislados. Las cepas tipo ST121, ya han sido descritas en conejos por Vancraeynest et al. (2006), que mostró que los problemas crónicos generados por las estafilococias en cunicultura eran a causa de la gran distribución de este gen de *S. aureus*. Al igual que la cepa ST121, la cepa ST96 también ha sido descrita en conejos por Smyth et al. (2009). Al contrario que estas dos cepas, la cepa tipo ST398 es una cepa típica de los cerdos causando grandes pérdidas económicas en el sector porcino (Rasigade et al., 2010; Schijffelen et al., 2010) que posee subtipos capaces de infectar a otras especies como el hombre (Fitzgerald, 2012). Este resultado constata la diferente capacidad de colonizar, sobrevivir y producir lesiones clínicas de los distintos tipos de cepas de *S. aureus*, lo que confirmaría que no todas ellas poseen una misma virulencia y por ende la misma capacidad de diseminación. Esto se ha demostrado también en infecciones intramamarias producidas en vacas, infectadas con distintas cepas de *S. aureus* (Kim et al., 2011). De hecho, se ha incluido a las cepas de *S. aureus* ST121 dentro del grupo de cepas muy virulentas, ampliamente distribuidas internacionalmente y capaces de provocar graves brotes en granjas, con diferentes formas de presentación y afectando a animales de distintas edades (Vancraeynest et al., 2006; Viana et al., 2011).

En mastitis naturales en conejos, tanto las cepas ST121 como las cepas ST96 pueden producir la misma lesión (Viana et al., 2011). No obstante, tras el estudio de la respuesta inmune se pudo comprobar que los animales infectados con cepas de alta virulencia (ST121) mostraron mayores (prácticamente el doble) recuentos de granulocitos y bajos recuentos (la mitad) de linfocitos totales, células B y T, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y CD25<sup>+</sup> en sangre, respecto a animales con mastitis clínica provocada por cepas ST96. Está reportado en la bibliografía que diferencias en los polisacáridos capsulares de *S. aureus* provocan distintas respuestas inflamatorias en los hospedadores, asociadas a la activación de células T CD4<sup>+</sup> mediante el reclutamiento de neutrófilos al lugar de infección (Tzianabos et al., 2001; McLoughlin et al., 2006). Estudios recientes también han sugerido que cada linaje de *S. aureus* podría evadir la respuesta inmune de una forma diferente (McCarthy y Lindsay, 2013) por lo que no todas las cepas de *S. aureus* producen el mismo efecto sobre el sistema inmune.

En definitiva, esta diferente respuesta inmunológica del hospedador ante la infección con distintas cepas de *S. aureus* pone de manifiesto el interesante papel que juega el

sistema inmune en la interacción hospedador-bacteria y podría justificar la distinta frecuencia de animales infectados entre las diferentes cepas bacterianas.

Como ya se ha comentado con anterioridad, los neutrófilos son esenciales para la resistencia a la infección por estafilococos (McLoughlin et al., 2006, Von Kockritz - Blickwede et al., 2008), ya que constituyen la primera línea de defensa inmunológica del huésped contra la invasión de este tipo de bacterias y son un determinante crítico en el resultado de las infecciones estafilocócicas (Veldkamp et al., 1997). Juegan un papel importante en la respuesta inmune innata del huésped por medio de la eliminación de citoquinas frente a estas bacterias (McLoughlin et al., 2006). Sin embargo, parece que en los conejos infectados por la cepa ST121 la actividad de los neutrófilos se prolonga en el tiempo, hecho que no se observa en animales infectados con cepas ST96. Podría ser que la cepa ST121 tuviera la capacidad de producir una respuesta tardía de neutrófilos. Se ha descrito que esta respuesta tardía podría llevar a un aumento de la susceptibilidad a *S. aureus* (von Kockritz - Blickwede et al., 2008) que condujera a una patogenia más dilatada y al desarrollo de lesiones más severas que las generadas por cepas ST96.

En cualquier caso, en el presente estudio se ha detectado la presencia de distintas células inflamatorias, en diferente número, en todas las lesiones mamarias de curso crónico estudiadas, lo que pone de manifiesto su incapacidad para evitar la infección, originando una infección de curso crónico. Este hecho podría estar relacionado con una posible reducción de la capacidad fagocitaria de las células fagocíticas, junto a un progresivo estado de anergia de los linfocitos T. De hecho, se ha descrito que las células protagonistas de la defensa inmune innata (neutrófilos y macrófagos), críticas en el control de *S. aureus* durante la infección aguda, son prescindibles para la contención bacteriana en fases crónicas (Ziegler et al., 2011). Esto puede estar relacionado con el hecho de que la capacidad de fagocitosis de los neutrófilos en las glándulas mamarias disminuye progresivamente a medida que ingieren partículas de grasa y caseína de la leche, lo que provoca su degranulación y pérdida de pseudópodos, reduciendo su potencial bactericida (Shoshani et al., 2000). Además, la principal célula responsable del control de las estafilococias (linfocitos T), durante la transición de la infección aguda a crónica, pierde progresivamente capacidad de responder a antígenos bacterianos y exhibe un estado de anergia (Ziegler et al., 2011). Por otro lado, y como se ha comentado con anterioridad, las células B son ineficaces en la contención de *S. aureus* en las fases crónicas ya que la bacteria es capaz de sobrevivir en animales infectados, a pesar de los altos niveles de anticuerpos antígeno-específicos generados durante la infección (Ziegler et al., 2011). Por lo tanto,

son necesarios más estudios sobre la actividad funcional de estas células inmunológicas para determinar mejor su papel en las infecciones estafilocócicas.

### Mastitis experimental

Existen varios trabajos en la literatura, sobre todo en ganado vacuno, donde se describen infecciones experimentales con distintas cepas de *S. aureus* para estudiar su efecto en el hospedador. Kim et al. (2011) realizaron un estudio empleando tres cepas diferentes: una cepa de variante de colonias pequeñas Heba 3231 (SCV), caracterizada por un lento crecimiento y una morfología atípica, dotada para la supervivencia y persistencia dentro de las células huésped (Proctor et al., 1998), que demostró ser mucho más resistente a los antibióticos que las cepas parenterales y capaz de residir dentro de las células fagocíticas, provocando infecciones persistentes (Proctor et al., 1998; Atalla et al., 2008; McLoughlin et al., 2008); una cepa 3231 parenteral (Atalla et al., 2008) y la cepa Newbould 305 (ATCC 29740), una cepa obtenida de la piel de los pezones, que causa mastitis clínica en bovinos (Newbould, 1974; Smith et al., 2005) y que se utiliza con frecuencia como modelo para el estudio de la mastitis inducida por *S. aureus*. Se planteó la hipótesis de que la respuesta inmune del huésped sería diferente para SCV que para las cepas parenterales o típicas de *S. aureus*. Los resultados que obtuvieron fueron que la cepa SCV, Heba 3231, mostró un aumento de los niveles en suero de IL-8, IFN- $\gamma$  y TGF- $\beta$  durante las tres semanas posteriores a la infección que no provocaron las otras cepas. Además, mientras que la cepa 3231 parenteral y la Newbould 305 producían, a los dos días post-infección, un aumento en las proteínas séricas de la leche, Heba 3231 no lo hacía hasta los 14 días post-infección. Estos resultados eran indicativos de la naturaleza patógena aguda de las cepa parenteral 3231 y Newbould 305, y las propiedades fenotípicas únicas de las cepas SCV que probablemente le lleve a provocar una respuesta del huésped más suave (Atalla et al., 2009). En este trabajo se monitorizó la respuesta inmune del huésped en función del nivel de citoquinas y quimioquinas segregadas por las poblaciones leucocitarias en sangre y en el suero lácteo (IL-8, IFN- $\gamma$ , and TGF- $\beta$ 1), además de los niveles de proteínas de la leche. En nuestro trabajo no se estudiaron este tipo de intermediarios químicos de la inflamación y sería interesante, en el futuro, implementar nuestros experimentos con este tipo de información que ponen de manifiesto la comunicación intercelular y el correcto funcionamiento de las células involucradas en el proceso inflamatorio.

La infección experimental, llevada a cabo en esta tesis, ha puesto de manifiesto (de forma similar a lo observado en condiciones naturales) una respuesta a la infección diferente entre los animales infectados con cepas ST121 o ST96. Estas diferencias se observaron tanto en el número de animales que desarrollaron la infección (ST121:

100% versus ST96: 33%) como en la intensidad de las lesiones mamarias (ST121: 3 severas, 5 moderadas y 3 leves versus ST96: 3 leves) y en los niveles de las poblaciones leucocitarias estudiadas.

Nuestros resultados obtenidos a través de la citometría a lo largo de toda la infección revelaron que los animales inoculados con la cepa ST121, responden de forma diferente a los animales inoculados con la cepa ST96 y con los animales control, de modo que, los animales inoculados con la cepa ST121 presentaron una disminución de los linfocitos totales, linfocitos CD5<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> a los 2-3 días p.i. seguido de una recuperación al final del desafío, este tipo de respuesta no se observa en el resto de animales. Estos niveles hacen que los animales inoculados con la cepa ST121 tengan menos linfocitos que los animales inoculados con la cepa ST96. En cambio, los niveles de linfocitos bajos contrastan con los altos niveles de granulocitos y monocitos que el grupo ST121 mostró en los últimos días del experimento frente al grupo ST96 y control. La respuesta generada por los animales ST96 tan solo mostró un incremento en el número de linfocitos B al final del estudio, mientras que el resto de las poblaciones estudiadas mantuvo niveles muy similares a los obtenidos en los animales control. Así los resultados obtenidos muestran que no hubo diferencias, estadísticamente significativas, entre el grupo control y el grupo ST96. A nivel del tejido mamario, los estudios de inmunohistoquímica revelaron que los animales inoculados con la cepa ST121 presentaron un mayor número de células Ram 11<sup>+</sup> e IgG<sup>+</sup> (células plasmáticas) que el resto de grupos, siendo estadísticamente significativo frente al grupo control. Por el contrario, esto no sucedía en los animales infectados con la cepa ST96.

Los conejos pueden infectarse por cepas de *S. aureus* de alta o baja virulencia (Okerman et al., 1984; Hermans et al., 2000). Las cepas de alta virulencia causan una gran mortalidad y morbilidad en las granjas lo que conlleva grandes pérdidas económicas en las mismas. Por otro lado las cepas clasificadas como poco virulentas, afectan a un número reducido de animales con una baja tasa de mortalidad y morbilidad y, por lo tanto, tienen poca repercusión a nivel económico (Hagen, 1963; Okerman et al., 1984; Holliman y Girvan, 1986; Hermans et al., 1999).

Se ha descrito que las infecciones provocadas por cepas de alta virulencia pertenecen al linaje ST121 (Vancraeynest et al., 2006; Viana et al., 2011), pero no hay bibliografía que haga referencia al grado de virulencia de las cepas aisladas en segundo lugar en la Comunitat Valenciana, la cepa ST96 (Viana et al., 2011).

Debido tanto al elevado número de ufc necesarias para generar una infección experimental exitosa (10.000 de ST96 vs. 100 de ST121), al reducido número de animales infectados (33% por ST96 vs. 100% por ST121), la menor gravedad de las

lesiones y la menor respuesta inmunitaria que genera la infección por la cepa ST96 en comparación con la ST121 podríamos decir que se trata de una cepa mucho menos virulenta que, además, concuerda con los resultados de prevalencia obtenidos en mastitis a nivel natural. Aunque fue la segunda cepa más aislada, únicamente se detectó en el 5,5% de los animales. Estos valores fueron similares a los obtenidos por Viana et al. (3,4%) en 2011.

Independientemente de su virulencia (a resaltar que en nuestro caso y en condiciones de campo, la diferencia en la virulencia no es tal, ya que tanto una cepa como la otra son capaces de generar lesión) tanto las cepas ST121 como las ST96 son capaces de desarrollar todo el espectro lesional descrito por Viana et al. (2011), por lo que no parece que exista una relación entre la cepa de *S. aureus* presente y una lesión específica. No obstante, es conocido que las cepas virulentas presentan ciertos grupos de genes, que podrían justificar su comportamiento, y que no se detectan en las cepas de *S. aureus* clasificadas como poco virulentas (Vancraeynest et al., 2006). En este trabajo se confirmó este hecho, ya que las cepas ST121 mostraron enterotoxinas *seg*, *sei*, *selm*, *seln*, *selo*, *selu* y, dependiendo de la cepa, también la enterotoxina *selk*, mientras que las cepas pertenecientes al ST96 no lo hicieron. Se ha visto que ante una rinosinusitis, este tipo de enterotoxinas estafilocócicas pueden producir una respuesta inflamatoria exacerbada, generando citoquinas provenientes de los linfocitos T, que aumente el daño a nivel de la mucosa nasal, contribuyendo así a la progresión de la rinosinusitis (Wei et al., 2014). Esta activación por parte de las enterotoxinas estafilocócicas también puede ser la causante de las rinitis alérgica y los pólipos nasales (Langier et al., 2011; Wei et al., 2014)

Otro de los resultados obtenidos en el estudio de los factores de virulencia presentes en las cepas ST121 y ST96, fue que todas las cepas (a excepción de un caso de seis de la cepa A1/II1/η) pertenecientes a la cepa del tipo ST121 resultaron ser positivas para el gen accesorio regulador *agrIV*, mientras que el 100% de las cepas estudiadas pertenecientes a la cepa ST96, resultaron ser positivas para el gen *agrIII*. Estudios recientes realizados en sangre periférica humana por Mairpady-Shambat et al. (2014) han demostrado que dependiendo del tipo de *agr* que muestre la cepa, puede variar la respuesta sobre la población de macrófagos. De modo que los resultados obtenidos fueron que el gen *agrIV* tiene un efecto predominantemente citotóxico sobre los macrófagos, mientras que el *agrIII* tiene un efecto preominantemente proliferativo. Estos datos nos llaman la atención ya que en nuestro estudio, los animales inoculados con la cepa ST121 se caracterizó por presentar partir del día 3 p.i. un aumento de forma significativa, respecto al día 0, en esta población celular, en cambio la cepa ST96 no muestra este incremento de macrófagos, pero tampoco un descenso

estadísticamente significativo respecto al día 0. Aún así lo que si queda reflejado es que, además de por el sistema inmune del hospedador, la respuesta inflamatoria podría estar condicionada por las diferentes estrategias bacterianas de persistencia en el huésped. No obstante, son necesarios más estudios para asegurar esta hipótesis. En la actualidad se están elaborando diferentes cepas mutantes en dichos factores de virulencia para intentar esclarecer si la presencia o ausencia de dichas toxinas está relacionada con la patogeneidad bacteriana y con la producción de una respuesta inmune diferente en el hospedador.

#### **5.4. Comparación mastitis naturales versus experimentales en función de la cepa infectante.**

Como se ha podido ver en el punto 4.3 de esta tesis, los resultados obtenidos en las mastitis naturales comparadas con las mastitis experimental<sup>4</sup>es son muy semejantes en varios aspectos estudiados. Así, centrándonos en la parte morfológica y macroscópica de las lesiones generadas de forma natural y experimental, se puede observar como las mastitis experimentales son muy parecidas en sus características morfológicas a las generadas de forma natural, de modo que las mastitis leves y las moderadas eran muy similares a los casos naturales. Por otro lado las mastitis clasificadas como severas mostraban lesiones macroscópicas compatibles con mastitis de curso agudo, es decir que el tejido mamario aparecía edematoso, muy hemorrágico y con un exudado serosanguinolento que recuerda mucho a las características macroscópicas de las llamadas “mamas azules”. Una vez clasificadas histomorfológicamente las mastitis generadas experimentalmente se obtuvieron que, tras siete días de infección el tejido mamario que cursó con una mastitis se pudo clasificar como: cuatro mastitis mixtas, con predominio del patrón lobulillar; una mastitis supurativa con patrón lobulillar; otro caso tipo absceso no encapsulado y cuatro casos con características típicas de las mastitis tipo celulitis, con una severa necrosis por coagulación. Por lo tanto, si descartamos los cuatro casos que mostraron características típicas de mastitis tipo celulitis, todos los otros casos restantes observados experimentalmente, coincidirían con las fases iniciales de la formación de un absceso y coincidirían con las lesiones más inmaduras detectadas en las mastitis crónicas. Por ello, estos hallazgos histológicos, basados en el tipo de células que aparecen y en la presencia o ausencia de una cápsula de tejido conjuntivo que rodee o no los focos necróticos que aparecen en las mastitis, indican que a partir de una semana tras la infección, las lesiones naturales y experimentales se asemejan en base a sus características microscópicas.

Con respecto a los datos obtenidos en la respuesta periférica fue sorprendente tal similitud entre los valores obtenidos en la citometría de las mastitis naturales en

función de la cepa infectante y los valores obtenidos a lo largo de la infección de las cepas ST121 y ST96, de modo que la cepa ST96 en condiciones naturales se caracterizó por presentar valores superiores frente a la cepa ST121 en las poblaciones de linfocitos B, T, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y CD25<sup>+</sup>) pero inferiores para la población de granulocitos. Estos niveles también se vieron en las mastitis experimentales, donde a lo largo de toda la infección la cepa ST96 mostró niveles superiores para esas mismas poblaciones linfocitarias e inferiores para la población de los granulocitos. Mientras que la respuesta periférica de la cepa ST121 se caracterizó por todo lo contrario, niveles bajos en las poblaciones linfocitarias de linfocitos B, T, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> pero altos niveles para la población de granulocitos y también de macrófagos.

Con estos resultados podemos decir que en nuestro estudio las cepas ST121 y ST96 se comportan de forma similar en condiciones naturales y experimentales.

### **5.5. Creación de un protocolo experimental en glándula mamaria a bajas dosis infectivas**

*S. aureus* es un microorganismo, responsable de numerosas patologías, tanto en animales, donde destacan los rumiantes (vacas, cabras y ovejas), cerdos, pollos (Fluit, 2012; Fitzgerald, 2012) y conejos (Segura et al., 2007), como en seres humanos, en los que esta bacteria puede provocar desde una simple infección de piel hasta endocarditis, shock tóxico o neumonía necrotizante (Lowy, 1998) debido, principalmente, a su capacidad para producir toxinas (McCormick et al., 2001; Bukowski et al., 2010).

Debido a la repercusión sanitaria y económica de estas infecciones, son múltiples los estudios que se han realizado intentando saber cómo actúa esta bacteria y cómo poder controlarla. Para ello se han llevado a cabo numerosas infecciones experimentales en las que se suele emplear como animal de estudio el ratón. Esto es debido a que es un modelo económico, por su pequeño tamaño, fácil manejo, gestaciones cortas y número elevado de su progenie (Wiles et al., 2006; Szabo y MacCallum, 2011; Kim et al., 2014).

El gran inconveniente de utilizar el ratón como modelo experimental en el estudio de enfermedades causadas por *S. aureus*, es que estos animales raramente son infectados, de forma natural, por dicha bacteria. Este factor conlleva a que las cepas bacterianas utilizadas para ser inoculadas en esta especie deben ser previamente adaptadas genéticamente para que puedan transmitir la enfermedad al ratón (Holtfreter et al., 2013). El hecho de emplear modelos murinos obliga, además, a utilizar protocolos infectivos con elevadas dosis bacterianas para reproducir la

infección, independientemente de la vía de inoculación de la bacteria. En los estudios realizados por von Kückritz-Blickwede et al. (2008) con el fin de estudiar, bajo un punto de vista genético, los mecanismos inmunológicos que tienen lugar en la infección por *S. aureus*, emplearon ratones inoculados experimentalmente con una concentración bacteriana de  $4 \times 10^7$  ufc. Dosis, incluso más elevadas ( $5 \times 10^8$  ufc), fueron utilizadas por Ziegler et al. (2011) para poder estudiar la respuesta inmune innata y adaptativa que se producía en ratones infectados con *S. aureus*. En el caso de experimentos en ratones en los que se ha querido reproducir una infección a nivel cutáneo, las dosis utilizadas han sido iguales que las inoculadas a nivel sistémico, entre  $10^7$  y  $10^9$  ufc (Bunce et al., 1992; Malachowa et al., 2013; Kim et al., 2014; Montgomery et al., 2014). El gran inconveniente de emplear dosis infectivas tan elevadas es que se alejan de lo que suele ocurrir en condiciones naturales por lo que estos modelos no suelen ser representativos, cuando se pretende simular condiciones de campo.

Además del ratón, se han empleado otras especies animales en modelos experimentales de infección por *S. aureus* como cerdos, conejos e incluso rumiantes (Adlam et al., 1976; Leitner et al., 2000; Cremonesi et al., 2012; Crombé et al., 2013; Jensen et al., 2013). En estos casos se suelen utilizar dosis infectivas más bajas a las descritas anteriormente en ratones. De esta forma, se han realizado infecciones experimentales en glándula mamaria de cabras, con el fin de estudiar la respuesta local y sistémica de estos animales, empleando una dosis infectiva de  $10^3$  ufc (Cremonesi et al., 2012). Ster et al. (2013) realizaron una infección experimental intramamaria en vacas, empleando una cepa bovina (SHY97-3906) a una concentración de 60 ufc en 3 mL de inóculo. Recientemente, Jensen et al. (2013), también infectaron experimentalmente las glándulas mamarias de vacas, utilizando  $10^4$  ufc de *S. aureus*. En los tres casos expuestos, al igual que en nuestro estudio, las concentraciones bacterianas inoculadas son muy bajas comparado con las infecciones realizadas en ratón.

En la especie cunícola, las primeras infecciones experimentales, reflejadas en la bibliografía, fueron realizadas por Adlam et al. en 1976, infectando glándulas mamarias de conejos, con el fin de estudiar las mastitis estafilocócicas de los rumiantes. En este estudio se describieron tanto lesiones de tipo gangrenoso como abscesos crónicos, para lo que inocularon diferentes concentraciones de bacterias, procedentes de aislados de ovino, sin especificar su concentración. Igualmente, Amorera et al. (1991), realizaron una infección intramamaria, en la que emplearon varias concentraciones de inóculo ( $5 \times 10^2$ ,  $5 \times 10^4$  y  $5 \times 10^6$  ufc) tras la cual, se seleccionó la dosis más concentrada porque, de ese modo, se conseguía reproducir, en todos los animales del experimento (10 conejos), una infección intramamaria aguda. Cabe

destacar que, al igual que Adlam et al. (1976), las cepas de *S. aureus* utilizadas no eran de origen cunícola sino ovino.

En otro estudio reciente, llevado a cabo en piel de conejos, se emplearon tres tipos de concentraciones bacterianas. Se utilizaron tres conejos en los que se inocularon tres concentraciones bacterianas ( $10^4$ ,  $10^6$  y  $10^8$  ufc) en tres lugares de la piel. Los resultados obtenidos fueron que el inóculo de  $10^4$  ufc producía pequeños abscesos, el inóculo de  $10^6$  ufc producía lesiones en la piel de tamaño variable, que desaparecían transcurrida una semana, y el inóculo de  $10^8$  ufc, reproducía la formación de abscesos subcutáneos (Meulemans, 2011). En este caso sí se empleaban cepas de origen cunícola pero al utilizarlas en tan elevada cantidad se alejan de lo que debe ocurrir en las infecciones naturales. Por lo tanto, pueden servir para estudiar y caracterizar las lesiones, pero probablemente no se asemejen a la patogenia de la infección en condiciones naturales.

Las razones por las que el número de bacterias necesario para poder reproducir la infección en un modelo animal u otro son distintas, seguramente estén relacionadas con una especificidad de hospedador por parte de la bacteria (Guinane et al., 2011). El estudio de diferentes clones de *S. aureus* ha revelado que existen clones que son específicos de determinadas especies animales indicando una adaptación al hospedador por parte de la bacteria (Smith et al., 2005). Así, por ejemplo, se ha descrito que una gran proporción de los aislados de *S. aureus* procedentes de mastitis bovina pertenecen al clon ET3 (Fitzgerald et al., 1997). Por lo tanto, cuando se utiliza una bacteria adaptada a un hospedador, el número de bacterias necesarias para provocar infección es mucho menor que si no está adaptada. Esto justificaría la alta variabilidad en la concentración de los inóculos utilizados en conejos a lo largo de la bibliografía donde, por lo general, se ha utilizado a esta especie animal como modelo para reproducir estafilococias inoculando bacterias procedentes de otras especies. Por ello, las dosis empleadas suelen ser superiores a las empleadas en nuestro estudio. De esta forma, la afirmación de Adlam et al. (1976) indicando que las cepas avirulentas aisladas en campo se volvían muy virulentas en condiciones experimentales de laboratorio, tal vez era debido al empleo de cepas de *S. aureus* ovinas en conejos, lo que les obligaba a inocular elevadas dosis bacterianas para generar infección. Consideramos que, salvo que sea estrictamente necesario ya que no pueda utilizarse la especie de la que se ha aislado la bacteria, este tipo de prácticas incurren en un importante error ya que los resultados difícilmente podrán ser extrapolables y se harán apreciaciones incorrectas.

En el presente trabajo se ambicionaba conseguir la caracterización de las lesiones provocadas por *S. aureus* en la glándula mamaria, pero en el marco de la enfermedad

reproducida, al menos en sus fases iniciales, de forma semejante a lo que probablemente ocurra en la naturaleza, donde un número reducido de bacterias debe invadir el organismo y entablarse una lucha con su sistema inmune. Buscando este objetivo, aparentemente la opción más apropiada en nuestro protocolo habría sido seleccionar el inóculo de 100 ufc. Sin embargo, la razón por la cual finalmente se empleó una concentración superior (10.000 ufc) estaba relacionada con el hecho de que era la dosis mínima con la que se producía una pequeña reacción inflamatoria, en animales inoculados con la cepa ST96. De esta forma la cepa ST96, considerada como poco virulenta, no fue capaz de infectar a bajas dosis, por lo que simulando condiciones, lo más próximas a las naturales, la cepa poco virulenta sigue sin ser capaz de reproducir una enfermedad tal y como lo hace la cepa ST121. Quizás esta sea la razón que justifique la baja prevalencia de infecciones naturales provocadas por la cepa ST96 observada en nuestro estudio y en el de Viana et al. (2011).

Por todo lo anteriormente mencionado podemos concluir indicando que el protocolo experimental presentado, caracterizado por la inoculación de bajas dosis infectivas eficaces, a partir de cepas aisladas de mastitis cunícolas naturales, puede ser un modelo apropiado en el estudio de las infecciones intramamarias. Esta aseveración se basa en que el conejo es un hospedador natural de *S. aureus* y, en este modelo se emplean cepas cunícolas. Por otra parte, las dosis utilizadas para reproducir la enfermedad son las mínimas necesarias para provocar lesión en la cepa menos virulenta, al contrario que ocurre en otros modelos animales empleados habitualmente, como el ratón, donde es necesario utilizar dosis elevadas de bacterias para reproducir la infección (von Köckritz-Blickwede et al., 2008; Ziegler et al., 2011). El uso de altas dosis infectivas en conejos, empleando cepas *S. aureus* procedentes de otras especies animales (Adlam et al., 1976; Amorera et al., 1991), podría conllevar a que los resultados no sean extrapolables a otras especies como la ovina o la bovina ya que la patogenia podría variar. En nuestro protocolo, el uso de cepas que provienen de mastitis naturales cunícolas, nos permite utilizar bajas dosis infectivas, obteniendo resultados muy semejantes a lo ocurrido en la naturaleza y, por lo tanto, la posibilidad de extrapolar los resultados experimentales a los casos naturales.



## **VI. CONCLUSIONES**



En respuesta a los objetivos planteados en el inicio de este trabajo hemos obtenido las siguientes conclusiones:

1. Las poblaciones celulares estudiadas en las 204 mastitis naturales variaron cuantitativamente según el patrón histomorfológico que presentaron las glándulas mamarias infectadas de forma natural.
2. Los linfocitos T, sobre todo la subpoblación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, fueron las células más numerosas en las mastitis supurativas con patrón lobulillar a nivel periférico, siendo los macrófagos (RAM11+) las células más numerosas de esta clasificación a nivel local. Por el contrario los valores de linfocitos T, tanto a nivel sistémico como local, fueron minoritarios para el grupo de los abscesos compactos.
3. Según la fluctuación observada en el recuento de linfocitos T, que aparecen entre los abscesos compactos, no compactos, no encapsulados y las mastitis supurativas con patrón lobulillar, se puede proponer que las mastitis supurativas y el grupo de los abscesos forman parte de un mismo proceso cuya evolución (de más inmadura a más madura) sería: mastitis supurativa con patrón lobulillar, abscesos no encapsulados, abscesos no compactos y abscesos compactos.
4. La respuesta inmune local y periférica, están correlacionadas a través de la población de macrófagos del tejido y los monocitos, granulocitos y linfocitos T CD4<sup>+</sup> de la sangre y también entre las células plasmáticas del tejido y los monocitos de la sangre. Siendo esta correlación más fuerte entre los macrófagos del tejido y los monocitos de la sangre.
5. Los aislados bacterianos obtenidos en este estudio revelaron que la cepa ST121 de *S. aureus* fue más prevalente que la cepa ST96 con un 88,7% frente a un 4,9%, respectivamente.
6. Los animales infectados de forma natural con las cepas pertenecientes al linaje clonal ST96 mostraban en sangre más del doble de linfocitos B (P<0,01), T (P<0,001), CD4<sup>+</sup> (P<0,001), CD8<sup>+</sup> (P<0,01) y CD25<sup>+</sup> (P<0,10) y un 35% menos de granulocitos (P<0,01) que los animales infectados con cepas pertenecientes al linaje clonal ST121.
7. Un protocolo experimental de infección intramamaria, a bajas dosis, empleando cepas cunícolas en conejos, permite reproducir la enfermedad de forma muy similar a lo ocurrido en condiciones naturales, observándose características microscópicas experimentales semejantes a las observadas en los casos de mastitis naturales,

pudiéndose ser clasificadas siguiendo los patrones utilizados para agrupar las mastitis naturales.

8. Las cepas de *S. aureus* pertenecientes al linaje clonal ST121 fueron capaces de provocar macroscópicamente un amplio abanico lesional (mastitis leves, moderadas y severas) en el 100% de los animales inoculados, mientras que la cepa ST96 no fue capaz de generar lesión macroscópica.

9. Las mastitis macroscópicas observadas experimentalmente (provocadas por la cepa ST121) mostraron características microscópicas típicas de todos los patrones lesionales observados en las mastitis naturales a excepción de las características observadas en los abscesos no encapsulados y compactos. Por el contrario, la cepa ST96 no es capaz de desarrollar estos patrones lesionales, puesto que no genera mastitis macroscópica, observándose únicamente una mastitis supurativa leve en el 33,3% de las conejas infectadas.

10. En condiciones experimentales los animales inoculados con la cepa ST121 cursan con una disminución de los linfocitos totales a los 2-3 días p.i. seguido de una recuperación al final del desafío y con un aumento progresivo en los niveles de granulocitos. Estos niveles hacen que los animales inoculados con la cepa ST121 tengan menos linfocitos que los animales inoculados con la cepa ST96 pero más granulocitos, al final del experimento

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**



Abrantes, J., van der Loo, W., Le Pendu, J., Esteves, P.J. (2012). Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review. *Vet. Res.* 43(1): 12.

Adlam, C., Thorley, C.M., Ward, P.D., Collins, M., Lucken, R.N., Knight, P.A. (1976). Natural and experimental staphylococcal mastitis in rabbits. *J. Comp. Pathol.* 86: 581-593.

Adlam, C., Ward, P.D., McCartney, A.C., Arbuthnott, J.P., Thorley, C.M. (1977). Effect of immunization with highly purified alpha- and beta-toxins on staphylococcal mastitis in rabbits. *Infect. Immun.* 17: 250–256.

Agnoletti, F., Favretti, M., Deotto, S., Passera, A., Tisato, E., Bano, I., Mazzolini, E. (2004). Report of enteropathogenic *Escherichia coli* (epec) isolated from enteric outbreaks in italian intensive rabbit herds. *Proc. 8<sup>o</sup> World Rabbit Congress, Puebla, Mexico.* Pp: 416-421

Aires, de S.M., Parente, C.E.S.R., Viera, da M.O., Bonna, I.C.F., Silva, D.A., de Lencastre, H. (2007). Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from buffalo, bovine, ovine, and caprine milk samples collected in Rio de Janeiro State, Brazil. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 3845-3849.

Akineden, O., Annemuller, C., Hassan, A.A., Lammler, C., Wolter, W., Zschock, M. (2001). Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8: 959-964.

Akira, S. (2012). Innate immunity and adjuvants. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 366: 2748-2755.

Amorena, B., Garcia de Jalon, J.A., Baselga, R., Duchá, J., Latre, M.V., Ferrer, L.M., Sancho, F., Mansson, I., Krovacek, K., Faris, A. (1991). Infection of rabbit mammary glands with ovine mastitis bacterial strains. *J. Comp. Pathol.* 104: 289-302.

Anelli, T., van Anken, E. (2013). Missing links in antibody assembly control. *J. Cell. Biol.* 606703

Appelbaum, P.C. (2006). The emergence of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Infect.* 12 Suppl. 1: 16-23.

Asher, R.J., Meng, J., Wible, J.R., McKenna, M.C., Rougier, G.W., Dashzeveg, D., Novacek, M.J. (2005). Stem lagomorpha and the antiquity of Glires. *Science.* 307: 1091-1094.

Atalla, H., Gyles, C., Jacob, C.L., Moisan, H., Malouin, F., Mallard, B.(2008). Characterization of a *Staphylococcus aureus* small colony variant (SCV) associated with persistent bovine mastitis. Foodborne Pathog. Dis. 5:1-15.

Atalla, H., Gyles, C., Wilkie, B., Leslie, K., Mallard, B.(2009). Somatic cell scores and clinical signs following experimental intramammary infection of dairy cows with a *Staphylococcus aureus* small colony variant (*S. aureus* SCV) in comparison to other bovine strains. Vet. Microbiol. 137:326-334.

Badiola, I., Perez, A., Carabaño, R., Garcia, J., Rosell, J., Diaz, J., V. Barbé, J., Pascual, J.J. (2005). Etiopatogénia de la enteropatía epizoótica del conejo. Boletín de Cunicultura. 139: 39-48.

Bagnoli, F., Bertholet, S., Grandi, G. (2012) Inferring reasons for the failure of *Staphylococcus aureus* vaccines in clinical trials. Front. Cell Infect. Microbiol. 2:16.

Barkema, H.W., Schukken, Y.H., Zadoks, R.N. (2006). The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. J. Dairy, Sci. 89: 1877-1895.

Belkaid, Y., Piccirillo, C.A., Mendez, S., Shevach, E.M., Sacks, D.L. (2002). CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. Nat. 420: 502-507.

Bemis, D.A., Wilson, S.A. (1985). Influence of potential virulence determinants on *Bordetella bronchiseptica*-induced ciliostasis. Infect. Immun. 50: 35-42.

Bende, R.J., Van Maldegem, F., Van Noesel, C.J. (2009). Chronic inflammatory disease, lymphoid tissue neogenesis and extranodal marginal zone B-cell lymphomas. Haematol. 94:1109–1123.

Bergonier, D., de Cremoux, R., Rupp, R., Lagriffoul, G., Berthelot, X. (2003). Mastitis of dairy small ruminants. Vet. Res. 34: 689-716.

Bergstrom, C.T., Antia, R. (2006). How do adaptive immune systems control pathogens while avoiding autoimmunity. Trends. Ecol. Evol. 21: 22-28.

Bhakdi, S., Tranum-Jensen, J. (1991). Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. Microbiol. Rev. 55 : 733-751.

Bhat, T.K., Jithendran, K.P. (1995). *Eimeria magna*: the effect of varying inoculum size on the course of infection in angora rabbits. World Rabbit Sci. 3: 163-165.

- Bhat, T.K., Jithendran, K.P., Kurade, N.P. (1996). Rabbit coccidiosis and its control, review. *World Rabbit Sci.*4: 37-41.
- Biberstein, E.L. (1994). Estafilococos. Tratado de microbiología veterinaria. Biberstein, E.L y Lee, Y.C. Ed. Acribia. Zaragoza. Pp. 167-73.
- Biswas, S.K., Mantovani, A. (2010). Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat. Immunol.* 11: 889-896.
- Bohez, L., Maertens, L., Laevens, H., Stakenborg, T., Peeters, J.E., Vandekerchove, D.G.F. (2004). Use of a 3-/o15 Deae enteropathogenic *Escherichia coli* vaccine in a rabbitry with mixed enteropathy problems: spreading characteristics and protective effect. Proc. 8<sup>o</sup> World Rabbit Congress, Puebla, Mexico. Pp : 439-434
- Bonilla, F., Oettgen, H. (2010). Adaptative inmunity. *J. Allergy Clin. Immunol.*125: S33-S40.
- Borregaard, N. (2010). Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity.* 33: 657-670.
- Boyce, J.M., Cookson, B., Christiansen, K., Hori, S., Vuopio-Varkila, J., Kocagoz, S., Oztop, A.Y., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Harbarth, S., Pittet, D. (2005). Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet. Infect. Dis.* 5: 653-663.
- Breshears, L.M., Schlievert, P.M., Peterson, M.L. (2012). A disintegrin and metalloproteinase 17 (ADAM17) and epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling drive the epithelial response to *Staphylococcus aureus* toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1). *J. Biol. Chem.* 287(39): 32578–32587.
- Bukowski, M., Wladyka, B., Dubin, G. (2010). Exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. *Toxins.*2: 1148–1165.
- Bunce, C., Wheeler, L., Reed, G., Musser, J., Barg, N. (1992). Murine model of cutaneous infection with Gram-positive cocci. *Infect. Immun.* 60: 2636-2640
- Burkhart, C.A., Cherry, J.A., Van Krey, H.P., Siegel, P.B.(1983). Genetic selection for growth rate alters hypothalamic satiety mechanisms in chickens. *Behav. Genet.* 13: 295-300.
- Calvete, C., Calvo, J.H., Sarto, P. (2012). Detección de una variante del virus de la enfermedad hemorrágica en conejos silvestres en España. Proc. 37<sup>o</sup> Simposium de cunicultura. ASESCU. Barbastro, España. Pp: 112-115.

- Camarda, A., Pennelli, D., Battista, P., Martella, V., Greco, I., Alloggio, I., Mazzolini, E., (2004). Virulence genes and antimicrobial resistance patterns of enteropathogenic *Escherichia coli* from rabbits in southern Italy. Proc. 8<sup>o</sup> World Rabbit Congress Puebla, Mexico. Pp :470-476
- Campagnolo, E.R., Ernst, M.J., Berninger, M.L., Gregg, D.A., Shumaker, T.J., Boghossian, A.M. (2003). Outbreak of rabbit hemorrhagic disease in domestic lagomorphs. J. Am. Vet. Med. Assoc. 223: 1151-1155.
- Capucci, L., Scicluna, M.T., Lavazza, A. (1991). Diagnosis of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome. Rev. Sci. Tech. 10: 347-370.
- Castello, J.A. (1984). Control ambiental en la crianza intensiva del conejo. Cunicultura. 47: 13-22.
- Cerolini, S., Marzoni-Fecia, M., Romboli, I. (2008). En : Avicoltura e Conigliicoltura. Ed. Le Point Veterinaire. Milan, Italia.
- Cesta, M.F. (2006). Normal structure, function, and histology of mucosa-associated lymphoid tissue. Toxicol. Pathol. 34: 599-608.
- Chasey, D. (1997). Rabbit haemorrhagic disease: the new scourge of *Oryctolagus cuniculus*. Lab. Anim. 31: 33-44.
- Chasey, D., Lucas, M.H., Westcott, D.G., Sharp, G., Kitching, A., Hughes, S.K. (1995). Development of a diagnostic approach to the identification of rabbit haemorrhagic disease. Vet. Rec. 137: 158-160.
- Cheng, A. G., McAdow, M., Kim, H. K., Bae, T., Missiakas, D. M., Schneewind, O. (2010). Contribution of Coagulases towards *Staphylococcus aureus*. Disease and Protective Immunity. PLoS Pathog. 6(8), e1001036.
- Cho, J.S., Pietras, E.M., Garcia, N.C. (2010). IL-17 is essential for host defense against cutaneous *Staphylococcus aureus* infection in mice. J. Clin. Invest. 120: 1762–1773.
- Cole, J., Aberdein, J., Jubrail, J., Dockrell, D.H. (2014). The Role of Macrophages in the Innate Immune Response to *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*: Mechanisms and Contrasts. Adv. Microb. Physiol. 65:125-202
- Comenge, J., Mora, F.X. (2011). Brotes atípicos de enfermedad hemorrágica vírica en conejos en la Península Ibérica. Cunicultura 36:7-10

Corbin, B.D., Seeley, E.H., Raab, A. (2008). Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses. *Science*. 319:962–965.

Corpa, J.M., Hermans, K., Haesebrouck, F. (2009). Main Pathologies associated with *Staphylococcus aureus* infections in rabbits: a review. *World Rabbit Sci.*17: 1-11.

Corrigan, R.M., Rigby, D., Handley, P., Foster, T.J. (2007). The role of *Staphylococcus aureus* surface protein SasG in adherence and biofilm formation. *Microbiology*. 153: 2435–2446.

Corrand, L., Lucas, M.N., Douet, J.Y., Etienne, C.L., Albaric, A.O., Cadec, A., Guérin, J.L. (2012). A case of unilateral periorbital cellulitis and mandibular osteomyelitis in a turkey flock. *Avian. Dis.* 56:427-431.

Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 284: 1318-1322.

Coudert, P., Licois, D., Drouet-Viard, F. (1995). *Eimeria* and *Isospora*. *Eimeria* species in rabbits .En: *Biotechnology. Guidelines on Techniques in Coccidiosis Research*. Eckert J., Braun R., Shirley M.W., Coudert P. Ed. Office for official publications of the European Communities. Bruselas, Luxemburgo. Pp : 53-73.

Coudert, P., Rideaud, P., Balencon, M. (1986). Pasteurellose non respiratoire en élevage intensif. L'otite moyenne des lapines reproductrices. *Cuni-Science*. 3: 1-6.

Cremonesi, P., Capoferri, R., Pisoni, G., Del Corvo, M., Strozzi, F., Rupp, R., Hugues Caillat, H., Paola Modesto, P., Moroni, P., Williams, J.L., Bianca Castiglioni, B., Stella, A. (2012). Response of the goat mammary gland to infection with *Staphylococcus aureus* revealed by gene expression profiling in milk somatic and white blood cells. *BMC Genomics*. 13: 540.

Crescio, M.I., Forastiere, F., Maurella, C., Ingravalle, F., Ru, G. (2010). Heat-related mortality in dairy cattle: A case crossover study. *Prev. Vet. Med.* 97: 191-197.

Crombé, F., Argudín, M. A., Vanderhaeghen, W., Hermans, K., Haesebrouck, F., Butaye, P. (2013). Transmission dynamics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. *Front. Microbiol.*4: 57.

Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I.; Penadés, J.R. (2001). Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J. Bacteriol.* 183: 2888-2896.

Cucarella, C., Tormo, M.A., Knecht, E., Amorena, B., Lasa, I., Foster, T.J., Penadés, J.R. (2002). Expression of the biofilm-associated protein interferes with host protein receptors of *Staphylococcus aureus* and alters the infective process. *Infect. Immun.* 70: 3180-3186.

Cucarella, C., Tormo, M.A., Úbeda, C., Trotonda, M.P., Monzón, M., Peris, C., Amorena, B., Lasa, I., Penadés, J.R. (2004). Role of biofilm-associated protein *bap* in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 72: 2177-2185.

Cunningham, J.G. (2003). La glándula mamaria. En: *Fisiología Veterinaria*. Ed. Elsevier. Madrid, España Pp: 406-420.

Dasso, J.F., Howell, M.D. (1997). Neonatal appendectomy impairs mucosal immunity in rabbits. *Cell. Immunol.* 182: 29-37.

David, M.Z., Daum, R.S. (2010). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clin. Microbiol. Rev.* 23: 616-687.

Davis, W.C., Hamilton, M.J. (2008). Use of flow cytometry to develop and characterize a set of monoclonal antibodies specific for rabbit leukocyte differentiation molecules. *J. Vet. Sci.* 9: 51-66.

Decoursey, T.E., Ligeti, E. (2005). Regulation and termination of NADPH oxidase activity. *Cell. Mol. Life. Sci.* 62: 2173-2193.

Decraene, A., Willems-Widyastuti, A., Kasran, A., De Boeck, K., Bullens, D. M., Dupont, L. J. (2010). Elevated expression of both mRNA and protein levels of IL-17A in sputum of stable Cystic Fibrosis patients. *Respir. Res.* 11: 177.

Deeb, B.J., DiGiacomo, R.F. (2000). Respiratory diseases of rabbits. *Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract.* 3: 465-480.

Delaney-Johnson, C. (2006). Anatomy and physiology of the rabbit and rodent gastrointestinal system. *Proc. Assoc. Avian. Vet.* Pp:9-17.

DeLeo, F.R., Diep, B.A., Otto, M. (2009). Host defense and pathogenesis in *Staphylococcus aureus* infections. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 23: 17-34.

DeLeo, F.R., Otto, M., Kreiswirth, B.N., Chambers, H.F. (2010). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet.* 375: 1557-1568.

- Del Fattore, A., Capannolo, M., Rucci, N. (2010). Bone and bone marrow: the same organ. *Arch. Biochem. Biophys.* 503: 28-34.
- Dellman, H.D. (1994). En : *Histología Veterinaria.* (Ed). Acribia. Zaragoza, España. Pp. 343-347.
- Devriese, L.A. (1984). A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated from animal species. *J. Appl. Bacteriol.* 56: 215-220.
- Devriese, L.A., Godard, C., Okerman, L., Renault, L. (1981). Characteristics of *Staphylococcus aureus* strains from rabbits. *Ann. Rech. Vet.* 12: 327-332.
- Dhanawade, N., Kalorey, D., Srinivasan, R., Barbuddhe, S., Kurkure, N. (2010). Detection of intercellular adhesion genes and biofilm production in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Vet. Res. Commun.* 34:81-89.
- DiGiacomo, R.F., Garlinghouse, L.E.Jr., Van Hoosier, G.L.Jr. (1983). Natural history of infection with *Pasteurella multocida* in rabbits. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 183: 1172-1175.
- DiGiacomo, R.F., Deeb, B.J., Giddens, W.E.Jr., Bernard, B.L., Chengappa, M.M. (1989). Atrophic rhinitis in New Zealand white rabbits infected with *Pasteurella multocida*. *Am. J. Vet. Res.* 50: 1460-1465.
- Dinges, M.M., Orwin, P.M., Schlievert, P.M. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 13: 16-34.
- Dorko, F., Danko, J., Flesárová, S., Boros, E., Sobeková, A. (2011). Effect of pesticide bendiocarbamate on distribution of acetylcholine- and butyrylcholine-positive nerves in rabbit's thymus. *Eur. J. Histochem.* 55: e37.
- Dos Santos, J., Dos Santos, K., Gentilini, E., Sordelli, D., De Freire, M. (2002). Phenotypic and genetic characterisation of bacteriocin-producing strains of *Staphylococcus aureus* involved in bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 85:133-144.
- Drouet-Viard, F., Fortun-Lamothe, L., (2002). Review. The organisation and functioning of the immune system: particular features of the rabbit. *World Rabbit Sci.* 10: 15-23.
- Duclos, P., Caillet, J., Javelot, P. (1986). Aerobic bacterial flora of the nasal cavity of rabbits. *Ann. Rech. Vet.* 17: 185-190.
- Duthie, E.S., Lorenz, L.L. (1952). Staphylococcal coagulase; mode of action and antigenicity. *J.Gen.Microbiol.* 6: 95-107.

- Ebrahimi, A., Lotfalian, Sh., Karimi, S. (2007). Drug resistance in isolated bacteria from milk of sheep and goats with subclinical mastitis in Shahrekord district. I.J.V.R. 8: 76-79.
- Echeverri, J. (2004). Explotación y manejo del conejo doméstico (*Oryctolagus cuniculus*). Proc. 8<sup>o</sup> World Rabbit Congress, Puebla, Mexico. Pp: 1-13
- Elmore, S.A. (2006). Enhanced histopathology of mucosa-associated lymphoid tissue. Toxicol. Pathol.34: 687-696.
- Enright, M.C., Day, N.P., Davies, C.E., Peacock, S.J., Spratt, B.G. (2000). Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 38: 1008-1015.
- Escoula, L., Camguilhem, R., Larrieu, G., More, J. (1981). Sur la sensibilité du lapin à l'association ampicilline-gentamycine. Ann. Rech. Vet. 12: 11-17.
- Fairfax, K.A., Kallies, A., Nutt, S.L., Tarlinton, D.M. (2008). Plasma cell development: From B-cell subsets to long-term survival niches. Sem. Immunol. 20:49-58.
- Fawcett, D.W. (1997). Glándula mamaria. En: Tratado de Histología. McGraw-Hill. Ed. Interamericana . Madrid, España. Pp: 934-946.
- Ferrian, S., Guerrero, I., Blas, E., García-Diego, F.J., David Viana, D., Pascual, J.J., Corpa, J.M. (2012). How selection for reproduction or foundation for longevity could have affected blood lymphocyte populations of rabbit does under conventional and heat stress conditions. Vet. Immunol. Immunop. 150: 53–60.
- Ferrian. S., Blas, E., Larsen, T., Sánchez, J.P., Friggens, N.C., Corpa, J.M., Baselga, M., Pascual, J.J. (2013). Response of rabbit does from lines selected for reproduction or founded for reproductive longevity to an immunological challenge with LPS. Res. Vet. 94: 518-552.
- Finzi, A., Valentini, A., Filippi Balestra, G. (1994). Approche de quelques indicateurs du stress chez le lapin. Cuniculture. 118: 189-193.
- Fitzgerald, J.(2012). Livestock-associated *Staphylococcus aureus*: origin, evolution and public health threat. Trends. Microbiol. 4: 192-198.
- Fitzgerald, J.R., Hartigan, P.J., Meaney, W.J., Smyth, C.J. (2000). Molecular population and virulence factor analysis of *Staphylococcus aureus* from bovine intramammary infection. J. Appl. Microbiol. 88: 1028-1037.

Fitzgerald, J.R., Meaney, W.J., Hartigan, P.J., Smyth, C.J., Kapur, V. (1997). Fine-structure molecular epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. *Epidemiol. Infect.* 119: 261-269.

Fitzgerald, J.R., Sturdevant, D.E., Mackie, S.M., Gill, S.R., Musser, J.M. (2001). Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus*: Insights into the origin of methicillin-resistant strains and the toxic shock syndrome epidemic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 8821–8826.

Flatt, R. (1974). Bacterial diseases. En: *The biology of the laboratory rabbit*. Weisbroth, S.H., Flatt, R.E., Krauss, A.K. Ed. Academic Press. Nueva York, EE UU. Pp: 193-236.

Fluit, A.C. (2012). Livestock-associated *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Infect.* 18:735–44.

Foster, R.A. (2006). Female Reproductive system. En: *Pathologic basis of veterinary disease*. McGavin, M. y Zachary, J. Ed. Elsevier, Mosby. St. Louise, Missouri, USA.. Pp: 1263-1315.

Foster, T.J., Geoghegan, J.A., Ganesh, V.K., Höök, M. (2014). Adhesion, invasion and evasion, the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat. Rev. Microbiol.* 12:49–62.

Fox, L.K., Zadoks, R.N., Gaskins, C.T. (2005). Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. *Vet. Microbiol.* 107: 295–299.

Fry, M.M., McGavin, M. (2012). General Pathology- Bone marrow, blood cells, and the lymphatic system. En: *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. Ed. Elsevier Mosby. St. Louis, Missouri, USA. Pp: 698-734.

Fueyo, J.M., Mendoza, M.C., Alvarez, M.A., Martin, M.C. (2005). Relationships between toxin gene content and genetic background in nasal carried isolates of *Staphylococcus aureus* from Asturias, Spain. *FEMS. Microbiol. Lett.* 243: 447-454.

Fuschiotti, P., Fitts, M.G., Pospisil, R., Weinstein, P.D., Mager, G. (1997). RAG1 and RAG2 in developing rabbit appendix subpopulations. *J. Immunol.* 158: 55-64.

Gao, J., Stewart, G.C. (2004). Regulatory elements of the *Staphylococcus aureus* protein A (Spa) promoter. *J. Bacteriol.* 186: 3738-3748.

García, J., Gómez-Conde, M.S., Chamorro, S., Nicodemus, N., De Blas, J.C., Carabaño, R., Pérez de Rozas, A., Badiola, I. (2005). Proyecto INIA sobre enteropatía mucoide: resultados sobre las investigaciones en nutrición. En: Proc. 30º Simposium de Cunicultura, ASESCU. Valladolid, España. Pp: 157-165.

Gázquez, A., Blanco, A. (2004). Tratado de Histología Veterinaria. Ed. Masson, S.A. Barcelona. Pp: 413-415.

Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages and dendritic cells. *Science*. 327: 656-661.

Gill, S.R., Fouts, D.E., Archer, G.L., Mongodin, E.F., Deboy, R.T., Ravel, J., Paulsen, I.T., Kolonay, J.F., Brinkac, L., Beanan, M., Dodson, R.J., Daugherty, S.C., Madupu, R., Angiuoli, S.V., Durkin, A.S., Haft, D.H., Vamathevan, J., Khouri, H., Utterback, T., Lee, C., Dimitrov, G., Jiang, L., Qin, H., Weidman, J., Tran, K., Kang, K., Hance, I.R., Nelson, K.E., Fraser, C.M. (2005). Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *J. Bacteriol.* 187: 2426-2438.

Gómez-Lucia, E., Blanco, M.M., Doménech, A. (2007). Manual de Inmunología Veterinaria. Ed., Pearson-Prentice Hall. Madrid, España.

Gomez, M.I., O'Seaghda, M., Magargee, M., Foster, T.J. y Prince, A.S. (2006). *Staphylococcus aureus* protein A activates TNFR1 signaling through conserved IgG binding domains. *J. Biol. Chem.* 281: 20190-20196

Gonzalez, S., González-Rodríguez, A.P., Suárez-Álvarez, B., López-Soto, A., Huergo-Zapico, L., Lopez-Larrea, C. (2011). Conceptual aspects of self and nonself discrimination. *Self Nonself*. 2(1):19-25.

Gordon, R.J., Lowy, F.D. (2008). Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin. Infect. Dis.* 46 Suppl 5: S350-359.

Graw, F., Regoes, R.R. (2012). Influence of the fibroblastic reticular network on cell-cell interactions in lymphoid organs. *PLoS Comput. Biol.* 8: e1002436.

Gregg, D.A., House, C., Meyer, R., Berninger, M. (1991). Viral haemorrhagic disease of rabbits in Mexico: epidemiology and viral characterization. *Rev. Sci. Tech.* 10: 435-451.

- Guerrero, I., Ferrián, S., Blas, E., Pascual, J.J., Cano, J.L., Corpa, J.M. (2011). Evolution of the peripheral blood lymphocyte populations in multiparous rabbit does with two reproductive management rhythms. *Vet. Immunol. Immunop.* 140: 75–81.
- Guinane, C.M., Penadés, J.R., Fitzgerald, J.R. (2011). The role of horizontal gene transfer in *Staphylococcus aureus* host adaptation. *Virulence.* 2: 241-243.
- Hadimli, H.H., Erganis, O., Kav, K., Sayin, Z., (2005). Evaluation of a combined vaccine against staphylococcal mastitis in ewes. *Bull.Vet. Inst. Pulawy.* 49: 179-182.
- Hagen, K.W.,Jr. (1963). Disseminated staphylococcal infection in young domestic rabbits. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 142: 1421-1422.
- Hart, G.T., Wang, X., Hogquist, K.A., Jameson, S.C. (2011). Kruppel-like factor 2 (KLF2) regulates B-cell reactivity, subset differentiation, and trafficking molecule expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108:716–721.
- Haveri, M., Hovinen, M., Roslof, A., Pyorala, S. (2008). Molecular types and genetic profiles of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine intramammary infections and extramammary sites. *J. Clin. Microbiol.* 46: 3728-3735.
- Hermans, K., De Herdt, P., Baele, M., Devriese, L.A., Haesebrouck, F. (2001). Sequence analysis of a RAPD band differentiating high and low virulence *Staphylococcus aureus* strains from rabbits. *Vet. Microbiol.* 82: 61-67.
- Hermans, K., De Herdt, P., Devriese, L.A., Hendrickx, W., Godard, C., Haesebrouck, F. (1999). Colonization of rabbits with *Staphylococcus aureus* in flocks with and without chronic staphylococcosis. *Vet. Microbiol.* 67: 37-46.
- Hermans, K., Devriese, L.A., Haesebrouck, F. (2003). Rabbit *staphylococcosis*: difficult solutions for serious problems. *Vet. Microbiol.* 91: 57-64.
- Hermans, K., Haesebrouck, F., Vaneechoutte, M., Devriese, L.A., Godard, C., De Herdt, P. (2000). Differentiation between high and low virulence *Staphylococcus aureus* strains from rabbits by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Vet. Microbiol.* 72: 311-319.
- Hesse, M., Modolell, M., Flamme, A. C. L., Schito, M., Fuentes, J. M., Cheever, A. W. (2001). Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: Granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *J. Immunol.* 167(11), 6533–6544.

Hoek, K.L., Gordy, L.E., Collins, P.L., Parekh, V.V., Aune, T.M., Joyce, S., Thomas, J.W., Van Kaer, L., Sebzda, E. (2010). Follicular B cell trafficking within the spleen actively restricts humoral immune responses. *Immunity*. 33: 254–265.

Holden, M.T., Feil, E.J., Lindsay, J.A., Peacock, S.J., Day, N.P., Enright, M.C., Foster, T.J., Moore, C.E., Hurst, L., Atkin, R., Barron, A., Bason, N., Bentley, S.D., Chillingworth, C., Chillingworth, T., Churcher, C., Clark, L., Corton, C., Cronin, A., Doggett, J., Dowd, L., Feltwell, T., Hance, Z., Harris, B., Hauser, H., Holroyd, S., Jagels, K., James, K.D., Lennard, N., Line, A., Mayes, R., Moule, S., Mungall, K., Ormond, D., Quail, M.A., Rabinowitsch, E., Rutherford, K., Sanders, M., Sharp, S., Simmonds, M., Stevens, K., Whitehead, S., Barrell, B.G., Spratt, B.G. y Parkhill, J. (2004). Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101: 9786-9791.

Holland, S.M, Deleo, F.R., Elloumi, H.Z., Hsu, A.P., Uzel, G., Brodsky, N., Freeman, A.F., Demidowich, A., Davis, J., Turner, M.L., Anderson, V.L., Darnell, D.N., Welch, P.A., Kuhns, D.B., Frucht, D.M., Malech, H.L., Gallin, J.I., Kobayashi, S.D., Whitney, A.R., Voyich, J.M., Musser, J.M., Woellner, C., Schaffer, A.A., Puck, J.M., Grimbacher, B. (2007) STAT3 mutations in the hyper-IgE syndrome. *N. Engl. J. Med.* 357:1608–1619.

Holliman A., Girvan G.A. (1986). Staphylococcosis in a comercial rabbitry. *Vet. Rec.* 119: 187.

Holmes, H.T., Patton, N.M., Cheeke, P.R. (1983). The incidence of vaginal and nasal *Pasteurella multocida* in commercial rabbitry. *J. Appl. Rabbit Res.*6: 95-6

Holtfreter, S., Bauer, K., Thomas, D., Feig, C., Lorenz, V., Roschack, K., Friebe, E., Selleng, K., Lovenich, S., Greve, T., Greinacher, A., Panzig, B., Engelmann, S., Lina, G., Broker, B.M. (2004). egc-Encoded superantigens from *Staphylococcus aureus* are neutralized by human sera much less efficiently than are classical staphylococcal enterotoxins or toxic shock syndrome toxin. *Infect. Immun.* 72: 4061-4071.

Holtfreter, S., Kolata, J., Broker, BM. (2010). Towards the immune proteome of *Staphylococcus aureus* the anti-*S.aureus* antibody response. *Int. J. Med. Microbiol.* 300:176–192.

Holtfreter, S., Radcliff, F.J., Grumann, D., Read, H., Johnson, S., Monecke, S., Ritchie, S., Clow, F., Goerke, C., Bröker, B.M., Fraser, J.D., Wiles, S.( 2013). Characterization of a mouse-adapted *Staphylococcus aureus* strain. *PLoS One*. 8:e71142.

- Hookey, J.V., Richardson, J.F., Cookson, B.D. (1998). Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. *J. Clin. Microbiol.* 36: 1083-1089.
- Huang, W.T., Niu, K.C., Chang, C.K., Lin, M.T., Chang, C.P. (2008). Curcumin inhibits the increase of glutamate, hydroxyl radicals and PGE2 in the hypothalamus and reduces fever during LPS-induced systemic inflammation in rabbits. *Eur. J. Pharmacol.* 593: 105-111.
- Ishihara, S., Yokoi, S., Ito, M., Kobayashi, S., Deguchi, T. (2001). Pathologic significance of *Staphylococcus saprophyticus* in complicated urinary tract infections. *Urology.* 57: 17-20.
- Jacobsen, C.N., Aasted, B., Broe, M.K., Petersen, J.L. (1993). Reactivities of 20 anti-human monoclonal antibodies with leucocytes from ten different animal species. *Vet. Immunol. Immunop.* 39: 461-466.
- Janeway, C.A.Jr., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M.J. (2001). *Immunobiology*; 5th. Ed. Garland Science. New York, USA.
- Jarraud, S., Lyon, G.J., Figueiredo, A.M., Gerard, L., Vandenesch, F., Etienne, J., Muir, T.W., Novick, R.P. (2000). Exfoliatin-producing strains define a fourth agr specificity group in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 182: 6517-6522.
- Jarraud, S., Peyrat, M.A., Lim, A., Tristan, A., Bes, M., Mougel, C., Etienne, J., Vandenesch, F., Bonneville, M., Lina, G. (2001). egc, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol.* 166: 669-677.
- Jaulhac, B., Prevost, G., Piemont, Y. (1991). Specific detection of the toxic shock syndrome toxin-1 gene using the polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Probes.* 5: 281-284.
- Jeklova, E., Leva, L., Faldyna, M. (2007). Lymphoid organ development in rabbits: Major lymphocyte subsets. *Dev. Comp. Immunol.* 31: 632-644.
- Jensen, K., Günther, J., Talbot, R., Petzl, W., Zerbe, H., Schuberth, H.J., Glass, E.J. (2013). *Escherichia coli*- and *Staphylococcus aureus* - induced mastitis differentially modulate transcriptional responses in neighbouring uninfected bovine mammary gland quarters. *BMC Genomics.* 14: 36.

Ji, G., Beavis, R., Novick, R.P. (1997). Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science*. 276: 2027-2030.

Jones, R.N. (2003). Global epidemiology of antimicrobial resistance among community-acquired and nosocomial pathogens: a five-year summary from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). *Semin. Respir. Crit. Care. Med.* 24: 121-134.

Jonuleit, H., Schmitt, E. (2003). The regulatory T cell family: distinct subsets y their interrelations. *J. Immunol.* 171: 6323-7.

Kemeny, D.M. (2012). The role of the T follicular helper cells in allergic disease. *Cell. Mol. Immunol.* 9: 386-389.

Kennedy, A.D., Bubeck Wardenburg, J., Gardner, D.J., Long, D., Whitney, A.R., Braughton, K.R., Schneewind, O., DeLeo, F.R. (2010) Targeting of alpha-hemolysin by active or passive immunization decreases severity of USA300 skin infection in a mouse model. *J. Infect. Dis.* 202:1050-1058.

Kennedy, A.D., DeLeo, F.R. (2009). Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. *Immunol. Res.* 43: 25-61.

Kim, H.K., Missiakas, D., Schneewind, O. (2014). Mouse models for infectious diseases caused by *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol. Methods.* 410:88-99.

Kim, Y., Atalla, H., Mallard, B., Robert, C., Karrow, N. (2011). Changes in Holstein cow milk and serum proteins during intramammary infection with three different strains of *Staphylococcus aureus*. *BMC Vet. Res.* 7:51

Kimura, M., Toth, L.A., Agostini, H., Cady, A.B., Majde, J.A., Krueger, J.M. (1994). Comparison of acute responses induced in rabbits by lipopolysaccharide and double-stranded RNA. *Am. J. Physiol.* 267: 1596-1605.

Kindt, T.J., Osborne, B.A., Goldsby, R.A. (2007). *Kuby Immunology*. Ed. W.H. Freeman and Company. Nueva York, USA

Kloos, W.E. (1980). Natural populations of the genus *Staphylococcus*. *Annu. Rev. Microbiol.* 34: 559-592.

Kluytmans, J., van Belkum, A., Verbrugh, H. (1997). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin. Microbiol. Rev.* 10: 505-520.

Kobayashi, S.D., Deleo, F.R. (2011). A MRSA-terious enemy among us: boosting MRSA vaccines. *Nat. Med.* 17:168–169.

Kobayashi, S.D., Voyich, J.M., Burlak, C., DeLeo, F.R. (2005). Neutrophils in the innate immune response. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 53: 505-517.

Kobayashi, Y. (2008). The role of chemokines in neutrophil biology. *Front. Bioscience* 13: 2400-2407.

Koning, J.J., Mebius, R.E. (2012). Interdependence of stromal and immune cells for lymph node function. *Trends Immunol.* 33: 264-270.

Koreen, L., Ramaswamy, S.V., Naidich, S., Koreen, I.V., Graff, G.R., Graviss, E.A., Kreiswirth, B.N. (2005). Comparative sequencing of the serine-aspartate repeat-encoding region of the clumping factor B gene (*clfB*) for resolution within clonal groups of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 43: 3985-3994.

Kotani, M., Yamamura, Y., Tamatani, T., Kitamura, F., Miyasaka, M. (1993a). Generation and characterization of monoclonal antibodies against rabbit CD4, CD5 and CD11a antigens. *J. Immunol. Methods* 157, 241-252.

Kotani, M., Yamamura, Y., Tsudo, M., Tamatani, T., Kitamura, F., Miyasaka, M., (1993b). Generation of monoclonal antibodies to the rabbit interleukin-2 receptor alpha chain (CD25) and its distribution in HTLV-1-transformed rabbit T cells. *Jpn. J. Cancer Res.* 84, 770-775.

Kötsche, W., Gottschalk, C. (1974). *Enfermedades del conejo y de la liebre*. Ed. Acribia. Zaragoza, España.

Koziel, J., Chmiest, D., Bryzek, D., Kmiecik, K., Mizgalska, D., Maciag-Gudowska, A., Shaw, LN., Potempa, J. (2015). The Janus Face of  $\alpha$ -Toxin: A Potent Mediator of Cytoprotection in Staphylococci-Infected Macrophages. *J. Innate. Immun.* 7:187-198

Krogstad, A.P., Simpson, J.E., Korte, S.W. (2005). Viral diseases of the rabbit. *Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract.* 8:123-38.

Kumar, V., Sharma, A. (2010). Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *Int. Immunopharmacol.* 10: 1325-1334.

Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., Baba, T., Yuzawa, H., Kobayashi, I., Cui, L., Oguchi, A., Aoki, K., Nagai, Y., Lian, J., Ito, T., Kanamori, M., Matsumaru, H., Maruyama, A., Murakami, H., Hosoyama, A., Mizutani-Ui, Y., Takahashi, N.K., Sawano, T., Inoue, R., Kaito, C., Sekimizu, K., Hirakawa, H., Kuhara, S., Goto, S., Yabuzaki, J., Kanehisa, M., Yamashita, A., Oshima, K., Furuya, K., Yoshino, C., Shiba, T., Hattori, M., Ogasawara, N., Hayashi, H., Hiramatsu, K. (2001). Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. 357: 1225-1240.

Labandeira-Rey, M., Couzon, F., Boisset, S.(2007). *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. *Science*. 315:1130-1133.

Lammers, A., Kruijt, E., van de Kuijt, C., Nuijten, P.J., Smith, H.E. (2000). Identification of *Staphylococcus aureus* genes expressed during growth in milk: a useful model for selection of genes important in bovine mastitis. *Microbiol*. 146:981-987.

Langier, S., Landsberg, R., Sade, K., Kivity, S.(2011). Anti-IL-5 immunomodulates the effect of *Staphylococcus aureus* enterotoxin on T cell response in nasal polyps. *Rhinology*. 49:570–576

Lanning, D., Sethupathi, P., Rhee, K.J., Zhai, S.K., Knight, K.L. (2000). Intestinal microflora and diversification of the rabbit antibody repertoire. *J. Immunol*.165: 2012-2019.

Las Heras, A., López I., Legaz E., Fernandez-Garayzabal, J., Dominguez, L. (1998). Aportes a la prevalencia y etiología de la mastitis subclínica en la comunidad de Madrid. *Producción ovina y caprina*. 23: 387-390.

Le Loir, Y., Baron, F., Gautier, M. (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet. Mol. Res*. 2: 63–76.

Lebas, F., Coudert, P., de Rochambeau, H., Thebault, R.G. (1997).The Rabbit – Husbandry, Health and Production.FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

LeBien, T.W., Tedder, T.F. (2008). B. lymphocytes: how they develop and function. *Blood*. 112: 1570-1580.

Lee, L.Y., Miyamoto, Y.J., McIntyre, B.W., Höök, M., McCrea, K.W., McDevitt, D., Brown, E.L. (2002). The *Staphylococcus aureus* Map protein is an immunomodulator that interferes with T cell-mediated responses. 110: 1461-1471.

- Leitner, G., Shoshani, E., Krifucks, O., Chaffer, M., Saran, A. (2000). Milk leucocyte population patterns in bovine udder infection of different aetiology. J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health. 47: 581-589.
- Lester, V.K., Tarpley, H. L., Latimer, K.S. (2005). Small mammal hematology: leukocyte identification in rabbits and guinea pigs. Vet. Clin. Pathol. Clerkship Program. Class of 2005 (Lester) and Department of Pathology (Tarpley, Latimer). College of Veterinary Medicine, University of Georgia, Athens, GA: 30602-7388.
- Letertre, C., Perelle, S., Dilasser, F., Fach, P. (2003). Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. J. Appl. Microbiol. 95: 38-43.
- Licois, D. (2004). Domestic rabbit enteropathies. Proc. 8<sup>o</sup> World Rabbit Congress, Puebla, Mexico. Pp: 385-403
- Licois, D., Wyers, M., Coudert, P. (2005). Epizootic Rabbit Enteropathy: experimental transmission and clinical characterization. Vet. Res. 36: 601-613.
- Lina, G., Piemont, Y., Godail-Gamot, F., Bes, M., Peter, M.O., Gauduchon, V., Vandenesch, F., Etienne, J. (1999). Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. Clin. Infect. Dis. 29: 1128-1132.
- Lina, G., Bohach, G.A., Nair, S.P., Hiramatsu, K., Jouvin-Marche, E., Mariuzza, R. (2004). Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. J. Infect. Dis. 189: 2334-2336.
- Littell, R.C., Henry, P.R., Ammerman, C.B. (1998). Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. J. Anim. Sci. 76: 1216-1231.
- Llewelyn, M., Cohen, J. (2002). Superantigens: microbial agents that corrupt immunity. Lancet. Infect. Dis. 2: 156-162.
- Lowy, F.D. (1998) *Staphylococcus aureus* infections. N. Engl. J. Med. 339: 520-532.
- Lu, Y., Hong, S., Li, H., Park, J., Hong, B., Wang, L., Zheng, Y., Liu, Z., Xu, J., He, J., Yang, J., Qian, J., Yi, Q. (2012). Th9 cells promote antitumor immune responses in vivo. J. Clin. Invest. 122: 4160-4171.
- Lu, Y.S., Ringler, D.H., Park, J.S. (1978). Characterization of *Pasteurella multocida* isolates from the nares of healthy rabbits with pneumonia. Lab. Anim. Sci. 28: 691-697.

- Mackiewich, A., Ganapathi, M.K., Scultz, D., Samols, D., Reese, J., Kushner, I. (1988). Regulation of rabbit acute phase protein biosynthesis by monokines. *Biochem. J.* 253: 851-857.
- Mairpady-Shambat, S., Haggar, A., Vandenesch, F., Lina, G., van Wamel, W. J. B., Arakere, G., Norrby-Teglund, A. (2014). Levels of Alpha-Toxin Correlate with Distinct Phenotypic Response Profiles of Blood Mononuclear Cells and with agr Background of Community-Associated *Staphylococcus aureus* Isolates. *PLoS ONE*, 9(8), e106107.
- Malachowa, N., Kobayashi, S. D., Freedman, B., Dorward, D. W., DeLeo, F. R. (2013). *Staphylococcus aureus* LukGH promotes formation of neutrophil extracellular traps. *J. Immunol.* 191, 6022-6029.
- Maloy, K. J., Powrie, F. (2001). Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat. Immunol.* 2:816
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25: 677-686.
- Marai, I.F.M., Habeeb, A.A.M., Gad, A.E. (2002a). Rabbit's productive, reproductive and physiological traits as affected by heat stress (a review). *Livest. Prod. Sci.* 78: 71-90.
- Marai, I.F.M., Habeeb, A.A.M., Gad, A.E. (2002b). Reproductive traits of male rabbits as affected by climatic conditions, in the subtropical environment of Egypt. *Anim. Sci.* 75: 451-458.
- Marai, I.F.M., Habeeb, A.A.M., Gad, A.E. (2004). Reproductive traits of female rabbits as affected by heat stress and lighting regime, under subtropical conditions of Egypt. *J. Anim. Sci.* 78: 119-127.
- Marca, M.C., Gómez-Quintero, A., Viñuales, C., Rodríguez-Yoldi, M.J. (2009). Changes in plasma hormone levels following lipopolysaccharide injection in rabbits. *Vet. J.* 180: 213-220.
- Marcato, P.S., Rosmini, R. (1986). Mammary glands. En: *Pathology of the rabbit and hare*. Marcato, P.S. y Rosmini, R. Ed. Società Editrice Esculapio. Bologna, Italia. Pp: 179-186.

Marlier, D., Hubens, N., Houeix, J., Licois, D., Mainil, J. (2010). Epizootic rabbit enteropathy inoculum (TEC4) antibiograms and antibiotic fractionation. *Vet. Res. Commun.*

Marples, R.R., Kligman, A.M. (1975). Experimental staphylococcal infections of the skin in man. En: Jeljaszewicz, J. (Ed.), *Staphylococci and Staphylococcal Diseases*, Proc. 3<sup>o</sup> International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections. Varsovia, Polonia. Pp: 750–755.

Martínez, F.O., Helming, L., Gordon, S. (2009). Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu. Rev. Immunol.* 27: 451-483.

Martínez-Vallespín, B., Martínez-Paredes, E., Ródenas, L., Cervera, C., Pascual, J.J., Blas, E. (2011). Combined feeding of rabbit female and young: partial replacement of starch with acid detergent fibre or/and neutral detergent soluble fibre at two protein levels. *Livest. Sci.* 141: 155-165.

Mashburn, Jr.T.A., Llanos, J., Hunter, W.S., Ahokas, R.A., Blatteis, C.M. (1984). Differential acute-phase responses in febrile and cold- and heat-exposed rabbits. *Pflügers Arch.* 402: 157-161.

McCann, H.C., Nahal, H., Thakur, S., Guttman, D.S. (2012). Identification of innate immunity elicitors using molecular signatures of natural selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109: 4215-4220.

McCarthy, A.J., Lindsay, J.A. (2013). *Staphylococcus aureus* innate immune evasion is lineage-specific: a bioinformatics study. *Infect. Genet. Evol.* 19: 7-14.

McCormick, J.K., Yarwood, J.M., Schlievert, P.M. (2001) Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. *Annu. Rev. Microbiol.* 55:77-104.

McDevitt, D. y Foster, T.J. (1995). Variation in the size of the repeat region of the fibrinogen receptor (clumping factor) of *Staphylococcus aureus* strains. *Microbiol.* 141 (Pt 4): 937-943.

McDonel, J.L., Duncan, C.L. (1975). Histopathological effect of *Clostridium perfringens* enterotoxin in the rabbit ileum. *Infect. Immun.* 12: 1214-1218.

McGavin, M., Carlton, W., Zachary, F. (2001). *Special veterinary pathology*. Ed. Mosby, St. Louis, Missouri, USA.

McHeyzer-Williams, L.J., McHeyzer-Williams, M.G. (2005). Antigen-specific memory B cell development. *Annu. Rev. Immunol.* 23: 487-513

McLoughlin, R.M., Lee, J.C., Kasper, D.L., Tzianabos, A.O. (2008) IFN-gamma regulated chemokine production determines the outcome of *Staphylococcus aureus* infection. *J. Immunol.* 181:1323-1332

McLoughlin, R.M., Solinga, R.M., Rich, J., Zaleski, K.J., Cocchiaro, J.L., Risley, A., Tzianabos, A.O., Lee, J.C. (2006). CD4+ T cells and CXC chemokines modulate the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* wound infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103: 10408-10413.

McNamee, P.T., Smyth, J.A. (2000). Bacterial chondronecrosis with osteomyelitis ('femoral head necrosis') of broiler chickens: a review. *Avian. Pathol.* 29: 253-270.

Meng, J., Bowen, G.J., Jie, Y., Koch, P.L., Ting, S., Qian, L., Jin, X. (2004). *Gomphos elkema* (Glires, Mammalia) from the Erlian Basin: Evidence for the Early Tertiary Bumbanian Land Mammal Age in Nei-Mongol, China. *American Museum Novitates* 3425: 1-24.

Menzies, B.E. (2003). The role of fibronectin binding proteins in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infections. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 16: 225-229.

Meulemans, L., Hermans, K., Duchateau, L., Haesebrouck, F. (2007). High and low virulence *Staphylococcus aureus* strains in a rabbit skin infection model. *Vet. Microbiol.* 125: 333-340.

Meulemans, L. (2011). *Staphylococcus aureus* in rabbits: pathogenesis and prevention. Tesis doctoral. Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University.

Milhaud, G., Renault, L., Vaissaire, J., Maire, C. (1976). Sensibilité du lapin à l'ampicilline. *Recl. Med. Vet.* 152: 843-847.

Miller, C., Ragheb, J.A., Schwartz, R.H. (1999). Anergy and cytokine-mediated suppression as distinct superantigen-induced tolerance mechanisms *in vivo*. *J. Exp. Med.* 190: 53-64

Mitchell-Jones, A.J., Amori, G., Bogdanowicz, W., Krystufek, B., Reijnders, P.J.H., Spitzenberger, F., Stubbe, M., Thissen, J.B.M., Vohralik, V., Zima, J. (1999). The atlas of European mammals. Academic Press. Londres. Reino Unido. Pp: 484.

- Mo, J-S., Matsukawa, A., Ohkawara, S., Yoshinaga, M. (1999). Role and regulation of IL-8 and MCP-1 in LPS-induced uveitis in rabbits. *Exp. Eye Res.* 68: 333-340.
- Molne, L., Verdrengh, M., Tarkowski, A. (2000). Role of neutrophil leukocytes in cutaneous infection caused by *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 68: 6162-6167.
- Montgomery, C.P., Daniels, M., Zhao, F., Alegre, M.L., Chong, A.S., Daum, R.S. (2014). Protective immunity against recurrent *Staphylococcus aureus* skin infection requires antibody and interleukin-17A. *Infect. Immun.* 82:2125–2134.
- Morisse, J.P. (1978). Induction d'une entérite de type colibacillaire chez le lapin. *Recl. Med. Vet.* 129: 625-632.
- Mork, T., Tollersrud, T., Kvitle, B., Jorgensen, H.J., Waage, S. (2005). Genetic diversity of *Staphylococcus aureus* isolated from ovine intramammary infections in Norway. *Vet. Microbiol.* 106: 265-273.
- Mosser, D.M., Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 958-969.
- Mucida, D., Cheroutre, H. (2010). The many face-lifts of CD4 T helper cells. *Adv. Immunol.* 107: 139-152.
- Nakagawa, M., Saito, M., Suzuki, E., Nakayama, K., Matsubara, J., Matsuno, K. (1986). A survey of *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus zooepidemicus*, *Salmonella* spp., *Bordetella bronchiseptica* and Sendai virus in guinea pig colonies in Japan. *Jikken Dobutsu* 35: 517-520.
- Nathan, C. (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* 6: 173-182.
- Newbould, F.H. (1974). Antibiotic treatment of experimental *Staphylococcus aureus* infections of the bovine mammary gland. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* 38:411-416.
- Ni Eidhin, D., Perkins, S., Francois, P., Vaudaux, P., Hook, M.; Foster, T.J. (1998). Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 30: 245-257.
- Novick, R. (1967) Properties of a cryptic high-frequency transducing phage in *Staphylococcus aureus*. *Virology.* 33: 155-166.

Novick, R.P. (2000). Pathogenicity factors and their regulation. En: Gram-positive pathogens. Fischetti, V., Novick, R.P., Ferretti, J., Rood, J.L.P.D. Ed. American Society for Microbiology. Washington DC . Pp: 392–407.

Oberbarnscheidt, M.H., Zecher, D., Lakkis, F.G. (2011). The innate immune system in transplantation. Sem. Immunol. 4: 264-272.

O'Garra, A., Vieira, P. (2004). Regulatory T cells and mechanism of immune system control. Nat. Med. 10: 801-805.

Ohlinger, V.F., Haas, B., Thiel, H.J. (1993). Rabbit hemorrhagic disease (RHD): characterization of the causative calicivirus. Vet. Res. 24: 103-116.

Okada, K., Yamasoba, T., Kiyono, H. (2011). Craniofacial mucosal immune system: importance of its unique organogenesis and function in the development of a mucosal vaccine. Adv. Otorhinolaryngol. 72: 31-36.

Okerman, L., Devriese, L.A., Maertens, L., Okerman, F., Godard, C. (1984). Cutaneous staphylococcosis in rabbits. Vet. Rec. 114: 313-315.

Otter, J.A., French, G.L. (2010). Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. Lancet. Infect. Dis. 10, 227–239.

Otto, M. (2008). Staphylococcal Biofilms. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 322, 207–228.

Parker, D., Ryan, C.L., Alonzo, F., Torres, V.J., Planet, P.J., Prince, A.S. (2014). CD4<sup>+</sup> T Cells Promote the Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* Pneumonia. J. Infect. Dis. jiu525v2-jiu525.

Parker, M. (1962) Phage typing and the epidemiology of *Staphylococcus aureus* infection. J. Appl. Bacteriol. 25: 389-402.

Pascual, A., de Cueto, M. (2009). Microbiología y patogenia de las infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. Ed. ICG Marge, SL. Valencia, España. Pp: 15 – 32.

Pascual, J.J. (2010). The role of body condition on new feeding and breeding programmes for reproductive rabbit does. Proc. 22th Hungarian Conference on Rabbit Production. Kaposvar, Hungría. Pp: 11-32.

Pascual, J.J., Savietto D., Cervera, C., Baselga, M. (2013). Resources allocation in reproductive rabbit does: a review of feeding and genetic strategies for suitable performance World Rabbit Sci. 21:123-144.

Patton, N.M., Hagen, K.W., Gorham, J.R., Flatt, R.E. (1986). Domestic rabbits: diseases and parasites. Ed. Pacific Northwest Extension. Oregon, Idaho and Washington. EEUU.

Patton, N.M., Holmes, H.T. (1977). Myxomatosis in domestic rabbits in Oregon. J. Am. Vet. Med. Assoc. 171: 560-562.

Peacock, S.J., de Silva, I. y Lowy, F.D. (2001). What determines nasal carriage of *Staphylococcus aureus*? Trends Microbiol. 9: 605-610.

Peacock, S.J., Moore, C.E., Justice, A., Kantzanou, M., Story, L., Mackie, K., O'Neill, G., Day, N.P. (2002). Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. Infect. Immun. 70: 4987-4996.

Peeters, J.E., Charlier, G., Antoine, O., Mammereckx, M. (1984). Clinical and pathological changes after *Eimeria intestinalis* infection in rabbits. Zentralbl. Vet. Med. B. 31: 9-24.

Peng, H.L., Novick, R.P., Kreiswirth, B., Kornblum, J., Schlievert, P. (1988). Cloning, characterization, and sequencing of an accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 170: 4365-4372.

Percy, D.H., Barthold, S.W. (2001). Mouse. En: Pathology of Laboratory Rodents & Rabbits. Ed. Iowa State University. Iowa. Pp: 3-106.

Peris, B., Corpa, J.M. (2003). Las estafilococias en el conejo. Cunicultura. 164: 271-281.

Perkins, S.E., Fox, J.G., Taylor, N.S., Green, D.L., Lipman, N.S. (1995). Detection of *Clostridium difficile* toxins from the small intestine and cecum of rabbits with naturally acquired enterotoxemia. Lab. An. Sci. 45: 379-384.

Pixley, F.J. (2012). Macrophage migration and its regulation by CSF-1. Int. J. Cell Biol. 2012: 501962.

Pollard, J.W. (2009). Trophic macrophages in development and disease. Nat. Rev. Immunol. 9: 259-270.

- Popovich, K.J., Weinstein, R.A., Aroutcheva, A., Rice, T., Hota, B. (2010). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and HIV: intersecting epidemics. *Clin. Infect. Dis.* 50: 979-987.
- Pospisil, R., Mage, R.G. (1998). Rabbit appendix: a site of development and selection of the B cell repertoire. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 229: 59-70.
- Proctor, R.A., Kahl, B., von Eiff, C., Vaudaux, P.E., Lew, D.P., Peters, G. (1998). Staphylococcal small colony variants have novel mechanisms for antibiotic resistance. *Clin. Infect. Dis.* 27(Suppl 1):S68-S74
- Quevedo, F., Pascual, J.J., Blas, E., Cervera, C. (2003). Influencia de la madre sobre el crecimiento y la mortalidad de los gazapos en cebo. Proc. 28º Simposium de Cunicultura. ASESCU. Teruel, España. Pp:115-122.
- Quilty, S., Kwok, G., Hajkovicz, K., Currie, B. (2009). High incidence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* sepsis and death in patients with febrile neutropenia at Royal Darwin Hospital. *Intern. Med. J.* 39:557-559.
- Quinn, P. (1999). *Staphylococcus* species. En: *Clinical veterinary microbiology*. Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B. y Carter, G.R. Ed. Elsevier Mosby. Londres, Reino Unido. Pp: 118-126.
- Radbruch, A., Muchlinghaus, G., Luger, E.O., Inamine, A., Smith, K.G., Dörner, T., Hiepe, F. (2006). Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat. Rev. Immunol.* 6: 741-750.
- Radostits, O.M., Gay, C.C. Blood, D.C. Hinchcliff, K.W. (2002). *Medicina veterinaria: tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino*. Ed. Mc Graw Hill-Interamericana. Madrid, España.
- Randall, T.D., Carragher, D.M., Rangel-Moreno, J. (2008). Development of secondary lymphoid organs. *Annu. Rev. Immunol.* 26: 627-650.
- Rasigade, J.P., Laurent, F., Hubert, P., Vandenesch, F., Etienne, J. (2010). Lethal necrotizing pneumonia caused by an ST398 *Staphylococcus aureus* strain. *Emerg. Infect. Dis.* 16:1330
- Rauw, W.M., Kanis, E., Noordhuizen-Stassen, E.N., Grommers, F.J. (1998). Undesirable side effects of selection for high production efficiency in farm animals. *Review. Livest. Prod. Sci.* 56: 15-33.

- Rauw, W.M., Knap, P.W., Verstegen, M.W.A., Luiting, P. (2002). Food resource allocation patterns in lactating females in a long-term selection experiment for litter size in mice. *Genet. Sel. Evol.* 34: 83-104.
- Ravagnolo, O., Misztal, I., Hoogenboom, G. (2000). Genetic component of heat stress in dairy cattle, development of heat index function. *J. Dairy Sci.* 83: 2120-2125.
- Reinoso, E., Magnano, G., Giraudo, J., Calzolari, A., Bogni, C. (2002). Bovine and rabbit models for the study of a *Staphylococcus aureus* avirulent mutant strain, RC122. *Can. J. Vet. Res.* 66: 285–288.
- Reynaud, C.A., Weill, J.C. (1996). Postrearrangement diversification processes in gut-associated lymphoid tissues. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 212: 7-15.
- Rich, R.R., Fleisher, T.A., Shearer, W.T., Kotzin, B.L., Schroeder, H.W.J.(2001). *Clinical Immunology: Principles and Practice*. Ed. Elsevier Mosby. New York. USA.
- Roitt, I., Delves, P.J. (2006). *Roitt's essential immunology* 11th Ed. Wiley-Blackwel. Londres, Reino Unido.
- Romano, R., Palamaro, L., Fusco, A., Iannace, L., Maio, S., Vigliano, I., Giardino, G., Pignata, C. (2012). From murine to human nude/SCID: The thymus, T-cell Development and the missing link. *Clin. Dev. Immunol.* 2012: 467101.
- Rooijackers, S.H., Ruyken, M., Roos, A., Daha, M.R., Presanis, J.S., Sim, R.B., van Wamel, W.J., van Kessel, K.P., van Strijp, J.A. (2005). Immune evasion by a staphylococcal complement inhibitor that acts on C3 convertases. *Nat. Immunol.* 6: 920-927.
- Roos, D., de Boer, M. (2014). Molecular diagnosis of granulomatous disease. *Clin. Exp. Immunol.* 175: 139-149.
- Rosell, J.M. (2003). Health status of commercial rabbitries in the Iberian Peninsula. A practitioner's study. *World Rabbit Sci.* 11: 157-169.
- Rosell, J.M., de la Fuente, L.F. (2009). Culling and mortality in breeding rabbits. *Prev. Vet. Med.* 88: 120-127.
- Rosell, J.M., de la Fuente, L.F., Fluvía, M. (2000). *Economía y Sanidad. Enfermedades del conejo*. Vol. I. Rosell, J.M. Ed. Mundi – Prensa. Madrid, España. Pp: 555-600.

Rosell, J.M., De la Fuente, L.F., García, F., Gracia, E. y Baselga, R. (2000). Enfermedades de la reproducción: conejas. En Enfermedades del conejo. Vol. II. Rosell, J.M. Ed. Mundiprensa, Madrid, España. Pp: 71-122.

Ruegg, P. (2003). Investigation of mastitis problems on farms. *Vet. Clin. Food Anim.* 19: 47-73.

Ruiz-Alcaraz, A.J., Martínez-Esparza, M., Caño, R., Hernández-Caselles, T., Recarti, C., Llanos, L., Zapater, P., Tapia-Abellán, A., Martín-Orozco, E., Pérez-Mateo, M., Such, J., García-Peñarrubia, P., Francés, R. (2011). Peritoneal macrophage priming in cirrhosis is related to ERK phosphorylation and IL-6 secretion. *Eur. J. Clin. Invest.* Jan; 41:8-15

Sabat, A., Melles, D.C., Martirosian, G., Grundmann, H., van Belkum, A., Hryniewicz, W. (2006). Distribution of the serine-aspartate repeat protein-encoding *sdr* genes among nasal-carriage and invasive *Staphylococcus aureus* strains. *J. Clin. Microbiol.* 44: 1135-1138.

Sabroe, I., Prince, L.R., Jones, E.C., Horsburgh, M.J., Foster, S.J., Vogel, S.N., Dower, S., Whyte, M.K.B (2003). Selective roles for Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in the regulation of neutrophil activation and life span. *J. Immunol.* 170: 5268-5275.

Saffarzadeh, M., Juenemann, C., Queisser, M.A., Lochnit, G., Barreto, G., Galuska, S.P., Lohmeyer, J., Preissner, K.T. (2012). Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PLoS One* 7: e32366.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Ed. Cold Spring Harbor. New York. USA.

Sánchez, J.P. (2006). Análisis genético de la longevidad en conejas de producción cárnica. Constitución y evaluación de una línea longevo-productiva de conejos. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. España.

Sánchez, J.P., de la Fuente, L.F., Rosell, J.M. (2012). Health and body condition of lactating females on rabbit farms. *J. Anim. Sci.* 90:2353-2361.

Sánchez, J.P., Theilgaard, P., Mínguez, C., Baselga, M. (2008). Constitution and evaluation of a long-lived productive rabbit line. *J. Anim. Sci.* 86: 515-525.

Schijffelen, M.J., Boel, C.H., van Strijp, J.A., Fluit, A.C. (2010). Whole genome analysis of a livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 isolate from a case of human endocarditis. *BMC Genomics*. 11:376

Schinkel, A.P., Richert, B.T., Frank, J.W., Kendall, D.C. (1999). Genetic by environmental interactions for pig growth. *Purdue Swine Day Report*,. 93-103.

Schlafer, D.H. (2007). Female genital system. En: *Pathology of Domestic Animals*. Vol. 3. Jubb, K.V.F., Kennedy, P.C. y Palmer, N. Ed. Academic Press, Inc. Orlando, USA. Pp: 429-564.

Schmalzer, M., Jann, N.J., Ferracin, F., Landmann, R. (2011). T and B cells are not required for clearing *Staphylococcus aureus* in systemic infection despite a strong TLR2-MyD88- dependent T cell activation. *J. Immunol*. 186: 443-52.

Schwartz, R.H. (2003). T cell anergy. *Annu. Rev. Immunol*. 21: 305-334.

Segal, A.W. (2005). How neutrophils kill microbes. *Annu. Rev. Immunol*. 23: 197-223.

Segura, P., Martinez, J., Peris, B., Selva, L., Viana, D., Penadés, J.R., Corpa, J.M. (2007). Staphylococcal infections in rabbit does on two industrial farms. *Vet. Rec*. 160: 869-872.

Shao, M., Qu, K., Liu, K., Zhang, Y., Zhang, L., Lian, Z., Chen, T., Liu, J., Wu, A., Tang, Y., Zhu, H. (2011). Effects of ligustilide on lipopolysaccharide-induced endotoxic shock in rabbits. *Planta Med.* 77: 809-816.

Shapiro, H., Lutaty, A., Ariel, A. (2011). Macrophages, meta-inflammation, and immuno-metabolism. *Sci. World J*. 11: 2509-2529.

Shapiro-Shelef, M., Calame, K. (2005). Regulation of plasma-cell development. *Nat. Rev. Immunol*. 5: 230-242.

Shevach, E.M., McHugh, R.S., Thornton, A.M., Piccirillo, C., Natarajan, K., Margulies, D.H. (2001). Control of autoimmunity by regulatory T cells. *Adv. Exp. Med. Biol*. 490:21-32.

Shibata, M., Uno, T., Riedel, W., Nishimaki, M., Watanabe, K. (2005). Transiently enhanced LPS-induced fever following hyperthermic stress in rabbits. *Int. J. Biometeorol*. 50: 67-74.

- Shoshani, E., G. Leitner, B., Hanochi, A., Saran, Y., Shpigel, N., Berman, A. (2000). Mammary infection with *Staphylococcus aureus* in cows: progress from inoculation to chronic infection and its detection. J. Dairy Res. 67: 155-169.
- Siegel, P.B., Honaker, C.F.(2009). Impact of genetic selection for growth and immunity on resource allocations. J. Appl. Poultry Res. 18: 125-130.
- Siri, A., De Bosson, H., Boursier, G. (2012).Regulatory T lymphocytes CD4<sup>+</sup>.Med. Sci. 28: 646-665
- Sitina, M., Turek, Z., Parizkova, R., Lehmann, C., Cerny, V. (2011).Preserved cerebral microcirculation in early stages of endotoxemia in mechanically-ventilated rabbits.Clin. Hemorheol. Micro. 47: 37-44.
- Smith, E.M., Green, L.E., Medley, G.F., Bird, H.E., Fox, L.K., Schukken, Y.H., Kruze, J.V., Bradley, A.J., Zadoks, R.N., Dowson, C.G. (2005) Multilocus sequence typing of intercontinental bovine *Staphylococcus aureus* isolates. J. Clin. Microbiol. 43:4737-4743.
- Smyth, D.S., Hartigan, P.J., Meaney, W.J., Fitzgerald, J.R., Deobald, C.F., Bohach, G.A., Smyth, C.J. (2005). Superantigen genes encoded by the egc cluster and SaPIbov are predominant among *Staphylococcus aureus* isolates from cows, goats, sheep, rabbits and poultry. J. Med. Microbiol. 54: 401-411.
- Smyth, D. S., Feil, E. J., Meaney, W. J., Hartigan, P. J., Tollersrud, T., Fitzgerald, J. R., Enright, M. C., Smyth, C. J. (2009). Molecular genetic typing reveals further insights into the diversity of animal-associated *Staphylococcus aureus*. J. Med. Microbiol. 58, 1343–1353.
- Snyder, P.W. (2012). General Pathology. Disease of immunity. En: Pathologic Basis of Veterinary Disease, Fifth Ed. Elsevier Mosby. St. Louis, Missouri, USA.. Pp: 242-288.
- Sompayrac, L.M. (2012). How immune system works. Ed.,Wiley-Blackwell. Oxford, Reino Unido.
- Spellberg, B., Daum, R. (2012). Development of a vaccine against *Staphylococcus aureus*. Semin. Immunopathol. 34:335-348.
- Spellberg, B., Ibrahim, A.S., Yeaman, M.R., Lin, L., Fu, Y., Avanesian, V., Bayer, A.S., Filler, S.G., Lipke, P., Otoo, H. (2008). The antifungal vaccine derived from the recombinant N terminus of Als3p protects mice against the bacterium *Staphylococcus aureus*. Infect. Immun. 76: 4574-4580.

- Ster, C., Allard, M., Boulanger, S., Lamontagne Boulet, M., Mulhbacher, J., Lafontaine, D.A., Marsault, E., Lacasse, P., Malouin, F. (2013). Experimental treatment of *Staphylococcus aureus* bovine intramammary infection using a guanine riboswitch ligand analog. *J. Dairy Sci.* 96:1000-1008
- Sterzl, J., Silverstein, A.M., 1967. Developmental aspects of immunity. *Adv. Immunol.* 6: 337-459.
- Strommenger, B., Cuny, C., Werner, G., Witte, W. (2004). Obvious lack of association between dynamics of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in central Europe and agr specificity groups. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 23: 15-19.
- Swati, M., Gita, N., Sujata, B., Farah, J., Preeti, M. (2010). Microbial etiology of febrile neutropenia. *Indian J. Hematol. Blood Transfus.* 26: 49-55.
- Szabo, E. K., MacCallum, D. M. (2011). The contribution of mouse models to our understanding of systemic candidiasis. *FEMS Microbiol. Letters*, 320: 1–8.
- Szendrő, Z. (1992). Effect of litter size at mating on the reproductive performance of does. *J. Appl. Rabbit Res.* 15: 538-544.
- Tenhagen, B., Köster, G., Wallmann, J., Heuwieser, W. (2006). Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *J. Dairy. Sci.* 89: 2542-2551.
- Tenover, F., Gayne, R.P. (2000). The epidemiology of *Staphylococcus* infections. En: *Gram-Positive Pathogens*. Fischetti, V.A., Novick, R.P., Ferretti, J.J., Portnoy, D.A., Rood, J.I. Ed. American Society for Microbiology. Washington, DC.
- Theilgaard, P. (2006). Prolificacy, reproductive longevity and body reserves in female rabbits examined using selection lines. Tesis. Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España.
- Theilgaard, P., Sánchez, J.P., Pascual, J.J., Berg, P., Friggens, N.C., Baselga, M. (2007). Late reproductive senescence in a rabbit line hyper selected for reproductive longevity, and its association with body reserves. *Genet. Sel. Evol.* 39: 207-223.
- Thorbecke, G.J. (1960). Gamma globulin and antibody formation in vitro. I. Gamma globulin formation in tissues from immature and normal rabbits. *J. Exp. Med.* 112: 279-292.

Tiffany, H.L., Lavigne, M.C., Cui, Y.H., Wang, J.M., Leto, T.L., Gao, J.L., Murphy, P.M. (2001). Amyloid-beta induces chemotaxis and oxidant stress by acting at formylpeptide receptor 2, a G protein-coupled receptor expressed in phagocytes and brain. *J. Biol. Chem.* 276: 23645-23652.

Tiron, A., Vasilescu, C. (2008). Role of the spleen in immunity. *Immunologic consequences of splenectomy. Chirurgia (Bucur).* 103: 255-263.

Tizard, I.R. (2009). *Introducción a la Inmunología Veterinaria*. Ed. Elsevier, Barcelona, España.

Tobon, G.J., Izquierdo, J.H., Canas, C. (2013). B lymphocytes: development, tolerance, and their role in autoimmunity-focus on systemic lupus erythematosus. *Autoimmune Dis.* 2013: 827254

Tollersrud, T., Kenny, K., Reitz, A.J., Jr., Lee, J.C. (2000). Genetic and serologic evaluation of capsule production by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus* and other *Staphylococcus spp.* Europe and the United States. *J. Clin. Microbiol.* 38: 2998-3003.

Tristan, A., Ying, L., Bes, M., Etienne, J., Vandenesch, F., Lina, G. (2003). Use of multiplex PCR to identify *Staphylococcus aureus* adhesins involved in human hematogenous infections. *J. Clin. Microbiol.* 41: 4465-4467.

Tzianabos, A.O., Chandraker, A., Kalka-Moll, W., Stingele, F., Dong, V.M., Finberg, R.W., Peach, R., Sayegh, M.H. (2000). Bacterial pathogens induce abscess formation by CD4<sup>+</sup> T-cell activation via the CD28-B7-2 costimulatory pathway. *Infect. Immun.* 68: 6650-6655.

Tzianabos, A.O., Wang, J.Y., Lee, J.C. (2001). Structural rationale for the modulation of abscess formation by *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 9365-9370

Vajdy, M., Sethupathi, P., Knight, K.L. (1998). Dependence of antibody somatic diversification on gut-associated lymphoid tissue in rabbits. *J. Immunol.* 160: 2725-2729.

Vancraeynest, D., Hermans, K., Haesebrouck, F. (2004). Genotypic and phenotypic screening of high and low virulence *Staphylococcus aureus* isolates from rabbits for biofilm formation and MSCRAMMs. *Vet. Microbiol.* 103: 241-247.

Vancraeynest, D., Haesebrouck, F., Deplano, A., Denis, O., Godard, C., Wildemaewe, C., Hermans, K. (2006a). International dissemination of a high virulence rabbit *Staphylococcus aureus* clone. J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health. 53: 418-422.

Vancraeynest, D., Hermans, K., Haesebrouck, F. (2006b). Prevalence of genes encoding exfoliative toxins, leucotoxins and superantigens among high and low virulence rabbit *Staphylococcus aureus* strains. Vet. Microbiol. 117: 211-218.

Varga, I., Uhrinova, A., Toth, F., Mistinova, J. (2011). Assessment of the thymic morphometry using ultrasound in full-term newborns. Surg. Radiol. Anat. 33: 689-695.

Veldkamp, KE., Van Kessel, KP., Verhoef, J., van Strijp, J.A. (1997). *Staphylococcal* culture supernates stimulate human phagocytes. Inflammation. 21:541-551.

Verdrengh, M., Tarkowski, A. (1997). Role of neutrophils in experimental septicemia and septic arthritis induced by *Staphylococcus aureus*. Infect. Immun. 65: 2517-2521.

Viana, D. (2011). Estafilococia en conejos: relación entre genotipos, virulencia y lesiones. Tesis doctoral. Dirigida por Juan Manuel Corpa Arenas y José R. Penadés Casanova. Universidad Cardenal Herrera. Valencia.

Viana, D., Selva, L., Callanan, J.J., Guerrero, I., Ferrian, S., Corpa, J.M. (2011). Strains of *Staphylococcus aureus* and pathology associated with chronic suppurative mastitis in rabbits. Vet. J. 190: 403-407.

Viana, D., Selva, L., Segura, P., Penades, J.R., Corpa, J.M. (2007). Genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from rabbit lesions. Vet. Microbiol. 121: 288-298.

Villa, A., Gracia, E., Fernandez, A., Albizu, I., Baselga, R. (2001). Detection of mycoplasmas in the lungs of rabbits with respiratory disease. Vet. Rec. 148: 788-789.

Vojtov, N., Ross, H.F., Novick, R.P. (2002). Global repression of exotoxin synthesis by staphylococcal superantigens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99: 10102-10107.

Von Köckritz-Blickwede, M., Rohde, M., Oehmcke, S., Miller, LS., Cheung, AL., Herwald, H., Foster, S., Medina, E. (2008). Immunological mechanisms underlying the genetic predisposition to severe *Staphylococcus aureus* infection in the mouse model. Am. J. Pathol. 173: 1657-1668.

- Walther, A., Riehemann, K., Gerke, V. (2000). A novel ligand of the formyl peptide receptor: annexin I regulates neutrophil extravasation by interacting with the FPR. *Mol. Cell.* 5: 831-840.
- Wang, S.C., Wu, C.M., Xia, S.C., Qi, Y.H., Xia, L.N., Shen, J.Z. (2009). Distribution of superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates from milk samples of bovine subclinical mastitis cases in two major dairy production regions of China. *Vet. Microbiol.* 137(3-4): 276-81
- Weih, F., Camaño, J. (2003). Regulation of secondary lymphoid organ development by the nuclear factor-kappaB signal transduction pathway. *Immunol. Rev.* 195: 91-105.
- Wei, H., Yuan, H., Zhu, Z., Liu, Z., Xin, J., Wu, X., Cao, Z. (2014). Staphylococcal enterotoxin burden determines the type of T helper cell response and pathology of the maxillary sinus mucosa in rabbits. *Int. Immunopharmacol.* 25;23 (2):633-641
- Welsch, U. (1999). *Histología*. 5ª ed. Marbán Libros, S.L. Madrid. España. Pp. 213.
- Wertheim, H.F., Melles, D.C., Vos, M.C., Van Leeuwen, W., van Belkum, A., Verbrugh, H.A., Nouwen, J.L. (2005). The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect. Dis.* 5: 751-762.
- Whiteside, T.L. (2012). What are regulatory T cells (Treg) regulating in cancer and why?. *Semin. Cancer Biol.* 22: 327-334.
- Wilber, J.L. (1999). *Pathology of the rabbit*. Department of Veterinary Pathology Armed Forces Institute of Pathology. Washinton, D.C.
- Wiles, S., Hanage, W.P., Frankel, G., Robertson, B. (2006). Modelling infectious disease – time to think outside the box? *Nat. Rev. Microbiol.* 4:307–312.
- Willem, M., Fieren, J.A. (2012). The local inflammatory responses to infection of the peritoneal cavity in humans: their regulation by cytokines, macrophages, and other leukocytes. *Mediators Inflamm.* 2012: 976241.
- Wu, Y., Zheng, Z., Jiang, Y., Chess, L., Jiang, H. (2009). The specificity of T cell regulation that enables self-nonself discrimination in the periphery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106: 534-539.
- Yeaman, M. R., Filler, S. G., Schmidt, C. S., Ibrahim, A. S., Edwards, J. E., Hennessey, J.P. (2014). Applying convergent immunity to innovative vaccines targeting *Staphylococcus aureus*. *Front. Immunol.* 5: 463.

Yin, L., Huseby, E., Scott-Browne, J., Rubtsova, K., Pinilla, C., Crawford, F., Marrack, P., Dai, S., Kappler, J.W. (2011). A single T cell receptor bound to major histocompatibility complex class I and class II glycoproteins reveals switchable TCR conformers. *Immunity*. 35: 23-33.

Zhu, X.Y., Wu, C.C., Hester, P.Y. (2001). Systemic distribution of *Staphylococcus aureus* following intradermal footpad challenge of broilers. *Poult. Sci.* 80: 145-150.

Ziegler, C., Goldmann, O., Hobeika, E., Geffers, R., Peters, G., Medina, E. (2011). The dynamics of T cells during persistent *Staphylococcus aureus* infection from antigen-reactivity to in vivo anergy. *EMBO Mol. Med.* 3: 652-666.

Zumpt I.F. (1976). Some diseases of domestic rabbits encountered in the western cape. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 57: 117-122.