

## NUEVAS APROXIMACIONES BIOTECNOLOGICAS PARA COMBATIR LA MASTITIS

### NEW BIOTECHNOLOGICAL APPROACHES TO TREAT MASTITIS

Fidel-Ovidio Castro, Pedro P. Rojas, Lleretny Rodríguez

Facultad de Medicina Veterinaria. Departamento de Ciencias Pecuarias, Universidad de Concepción, Campus Chillán, Av. Vicente Méndez 595, Chillán, Chile, Teléfono: (56)-42 208833, Fax: (56)-42-270112. E-mail: fidcas-tro@udec.cl

#### RESUMEN

La mastitis es la inflamación de la glándula mamaria, caracterizada por cambios físicos y químicos de la leche y por alteraciones patológicas del epitelio glandular. La mastitis es el resultado de la interacción de varios factores tales como: manejo e higiene de los animales durante la ordeña, susceptibilidad de las vacas, características ambientales, y la presencia de microorganismos. Se han descrito más de 140 microorganismos que causan mastitis, siendo el *Staphylococcus aureus* uno de los principales. En la mayoría de los casos resulta difícil su erradicación y los microorganismos con facilidad desarrollan resistencia a las terapias con antibióticos. La tecnología del ADN recombinante y la biotecnología han puesto a disposición de los científicos nuevas herramientas para el tratamiento de esta enfermedad, abordando la misma desde el punto de vista de la eliminación del agente microbiológico causal. De este modo, la clonación y expresión de genes con actividad bactericida contra *S. Aureus*, la transgénesis asociada a la clonación somática, la terapia génica y el uso de bacteriófagos, son las más relevantes armas modernas para el control de la mastitis en el ganado bovino. Su estado actual de desarrollo y posibilidades reales de uso son el objetivo de esta revisión.

**Palabras claves:** Lisostafina, terapia génica, Lys K, mamíferos transgénicos, leche.

#### ABSTRACT

Mastitis is a pathological inflammation of the lactating mammary gland, it is characterised by changes in physical and chemical composition of milk, as well as by pathological changes of the udder. Mastitis is the result of a combined action of several factors, including: handling and hygiene of the udder during the process of milking, individual susceptibility of cattle, environmental conditions and the presence of microorganisms. There are at least 140 microorganisms known to cause mastitis, among them the most important is *Staphylococcus aureus*. In most cases, it is almost impossible to completely eliminate the causative agent of mastitis, and the microorganisms, trend to develop resistance to antibiotics. Recombinant DNA technology had made it possible to develop new tools for the combat against mastitis, focusing on the elimination of the microbial causative of the disease. In this way, cloning and expression of staphylococcal genes, such as lysostaphin and lys K have been used in attempts to treat mastitis. Transgenesis through somatic nuclear transfer and local gene therapy are the most exciting ways to target the expression of those (and other) genes to the mammary gland so that the staphylococci can be destroyed. The use of bacteriophages active in the mammary gland against bacteria causing mastitis is another revolutionary approach. Author's experience in using cloning and gene therapy to target genes to the mammary gland as a potential way to treat mastitis as well as relevant literature on the subject is discussed in this review.

**Keywords:** Lysostaphin, gene therapy, Lys K, transgenic mammals, milk.

Fecha de recepción: 29-12-05

Fecha de aceptación: 01-06-06

## INTRODUCCION

### **Mastitis: inflamación patológica de la glándula mamaria**

Por mastitis se entiende la inflamación mamaria caracterizada por alteraciones patológicas del epitelio glandular mamario, las cuales se reflejan en cambios físicos y químicos de la leche. La magnitud de las lesiones y de la pérdida de productividad láctea, así como la claridad de los síntomas de inflamación, constituyen las bases para el diagnóstico clínico que puede dividir las mastitis en mastitis clínicas o subclínicas. La mastitis puede ser causada por agentes físicos o infecciosos (Blood *et al.*, 1992). Al menos 140 microorganismos que causan mastitis han sido reportados, la mayoría de los cuales son de difícil erradicación (Philpot, 1999). No sólo los microorganismos son responsables de la mastitis, ya que en realidad la enfermedad es el resultado de la interacción y cooperación de varios factores, entre los cuales destacan: la higiene y el manejo de los animales, especialmente durante la ordeña, las características del ambiente productivo, susceptibilidad individual de las vacas (Philpot, 1999).

La mastitis puede presentarse de forma subclínica o clínica, aguda o crónica y gangrenosa. Sus síntomas y signos varían desde una leve reacción local, hasta grave toxemia (Blood *et al.*, 1992). Las formas más frecuentes de presentación son: la mastitis subclínica y la mastitis clínica (Kruze, 1988; Philpot, 1999). La mastitis subclínica es difícil de detectar, dado que la enfermedad transcurre sin provocar una inflamación glandular visible, ni cambios organolépticos de la leche, pero sí afecta su calidad físico-química. Para la confirmación del diagnóstico de mastitis subclínica se requieren análisis de laboratorio y de calidad de la leche que detecten la presencia de microorganismos causantes o el recuento de células somáticas en el fluido lácteo. La mastitis subclínica es entre 10-40 veces más frecuente que la clínica, a la cual usualmente precede. En muchos casos, tiene una alta prevalencia, lo que repercute en cuantiosos daños económicos (Philpot, 1999). Por su parte la forma clínica de la enfermedad presenta manifestaciones externas obvias de naturaleza inflamatoria en la glándula, detectables por análisis clínico, secreciones lácteas alteradas y reacción sistémica (Kruze, 1988; Blood *et al.*, 1992; Philpot, 1999). En los procesos productivos vigentes en la actualidad, la leche proveniente de estos

animales es automáticamente eliminada y los animales sometidos a tratamiento con antibióticos, los cuales en la mayoría de las veces no redundan en la cura del animal, por lo que una salida bastante común es el sacrificio del animal enfermo. Para ambos casos de mastitis, el diagnóstico confirmatorio incluye el conteo de células somáticas en la leche.

### **Recuento de células somáticas (RCS)**

Uno de los indicadores más importantes para comprobar el estado sanitario de la glándula mamaria de un rebaño lechero es el recuento celular somático (Best, 1998). A medida que aumenta el RCS mayor es el grado de inflamación que presenta la glándula y esto va asociado a una menor calidad de la leche. Dentro del recuento de células somáticas en la leche prevalecen dos poblaciones celulares: leucocitos y células epiteliales mamarias. Los primeros protegen contra las infecciones mamarias y se agrupan en macrófagos, linfocitos y polimorfonucleares (PMN). Las células epiteliales mamarias están presentes en menor cuantía en la leche. De modo general se considera por debajo del límite permisivo de inflamación cuando el recuento de células es inferior a 250.000 células/mL. De manera normal, la mayor parte de los cuartos de las ubres poseen menos de 100.000 células/mL (Blood *et al.*, 1992).

### **Prevalencia de mastitis**

La estimación de la prevalencia de la mastitis es una tarea difícil y a menudo subestimada, ya que el productor lechero por lo general registra los casos de mastitis clínica. A nivel internacional los datos de prevalencia de mastitis subclínicas no son habitualmente informados o se desconocen con exactitud los porcentajes de animales afectados. Se conoce que los casos de mastitis clínica a veces son 15 a 40 veces menos frecuentes que la mastitis subclínica. Los rangos de variación que se describen para la prevalencia de mastitis subclínica van desde un 30 hasta un 70%. A esto hay que sumarle la larga duración y dificultad de detección de la enfermedad subclínica, por lo que se asume que existe una marcada inexactitud en los datos reportados (Philpot y Nickerson, 1992). Respecto a la prevalencia de mastitis en Chile, no se han efectuado de manera sistemática estudios que permitan determinar con exactitud la magnitud del problema a nivel nacional o regional.

### Importancia económica de la mastitis

Según estudios realizados en los Estados Unidos los costos para el productor lechero por causa de la mastitis ascienden a 200 dólares por vaca al año, lo cual se traduce en pérdidas anuales para la industria lechera por sobre los 2 billones de dólares (Rainard, 2005), siendo la mastitis una de las enfermedades de mayor impacto económico para la actividad lechera (Moraga, 1988; Philpot y Nickerson, 1992). Especialmente la mastitis subclínica, que transcurre desapercibida en la mayoría de los casos, es la causante de la mayor parte de las pérdidas.

Según la mayoría de los autores, por lo menos un 70% de las pérdidas económicas relacionadas con la mastitis se expresan en mermas en la producción de leche y eliminación de la leche procedente de animales enfermos (Hoblet *et al.*, 1991; Philpot y Nickerson, 1992). Otros elementos de costo, de no menos importancia, son la eliminación de leche contenedora de residuos de antibióticos empleados en el tratamiento de los animales, pérdida de valor genético por eliminación temprana de vacas y por ende encarecimiento del reemplazo, honorarios veterinarios, gastos en medicamentos, pagos de horas extras y reducción del valor comercial de las vacas eliminadas (Morin *et al.*, 1993; Philpot, 1999; Agüero, 1995; Kruze, 1999).

La severidad de la lesión glandular está directamente relacionada con la disminución productiva y con el recuento de células somáticas en la leche. De este modo, Forster *et al.*, tan temprano como en 1967, y Blood *et al.*, en 1992, trazaron una relación entre las pérdidas económicas y la severidad de la mastitis, que varió desde el 2,8% al 45% por cuarto, cada día, según el grado de reacción al CMT (Test de California para la Mastitis) y Philpot en 1999 concluyó que las pérdidas de leche pueden ser de hasta un 2,5% por vaca, por cada 100 mil células somáticas encontradas en la leche de los animales enfermos, por encima del umbral permitido de 200 mil células por mililitro.

En Chile se realizó un minucioso estudio destinado a evaluar las pérdidas de leche asociadas al RCS. Se halló una reducción de 3,4% en la producción de leche para vacas primíparas por cada unidad de aumento en base al logaritmo natural de RCS. En vacas múltiparas, la cifra fue de 3,7% (Pedraza *et al.*, 1994). La reducción en la producción de leche se hizo estadísticamente significativa a partir del rango celular de 200.000 - 500.000 cél/ml, alcanzando aproxi-

madamente a un 7%, tanto en primíparas como en múltiparas, incrementándose progresivamente hasta un valor cercano al 20% para el rango celular >5.000.000 cél/ml. Estos datos esencialmente coinciden con los de Barría y Jara (2000).

La leche también sufre importantes alteraciones en su composición en presencia de la enfermedad. Por ejemplo, en animales con mastitis de ambos tipos está descrita la disminución en el contenido de lactosa, caseína, grasa láctea, sólidos no grasos, sólidos totales, calcio, fósforo y potasio; y un incremento en la concentración de inmunoglobulinas, cloruro de sodio, carbonato de sodio, minerales trazas, ácidos grasos libres y enzimas como plasmina, lactasa y lipasa, además de un aumento del pH (Moraga, 1988; Philpot, 1999).

No sólo se afecta la leche, sino que los productos derivados de ella también suelen estar afectados, debido a los cambios físico-químicos de la leche, lo que se expresa en una menor estabilidad y valor nutricional de la leche, mayor facilidad para enranciarse, dificultad para la elaboración de productos fermentados, merma en los rendimientos, palatabilidad y por ende en los costos de elaboración de quesos (Philpot y Nickerson, 1992).

### Patógenos mamarios

La mastitis puede ser causada por distintos microorganismos patógenos, como bacterias, micoplasmas, hongos, algas y virus, siendo las bacterias el grupo de mayor importancia (Philpot, 1999). Los patógenos causantes de mastitis suelen clasificarse en patógenos contagiosos, ambientales u otros patógenos oportunistas. Más del 95% de los cuadros de mastitis clínica y subclínica son causados sólo por un pequeño grupo de bacterias contagiosas, entre ellas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* y *Streptococcus uberis* (Philpot y Nickerson, 1992). El porcentaje restante corresponde a infecciones por coliformes, especialmente *E. coli*, *Klebsiella*, *Aerobacter* y otros patógenos ocasionales.

El reservorio principal de los patógenos contagiosos causantes de mastitis es la glándula mamaria. Esto hace que la diseminación de la enfermedad ocurra esencialmente durante el ordeño, ya sea mecánico (a través de las máquinas de ordeño) o manual (por la mano del operario), los accesorios de limpieza y preparación de las ubres, tales como esponjas, toallas o tra-

pos, sirven también como elementos para la propagación de los microorganismos. Adicionalmente, los patógenos ambientales del entorno pueden contaminar el pezón a través de estiércol, barro y aguas estancadas. Otros accesorios, como pomos intramamarios, agujas, cánulas y jeringas contaminadas, contribuyen a la diseminación de los patógenos ambientales, al igual que alimentos y comederos y materiales orgánicos de las camas (Smith y Hogan, 1995; Philpot, 1999).

### ***Staphylococcus aureus* principal agente de mastitis infecciosa**

El *Staphylococcus aureus* es una bacteria inmóvil Gram positiva, esférica y usualmente agrupada en racimos, anaerobia-aerobia facultativa, catalasa positiva. Produce generalmente la enzima coagulasa, fermenta el manitol u otros azúcares, formando ácido pero no gas. Su crecimiento ocurre en un amplio rango de temperatura (6.5 a 50° C), siendo su temperatura óptima 30-40° C. Tolerancia altas concentraciones de cloruro de sodio. Se destruye fácilmente por altas temperaturas y por casi todos los agentes desinfectantes, por lo cual la presencia de esta bacteria en alimentos procesados o en equipos indica generalmente higiene deficiente o contaminación post proceso por causa humana. El crecimiento de *S. aureus* en los alimentos presenta un riesgo en salud pública debido a que algunas cepas producen enterotoxinas termoestables (A, B, C1, C2, C3, D y E), las cuales causan intoxicación alimentaria de alta incidencia (Núñez, 2002).

La pared celular del *S. aureus* está compuesta por polisacáridos de membrana (fundamentalmente péptido glicano asociado a ácido teitico) y proteínas estructurales. El *S. aureus* secreta una gran cantidad de enzimas, como lipasa, esterase, desoxirribonucleasa, estafiloquinasa, hialuronidasa y la fosfolipasa. Presenta pigmentos carotenoides en la membrana celular, lo cual le da un color dorado (del latín *aureus*) a sus colonias (Scanlan, 1991). La proteína A se encuentra siempre asociada al péptido glicano, esta proteína le confiere a las bacterias una capacidad especial para unirse al fragmento Fc de las inmunoglobulinas del tipo G, lo que tiene profundas implicaciones en el reconocimiento y sobre todo en la eliminación del *S. aureus*, por los organismos en los cuales prolifera, al impedir la opsonización y el reconocimiento como antígeno por parte del sistema inmune. Adicionalmente,

la proteína A no puede ser fagocitada, lo que complica aún más la eliminación por el sistema inmune (Carter *et al.*, 1995).

El principal reservorio del *Staphylococcus aureus* es la glándula mamaria infectada, pudiendo encontrarse también en lesiones de los pezones y otras partes del cuerpo, como en vagina; sin embargo, no es capaz de colonizar la piel sana. Otros reservorios de menor importancia los constituyen el hombre, las moscas, alojamientos, equipos y otros animales no bovinos. Las infecciones tienden a ser subclínicas y crónicas, con episodios periódicos de mastitis clínica, pudiendo causar también mastitis gangrenosa. Este patógeno se asocia a una disminución considerable en la producción de leche y un gran aumento de su contenido celular (Harmon, 1996).

Dentro de la glándula mamaria los neutrófilos polimorfonucleares son esenciales para la prevención de infecciones provocadas por *S. aureus*. En la leche de una glándula mamaria saludable, los PMN son insuficientes para impedir el crecimiento bacteriano (Herbelin *et al.*, 1997). Por otro lado la capacidad del *S. aureus* de sobrevivir intracelularmente dentro de PMN protege a este patógeno de antibióticos que penetran pobremente al PMN, por lo tanto la respuesta al tratamiento con antibióticos no es óptima (Owens *et al.*, 1999).

Se han desarrollado vacunas capaces de reducir la severidad de los casos clínicos y facilitar la cura espontánea (Harmon, 1996). También se han evaluado experimentalmente algunas vacunas que son capaces de reducir las tasas de nuevas infecciones (Nickerson, 1992). Pero hasta el momento aún se prosigue en fase de experimentación.

Debido al peculiar patrón de respuesta de *S. aureus* y su interacción con el sistema inmune de la glándula mamaria, aumenta la dificultad para una apropiada identificación de vacas que estén infectadas. En algunos casos, la concentración de la bacteria podría ser menor al límite de detección del método bacteriológico o la bacteria pudiera estar localizada en el interior de los leucocitos, lo que impediría su capacidad de ser aislada en cultivo *in vitro* (Zecconi *et al.*, 1997).

A pesar de que no existen estudios detallados, en Chile el *S. aureus* constituye el patógeno de mayor importancia entre los patógenos causantes de mastitis, al menos en la zona centrosur del país. (Azócar, 2001). En lecherías de la provincia de Ñuble se ha encontrado una prevalencia de 80% de mastitis producidas por *S.*

*aureus* y enterobacterias. Además estos patógenos han desarrollado una alta resistencia a los antibióticos. De 598 cepas bacterianas aisladas de leche cruda, cerca de un 70% correspondió a bacterias Gram positivas de las cuales un alto porcentaje eran cepas de *S. aureus*. De estas cepas, 11 presentaron resistencia a más de un antibiótico (Viera *et al.*, 2004).

### Nuevas estrategias para combatir la mastitis

En los últimos años ha disminuido la incidencia de mastitis en los rebaños lecheros debido a un mejor mantenimiento de los equipos de ordeña, a la desinfección de la ubre postordeña, al uso profiláctico y terapéutico de antibióticos y a la eliminación de los animales con infecciones persistentes. Con este tipo de medidas se ha podido disminuir y en algunos predios eliminar las mastitis causadas por *Staphylococcus agalactiae* y *Staphylococcus dysgalactiae*. Sin embargo las infecciones producidas por el *Staphylococcus aureus* (que dan cuenta de un 15 a un 30% de las infecciones) no han podido ser controladas.

Como se mencionó anteriormente, el tratamiento con antibióticos no es del todo efectivo, menos de un 15% de los animales infectados por *S. aureus* responde a la terapia con antibióticos. Esto se debe a la mala penetración de la droga a la glándula mamaria, lo cual ocasiona que un porcentaje importante de bacterias sobreviva en las células huéspedes y produzca infecciones recurrentes post tratamiento (Craven y Anderson, 1984; Yancey *et al.*, 1991).

La terapia con antibióticos se basa principalmente en el uso de antibióticos ( $\beta$ -lactámicos como la penicilina y las cefalosporinas. Aun cuando este tipo de antibióticos ha tenido un gran impacto en la salud de las vacas lecheras y por consiguiente en la producción de leche, existe bastante preocupación por su uso, debido a la posibilidad de producir reacciones anafilácticas en los consumidores. Por este motivo se ha establecido un período de resguardo, o seguridad de aquellas leches que provengan de animales tratados con antibióticos u otras sustancias capaces de producir algún daño en el consumidor. En caso de no respetarse este período se procede a la eliminación de la leche produciendo pérdidas económicas para el productor. También existe una enorme preocupación por el uso indiscriminado de antibióticos en la agricultura debido a que esto contribuiría al creciente aumento en la resistencia a algunos antibióticos que han presentado patógenos cau-

santes de enfermedades en el ser humano.

Existen dos vías por las cuales se puede aumentar la resistencia a las mastitis: mediante la creación de animales transgénicos que sintetizan en leche proteínas antibacterianas o bien mediante la terapia génica local de la glándula mamaria utilizando vectores adenovirales que contengan un gen que codifique para una proteína antibacteriana.

Mediante estas dos tecnologías las células epiteliales mamarias sintetizarían enzimas antibacterianas, lo cual permitiría disminuir el uso de antibióticos. Se considera que un tercio del total de antibióticos usados en los animales es para combatir la mastitis, lo que aumenta el riesgo de resistencia a los antibióticos por parte de las bacterias. Además, por tratarse de la producción de proteínas disminuiría los riesgos para el consumidor debido a que, a diferencia de los antibióticos una vez ingeridas por la leche son degradadas durante el proceso digestivo atenuándose las reacciones alérgicas.

### Expresión de proteínas antibacterianas en animales transgénicos para combatir la mastitis

En 1987 fue reportado por primera vez el uso de la transgénesis para expresar proteínas foráneas en la leche de ratonas (Gordon *et al.*, 1987). Al poco tiempo se propuso que la síntesis de Lisozima II o Lisostafina podían constituir un medio efectivo para mejorar la resistencia a la mastitis. Ambas proteínas poseen actividad contra estafilococos. La leche proveniente de ratones transgénicos que expresaban lisozima contenía aproximadamente 0.5 mg/mL de lisozima humana (Maga *et al.*, 1995). En estos animales se pudo comprobar que la lisozima degradó la pared celular de *Micrococcus lysodeiktu*s, por lo que la bioactividad de la proteína se mantuvo. No obstante la actividad de la lisozima humana en contra de *S. aureus* fue limitada. La incubación de 1 mg/mL de lisozima humana en placas de cultivo previamente sembradas con *S. aureus* no mostró ninguna actividad antibacteriana, ya que postincubación se desarrolló una capa completamente confluyente de *S. aureus*. Pero la aplicación de una concentración de 1 $\mu$ g/mL de lisostafina resultó en una clara inhibición del crecimiento bacteriano.

Mediante la metodología de transgénesis también se han creado ratones y vacas que secretan en su leche lactoferrina humana (Platenburg *et al.*, 1994; van Berkel *et al.*, 2002). Lactoferrina corresponde a una glicoproteína que une

hierro y que se encuentra presente en varias secreciones exocrinas como las lágrimas, saliva y la leche. Existen estudios publicados que demuestran su actividad antibacteriana tanto in vitro como in vivo (Nuijens *et al.*, 1996; Nibbering *et al.*, 2001). Pero nuevamente el objetivo de la producción de estos animales transgénicos fue generar vacas como potenciales biorreactores para producir grandes cantidades de lactoferrina humana recombinante para su aplicación en la salud humana y no como posible mecanismo de defensa contra la mastitis de los animales. Del mismo modo también se han creado ratones transgénicos que en su leche producen una defensina de mamíferos denominada péptido antimicrobiano traqueal bovino (bTAP), pero no existen actualmente estudios sobre su uso como posible candidato para aumentar la resistencia a mastitis por *S. aureus*.

La producción de ratones transgénicos que secretan en su leche lisostafina proporciona un claro ejemplo del uso de la transgénesis para mejorar la salud animal. La lisostafina es una potente enzima hidroxilasa secretada naturalmente por el *Staphylococcus simulans* que degrada el péptido glicano. El péptido glicano constituye el marco de la estructura de la pared celular y su degradación expone a la bacteria a daños mecánicos y también a lisis por osmosis. El gen de la lisostafina se encuentra en un plasmidio que codifica una preproenzima de 493 aminoácidos que luego es procesada extracelularmente a la forma madura de 246 aminoácidos (Recsei *et al.*, 1987). La actividad de la enzima es específica para hidrolizar los puentes de poliglicina de la pared celular de todas las cepas de *Staphylococcus aureus*. Esta especificidad la limita exclusivamente a actuar sobre los estafilococos, teniendo por lo tanto escaso efecto sobre otros microorganismos causantes de mastitis. Esta propiedad otorga seguridad sobre el procesamiento de leches para la industria láctea, pues es poco probable que se vean afectados los microorganismos usados en estos procesos. Kerr y Wellnitz (2003) indican que el uso de lisostafina en concentraciones de 100 µg/mL no tuvo efectos en la producción de yogur.

### **Lisostafina: una nueva herramienta en el control de la mastitis**

Bramley y Foster (1990) demostraron por primera vez usando un modelo murino el potencial terapéutico y profiláctico de la lisostafina. Al año siguiente Oldham y Daley (1991) de-

mostraron lo mismo en vacas. Estudios de transfección realizados por Kerr *et al.* (2001) usando el gen de la lisostafina y la línea celular tipo fibroblasto de riñón de mono, COS-7 mostraron que la célula eucarionte podía sintetizar lisostafina, pero la secretaba en una forma glicosilada inactiva. Ellos establecieron que existen dos potenciales sitios de N-glicosilación (Asn-Xxx-Ser/Thr) en la forma nativa de la enzima sintetizada por el *S. simulans*, que constituyen los sitios blancos de la maquinaria de glicosilación de la célula eucarionte. Mediante la técnica de PCR pudieron sustituir el codón que codifica para asparagina por glutamina modificando de esta manera el dominio de glicosilación. La variante resultante, lisostafina Gln<sup>125,232</sup> producida por las células COS-7, retuvo un 20% de la actividad de la forma nativa. Al realizar un estudio con ratones transgénicos a los cuales se les incorporó el gen de la lisostafina bajo el control de la región regulatoria 5' del gen de la β-lactoglobulina ovina, demostraron que la leche de estos animales tenía una concentración de lisostafina entre 0.1 a 1 mg/mL. La glándula mamaria de ratones controles y transgénicos en lactancia fue infundida con elevadas concentraciones de *S. aureus*. Al hacer el análisis macroscópico cerca de un 80% de las glándulas de animales controles estaban infectadas y presentaban signos claros de inflamación incluso con secreciones hemorrágicas. Por el contrario las glándulas mamarias de animales transgénicos no presentaron ningún problema macroscópico y al analizar la presencia de *S. aureus* se pudo comprobar que en aquellos ratones que expresaron altas cantidades de lisostafina en el tejido mamario, no fue posible detectar la presencia de *S. aureus*.

Estos resultados estimularon a la generación de vacas transgénicas que expresaran dichos genes. Wall *et al.* (2005) publicaron la creación de las primeras vacas transgénicas que secretan en su leche lisostafina, lo cual les confiere resistencia a la mastitis producida por el *Staphylococcus aureus*. Mediante la infusión intramamaria de *S. aureus* a 3 vacas transgénicas y a 10 vacas no transgénicas se demostró que todos los animales no transgénicos presentaban elevados RCS, elevadas temperaturas corporales y proteínas sanguíneas de fase aguda, todos parámetros indicativos de infección. Las vacas transgénicas no experimentaron ninguno de estos parámetros. De dicho trabajo se concluye que la protección contra mastitis por *S. aureus* puede ser alcanzada con niveles de 300 µg/mL de li-

sostafina en la leche. No obstante, la transgénesis si bien puede llegar a ser efectiva en el control de la mastitis causada por *S. aureus*, es una tecnología compleja y aún muy costosa, por lo que se han desarrollado vías alternativas que permitan sintetizar proteínas antimicrobianas en la glándula mamaria de bovinos.

### Terapia génica mediante un vector adenoviral que contenga el gen de la lisostafina

Los trabajos que están realizando a nivel mundial grupos importantes de investigadores tienen como objetivo darle la capacidad a las células de la glándula mamaria para que sinteticen compuestos antibacterianos. En esta línea de investigación se han publicado artículos en revistas de un gran índice de impacto (ejemplo Nature Biotechnology) que demuestran la viabilidad de la metodología y los resultados prometedores que se han obtenido utilizando el gen de la lisostafina para conferirle tal capacidad al tejido mamario.

Fan *et al.* (2002), mediante la transducción de células epiteliales mamarías de bovino *in vitro* y de caprinos *in vivo*, con un adenovirus de replicación deficiente, que contenía el gen modificado de la lisostafina usado por Kerr *et al.* (2001), demostraron la capacidad de estas células de secretar lisostafina en su forma bioactiva, capaz de inhibir el crecimiento bacteriano en placas de cultivo. Sin embargo los niveles de expresión alcanzados fueron extremadamente bajos (de 0.2 a 0.6 µg/mL y de 0.9 a 1.1 µg/mL 24 y 48 h postinfusión respectivamente) probablemente vinculados a la baja dosis viral total inoculada ( $1.5 \times 10^{10}$  pfu/mL en un ml). Nuestro grupo demostró que era posible expresar niveles 1.000 veces superiores, del orden de los mg/ml de hormona de crecimiento humana (hGH) y eritropoyetina humana (hEPO) tanto en ratonas como en cabras (Toledo *et al.*, 2002; Sánchez *et al.*, 2004, Toledo *et al.*, 2005). Nuestros resultados están avalados para tres genes más no publicados aún y el éxito de nuestro enfoque se basa desde nuestro punto de vista en el uso de un volumen de inóculo viral al menos 100-300 veces superior, lo que permite un mayor acceso del virus a los receptores celulares.

Tanto nuestros resultados como los de Fan *et al.* (2004) indican que no se encuentra viremia en los animales posterior a la inoculación viral, ni se detecta virus en saliva, heces, orina o leche pasadas las 48 horas posteriores a la inoculación, lo que avala el uso de estos animales como

sistema productivo.

Desde el punto de vista práctico, la única limitación del sistema propuesto es la corta duración de la respuesta productiva de las proteínas introducidas (7-12 días; Toledo *et al.*, 2002; Sánchez *et al.*, 2004, Fan *et al.*, 2004; Toledo *et al.*, 2005). Es probable que esta reacción se deba a una reacción inmunitaria que dificulte tanto la persistencia como los niveles de expresión de las proteínas que se deseen producir. No obstante, el uso de vectores adenovirales de última generación a los cuales se les ha eliminado casi todo el genoma viral y por lo tanto la capacidad para codificar proteínas virales, ayudarán a disminuir la reacción inmune (por ejemplo el helper-dependent adenoviral vector (HD-Ad) descrito por Morsy *et al.*, 1998). Junto con lo anterior el desarrollo de una mayor investigación en esta área permitirá mejorar este tipo de tecnología en el corto plazo.

Esta tecnología al compararla con la tradicional expresión de proteínas en la leche de animales transgénicos tiene las siguientes ventajas: 1) no precisa de la generación de animales genéticamente modificados, 2) reduce notablemente el intervalo entre el clonaje de los genes y la expresión de interés, 3) permite el escalado inmediato a especies de importancia económica como cabras y vacas, 4) no tiene efectos adversos sobre la salud del animal al ser confinada la expresión sólo a la glándula mamaria y 5) se obtienen niveles de expresión de los transgenes, similares o superiores a los que se obtienen en animales transgénicos.

### Bacteriófagos y su potencial uso en el tratamiento de la mastitis

Recientemente se ha desarrollado una nueva línea de investigaciones para el control de la mastitis basada en el uso de bacteriófagos o sus proteínas, capaces de provocar daños sustanciales al *S. aureus* responsable de la gran mayoría de las mastitis bacterianas (Lowy, 2003).

O'Flaherty *et al.* (2005a) han empleado el bacteriófago K de *Myoviridae* spp en leche contaminada con *S. aureus*, demostrando la capacidad del fago de destruir las células bacterianas, cuando la leche había sido previamente tratada con calor para inactivar las bacterias, no así en leche fresca. La causa de este resultado negativo radicó al parecer en la baja adsorción del fago a la bacteria en la leche fresca, lo que a su vez estuvo relacionado con la formación de clusters o racimos de bacterias en la leche fresca alrede-

dor de las mezclas lipídicas, lo que no ocurre en la leche tratada con calor.

Más recientemente, el mismo grupo (O'Flaherty *et al.*, 2005b) aisló, clonó y expresó un gen de un bacteriófago K a partir de *Lactobacillus lactis*. La proteína de 54 KDa expresada en *E. coli* demostró una amplia actividad lisogénica contra una amplia gama de bacterias, incluidas cepas de *S. aureus* recalcitrantes al tratamiento con antibióticos. Queda por evaluar la efectividad de esta proteína cuando se use *in vivo*, tomando en cuenta la experiencia negativa de los experimentos con fago K de *Myoviridae*. No obstante, esta proteína, llamada LysK puede ser de interés para ser expresada en los sistemas mencionados anteriormente.

Como se ha discutido en este trabajo, la mastitis es una enfermedad compleja, que requiere de un abordaje multifactorial, en el cual se combinen las terapias tradicionales con los últimos adelantos de la biología molecular y las biotecnologías, los que sin dudas serán de gran utilidad en el combate de la mastitis del ganado bovino.

## RECONOCIMIENTOS

Los autores quieren agradecer al profesor A. Best por el aporte de literatura y de su experiencia en el tema.

## REFERENCIAS

AGÜERO, H. 1995. Situación actual de la calidad láctea en Chile y en países desarrollados. En: Lanuza, F. ed. Seminario Calidad de Leche Bovina. Osorno, CL. 23-24. Colegio Médico Veterinario de Chile, Consejo Regional Osorno. 3-32.

AZOCAR, J. 2001. Prevalencia, incidencia y etiología de mastitis en un centro de acopio lechero comuna de María Pinto, Región Metropolitana. Tesis de pregrado para optar al título de médico veterinario. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Chile.

BARRIA, N., A. JARA. 2000. Relaciones entre el recuento de células somáticas, producción y componentes lácteos en vacas lecheras de la X Región (Chile) utilizando un modelo del día de control. *Av Prod Anim* 25:23-32.

BEST, A. 1998. Tecnología de la leche a pequeña escala. Universidad de Concepción, Escuela de Graduados. Chillán, Chile.

BLOOD, D. C., O. M. RADOSTIS, J. H. ARUN-

DEL, C. C. GAY. 1992. Medicina Veterinaria: libro de textos de las enfermedades del ganado vacuno, ovino, porcino, caprino y equino. 7ª ed. México DF, MX. Interamericana McGraw-Hill.

BRAMLEY, A. J., R. FOSTER. 1990. Effects of lysostaphin on *Staphylococcus aureus* infections of the mouse mammary gland. *Res Vet Sci*: 49:120-121.

CARTER, G. R., M. M. CHENGAPPA, A. W., ROBERTS, G. W. CLAUS, Y. RIKIHISA. 1995. *Essentials of Veterinary Microbiology* (5th ed.). William & Wilkins. Baltimore, USA.

CRAVEN, N., J. C. ANDERSON. 1984. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by bovine mammary gland macrophages and intracellular protection from antibiotic action *in vitro* and *in vivo*. *J Dairy Sci* 51: 513-523.

FAN, W., K. PLAUT, A. J. BRAMLEY, J. W. BARLOW, D. E. KERR. 2002. Adenoviral-mediated transfer of a lysostaphin gene into the goat mammary gland. *J Dairy Sci* 85: 1709-1716.

FAN, W., K. PLAUT, A. J. BRAMLEY, J. W. BARLOW, S. A. MISCHLER, D. E. KERR. 2004. Persistence of adenoviral-mediated lysostaphin expression in goat mammary glands. *J Dairy Sci* 87: 602-608.

FORSTER, T. L., U. S. ASHWORTH, L. D. LUE-DECKE. 1967. Relationship between California Mastitis Test reaction and production and composition of milk from opposite quarters. *J Dairy Sci* 50: 675-682.

GORDON, K., E. LEE, J. A. VITALE, A. E. SMITH, H. WESTPHAL, L. HENNINGHAUSEN. 1987. Production of human tissue plasminogen activator in transgenic mouse milk. *Bio-technol* 24: 425-428.

HARMON, R. J. 1996. Controlando la mastitis causada por patógenos contagiosos. In: Reunión Regional 1996 Consejo Nacional de Mastitis. Querétaro, MX. National Mastitis Council (NMC). p 11-19.

HERBELIN, C., B. POUTREL, F. B. GILBERT, P. RAINARD. 1997. Immune recruitment and bactericidal activity of neutrophils in milk of cows vaccinated with staphylococcal alpha-toxin. *J Dairy Sci* 80: 2025-2034.

HOBLET, K. H., G. D. SCHNITKEY, D. ARBAUGH, J. S. HOGAN, K. L. SMITH. 1991. Costs associated with selected preventive practices and with episodes of clinical mastitis in nine herds with low somatic cell counts. *J Am Vet Mec Assoc* 199: 190-196.

KERR, D.E., K. PLAUT, A. J. BRAMLEY, C. M. WILLIAMSON, A. J. LAX, K. MOORE, K. D. WELLS, R. J. WALL. 2001. Lysostaphin expres-

- sion in mammary glands confers protection against staphylococcal infection in transgenic mice. *Nat Biotechnol* 19: 66-70.
- KERR, D.E., O. WELLNITZ. 2003. Mammary expression of new genes to combat mastitis. *J Anim Sci* 81 Suppl 3:38-47.
- KRUZE, J. 1988. Diagnóstico bacteriológico de mastitis. En: IV Curso Mastitis del Bovino y su Impacto Económico. p. 169-184. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias.
- KRUZE, J. 1999. Calidad higiénica de leche cruda en Chile. En: Curso de Perfeccionamiento Mejoramiento de la Calidad Higiénica de Leche de Pequeños Productores. p 1-33. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias; UFOCO S.A.
- LOWY, F. D. 2003. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* 111: 1265-1273.
- MAGA, E. A., G. B. ANDERSON, J. D. MURRAY. 1995. The effect of mammary gland expression of human lysozyme on the properties of milk from transgenic mice. *J Dairy Sci* 78: 2645-2652.
- MORAGA. 1988. Pérdidas económicas atribuidas a mastitis. En: IV Curso Mastitis del Bovino y su Impacto Económico. p 146-153. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias.
- MORIN, D. E., G. C. PETERSEN, H. L. WHITMORE, L. L. HUNGERFOLD, R. A. HINTON. 1993. Economic analysis of a mastitis monitoring and control program in four dairy herds. *J Am Vet Med Assoc* 202: 540-548.
- MORSY, M. A., M. GU, S. MOTZEL, J. ZHAO, J. LIN, Q. SU, H. ALLEN, L. FRANKLIN, R. J. PARKS, F. L. GRAHAM, S. KOCHANNEK, A. J. BETT, C. T. CASKEY. 1998. An adenoviral vector deleted for all viral coding sequences results in enhanced safety and extended expression of a leptin transgene. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7866-7871.
- NIBBERING, P. H., E. RAVENSBERGEN, M. M. WELLING, L. A. VAN BERKEL, P. H. VAN BERKEL, E. K. PAUWELS, J. H. NUIJENS. 2001. Human lactoferrin and peptides derived from its N terminus are highly effective against infections with antibiotic-resistant bacteria. *Infect Immun* 69:1469-1476.
- NICKERSON, S. C. 1992. Host resistance mechanisms to mastitis In: Van Horn, H.H; Wilcox, C.J. eds. Large dairy herd management. Champagne, IL, US. American Dairy Science Association. p. 464-474.
- NUIJENS, J. H., P. H. VAN BERKEL, F. L. SCHANBACHER. 1996. Structure and biological actions of lactoferrin. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1:285-95.
- NUÑEZ, D. 2002. Recuento de células somáticas de leche cruda recepcionada en planta proveniente de estanques prediales positivos a cultivo de *staphylococcus aureus* en la provincia de Ñuble. Memoria de Título. Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Concepción campus Chillán.
- O'FLAHERTY, S. O., A. COFFEY, W. J. MEANEY, G. C. FITZGERALD, R. P. ROSS. 2005a. Inhibition of bacteriophage K proliferation on *Staphylococcus aureus* in raw bovine milk. *Lett Appl Microbiol* 41: 274-279.
- O'FLAHERTY, S. O., A. COFFEY, W. J. MEANEY, G. C. FITZGERALD, R. P. ROSS. 2005b. The recombinant phage lysin Lysk has a broad spectrum of lytic activity against clinically relevant Staphylococci, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 187: 7161-7164.
- OLDHAM, E. R., M.J. DALEY. 1991. Lysostaphin: use of a recombinant bactericidal enzyme as a mastitis therapeutic. *J Dairy Sci* 74: 4175-4182.
- OWENS, W. E., S. C. NICKERSON, C. H. RAY. 1999. Efficacy of parenterally or intramammarily administered tilmicosin or ceftiofur against *Staphylococcus aureus* mastitis during lactation. *J Dairy Sci* 82: 645-647.
- PEDRAZA, G., H. AGÜERO, M. GOMEZ, E. JAHN, F. LANUZA, S. HAZARD, A. VIDAL, P. FAJARDO, R. LEIVA. 1994. Relación entre la concentración de células somáticas y producción diaria de leche, determinada en cinco rebaños de Chile. *Agric Téc (Chile)*. 54:259-267.
- PHILPOT, W. N., S. C. NICKERSON. 1992. Mastitis: El contra ataque. Ed. Surge International Babson Brothers Co. USA, p 147-234.
- PHILPOT, W. N. 1999. Aumento de la rentabilidad mediante el mejoramiento de la calidad de leche y la reducción de la mastitis. En: Curso de Perfeccionamiento Mejoramiento de la Calidad Higiénica de Leche de Pequeños Productores. p 49-84. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias; UFOCO S.A.
- PLATENBURG, G. J., E. P. KOOTWIJK, P. M. KOOIMAN, S. L. WOLOSHUK, J. H. NUIJENS, P. J. KRIMPENFORT, F. R. PIEPER, H. A. DE BOER, R. STRIJKER. 1994. Expression of human lactoferrin in milk of transgenic mice. *Transgenic Res* 3: 99-108.
- RAINARD, P. 2005. Tackling mastitis in dairy cows. *Nat Biotechnol* 23:430-432.
- RECSEI, P. A., A. D. GRUSS, R. P. NOVICK. 1987. Cloning, sequence, and expression of the

- lysostaphin gene from *Staphylococcus simulans*. Proc Natl Acad Sci U S A. 84: 1127-1131.
- SANCHEZ, O., J. R. TOLEDO, M. P. RODRIGUEZ, F. O. CASTRO. 2004. Adenoviral vector mediates high expression levels of human growth hormone in the milk of mice and goats. J Biotechnol 114: 89-97.
- SCANLAN, C. M. 1991. Introducción a la bacteriología veterinaria. Acribia. Zaragoza, España.
- SMITH, K. L., J. S. HOGAN. 1995. Epidemiology of mastitis. In: Proceedings 3rd IDF International Mastitis Seminar. Tel Aviv, IL. May 28-June 1, 1995. Federation Internationale de Laiterie/International Dairy Federation (FIL/IDF. book II, session 6, p. 3-12.
- TOLEDO, J. R., O. SANCHEZ, M. P. RODRIGUEZ, F. O. CASTRO, 2002. Método para la producción de proteínas recombinantes en la glándula mamaria de mamíferos no transgénicos. Patente Cubana 2002-0235. Oficina Cubana de Propiedad Intelectual (OCPI)
- TOLEDO, J. R., O. SANCHEZ, R. MONTESINO, Y. FERNANDEZ, M. P. RODRIGUEZ, J. A. CREMATA. 2005. Differential in vitro and in vivo glycosylation of human erythropoietin expressed in adenovirally transduced mouse mammary epithelial cells. Biochim Biophys Acta. 1726: 48-56.
- VAN BERKEL, P. H. C, M. M. WELLING, M. GEERTS, H. A. VAN VEEN, B. RAVENSBERGEN, M. SALAHEDDINE. 2002. Large scale production of recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic cows. Nature Biotechnol 20:484-487.
- VIERA, A., F. CERDA, H. BELLO, M. DOMINGUEZ, G. GONZALEZ. 2004. Genes de resistencia en *Staphylococcus aureus* y Bacilos gram negativos aislados en predios lecheros de la provincia de Ñuble, VIII Región de Chile. XIII Congreso Chileno de Medicina Veterinaria. Valdivia. Póster
- WALL, R. J., C. E. REXROAD, A. POWELL, D. COWFER. 1996. Synthesis and secretion of the mouse whey acidic protein in transgenic sheep. Transgenic Res 5:67-72.
- WALL, R. J., A. M. POWELL, M. J. PAAPE, D. E. KERR, D. D. BANNERMAN, V. G. PURSEL, K. D. WELLS, N. TALBOT, H. W. HAWK. 2005. Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection. Nat Biotechnol 23: 445-451.
- YANCEY, R.J., M. S. SANCHEZ, C. W. FORD. 1991. Activity of antibiotics against *Staphylococcus aureus* within polymorphonuclear neutrophils. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 10: 107-113.
- ZECCONI, A., A. PASQUIN, A. ZEPPONI, G. RUFO. 1997. Recovery of *Staphylococcus aureus* from centrifuged quarter milk samples. J Dairy Sci 80: 3058-3063.