

# RESPUESTA INMUNITARIA CELULAR DEL RATON INDUCIDA POR UN AISLAMIENTO BOVINO DE *Staphylococcus aureus* INOCULADO POR DIFERENTES RUTAS.

Fernando Díaz Otero <sup>a</sup>

Julio Raúl Santiago Cruz <sup>a</sup>

Rodolfo Rojas Cruz <sup>a</sup>

Juan Antonio Montaraz Crespo <sup>b</sup>

## RESUMEN

Se estudió la respuesta inmunitaria celular del ratón contra un aislamiento bovino de *S. aureus* después de inocular la bacteria por diferentes vías. Para esto grupos de cinco ratonas gestantes recibieron una dosis de  $1.5 \times 10^8$  bacterias muertas de seis a ocho días antes del parto. Siete días después del mismo fueron inoculados con una segunda dosis similar y treinta días más tarde se determinó la respuesta blastogénica de los linfocitos de bazo y de ganglios linfáticos mesentéricos por incorporación de timidina tritiada. Las rutas de inoculación fueron, primera y segunda dosis respectivamente: intramuscular-intramuscular (IM-IM), intramuscular-oral (IM-O), intramuscular-intraperitoneal (IM-IP), intramuscular-intracecal (IM-IC), y oralintracecal (O-IC). Los índices de estimulación fueron: ruta IM-IM, linfocitos de bazo 54.33 y linfocitos de ganglios linfáticos mesentéricos 130.23; IM-IO, 1.52 y 2.43; IM-IP, 2.98 y 3.96; IM-IC, 4.66 y 0.88; OIC, 4.89 y 1.24. Además, la inoculación del aislamiento de *S. aureus* de origen bovino no afectó la capacidad de los linfocitos de ratón para proliferar en respuesta a la concanavalina A. Se concluye que la inoculación de células inactivadas de *S. aureus* por vía IM-IM induce la mayor respuesta celular de ratón.

Téc. Pec. Méx. Vol. 28 No. 3 (1990)

## INTRODUCCION

Las infecciones bacterianas de la glándula mamaria del ganado lechero y la consecuente mastitis son una de las causas más importantes de pérdidas económicas en la industria lechera. Entre los diversos patógenos que

infectan la glándula, destaca *Staphylococcus aureus* por su alta prevalencia y difícil control <sup>9, 29</sup>.

Con la finalidad de disminuir al mínimo la prevalencia de las infecciones de la ubre de bovinos por esta bacteria se han puesto en marcha diferentes programas de control. En nuestro país los programas basados en el manejo racional del ganado, técnicas higiénicas de ordeño, desinfección y sellado de la teta después del ordeño y quimioterapia no han controlado los casos de mastitis causados por *S. aureus* <sup>29</sup>.

Por otra parte, la vacunación como

<sup>a</sup> Subproyecto Inmunología de la Glándula Mamaria, Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología, INIFAP-SARH, Km 15.5 Carr. México-Toluca, México 05110, D.F.

<sup>b</sup> Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. Cuautitlán, Izcalli, Edo. de México, México.

medida de protección del ganado contra el estafilococo dorado, ofrece grandes posibilidades de desarrollo e implementación. Se han realizado numerosos intentos de inmunizar al ganado lechero contra esta bacteria los cuales han tenido resultados cuestionables; en este respecto, se ha ensayado la administración de bacterias atenuadas<sup>13, 32, 34</sup>, bacterias inactivadas (bacterinas)<sup>5, 9, 10, 13, 17, 24, 28, 30, 33</sup>, mezclas de bacterias muertas y metabolitos extracelulares<sup>1, 3, 8, 20, 31</sup>, toxinas activas o destoxificadas<sup>8, 18</sup> y antígenos de superficie como proteína A, ácido teicoico y polisacáridos capsulares<sup>4, 16, 17 y 24, 28, 30</sup>.

Sin embargo, se puede decir que las vacunas contra esta bacteria se encuentran en realidad en una etapa promisorias, ya que se empieza a estudiar la importancia de los principales metabolitos de la bacteria en la inducción de protección en el huésped. Para esto ya se han elaborado algunos inmunógenos con propósitos particulares como neutralizar los mecanismos de patogenia o facilitar la eliminación del microorganismo (v.gr., síntesis de anticuerpos contra las diferentes toxinas o de anticuerpos opsonizantes dirigidos contra antígenos estructurales relevantes).

En la mayoría de las pruebas de inmunización contra *S. aureus*, se ha estudiado sobre todo la respuesta inmunitaria humoral<sup>1, 3, 5, 8, 9, 10, 11, 14, 16, 17, 18, 20, 31, 32, 33, 34</sup>. Sin embargo, la mayoría de los leucocitos en la respuesta inflamatoria de la glándula mamaria son neutrófilos, y éstos se puede decir que son reclutados con rapidez gracias a la presencia en la glándula de linfocitos sensibilizados que responden vigorosamente contra la bacteria y que secretan linfocinas quimiotácticas<sup>27</sup>. A pesar de esto, hay pocos trabajos<sup>4, 24, 31</sup> sobre evalua-

ción de la respuesta celular después de inmunizar contra *S. aureus*. Por tanto, se consideró relevante estudiar la respuesta inmunitaria celular contra *S. aureus* en un modelo animal.

El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar la respuesta celular del ratón contra *S. aureus*. Se usó este modelo biológico por su valor práctico y económico<sup>2, 4, 7</sup>. Además, se evaluaron diferentes vías de inoculación de la bacteria, dado que en los reportes del área existen discrepancias sobre el mejor sistema para inmunizar contra *S. aureus*. Finalmente, para evaluar la respuesta celular se escogió el ácido teicoico de *S. aureus* por su relevancia como antígeno estructural.

## MATERIALES Y METODOS

**Bacteria.** Se trabajó con una cepa de *S. aureus*, aislada de un caso de mastitis bovina. La bacteria se identificó por su morfología, afinidad a la tinción de Gram y mediante pruebas bioquímicas que incluyen: fermentación de manitol, catalasa, coagulasa, y reducción del nitrato<sup>6, 21</sup>.

**Preparación del inóculo bacteriano.** Se ajustó la concentración de la suspensión bacteriana a  $150 \times 10^6$  ufc/0.1 ml por nefelometría mediante el método de McFarland<sup>22</sup> y mediante el uso de un espectrofotómetro a una longitud de onda de 546 nm. El estafilococo se inactivó incubándolo, con formol al 2%, en baño María a 65 C durante 30 min. Se lavó tres veces mediante centrifugación a 500 g 30 min y el botón bacteriano se resuspendió en amortiguador salino de fosfatos estéril, pH 7.2 (ASF).

**Esquemas de inmunización.** Se aplicaron 6 esquemas de inmunización con cinco ratonas por experimento. El grupo testigo (A) recibió

dos inóculos de 0.1 ml de ASF. A los grupos restantes se les administró dos dosis de 0.1 ml de suspensión bacteriana. La primera dosis se inoculó de cinco a ocho días antes del parto y la segunda, siete días después del mismo. El grupo B se inoculó por vía intramuscular en las dos ocasiones (IM-IM). El grupo C se inoculó por vía intramuscular antes del parto y oral después del parto (IM-O). El grupo D se inoculó por vía intramuscular en la primera ocasión y por vía intraperitoneal en la segunda (IM-IP). El grupo E, por vía intramuscular la primera vez y por vía intracecal la segunda (IM-IC). El grupo F, por vía oral primero y después por vía intracecal (O-IC).

**Purificación del ácido teicoico.** El ácido teicoico se obtuvo de acuerdo a Weir<sup>35</sup> con ligeras modificaciones. Una suspensión de estafilococos inactivados se congeló a 70 C y se descongeló de inmediato a baño María a 56 C. Las bacterias se sonicaron a una amplitud de 30 micrones durante 10 min en un desintegrador ultrasónico Mk2 de 150 watts (MSE). Luego, en un agitador mecánico, con adición de microperlas de vidrio, se efectuaron tres ciclos de trituración de 15 min cada uno con intervalos de reposo de 10 min. La suspensión obtenida se filtró en papel Whatman 3 para separar las perlas y después se centrifugó a 3 000 g por 15 min para eliminar las bacterias enteras y fragmentos grandes. La suspensión se centrifugó a 10 000 g durante 30 min, con lo cual se sedimenta la pared celular. Para extraer el ácido teicoico del sedimento, se resuspendió éste en 20 ml de ácido tricloroacético (ATCA) 10% y se agitó la suspensión a 4 C durante 70 h. El botón de material insoluble, se sedimentó a 500 g 30 min y se lavó con 3 volúmenes de 2 ml de ATCA antes de eliminarlo.

Se mezclaron las fracciones de ATCA y se les eliminó el material liposoluble mediante agitación con un volumen igual de éter etílico. La fase acuosa se recuperó y se liofilizó. El liofilizado se redisolvió en 20 ml de ATCA 10%; para precipitar el ácido teicoico, a la solución se le añadieron 40 ml de alcohol etílico frío y se incubó a 4 C 18 h. Se separó el ácido teicoico precipitado mediante centrifugación a 500 g 30 min; el botón se lavó con etanol, después con éter y se disolvió en ASF estéril. La solución de ácido teicoico se filtró a través de membranas Millipore con poros de 0.22  $\mu$ m y se determinó el contenido de proteínas por el método de Lowry<sup>19</sup>. La identidad del ácido se verificó mediante una prueba de inmunodifusión en contra de un antígeno estándar comercial (Sigma Chemical Col, L2515) con suero hiperinmune de conejo contra *S. aureus* elaborado en el laboratorio.

**Obtención de linfocitos de ratón.** Treinta días después de la segunda inoculación se sacrificaron todas las ratonas y se les extrajeron el bazo y los ganglios linfáticos mesentéricos. Los linfocitos de cada órgano se obtuvieron mediante disgregación mecánica del tejido en medio RPMI-1640 frío; luego de la disgregación, las células se lavaron tres veces centrifugando a 500 g 10 min con el mismo medio. Después de la última centrifugación, se decantó el sobrenadante y se agregó a las células medio suplementado con suero fetal de ternera (inactivado 30 min a 56 C) al 5% y 2-mercaptoetanol  $5 \times 10^{-4}$  M. La suspensión de células se ajustó a una concentración de  $2 \times 10^6$  células/ml y tuvo un 94% de viabilidad por exclusión de azul de tripano<sup>12</sup>.

Estimulación mitogénica de linfocitos de ratón por concanavalina A.

Con el siguiente método se estableció la dosis óptima de estimulación con un mitógeno conocido, para tener un testigo positivo de estimulación. En placas de cultivo celular de 96 pozos se colocaron 100  $\mu$ l de la suspensión de linfocitos ( $2 \times 10^5$ ) por pozo. Por triplicado se adicionó a los linfocitos 100  $\mu$ l de medio con concanavalina A (con A) en las siguientes concentraciones; 0, 1, 3, 5, 10, 20, 30, 40 y 50  $\mu$ g/ml. Las células se incubaron 54 h a 37 C en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>, después de este tiempo se les adicionó 1  $\mu$ Ci de timidina tritiada con una actividad específica de 6.7 Ci/mMol (New England Nuclear) y se prolongó 18 h la incubación.

Las células se cosecharon y se lavaron con PBS pH 7.2 frío en filtros de fibra de vidrio mediante un microcosechador manual (Bellco Microharvester) conectado a una bomba de vacío. Cada cosecha se lavó con ATCA 5%, después con ATCA 10% y finalmente con metanol 70% para fijar las células. Los filtros lavados se colocaron en viales de plástico con 2 ml de líquido de centelleo. Se llevaron los viales a un contador beta (Beckman-LS 100-C) y se registraron las cuentas por minuto (CPM). El índice de estimulación (IE) se obtuvo con la siguiente fórmula: IE = CPM del cultivo estimulado/CPM del testigo.

Cinética de la estimulación antigénica de linfocitos inmunizados. Usando el mismo sistema que en el método anterior, a los linfocitos se les adicionó 100  $\mu$ l de medio con ácido teicoico a diferentes concentraciones: 0, 1, 3, 5, 10, 50, 100 y 150  $\mu$ g/ml. Las células se incubaron 102 h a 37 C en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>; se les adicionó 1  $\mu$ Ci de timidina tritiada con una actividad específica de 6.7 Ci/mMol (New England Nuclear) y se prolongó 18 h más la incubación.

Estimulación antigénica de linfocitos de ratones inmunizados por diferentes rutas. Mediante el mismo sistema que se usó para la con A, se estimularon los linfocitos de los animales inoculados por diferentes vías. Como antígeno se usaron 100  $\mu$ l de ácido teicoico a una concentración de 10  $\mu$ g/ml; esto es, 1  $\mu$ g en 100  $\mu$ l por pozo. Las células se incubaron como en el método anterior, se determinaron las CPM y el IE.

Pruebas estadísticas. A los resultados obtenidos se les realizó análisis de varianzas<sup>23</sup>.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Estimulación de linfocitos de ratón por con A. La máxima estimulación de linfocitos por el mitógeno se obtuvo a bajas concentraciones (figura 1). Los linfocitos de bazo mostraron un IE máximo a 1  $\mu$ g/ml de con A y los de ganglios, a 3  $\mu$ g/ml. Se utilizó en lo sucesivo una concentración de 3  $\mu$ g/ml (0.3  $\mu$ g en 100  $\mu$ l) por la respuesta notoria que induce en las dos poblaciones de linfocitos.

Cinética de la estimulación de los linfocitos de ratón por el ácido teicoico. Se realizó la cinética de respuesta de linfocitos de animales inmunizados por las 5 rutas diferentes, pero se presentan sólo los valores correspondientes a la ruta intramuscular-intramuscular (figuras 2 y 3) por ser representativos. Tanto para los linfocitos de bazo como para los de ganglios, la concentración de antígeno que induce una respuesta óptima fue de 10  $\mu$ g/ml (1  $\mu$ g por pozo). A concentraciones más elevadas de antígeno la respuesta disminuye en ambas poblaciones de células. Con los linfocitos de bazo parece presentarse un segundo pico de estimulación a 150  $\mu$ g/ml. Sin embargo, la desviación es-

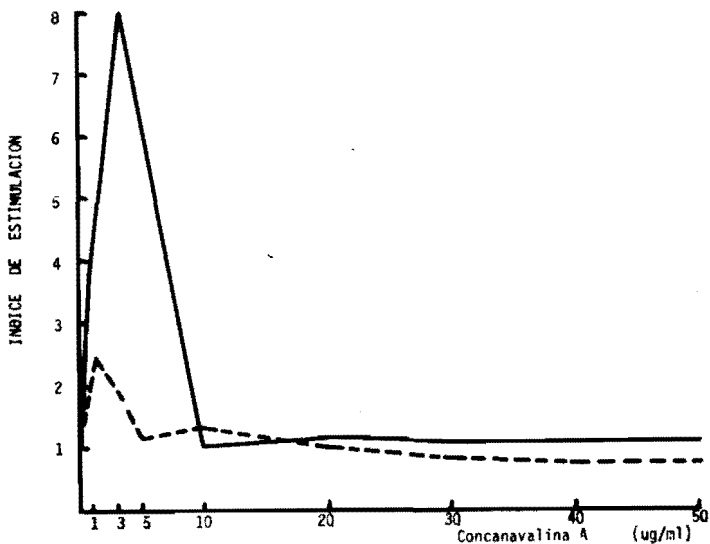


FIGURA 1. Estimulación por diferentes concentraciones de concanavalina A de linfocitos de bazo (---) y ganglios linfáticos mesentéricos (—) de ratones normales.

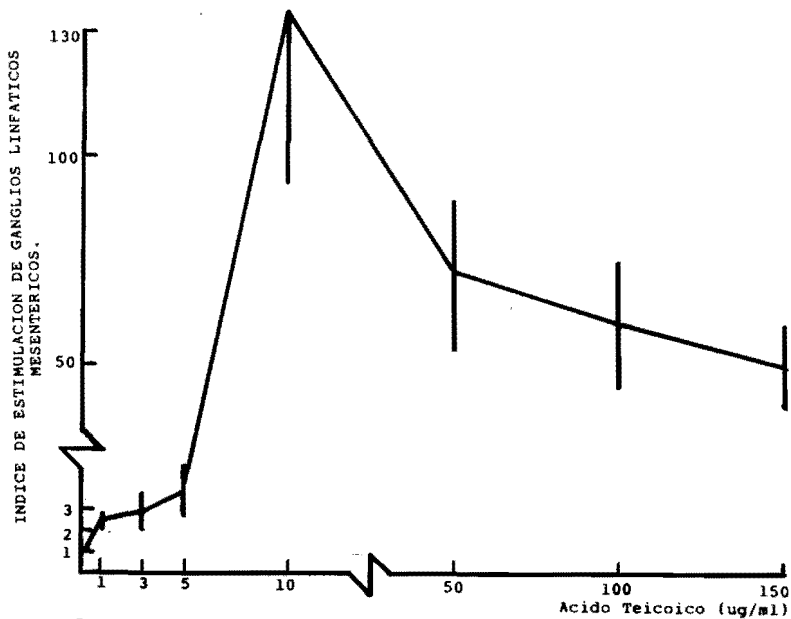


FIGURA 2. Estimulación de linfocitos de ganglios linfáticos mesentéricos de ratones inmunizados por vía intramamaria/intramamaria con diferentes concentraciones de ácido teicoico. Las barras indican +/- una desviación estándar.

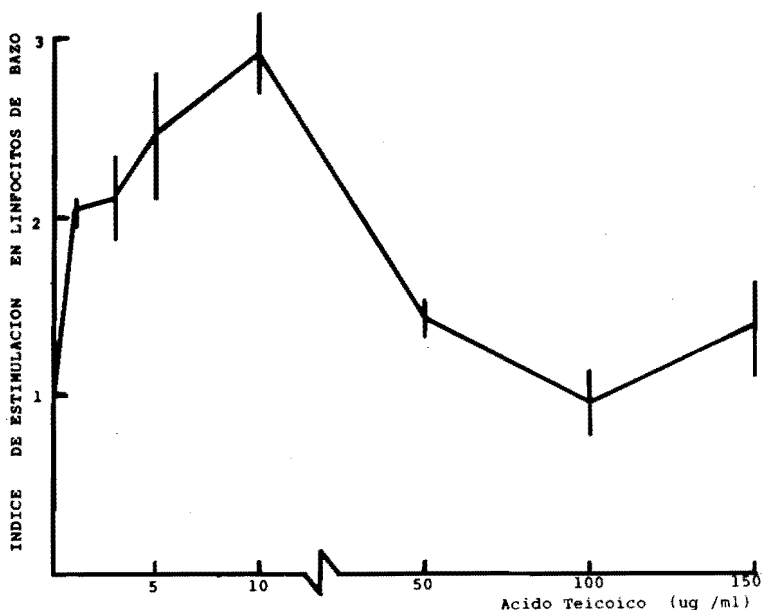


FIGURA 3. Estimulación de linfocitos de bazo en ratones inmunizados por vía intramamaria/intramamaria con diferentes concentraciones de ácido teicoico. Las barras indican +/- una desviación estándar.

tándar de este valor se traslapa con la desviación del valor correspondiente a 100 µg/ml, entre estos dos valores no hay una diferencia significativa por t de Student ( $P < 0.05$ ) y el valor no es tan alto como el de 10 µg/ml.

Estimulación por el ácido teicoico de linfocitos de bazo y de ganglios linfáticos mesentéricos de ratonas inmunizadas por diferentes rutas. En el caso de linfocitos de bazo (cuadro 1) las cuentas por minuto (CPM) obtenidas fueron: esquema IM-IM, 30, 428; IM-O, 710; IM-IP, 947; IM-IC, 1,355; y O-IC, 1,530. Los IE fueron los siguientes: el esquema IM-IM tuvo un valor de 54.33; el IM-O, 1.52; el IM-IP, 2.98; el IM-IC, 4.66; y el O-IC, 4.89. En resumen, los linfocitos de bazo fueron estimulados sólo por la ruta IM-IM. Las CPM obtenidas de Con A tuvieron un

rango de 5,328 a 7,127.

Para los linfocitos de ganglios las CPM fueron las siguientes: IM-IM, 127 760; IM-O, 1 273; IM-IP, 1 331; IM-IC, 406 y O-IC, 443. Los IE fueron: IM-IM, 130.23; IM-O, 2.43; IM-IP, 3.96; IM-IC, 0.88 y O-IC, 1.24 (cuadro 2). Las CPM con concanavalina tuvieron una variación de 3,490 a 4,331.

En relación con la respuesta celular contra *S. aureus* se ha observado que: antígenos de superficie de una cepa de referencia de *S. aureus* estimulan la hipersensibilidad tardía en el ratón<sup>4</sup>; vacunas de bacterias vivas o muertas estimulan la salida de linfocitos de ganglios linfáticos de ovinos<sup>13</sup>; la inmunización de vacas con una bacterina combinada con proteína A reduce, después de un reto intramamario, las cuentas de leucocitos en

CUADRO 1. INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA DE LINFOCITOS DE BAZO DE RATON ESTIMULADOS CON ÁCIDO TEICOICO DE *Staphylococcus aureus*.

Experimento	Testigo sin estimular	Estimulados	
		con antígeno	con mitógeno
Sin inmunizar	340 ± 203 *a	863 ± 497 a	6 546 ± 1 138 a
IM-IM	560 ± 272 a	30 428 ± 8 416 b	5 328 ± 1 482 a
IM-O	467 ± 222 a	710 ± 490 a	7 127 ± 827 a
IM-IP	318 ± 175 a	947 ± 259 a	6 508 ± 1 029 a
IM-IC	291 ± 121 a	1 355 ± 710 a	7 087 ± 1 012 a
O-IC	313 ± 151 a	1 530 ± 755 a	6 265 ± 791 a

Abreviaturas: IM, intramuscular; O, oral; IP, intraperitoneal; IC, intracecal; \*, cuentas por minuto ± una desviación estándar de tres repeticiones; a, b, literales diferentes denotan diferencias significativas ( $p < 0.01$ ). Se estimuló con 1 ug de ácido teicoico y con 0.3 ug de con A.

CUADRO 2. INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA DE LINFOCITOS DE GANGLIOS LINFATICOS MESENERICOS DE RATÓN ESTIMULADOS CON ÁCIDO TEICOICO DE *Staphylococcus aureus*.

Experimento	Testigo sin estimular	Estimulados	
		con antígeno	con mitógeno
Sin inmunizar	518 ± 179*a	891 ± 384 a	4 140 ± 612 a
IM-IM	981 ± 256 a	127 760 ± 69 870 b	4 225 ± 560 a
IM-O	523 ± 131 a	1 273 ± 471 a	3 676 ± 412 a
IM-IP	336 ± 142 a	1 331 ± 730 a	3 597 ± 465 a
IM-IC	464 ± 245 a	406 ± 213 a	4 331 ± 608 a
O-IC	358 ± 248 a	443 ± 153 a	3 490 ± 400 a

Abreviaturas: IM, intramuscular; O, oral; IP, intraperitoneal; IC, intracecal; \*, cuentas por minuto ± una desviación estándar de tres repeticiones; a,b, literales diferentes denotan diferencias significativas ( $p < 0.01$ ). Se estimuló con 1 ug de ácido teicoico y con 0.3 ug de con A.

leche, además aumenta la cantidad de leucocitos en tejido de la teta y mejora la tasa de curas espontáneas<sup>24, 28</sup>; las células T y B de bovinos pueden ser sensibilizadas *in vitro* con diferentes antígenos de *S. aureus*<sup>27</sup>; y la inoculación en glándula mamaria bovina de bacterias muertas y pared celular estimula el reclutamiento de leucocitos<sup>30</sup>. En el presente trabajo se observó que la inoculación de bac-

terias muertas es capaz de estimular la respuesta celular del ratón medida por transformación blastoide. Esto concuerda con las principales observaciones hechas sobre la respuesta celular contra *S. aureus* y, dado que no existen trabajos de evaluación de la respuesta celular en vacas vacunadas, sugiere la posibilidad de estimular la respuesta celular del bovino mediante una bacterina.

Por otra parte, sólo la ruta IM-IM estimuló a los linfocitos de bazo (un órgano linfoide relacionado con la respuesta inmunitaria sistémica) y a los de ganglios linfáticos mesentéricos (responsables de inmunidad secretoria). Esto sugiere que los antígenos de *S. aureus* administrados por vía intramuscular pueden estimular tanto la respuesta celular sistémica como la secretoria del ratón. Sería interesante determinar cuál o cuáles son los mecanismos inmunitarios responsables de la mayor estimulación por dicha vía; ya que las vías intramuscular-oral, intramuscular-intracecal y oral-intracecal no produjeron respuesta significativa a nivel de ganglios linfáticos mesentéricos, a pesar de que se considera que hay una asociación entre el sistema inmunitario de los diferentes epitelios mucosos (v.gr., intestino, glándulas salivales y lagrimales, glándula mamaria)<sup>15</sup>.

Por otra parte, la inoculación de *S. aureus* no afectó la capacidad de las células linfoides del ratón para proliferar en respuesta a la con A (cuadro 1 y 2). Este resultado no es compatible con las observaciones de Nonnecke y Harp,<sup>25, 26</sup> quienes reportan una reducción en la respuesta a dicho mitógeno, por parte de leucocitos de leche y sangre periférica de vacas expuestas a *S. aureus* vivos en glándula mamaria, y por parte de leucocitos de sangre expuestos *in vitro* a bacterias muertas. Posiblemente la discrepancia se deba a las diferentes condiciones de los experimentos; en el presente trabajo se inoculó por vía intramuscular bacteria muerta en ratón y se midió la respuesta de linfocitos de bazo y ganglios linfáticos mesentéricos. Además, el ácido teicoico de *S. aureus* no estimula la proliferación inespecífica de linfocitos no sen-

sibilizados (cuadro 1 y 2); esto significa que no tiene actividad mitogénica, de manera que resulta un antígeno adecuado para evaluar la respuesta inmunitaria celular contra *S. aureus*.

Finalmente, con la idea de elaborar en un futuro una vacuna eficiente contra las infecciones por *S. aureus* en glándula mamaria y considerando que los ganglios linfáticos mesentéricos son responsables de la inmunidad en órganos secretorios, sería interesante determinar si la respuesta celular que *S. aureus* estimula en ganglios linfáticos mesentéricos puede proteger contra la infección de la glándula en el ratón. Se están realizando estudios adicionales para someter a prueba esta hipótesis y también para definir la importancia de los metabolitos individuales en la estimulación de la respuesta celular del ratón.

#### SUMMARY

Cellular immune murine response to a bovine isolate of *S. aureus* after inoculation by different routes was studied. Groups of five female mice received a dose of  $1.5 \times 10^8$  of dried bacteria from six to eight days before delivery. Seven days after it they were inoculated with a second similar dose; and 30 days later blastogenic response of lymphocytes from spleen and lymphatic mesenteric nodes was measured by  $^3\text{H}$ thymidine uptake. Inoculation routes were, first and second inoculum respectively, as follows: intramuscular-intramuscular (IM-IM), intramuscular-oral (IM-O), intramuscular-intraperitoneal (IM-IP), intramuscular-intracecal (IM-IC), and oral-intracecal (O-IC).

Stimulation indexes were as follow: IM-IM route, splenic lymphocytes 54.33 and mesenteric lymphatic node lymphocytes 130.23; IM-IO, 1.52 and 2.43; IM-IP, 2.98 and 3.96; IM-IC, 4.66 and 0.88; O-IC, 4.89 and 1.24. Furthermore, inoculation of the bovine isolate of *S. aureus* have no effect on ability of murine lymphocyte to proliferate in response to concanavalin A. Inoculation of inactivated *S. aureus* by IM-IM route elicit the greatest murine cellular response was concluded.



## LITERATURA CITADA

1. ADLAM, C., KERRY, J.B., EDKINS, S., and WARD, P.D. 1981. Local and systemic antibody responses in cows following immunization with staphylococcal antigens in the dry period. *J. Comp. Path.* 91: 105-113.
2. ANDERSON, J.C., 1987. Dissemination of staphylococci in mice with experimental mastitis. *J. Dairy Res.* 54:339-345.
3. BLOBEL, H. and BERMAN, D.T., 1962. Vaccination of dairy cattle against staphylococcal mastitis. *Am. J. Vet. Res.* 23(92):7-14.
4. BOLEN, J.B. and TRIBBLE, J.L., 1979. Delayed hypersensitivity to *Staphylococcus aureus* in mice: *in vivo* response to isolated staphylococcal antigens. *Immunol.* 38:809-817.
5. BROCK, J.H. STELL, E.D. and REITER, B., 1975. The effect of intramuscular and intramammary vaccination of cows on antibody levels and resistance to intramammary infection by *Staphylococcus aureus*. *Res. Vet. Sci.* 19:152-158.
6. CARTER, G.R., 1982. Essentials of veterinary bacteriology and mycology. Michigan State University Press, East Lansing, EU, pp. 130.136.
7. CHANDLER, R.L. 1970. Experimental bacterial mastitis in the mouse. *J. Med. Microbiol.* 3:273-282.
8. DERBYSHIRE, J.B., and HELLIWELL, B.I., 1962. Immunity to experimental staphylococcal mastitis in goats produced by alpha lysin, coagulase and leucocidin. *Res. Vet. Sci.* 3:56-62.
9. DIAZ, O.F., 1983. Estudios preliminares sobre la respuesta inmunológica en conejos con bacterias causantes de mastitis. Tesis de licenciatura, ENEP Iztacala, UNAM, México, D.F.
10. EKSTEDT, R.K., 1966. Studies on immunity to staphylococcal infection in mice. IV. The role of specific and nonspecific immunity. *J. Infect. Dis.* 116:514-522.
11. GUIDRY, A.J.; PAAPE, M.J.; PEARSON, R.E; and WILLIAMS, W.F., 1980. Effect of local immunization of the mammary gland on phagocytosis and intracellular kill of *Staphylococcus aureus* by polymorphonuclear neutrophils. *Am. J. Vet. Res.* 41(9):1427-1431.
12. HUDSON, L. and HAY, F.C., 1980. Practical Immunology. II ed., Blackwell Scientific Publications, London, pp. 29-31
13. KERLIN, R.L. and WATSON, D.L., 1987. The secondary immune response to *Staphylococcus aureus* vaccines in efferent popliteal lymph of sheep. *Immunol.* 60:295-301.
14. KOWALSKI, J.J., TIPPER, D.J. and BERMAN, D.T., 1970. Preparation of cell wall antigens of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 2:54-59.
15. KRISTENSEN, K., KRISTENSEN, B. and LAZARY, S., 1982. The lymphocyte stimulation test in veterinary immunology. Elsevier Scientific Pub. Col. Amsterdam, pp. 203-227.
16. LEE, J.C., MICHON, F., PEREZ, N.E., HOPKINS, C.A. and PIER, G.B.; 1987. Chemical characterization and immunogenicity of capsular polysaccharide isolated from mucoid *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 55(9):2191-2197.
17. LEE, J.C., PEREZ, N.E., HOPKINS, C.A. and PIER, G.B., 1988. Purified capsular polysaccharide-induced immunity to *Staphylococcus aureus* infection. *J. Infect. Dis.* 157(4):723-730.
18. LOEFFLER, D.A., NORCROSS, N.L. and OPDEBEECK, J.P., 1988. Determination by enzyme-linked immunosorbent assay of the optimal dose of staphylococcal leukocidin for systemic immunization of dairy cows. *Am. J. Vet. Res.* 49(9):1452:1455.
19. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; and RALL, R.J., 1951. Protein measurement with the folinphenol reagent. *J. Biol. Chemys.* 193:265-275.
20. MC DOWELL, G.H. and WATSON, D.L., 1974. Immunity to experimental staphylococcal mastitis: Comparison of local and systemic immunization. *Aust. Vet. J.* 50:533-536.
21. MACFADDIN, J.F., 1980. Puebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. *Editorial Médica Panamericana, S.A. Argentina* pp. 27-38, 34-44, 50-59, 142-147 y 208.

22. MCFARLAND, J., 1957. The nephelometer: An instrument for estimating the number of bacteria in suspension used for calculating the opsonic index and for vaccines. *J. Am. Med. Assoc.* 49:1179-1184.
23. NAIMAN, A., 1987. Introducción a la estadística. 3ra. ed. McGraw Hill, Barcelona. pp. 293-295.
24. NICKERSON, S.C.; PANKEY, J.W.; and WATTS, J.L., 1985. Enhancement of the cellular immune response of the bovine udder by local and systemic immunization against staphylococcal mastitis. *Agri-Practice* 6(3):34-38.
25. NONNECKE, B.J. and HARP, J.A., 1985. Effect of chronic staphylococcal mastitis on mitogenic responses of bovine lymphocytes. *J. Dairy Sci.* 68:3323-3328.
26. NONNECKE, B.J. and HARP, J.A., 1988. Effects of *Staphylococcus aureus* on bovine mononuclear leukocyte proliferation and viability: modulation by phagocytic leucocytes. *J. Dairy Sci.* 71:835-842.
27. OJO-AMAIZE, E.A. and GUIDRY, A.J., 1987. *In vitro* sensitization and stimulation of bovine lymphocytes with encapsulated or nonencapsulated Smith strain of *Staphylococcus aureus*. *Am. J. Vet. Res.* 48:1456-1460.
28. PANKEY, J.W.; BODDIE, N.T.; WATTS, J.L. and NICKERSON, S.C., 1985. Evaluation of protein A and a commercial bacterin as vaccines against *Staphylococcus aureus* mastitis by experimental challenge. *J. Dairy Sci.* 68:726-731.
29. PEREZ, D.M. and ROJANO, F.U., 1989. Mastitis causada por *Staphylococcus aureus*. Primer Congreso Internacional sobre ganado Lechero del Estado de México. Edo. de Méx. México. pp 63-67.
30. TARGOWSKI, S.P. y BERMAN, D.T., 1975. Leukocytic response of bovine mammary gland to injection of killed cells and cell walls of *S. aureus*. *Am. J. Vet. Res.* 36:1561-1565.
31. WATSON, D.L., 1988. Vaccination against experimental staphylococcal mastitis in ewes. *Res. Vet. Sci.* 45: 16-21.
32. WATSON, D.L., 1984. Evaluation of attenuated, live staphylococcal mastitis vaccine in lactating heifers. *J. Dairy Sci.* 67:2608-2613.
33. WATSON, D.L., 1989. Ovine opsonins for *Staphylococcus aureus* cell wall and pseudocapsule. *Res. Vet. Sci.* 46: 84-89.
34. WATSON, D.L. and COLDITZ, I.G., 1985. Immunity to *Staphylococcus aureus* mastitis in ruminants using an attenuated live vaccine. En: *The Staphylococci*, Ed. J. Jeljaszewicz; *Zbl. Bakt. Suppl.* 14; Gustav Fischer Verlag, Nueva York, 433-436.
35. WEIR, D.M., 1979. Application of immunological methods. Vol. I, 3ra. Ed., Black wall Scientific Publications, E.U. pp. 2.1-2.17.