FROLA, IGNACIO DANIE
Aplicacion potencial

2013 72657

Universidad Nacional de Río Cuarto

Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales
Departamento de Microbiología e Inmunología
Orientación Genética Microbiana

Tesis Final de Doctorado en Ciencias Biológicas

"Aplicación potencial de probióticos para la prevención y control de la mastitis bovina"

TESISTA: Mic. Frola Ignacio Daniel _____

DIRECTORA: Dra. Cristina Bogni _____

CO-DIRECTORA: Dra. Claudia Raspanti _____

Aprobado por el jurado integrado por:

_____

Dra. Laura Ramírez Dra. Cecilia Greco Dra. Nora Mestorino

Río Cuarto, 13 de Septiembre de 2013

Dedicada a mi Familia...

"Pedid que esos edificios sagrados, llamados laboratorios, sean completados y multiplicados. Son los templos del porvenir, las riquezas y el bienestar"...

Louis Pasteur
Científico francés
(1822-1895)

Reconocimiento

A la Universidad Nacional de Río Cuarto por brindarme el espacio, el conocimiento y la formación académica y personal durante todos estos años.

Al Concejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por las becas concedidas y la oportunidad de realizar el Doctorado.

Agradecimiento

A mi familia, por alentarme permanentemente a crecer como persona y profesional.

A los integrantes del jurado, Dra. Laura Ramírez, Dra. Silvia González de Elías, Dra. Nora Mestorino y Dra. Cecilia Greco, por guiar el desarrollo de esta tesis y por sus valiosas contribuciones.

A mi directora, Dra. Cristina Bogni, por su confianza hacia mí para realizar el doctorado, por sus enseñanzas, su predisposición y calidez personal y por alentarme cada día a seguir creciendo como profesional y persona.

A mi codirectora, Dra. Claudia Raspanti, por estar siempre presente, por sus valiosas sugerencias, por guiarme permanentemente y por el compañerismo de todos los días.

A mi codirector de CONICET, Vet. José Ángel Giraudo, por estar siempre presente desde mis inicios en la investigación, por enseñarme permanentemente, por su predisposición ante cada duda, por todos los viajes realizados y su compañerismo, simplemente gracias.

Al grupo de investigación del laboratorio, Dr. Matías Pellegrino, Dra. Liliana Odierno, Dr. Alejandro Larriestra, Dra. Claudina Vissio, Dra. Mirta Lasagno, Dra. Elina Reinoso, Dra. Miriam Ferrari, Dra. Edith Ducros, Dra. Silvana Dieser y Vet. Melina Richardet, por ser una guía permanente en cada ensayo realizado, por sus enseñanzas y por todo lo que compartimos cotidianamente.

A la Dra. María Elena Fátima-Nader y a la Dra. Carolina Espeche del CERELA-CONICET, por estar presente de manera incondicional desde mis inicios en la investigación, por enseñarme permanentemente, por su calidez y profesionalidad, simplemente gracias.

A las personas que forman parte del departamento de Patología Animal de la Facultad de Agronomía y Veterinaria, en especial al Vet. Gabriel Magnano, Vet. Laura Zapata y Tec. Nelcy Schleef por su colaboración y aportes constantes en esta tesis.

A los miembros del área de Microscopía Electrónica de la Facultad de Agronomía y Veterinaria, Dra. Cecilia Merkis, Dra. Andrea Cristofolini y Dra. Gabriela Sanchiz, por sus consejos y su ayuda en todo momento.

Al personal no docente de la Universidad, en especial a María Scamperte que con su aporte diario ha formado parte de cada ensayo, por su amistad, compañerismo y generosidad.

A mis grandes amigos de esta hermosa etapa académica, Cristian, Rafa, Marco, Lucas, Natalia y Daiana, por tantos momentos compartidos y por alentarme y acompañarme siempre en estos años. Muchas gracias.

A mis amigos de toda la vida, en especial a Aníbal, Gonzalo y Martín por tantos momentos lindos que compartieron conmigo y por estar siempre en todas las etapas de mi vida.

Y muchísimas gracias a todas aquellas personas que de una u otra manera me acompañaron a lo largo de estos hermosos años.

Resumen

La mastitis bovina, se define como la inflamación de la glándula mamaria que tiene por objetivo la eliminación del agente patógeno y la restauración de la funcionalidad del órgano. Además de la utilización de antibióticos y químicos para prevenir la mastitis, el control biológico brindaría una gran alternativa natural para la prevención de esta enfermedad infecto-contagiosa. Por esta razón, el objetivo principal de este trabajo fue profundizar en el estudio de los mecanismos involucrados en el efecto protector de los probióticos en la glándula mamaria, para diseñar a futuro un producto que pueda ser utilizado en la prevención de la mastitis bovina. Se trabajó con 12 bacterias lácticas potencialmente probióticas, aisladas por integrantes de la UNRC y CERELA-CONICET, de leche de vacas de tambos de las provincias de Córdoba y Tucumán: *Ent. hirae* CRL 1837, *Ent. hirae* CRL 1835, *Ent. hirae* CRL 1834, *Ent. hirae* 7-3, *W. cibaria* CRL 1840, *W. cibaria* CRL 1833, *P. pentosaceus* CRL 1832, *P. pentosaceus* CRL 1831, *L. perolens* CRL 1724, *L. plantarum* CRL 1716, *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 y *Ent. mundtii* CRL 1656. Se realizaron diferentes estudios *in vitro* (inhibición, auto-inhibición, co-agregación y adherencia) e *in vivo* (ensayos de inoculación a campo) con la finalidad de escoger las mejores cepas para formar parte de la formulación probiótica. Se determinó que *Ent. hirae* CRL 1835, *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 y *L. perolens* CRL 1724 son capaces de inhibir parcialmente a los microorganismos considerados flora microbiana normal del canal del pezón bovino, inhibir y co-agregar patógenos considerados agentes causales de mastitis y adherirse a células epiteliales del canal y la cisterna del pezón bovino sin ocasionar modificaciones en la morfología o ultra-estructura celular. Además, se determinó la capacidad de las 3 cepas de ejercer un efecto inhibitorio conjunto y sinérgico (*in vitro)* sobre *Staph. aureus*, principal agente causal de mastitis, y proteger a la glándula mamaria bovina en vacas al secado, al ser aplicados de forma intramamaria en concentraciones de 10^6 ufc/ml, Esta protección fue evidenciada por un incremento significativo del recuento celular somático durante los dos días posteriores a su inoculación, caracterizado por una hiperemia en vasos sanguíneos, reclutamiento de polimorfonucleares hacia vasos sanguíneos, intersticio y hacia la región cercana al epitelio de la cisterna del pezón bovino, estimulando así las defensas naturales de la glándula mamaria bovina. La sobrevida de las bacterias lácticas dentro de la glándula mamaria bovina fue de quince días. Los resultados obtenidos permitieron pensar que en un futuro próximo una formulación probiótica podría convertirse en una valiosa herramienta para prevenir la mastitis y ayudar a reducir el uso indiscriminado de los antibióticos, utilizados como preventivos durante el período seco para combatir la mastitis bovina.

Summary

Bovine mastitis is defined as inflammatory of mammary gland. The goal of any research on this field is to eliminate the causative pathogen agent to restore the functionality of the organ. In addition to the use of antibiotics and chemicals to prevent mastitis, biological control would provide a great natural alternative for the prevention of this contagious disease. The principal objective of this work was to study the mechanisms involved in the protective effect of probiotics in the mammary gland, to design in a near future, a product that can be used to prevent bovine mastitis. Twelve lactic acid bacteria, isolated from milk samples of dairy cows from the provinces of Córdoba and Tucumán: *Ent. hirae* CRL 1837, *Ent. hirae* CRL 1835, *Ent. hirae* CRL 1834, *Ent. hirae* 7-3, *W. cibaria* CRL 1840, *W. cibaria* CRL 1833, *P. pentosaceus* CRL 1832, *P. pentosaceus* CRL 1831, *L. perolens* CRL 1724, *L. plantarum* CRL 1716, *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 y *Ent. mundtii* CRL 1656 were characterized as potentially probiotic by members of the UNRC and CERELA-CONICET. Different studies were performed *in vitro* (inhibition, self-inhibition, co-aggregation and adhesion) and *in vivo* (field inoculation assay) for selections of the best strains to form part of the probiotic formulation. We determined that *Ent. hirae* CRL 1835, *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 y *L. perolens* CRL 1724 are not able to completely inhibit microorganisms considered normal microbial flora of the bovine teat canal, to inhibit and co-aggregate with pathogenic agents causing mastitis. Adherence to epithelial cells of the teat canal and the teat cistern didn´t cause changes in the morphology or cellular ultra-structure of the bovine mammary gland. The three lactic acid bacteria, showed a synergic and inhibitory effect in vitro on *Staph. aureus*, the main causative agent of mastitis and were able to protected the bovine mammary gland of cows at drying period, when 10^6 cfu/ml were applied intramammarilly. The inoculation of *Ent. hirae* CRL 1835, *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 y *L. perolens* CRL 1724, generate a significant increase of somatic cell count during the two days after inoculation, characterized by hyperaemia blood vessels, recruitment of polymorfonucleares to blood vessels, interstitial and into the region near the epithelium of the bovine teat cistern, thus stimulating bovine mammary gland´s natural defences. In additions, the three lactic acid bacteria presented a minimum of fifteen days of survival within bovine mammary gland. The results obtained encourage us to think that in the near future a probiotic formulation could become a valuable tool to prevent mastitis and will help to reduce the indiscriminate use of antibiotics utilized as preventive during the dry period to combat the bovine mastitis.

Índice de Contenidos

ABREVIATURAS EMPLEADAS 1

INTRODUCCIÓN 2

1. La lechería en Argentina: generalidades 2
2. La ubre bovina: anatomía, función y características 3
3. La mastitis bovina 7
   3.1. Patogenia de la enfermedad 8
   3.2. Tipos de mastitis 10
   3.3. Etiología de la enfermedad 12
   3.4. Impacto económico de la enfermedad 13
   3.5. Medidas de prevención 14
   3.6. Medidas de control 17
4. El período seco 17
   4.1. Terapia al secado 19
5. Probióticos: definición, características y beneficios 23
   5.1. Criterios de selección 24
   5.2. Principales géneros 25
   5.3. Una alternativa al uso de antibióticos 26

HIPÓTESIS 29

OBJETIVOS 30

MATERIALES Y MÉTODOS 32

Materiales
1. Cepas bacterianas 32
2. Animales de experimentación 33
3. Medios de cultivos 33
4. Medios y soluciones de conservación 35
5. Soluciones y reactivos 35
6. Drogas comerciales 38

Métodos
A. Aislamiento e identificación de bacterias lácticas a partir de leche bovina 40
1. Relevamientos de tambos de la región centro-sur de la provincia de Córdoba 40
   1.1. Toma de muestras y recuento celular somático 41
   1.2. Diagnóstico de mastitis 41
   1.3. Aislamiento e identificación fenotípica de bacterias lácticas 41
   1.4. Conservación y envío de bacterias lácticas 42
   1.5. Liofilización de cepas potencialmente probióticas enviadas desde el CERELA-Tucumán 42
B. Aislamiento e identificación de bacterias pertenecientes a la flora microbiana normal del canal del pezón bovino 43
1. Relevamiento de un tambo de la región central de la provincia de Córdoba 43
   1.1. Toma de muestra 43
   1.2. Aislamiento y caracterización bacteriológica 44
   1.3. Conservación de cepas 45

C. Estudios *in vitro* con bacterias lácticas aisladas de tambos de las provincias de Córdoba y Tucumán, y caracterizadas como potencialmente probióticas 46
1. Ensayos de inhibición 46
1.1. Bacterias lácticas vs bacterias consideradas flora microbiana normal 46
1.2. Bacterias lácticas vs bacterias causantes de mastitis bovina 47
2. Ensayo de co-agregación 47
3. Ensayo de adhesión 48
3.1. Condiciones de cultivo 48
3.2. Aislamiento de células epiteliales del canal y la cisterna del pezón 48
3.3. Preparación de la suspensión bacteriana y celular 49
3.4. Determinación del porcentaje e índice de adhesión 50
3.5. Microscopía electrónica de barrido 50
4. Ensayo de auto-inhibición 51
4.1. Bacterias lácticas vs bacterias lácticas 51
D. Formulación de un producto probiótico en base a la selección de bacterias lácticas y estudio de su comportamiento por ensayos *in vitro* e *in vivo* 52
1. Estudios *in vitro* con bacterias lácticas seleccionadas: comportamiento inhibitorio conjunto 52
1.1. Co-incubación 52
1.2. Técnica de estrías perpendiculares 53
2. Liofilización de las bacterias lácticas seleccionadas 54
3. Estudios *in vivo* con bacterias lácticas seleccionadas: comportamiento individual 54
3.1. Estudio de tolerancia 54
3.2. Estudio de eficacia 59
3.3. Estudio histológico 62
4. Estudio *in vivo* con bacterias lácticas seleccionadas: comportamiento conjunto 66
4.1. Estudio de tolerancia de la formulación probiótica 66
4.2. Estudio de eficacia de la formulación probiótica 69
E. Análisis estadístico 71

RESULTADOS Y DISCUSIÓN 72

A. Aislamiento e identificación de bacterias lácticas a partir de leche bovina 72
B. Aislamiento e identificación de bacterias pertenecientes a la flora microbiana normal del canal del pezón bovino 76
C. Estudios *in vitro* a bacterias lácticas caracterizadas como potencialmente probióticas 83
1. Ensayos de inhibición 83
1.1. Bacterias lácticas vs bacterias consideradas flora microbiana normal 83
1.2. Bacterias lácticas vs bacterias causantes de mastitis bovina 86
2. Ensayo de co-agregación 88
3. Ensayo de adhesión 91
3.1. Evaluación de adhesión por microscopía electrónica de barrido 93
4. Ensayo de auto-inhibición: bacterias lácticas vs bacterias lácticas 94
5. Selección de bacterias lácticas potencialmente probióticas 95
5.1. Criterio de selección de bacterias lácticas 95
D. Formulación de un producto probiótico y estudio de su comportamiento por ensayos *in vitro* e *in vivo* 98
1. Estudios *in vitro* a bacterias lácticas seleccionadas: comportamiento inhibitorio conjunto 98
1.1. Co-incubación 99
1.2. Técnica de estrías perpendiculares 101
2. Estudios *in vivo* a bacterias lácticas seleccionadas: comportamiento individual 102
2.1. Estudio de tolerancia 103
2.2. Estudio de eficacia 112

2.3. Estudio histológico 115
3. Estudio *in vivo* a bacterias lácticas seleccionadas: comportamiento conjunto 124
3.1. Estudio de tolerancia de la formulación probiótica 124
3.2. Estudio de eficacia de la formulación probiótica 128

CONCLUSIÓN 135

BIBLIOGRAFÍA 138

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Índice de Figuras

Figura 1	Mapa completo de las principales cuencas lecheras de la Argentina	2
Figura 2	Ubre bovina	4
Figura 3	Anatomía de la glándula mamaria bovina	4
Figura 4	Representación esquemática del pezón bovino	5
Figura 5	Triángulo epidemiológico	8
Figura 6	Ubres de vacas con mastitis bovina	11
Figura 7	Distribución y frecuencia de nuevas infecciones intramamarias durante el período seco bovino	18
Figura 8	Ubicación geográfica de la cuenca lechera de Villa María	40
Figura 9	Esquema de tipificación para la identificación, en géneros y grupo, de bacterias pertenecientes a la flora microbiana normal	45
Figura 10	Representación gráfica del material necesario para el aislamiento de células epiteliales del canal y la cisterna del pezón bovino	49
Figura 11	Representación esquemática para interpretar la interacción entre las bacterias lácticas y el microorganismo patógeno causante de mastitis bovina	54
Figura 12	Fotografía representativa de la granja experimental SIQUÉM	55
Figura 13	Esquema del ensayo de inoculación intramamario a campo y toma de muestra de leche y secreción de vacas seleccionadas para la inoculación de *Ent. hirae* CRL 1835, *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 y *L. perolens* CRL 1724	57
Figura 14	Esquema del ensayo de inoculación intramamario a campo y toma de muestra de leche, de vacas seleccionadas para la inoculación con *L. perolens* CRL 1724	61
Figura 15	Esquema del ensayo de inoculación intramamario a campo y toma de muestra de leche y de tejido epitelial mamario, de dos vacas seleccionada para la inoculación con *L. perolens* CRL 1724	63
Figura 16	Fotografías de pezón bovino perteneciente a una vaca lactante en período de secado	63
Figura 17	Esquema del ensayo de inoculación intramamario a campo y toma de muestra de leche o secreción, de una vaca seleccionada para la inoculación con *Ent. hirae* CRL 1835, *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 y *L. perolens* CRL 1724	69
Figura 18	Esquema del ensayo de inoculación intramamario a campo y toma de muestra de leche a 27 vacas seleccionadas para la inoculación con *Ent. hirae* CRL 1835, *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 y *L. perolens* CRL 1724, o una suspensión intramamaria al secado	70
Figura 19	Matriz de puntos de dos propiedades probióticas (hidrofobicidad y auto-agregación) de cepas bacterias lácticas, aisladas de leche compuesta de cuartos mamarios bovinos	75
Figura 20	Porcentaje de cuartos mamarios con presencia de Enterobacterias no coliformes, *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp., aislados de 100 muestras individuales de raspado de pezón bovino	79
Figura 21	Número de vacas con presencia de Enterobacterias no coliformes, *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp., aislados de 100 muestras individuales de raspado de pezón bovino	80
Figura 22	Porcentaje de colonias consideradas flora microbiana normal, por géneros y grupo bacteriano, aisladas de 100 muestras individuales de raspado de pezón bovino. Comparación entre cuartos sanos y cuartos con distintos grados de afección	81
Figura 23	Número de cuartos CMT positivos y negativos y distribución del recuento de la flora microbiana normal (ufc/placa) por géneros y grupo bacteriano aislado	83
Figura 24	Microscopía óptica de tinción de Gram, mostrando la auto-agregación del *L. perolens* CRL 1724 y su co-agregación a *Strep. mitis* ATCC98011 y la ausencia de co-agregación entre *L. plantarum* CRL 1716 y *Strep. mitis* ATCC98011	91

Figura 25	Microscopía óptica de fresco de células epiteliales mamarias bovinas, aisladas de raspado de canal y cisterna de pezón bovino, teñidas con azul de Trypan	91
Figura 26	Microscopía óptica de tinción de Gram y H-E, mostrando la adhesión de *L. perolens* CRL 1724 y *Ent. hirae* CRL 1835 a células epiteliales mamarias bovinas	92
Figura 27	Adhesión de *L. perolens* CRL 1724 a células epiteliales mamarias bovinas por microscopía electrónica de barrido	94
Figura 28	Efecto sinérgico entre *Ent. hirae* CRL 1835, *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 y *L. perolens* CRL 1724, y una cepa de *Staph. aureus* ATCC25923	102
Figura 29	Perfil de resistencia de *L. perolens* CRL 1724 a distintos antibióticos de uso veterinario	107
Figura 30	Recuentos celulares somáticos en muestras de leche de tres vacas lactantes Holando Argentino inoculadas con *L. perolens* CRL 1724	113
Figura 31	Recuperación de *L. perolens* CRL 1724 (expresado en ufc/ml) en muestras de leche de tres vacas lactantes, durante quince días posteriores a su inoculación	114
Figura 32	Microscopía óptica representativa de cortes histológicos, teñidos con Hematoxilina-Eosina, de un cuarto control de pezón bovino	116
Figura 33	Microscopía óptica representativa de cortes histológicos, teñidos con Hematoxilina-Eosina, de tejido conectivo de canal de pezón bovino comparando cuartos inoculados con *L. perolens* CRL 1724 y no inoculado	117
Figura 34	Microscopía óptica representativa de cortes histológicos, teñidos con Hematoxilina-Eosina, de cisterna de pezón bovino comparando cuartos inoculados con *L. perolens* CRL 1724 y no inoculado	118
Figura 35	Microscopía óptica representativa de cortes histológicos de cisterna del pezón bovino, teñidos con H-E y Gram modificado, mostrando la adherencia de *L. perolens* CRL 1724 al tejido epitelial mamario	119
Figura 36	Microscopía óptica de alta resolución representativa de cortes histológicos, teñidos con azul de toluidina, de canal de pezón bovino comparando cuartos inoculados con *L. perolens* CRL 1724 y no inoculado	120
Figura 37	Microscopía electrónica de transmisión representativa de cortes histológicos de canal de pezón bovino comparando cuartos inoculados con *L. perolens* CRL 1724 y no inoculado	122
Figura 38	Microscopía óptica de alta resolución representativa de cortes histológicos, teñidos con azul de toluidina, de cisterna de pezón bovino comparando cuartos inoculados con *L. perolens* CRL 1724 y no inoculado	123
Figura 39	Esquema de cuarto mamario bovino, en período seco, sin aplicación intramamaria preventiva	133
Figura 40	Esquema de cuarto mamario bovino, en período seco, con aplicación intramamaria preventiva. Fórmula probiótica: 1 mililitro de 6.10^6 ufc/ml de *Ent. hirae* CRL 1835 más *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 y *L. perolens* CRL 1724.	134

Índice de Tablas

Tabla 1	Antibióticos de uso común en Argentina, Estado Unidos y en países Europeos para el tratamiento intramamario de vacas al secado	19
Tabla 2	Criterios de selección para microorganismos probióticos	24
Tabla 3	Interpretación de resultados de la prueba de California Mastitis Test	44
Tabla 4	Porcentajes de muestras de leche compuesta de cuartos mamarios bovinos, analizadas en relación al recuento celular somático/ml y la sintomatología	72
Tabla 5	Propiedades probióticas benéficas de bacterias lácticas aisladas de leche compuesta de cuartos mamarios bovinos	74
Tabla 6	Número de cuartos con aislamiento positivo de flora microbiana normal	77
Tabla 7	Bacterias lácticas aisladas de leche bovina en tambos del noroeste de Tucumán por integrantes del CERELA-CONICET	83
Tabla 8	Actividad antimicrobiana de 12 bacterias lácticas aisladas de leche bovina frente a 15 cepas consideradas flora microbiana normal de pezón bovino	85
Tabla 9	Actividad antimicrobiana de 12 bacterias lácticas aisladas de leche bovina frente a 18 bacterias causantes de mastitis bovina	87
Tabla 10	Actividad antimicrobiana de 12 bacterias lácticas aisladas de leche bovina frente a 18 bacterias causantes de mastitis bovina	90
Tabla 11	Porcentaje e índice de adhesión a células epiteliales del canal y la cisterna del pezón bovino de bacterias lácticas aisladas de leche bovina	92
Tabla 12	Actividad auto-inhibitoria de bacterias lácticas potencialmente probióticas aisladas de leche bovina	95
Tabla 13	Propiedades probióticas benéficas de 12 bacterias lácticas, aisladas de leche de cuartos mamarios bovinos	96
Tabla 14	Eficacia bactericida de *Ent. hirae* CRL 1835, *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 y *L. perolens* CRL 1724 frente a una cepa de *Staph. aureus* ATCC25923	99
Tabla 15	Determinación del recuento celular somático, bacterias patógenas de mastitis y recuperación de *L. perolens* CRL 1724 en muestras de leche de vaca al secado, antes y después de la inoculación con *L. perolens* CRL 1724	104
Tabla 16	Determinación del recuento celular somático, bacterias patógenas de mastitis y recuperación de *L. perolens* CRL 1724 en muestras de leche de vaca lactante, antes y después de la inoculación con *L. perolens* CRL 1724	105
Tabla 17	Determinación del recuento celular somático, bacterias patógenas de mastitis y recuperación de *Ent. hirae* CRL 1835 y *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 en muestras de leche de vaca al secado, antes y después de la inoculación	109
Tabla 18	Determinación del recuento celular somático, bacterias patógenas de mastitis y recuperación de *Ent. hirae* CRL 1835 y *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 en muestras de leche de vaca lactante, antes y después de la inoculación	109
Tabla 19	Determinación del recuento celular somático, análisis bacteriológico y recuperación de bacterias lácticas en el tiempo, de muestras de leche de una vaca en período de secado, antes y después de ser inoculada con la formulación probiótica	126
Tabla 20	Determinación del recuento celular somático y análisis bacteriológico en el tiempo. Análisis de muestras de leche de cuartos de 27 vacas en período de secado, antes y después de ser inoculadas con la formulación probiótica o antibióticos de rutina	130

Abreviaturas Empleadas

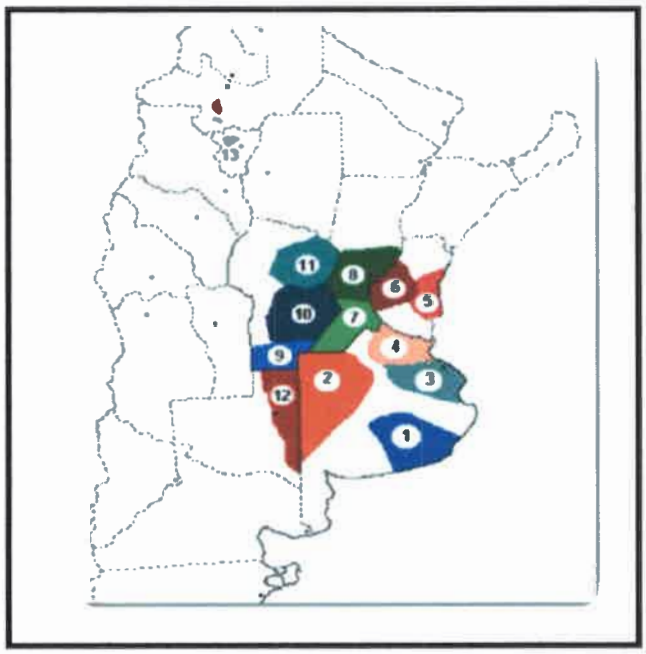
BHI:	Caldo infusión cerebro corazón
BL:	Bacterias lácticas
CB:	Cristal violeta-bicarbonato de sodio
CMT:	California Mastitis Test
EMP:	Embden-Meyerhof-Parnas
FAO:	Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura)
FM:	Factor del microscopio
H-E:	Hematoxilina-Eosina
LDR:	Leche descremada reconstituida
LEL:	Leche extracto de levadura
MC:	Mastitis clínica
MEM:	Medio mínimo esencial
MET:	Microscopía electrónica de transmisión
MN:	Mononucleares
MOAR:	Microscopía óptica de alta resolución
MRS:	Medio Manosa Rogosa y Sharpe
MsC:	Mastitis subclínica
NCCLS:	Nacional Committee for Clinical Laboratory Standards
P_1:	Pesado previo
P_2:	Peso constante
PA:	Acido pícrico-acetona
PBS:	Buffer fosfato
PMN:	Neutrófilos polimorfonucleares
PS:	Peso seco
RCS:	Recuento celular somático
RM/VP:	Rojo Metilo-Voges Proskauer
TSA-SAL:	Agar tripticasa soya- sal
TSB:	Caldo tripticasa soya
UFC:	Unidades formadoras de colonias
V_a:	Volumen final del medio
Y:	Yodo-yoduro de potasio

Introducción

1. La lechería en Argentina: generalidades

La leche de vaca, líquido de color blanco amarillento que se obtiene por ordeño ininterrumpido, tiene una gran importancia en la alimentación humana mundial dado que aporta innumerables nutrientes a la dieta diaria. Su principal componente es el agua, seguido por las grasas (ácidos grasos saturados en mayor proporción y colesterol), las proteínas (caseína, lactoalbúminas y lactoglobulinas), los hidratos de carbono (principalmente lactosa), las vitaminas (A, D y vitaminas del grupo B, especialmente B1, B2, B6 y B12) y los minerales (fósforo, calcio, zinc y magnesio). Estos componentes determinan su calidad nutritiva y pueden sufrir variaciones que dependen de la raza, alimentación, edad, período de lactación, época del año y sistema de ordeño de la vaca, entre otros factores de importancia (Eroski Consumer, 2009).

Argentina es un país mundialmente reconocido por su producción lechera y centra su desarrollo lácteo en la Región Pampeana argentina. En esta región se encuentran las cuencas lecheras más importantes del país, principalmente en las provincias de Córdoba, Santa Fe, Buenos Aires y Entre Ríos (Buelink y col., 1996) (Figura 1).



Fuente: Ordoqui y col., 2005.

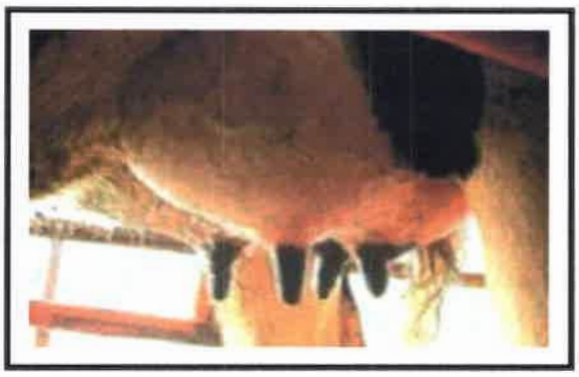
Figura 1: Mapa completo de las principales cuencas lecheras de la Argentina. Buenos Aires: *1 Mar y Sierras, 2 Oeste, 3 Abasto Sur, 4 Abasto Norte*. Santa Fe: *7 Sur, 8 Central*. Córdoba: *9 Sur, 10 Villa María, 11 Noreste*. Entre Ríos: *5 Cuenca "B", 6 Cuenca "A"*. La Pampa: *12 La Pampa*. Tucumán: *13 Cuenca de Trancas*.

Las provincias mencionadas, no solo muestran toda su potencialidad en la producción láctea nacional, como lo indican los 10.100 millones de litros de leche alcanzados durante el año 2009 a nivel nacional (Centro de la Industria Lechera, 2010), sino que además concentran más de un 90% de la producción primaria del país (INTA, 2007), siendo la provincia de Córdoba la principal productora lechera del país según el último reporte (2013) del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación.

Como lo indicó una publicación del Centro de la Industria Lechera en 2003, la República Argentina se posicionaba como el 2° productor de le che de América Latina (después de Brasil) y se ubicaba en el 11° lugar a nivel mundial. Datos del año 2012 indicaron que la producción lechera superó en un 0,5% a los índices lácteos de 2011, alcanzando un volumen de 11.700 millones de litros de leche, según informe de la Subsecretaría de Leche dependiente del Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca de la Nación. La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), en su último informe sobre la década que se viene para la agricultura, informó que la producción de leche argentina crecería 2,5% y que el país con mayor producción de leche en Latinoamérica seguirá siendo Brasil; se estima que para el 2019 la producción brasileña superará los 36.000 millones de litros/año mientras que nuestro país estará más cerca de los 13.000 millones de litros/año (Agro, 2012).

2. La ubre bovina: anatomía, función y características

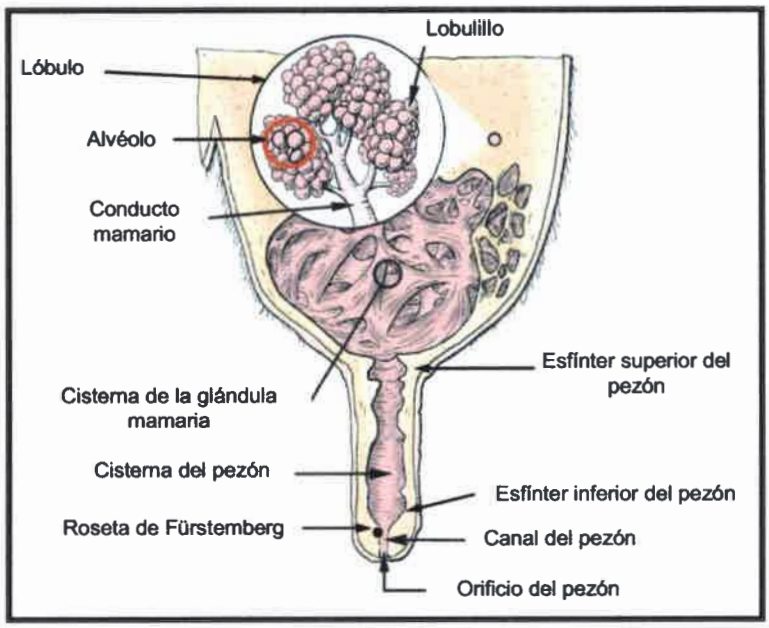
La ubre bovina (Figura 2) es considerada una glándula sudorípara exócrina, debido a que la leche es sintetizada en células especializadas agrupadas en alvéolos y luego es excretada fuera del cuerpo por medio de un sistema de conductos. Puede pesar, en promedio, cerca de 22,5 kg (sin leche) y consta de cuatro glándulas mamarias llamadas cuartos que operan de forma independiente y que se hallan divididas por membranas que separan las glándulas anteriores de las posteriores. Estas últimas son más grandes y poseen más tejido secretor, pudiendo llegar a producir el 60% de la leche secretada (Wattiaux, 1999; Avila Téllez y Gutiérrez Chávez, 2010a).



Fuente: Ávila Téllez y Gutiérrez Chávez, 2010a.

Figura 2: Ubre bovina.

La glándula mamaria presenta diversas estructuras: una estructura externa, formada por el aparato suspensorio (compuesto por ligamentos) que permite adosarla a la pared abdominal del cuerpo de la vaca; y una estructura interna que consta de un estroma (armazón de tejido conectivo), un parénquima (parte epitelial y parte secretor), conductos, vasos y nervios. El parénquima está dividido en pequeños lóbulos glandulares por medio de septos interlobulares ricos en vasos sanguíneos, linfáticos y nervios. Cada lóbulo está integrado por una serie de lobulillos (formado por 150-220 alvéolos dispuestos en racimos) divididos entre si por septos, tal como se aprecia en la Figura 3 (Avila Téllez y Gutiérrez Chávez, 2010a).



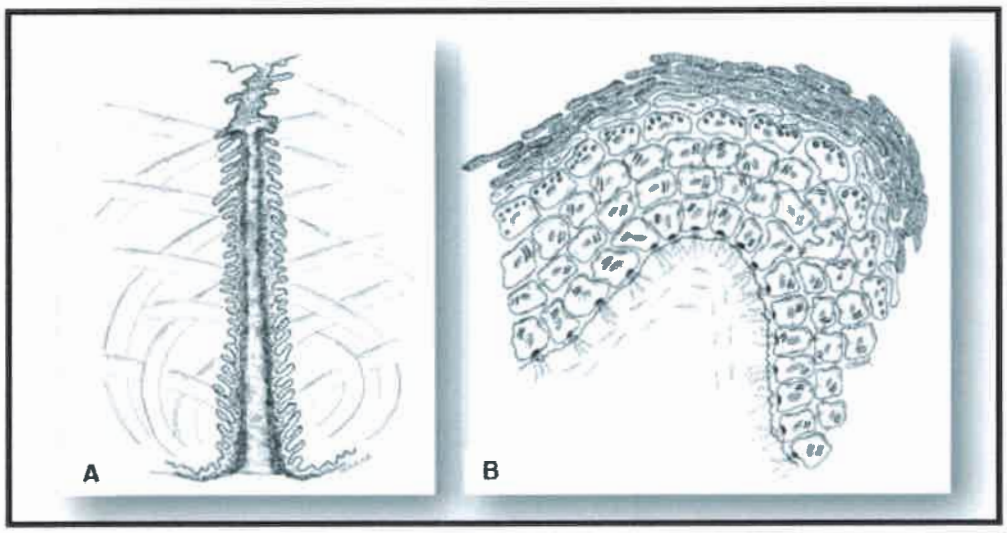
Fuente: modificado de Ramos, 2009.

Figura 3: Anatomía de la glándula mamaria bovina.

El alvéolo, saco pequeño de forma esférica, es la unidad funcional de producción de leche; tiene un lumen y está forrado de células epiteliales secretoras de leche. Sus funciones son remover los nutrientes de la sangre, transformar estos nutrientes en leche y descargar la leche dentro del lumen. La leche deja el lumen por medio de un tubo colector, que es un conducto o canal de drenaje que la conduce a la cisterna de la glándula (cavidad que descansa directamente encima del pezón) (Avila Téllez y Gutiérrez Chávez, 2010a).

Dentro del pezón y debajo de la cisterna de la glándula, se encuentra otra cavidad llamada cisterna del pezón, que se encuentra separada de la primera cavidad por una serie de delicados pliegues de células sensitivas, sensibles al daño (pliegue anular). Estos pliegues de tejido se encuentran también en el otro extremo del pezón directamente por debajo de la cisterna del mismo y por encima del conducto o canal del pezón (Roseta de Fürstenburg) (Wattiaux, 1999) ejerciendo una función mecánica tanto para el cierre como para la defensa del pezón (Paulrud, 2005).

De esta manera el pezón mamario y su pared interna, de forma cilíndrica, constituyen una cavidad interior donde se almacena la leche hasta que es extraída. Esta pared interna está constituida por tres capas de tejido diferentes: epitelio exterior, capa intermedia muscular vascularizada y epitelio interior (mucosa). La capa muscular es la más gruesa de las tres, contiene fibras musculares y una gran cantidad de vasos sanguíneos y linfáticos, mientras que el epitelio interior se encuentra rodeando a la cisterna y al canal del pezón (Muelas y col., 2004). Este último, se halla además rodeado de una red o sistema musculo-elástico integrado que facilita su apertura y cierre (Figura 4 A).



Fuente: Paulrud, 2005.

Figura 4: Representación esquemática del pezón bovino. A: Corte longitudinal donde se observa el epitelio del canal y la cisterna del pezón, rodeados de fibras elásticas y músculos lisos, como lo sugiere Van Der Merwe (1985). B: Corte transversal del canal del pezón bovino donde se observan las diferentes capas que lo componen.

La cisterna o seno del pezón, se caracteriza por presentar un *epitelio cúbico biestratificado* (Figura 4 B), mientras que el canal del pezón es una consecuencia de la invaginación de la piel del pezón y por ende está recubierto con el mismo tipo de epitelio que la piel normal, una capa de *epitelio escamoso estratificado* (Paulrud, 2005; Seanq, 2009) que a su vez está cubierto por queratina y por una capa de material seroso compuesta por desechos epiteliales y restos de leche (Seanq, 2009). Es en este canal (anillo de músculo liso o esfínter de diámetro variable de 10 mm. de longitud) donde se produce la apertura a través del cual se secreta la leche y donde habita una flora microbiana normal que varía constantemente, en una proporción de 10^3-10^{11} bacterias/ml. La misma, está conformada por micrococos (6-20%), corynebacterias (10-16%), bacterias coliformes (0,8-30%), otras bacterias Gram negativas (11-27%) y bacterias aeróbicas formadoras de esporas (0,5-3,6%) (Sandholm y Pyorala, 1995). Estos microorganismos, que colonizan el orificio del pezón, han sido ampliamente estudiados por diferentes investigadores como Woodward y col. (1987), Al-Qumber y Tagg (2006) y Gill y col. (2006), ya que formarían parte de la primera barrera de defensa contra la invasión de patógenos en la glándula mamaria, dada su capacidad de inhibición hacia los mismos y su influencia en las variaciones de susceptibilidad a la mastitis.

Durante el ordeño, se produce el desprendimiento de restos celulares de la superficie del canal del pezón. Estas células son continuamente reemplazadas por células internas que se diferencian constantemente hacia el exterior. Es decir, la epidermis se caracteriza por un patrón polarizado de crecimiento epitelial y diferenciación, con una sola capa de proliferación de queratinocitos y múltiples capas superpuestas diferenciadas. Morfológicamente, el tránsito de las células se produce desde la capa basal a la suprabasal de la epidermis, pasando por los estratos espinosos, granulosos, lúcidos y finalmente córneo de la epidermis, para terminar como "escamas" (desecho epitelial más normal de obtener) o la llamada queratina del canal del pezón (Paulrud, 2005).

Las células que componen el interior del canal del pezón son productoras de queratina. La queratina es la principal proteína estructural y constituye hasta el 85% de los queratinocitos completamente diferenciados (Paulrud, 2005). Por ende, el canal del pezón está cubierto por queratina, además de una capa de material seroso compuesta por desechos epiteliales y leche.

La queratina está compuesta por un material fibroso proteico y ácidos grasos, que en conjunto poseen un fuerte poder antibacteriano y generan una barrera efectiva contra la introducción de bacterias en la ubre (Sandholm y Korhonen, 1995) como *Streptococcus (Strep.) agalactiae* y *Staphylococcus (Staph.) aureus*, evitando la penetración de las mismas al interior de la glándula mamaria cuando el esfínter queda abierto (Seanq, 2009). De esta manera, el canal del pezón constituye una *barrera física* (contra bacterias invasoras), que opera en forma mecánica mediante la formación natural de un tapón de queratina que evita la entrada de

agentes patógenos al interior de la glándula mamaria durante el período de no lactancia (período seco), y una *barrera bioquímica* por la acción bactericida de la queratina y por la proliferación de células subepiteliales en la pared del pezón, la cual es más gruesa cerca del conducto estriado (Woolford y col., 1998; Twomey y col., 2000; Avila Téllez y Gutiérrez Chávez, 2010a). Si bien en la vaca lactante este tapón será lavado casi completamente durante el ordeño, pasadas 2-3 horas de ello, se restablece completamente y con él la función de defensa del canal del pezón (Seanq, 2009).

Es importante aclarar que, a diferencia del queratinizado del canal del pezón, la cisterna del pezón y el tejido epitelial mamario interno, no están queratinizados y ofrecen poca protección contra la colonización e invasión de patógenos. De esta manera la colonización externa del extremo final del canal del pezón, generada por bacterias patógenas, parece ser un requisito importante para el desarrollo de infecciones intramamarias (Myllys y col., 1994; Roberson y col., 1994; Fox y Cumming, 1996).

3. La mastitis bovina

La Federación Internacional de Lechería definió a la mastitis bovina como la inflamación de la glándula mamaria que tiene por objetivo la eliminación del agente patógeno y la restauración de la funcionalidad de la glándula (Kastli, 1967). Es una enfermedad originada en respuesta a un daño local, siendo su origen de tipo infeccioso, tóxico o traumático. Deriva de las palabras griegas *mastos* (mama) e *itis* (inflamación) (Ma y col., 1999; National Mastitis Council, 2003) y es considerada un problema poblacional multifactorial (Hans Andresen, 2001) ya que desde el punto de vista epidemiológico se distinguen tres elementos que forman el llamado "triángulo epidemiológico": la ubre bovina, los patógenos y el medio ambiente (Chaves, 2009) (Figura 5).

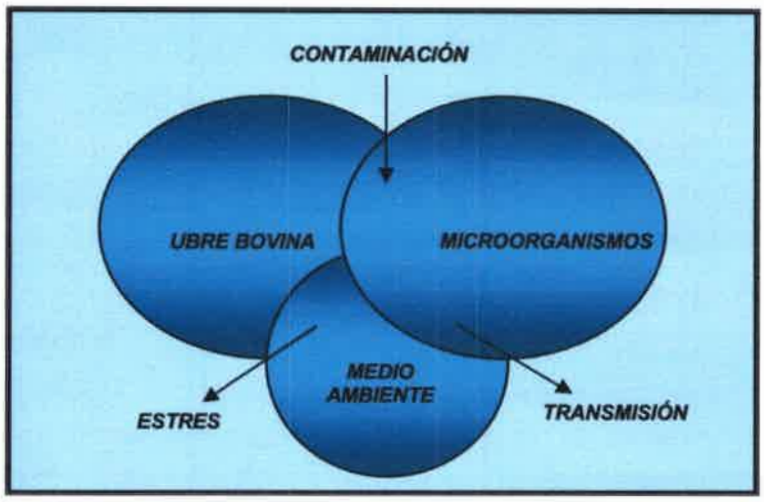


Figura 5: Triángulo epidemiológico. Interacciones entre los biosistemas que participan en la proliferación de la mastitis bovina.

La mastitis bovina es la enfermedad más frecuente y prevalente en los rodeos lecheros de todo el mundo y está asociada a una importante disminución de la producción y calidad de la leche (Calvinho y Tirante, 2005).

3.1. Patogenia de la enfermedad

Invasión del pezón

La principal vía de entrada de los distintos agentes patógenos al bovino, es el orificio del pezón y sólo en casos excepcionales la llegada a la ubre puede producirse por vía hematógena (Chaves, 2009). El canal del pezón es la comunicación directa con el exterior de la ubre y es altamente especializado en su única función de prevenir tanto la salida de la leche como la entrada de bacterias, jugando así un papel importante en la defensa de la ubre contra la mastitis (Muelas y col., 2004; Paulrud, 2005). Por este motivo, el pezón es la primera barrera de defensa contra el ingreso de bacterias a la ubre.

La invasión del pezón se presenta generalmente durante el ordeño (de lo contrario el esfínter cierra el canal del pezón) cuando los organismos presentes en la leche o en la punta del pezón son impulsados dentro del canal del mismo y de la cisterna. Esto ocurre cuando se produce la entrada indeseable de aire en la unidad de ordeño a causa del desprendimiento, pérdidas en la unidad o remoción de la pezonera sin haber antes cerrado el vacío. Por otro lado, luego del ordeño, el canal del pezón permanece dilatado por una o dos horas e inclusive, el canal dañado, puede permanecer parcial o totalmente abierto. Este proceso genera que los organismos del ambiente (materia fecal, establo, entre otros) o aquellos que se encuentran en

la piel, puedan invadir fácilmente y abrir total o parcialmente el canal (Muelas y col., 2004; Paulrud, 2005).

Establecimiento de la infección e inflamación del área dañada

La inflamación de la glándula mamaria, es el resultado de los factores de invasión y multiplicación de los microorganismos, y de la reacción del huésped a los mismos. El progreso de la infección depende de la capacidad de los agentes agresores para adaptarse al medio ambiente y de los factores de virulencia que ellos puedan sintetizar (Bogni y col., 1997; Barkema y col., 2006).

El grado de inflamación puede variar mucho en sus diversas formas (desde subclínico hasta clínico), dependiendo esto de la severidad con que la ubre reaccione a la fuente de irritación. Esta reacción inflamatoria es un mecanismo de protección que sirve para: eliminar a los microorganismos, neutralizar sus toxinas y ayudar a reparar al tejido productor de leche para que la glándula mamaria vuelva a funcionar normalmente. Además trae aparejado modificaciones en la composición de la leche como: disminución de la cantidad y calidad de caseínas sintetizadas, grasa butirosa y lactosa; sumado a un aumento de la concentración de sodio, cloruros, proteínas del suero sanguíneo, enzimas y células somáticas (Chaves, 2009).

Algunas bacterias pueden avanzar dentro de la ubre atacando y colonizando nuevos tejidos. Por lo general dañan primero los tejidos que recubren los grandes tubos colectores de leche y pueden enfrentarse con glóbulos blancos presentes naturalmente en bajas cantidades en la leche, principalmente polimorfonucleares neutrófilos (PMN) (Kerr y Wellnitz, 2003). Es así que las células somáticas, constituyen la segunda barrera de defensa debido a que pueden englobar y destruir a las bacterias invasoras o neutralizar microorganismos que penetren a la glándula mamaria y así ayudar a reparar los tejidos dañados para que regresen a su normalidad. Todo esto se lleva a cabo mediante una respuesta inflamatoria. Durante este proceso, los leucocitos liberan sustancias que atraen a más leucocitos desde el torrente circulatorio hacia la leche. Por esta razón, sin la presencia de estas células blancas, los microorganismos causantes de mastitis continuarían multiplicándose.

Por otro lado, existen otros factores inhibidores de crecimiento bacteriano que aumentan en la inflamación; algunos de ellos son la lactoferrína, proteína que compite con los microorganismos que requieren hierro, y las células inmunológicas como linfocitos T, B y las inmunoglobulinas (Seanq, 2009).

Aún así, si las bacterias no son totalmente destruidas, pueden continuar multiplicándose y comenzar a invadir los pequeños conductos y áreas alveolares. Las células secretoras de leche que son dañadas por las toxinas, liberan sustancias irritantes que conducen a un incremento en la permeabilidad de los vasos sanguíneos. Leucocitos adicionales, conjuntamente con

minerales y factores de coagulación, se mueven al lugar de la infección y penetran el tejido alveolar moviéndose entre el tejido secretor de leche dañado. La leche coagulada puede cerrar conductos y en efecto, aislar las regiones infectadas (Cruz Alamilla, 2007; Seanq, 2009). Es así que estas células se caracterizan por ser indicadores de los procesos inflamatorios que pueden estar ocurriendo en el tejido mamario y son un reflejo de una respuesta a una infección intramamaria o a otro factor que provoque una activación del sistema inmune (Sordillo y col., 1997).

Aproximadamente el 99% de todas las células presentes en la leche de un cuarto infectado son glóbulos blancos (macrófagos 60%, linfocitos 25%, neutrófilos 15%) y el 1% restante son células de descamación que provienen de los tejidos mamarios (Sordillo y col., 1997). Ambos tipos de células componen el recuento celular somático (RCS) de la leche (cel/ml), conocido como una medida general del estado de infección y la respuesta inflamatoria a esa enfermedad. De esta manera, para distinguir entre cuartos infectados y no infectados se ha demostrado que un corte entre 200.000 y 250.000 células es óptimo y permite reducir el error diagnóstico (Dohoo y Leslie, 1991; Leavens, y col., 1997; Leslie, y col., 1997; Schepers y col., 1997).

Destrucción del tejido alveolar

Cuando los microorganismos son eliminados rápidamente y la infección se resuelve, los conductos tapados se abren y la composición y producción de leche retorna a valores normales en varios días. Si la infección persiste y los conductos se mantienen tapados, la leche encerrada hace que las células secretoras pasen a una etapa de descanso (sin producción) y el alvéolo comienza a reducir su tamaño. Las sustancias liberadas por los leucocitos conducen a una destrucción completa de las estructuras alveolares, que son reemplazadas por tejido conectivo. La destrucción del tejido secretor de leche es, en efecto, la tercera barrera de defensa de la vaca para mantener a la infección bajo control. Por lo tanto, a medida que la enfermedad progresa el número de células somáticas en la leche se eleva y se asocia con una reducción permanente en la producción de leche (Sordillo y col., 1997).

3.2. Tipos de mastitis

Según el National Mastitis Council (2004), dependiendo del grado de inflamación y daño causado, la mastitis se puede clasificar en:

- **Mastitis subclínica:** las vacas no muestran ninguna señal obvia de la enfermedad (Kerr y Wellnitz, 2003) y a menudo presentan una disminución en la producción y calidad de la leche, sumado a un elevado RCS y a un aumento en el contenido de bacterias en la leche

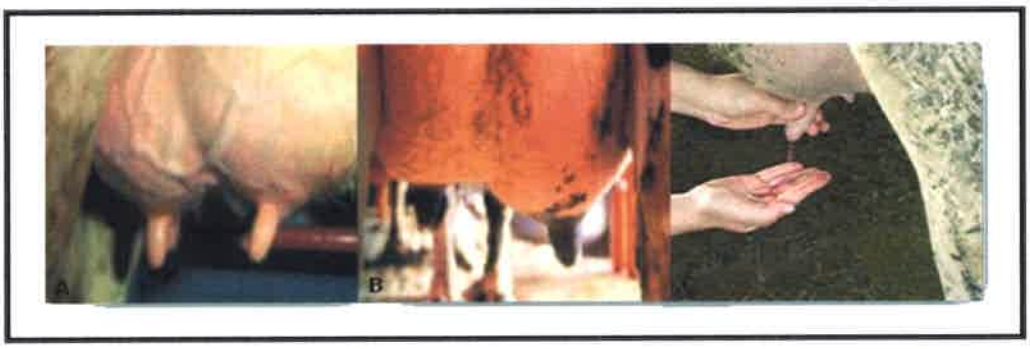
(Bedolla y col., 2007; Concha Bascuñán, 2008; Hansen y col., 2004; Hillerton y Berry, 2005).

En este tipo de mastitis, la ubre permanece aparentemente sana, la leche a simple vista es normal, pero una infección incipiente puede estar dañando el tejido glandular y provocando por lo tanto una alteración en la leche (Pérez y col., 2005).

En la mayoría de los tambos, la mastitis subclínica es la prevalente y causa las mayores pérdidas económicas por una reducción en la producción de leche. Además las vacas infectadas constituyen un reservorio importante de microorganismos que pueden infectar a otros animales (National Mastitis Council, 2004) (Figura 6 A).

- **Mastitis clínica subaguda:** se manifiesta con signos claros y evidentes de inflamación en la ubre del animal, y alteraciones de la leche (Concha Bascuñán, 2008). Esta forma de mastitis puede variar en severidad, dependiendo en parte, del tipo de microorganismo que produjo la infección. Se pueden observar anormalidades en la leche como coágulos y apariencia acuosa. Síntomas como calor, hinchazón y sensibilidad en la ubre pueden presentarse en forma leve o estar ausentes (Figura 6 B).

- **Mastitis clínica aguda:** se caracteriza por un avance repentino de la enfermedad con enrojecimiento, hinchazón, calentamiento y dolor en la ubre, anormalidades importantes en la leche y reducción en la producción de la misma. Se pueden presentar algunos síntomas sistémicos como fiebre, pérdida del apetito, reducción en la función del rumen, pulso rápido, deshidratación, debilidad y depresión (National Mastitis Council, 2004) (Figura 6 C).



Fuente: Ávila Téllez y Gutiérrez Chávez, 2010ab; Pérez Cabal, 2010.

Figura 6: Ubres de vacas con mastitis bovina: A: Mastitis subclínica. B: Mastitis clínica subaguda. C: Mastitis clínica aguda.

- **Mastitis crónica:** se da cuando la agresión en la glándula mamaria persiste y no hay una solución a la reacción inflamatoria aguda. Microscópicamente puede verse necrosis tisular,

tejido de granulación o infiltración de células inflamatorias tales como linfocitos, células plasmáticas, macrófagos y células gigantes multinucleadas (Schällibaum, 2001). Este tipo de mastitis puede presentarse como una fase subclínica indefinida, o la infección puede alternarse entre fases clínicas y subclínicas, y en algunos casos los signos clínicos pueden permanecer por largos períodos (National Mastitis Council, 2004).

- **Mastitis no bacteriana:** esta forma de inflamación de la ubre ocurre cuando los microorganismos no pueden ser aislados de muestras de leche. Pueden presentarse como casos clínicos o subclínicos (National Mastitis Council, 2004).

3.3. Etiología de la enfermedad

Se estima que alrededor de 200 especies microbianas son posibles agentes causales de mastitis bovina (Blowey y Edmondson, 1995; Bogni y col., 2011) y todos proliferan en la vaca o en su entorno. Dentro de los microorganismos involucrados, podemos hallar: bacterias, micoplasmas, levaduras, hongos y rara vez virus (Cruz Alamilla, 2007), pudiendo ser agrupados en 3 categorías:

- **Bacterias contagiosas,** transmitidas desde una vaca con la ubre infectada a otra sana. La transferencia de bacterias patógenas entre vacas ocurre por lo general en el momento del ordeño. Las manos, toallas y la máquina de ordeñar pueden ser reservorios de bacterias contagiosas. Entre los principales organismos patógenos contagiosos encontramos a *Staph. aureus*, el cual genera importantes pérdidas económicas en la industria lechera de todo el mundo (Bogni y col., 1997; Twomey y col., 2000; Barkema y col., 2006; Pellegrino y col., 2010). Sumado a él tenemos a *Strep. agalactiae, Mycoplasma* spp. (Pol, 2009) y *Corynebacterium bovis,* el cual puede estar dentro de esta clasificación, aunque como patógeno menor.
  De acuerdo con trabajos de investigación recientes, algunos estreptococos ambientales pueden ser también contagiosos (García, 2007).

- **Bacterias ambientales,** como su nombre lo indica provienen del medio ambiente de la vaca (establo, suelo, estiércol, entre otros) y por lo tanto para evitar este tipo de mastitis, es importante llevar a cabo prácticas de manejo adecuadas. Esta es la razón por la cual es prácticamente imposible eliminarlas completamente, ya que están naturalmente en donde vive el animal y pueden ser solo controladas, hasta cierto punto, mejorando la limpieza tanto de las vacas como de su medio ambiente. Las bacterias ambientales más comunes son los coliformes (*Escherichia (E.) coli, Klebsiella* spp. y *Enterobacter*) provenientes del

estiércol y la tierra (se multiplican bajo condiciones de humedad en presencia del sustrato adecuado), y los estreptococos ambientales (*Strep. uberis* y *Strep. dysgalactiae*) que provienen del medio ambiente, aunque también de las ubres infectadas (Pol, 2009). El hecho de que este último grupo también esté presente en la ubre, aumenta la posibilidad de su transmisión (García, 2007).

Dentro de este grupo también podemos incluir a varias especies de *Staphylococcus*, siendo las principales, las pertenecientes al grupo de los *Staph.* coagulasa negativos (SCN), *Enterococcus (Ent.) faecalis, Ent. faecium, Citrobacter spp.* y *Strep. equinus.*

- Patógenos **no comunes** del medio **ambiente,** donde podemos mencionar a *Arcanobacterium pyogenes, Mycobacterium spp., Pseudomonas aeruginosa*, levaduras, mohos, *Nocardia asteroides* y el alga incolora *Prototheca* spp. (Hans Andresen, 2001).

3.4. Impacto económico de la enfermedad

La mastitis bovina, una de las enfermedades más costosas del ganado bovino lechero, es actualmente considerada una de las causas principales de las deficiencias en la producción y calidad de la leche, afectando de manera real a las ganancias netas del productor y la industria láctea (Avila Téllez y Gutiérrez Chávez, 2010b). La importancia y gravedad de esta enfermedad está dada principalmente por los daños y pérdidas que origina: pérdidas en producción y desperdicio de leche, trabajo y mano de obra, gastos en medicamentos, erogaciones por servicios veterinarios e incrementos en los gastos por conceptos de reemplazo de bovinos afectados crónicamente (Avila Téllez y Gutiérrez Chávez, 2010b; Klostermann y col., 2010). Las pérdidas mencionadas son dos veces superiores a las causadas por infertilidad y enfermedades reproductivas (Chaves, 2009). Por ende, uno de los desafíos más importantes, y de gran implicancia económica en los tambos lecheros de todo el mundo, es la reducción de su incidencia (Lescourret y Coulon, 1994; Bradley, 2002; Pellegrino y col., 2010).

Si bien la mayoría de los tamberos cuantifica las pérdidas a través de: casos clínicos, animales que debe reemplazar y grandes gastos en medicamentos y servicios veterinarios, no resultan evidentes las pérdidas en producción de leche causadas por las infecciones subclínicas. Por ende fracasar en el control de la mastitis en un rodeo lechero es comparable con derramar leche por el desagüe, dado que las vacas infectadas producen significativamente menos leche que las vacas no infectadas (Chaves, 2009).

Numerosos trabajos de investigación han demostrado que las vacas con bajos RCS tienen una vida productiva más larga. Además, la leche con altos RCS contiene menos componentes deseables como lactosa, caseína y grasa; y más componentes indeseables como enzimas que

atacan a los componentes deseables de la leche dando un menor rendimiento y calidad de subproductos (Schepers y col., 1997; Ma y col., 1999; Dutto, 2004; Chaves, 2009).

El cálculo económico de las mastitis varía según los países e incluso entre regiones dentro de un país. Los resultados de pérdidas por estos cálculos cambian con el tiempo, en función de las modificaciones de los reglamentos de calidad de la leche y las circunstancias del mercado (Lescourret y Coulon, 1994; Bogni y col., 2011). Algunos informes han estimado que en la Unión Europea las infecciones por mastitis afectan al 30% del ganado lechero, generando pérdidas en la industria láctea (2005) que rondan los € 1.550 millones (SABRE, 2006).

Por otro lado, está estimado que las pérdidas, sólo por disminución de la producción de leche en USA son de US$ 1.000 millones/año; y ascienden a aproximadamente US$ 2.000 millones/año cuando se consideran todos los demás costos. Dicho de otra manera, el costo para los tamberos es de aproximadamente US$ 185/vaca/año (Chaves, 2009).

En la Argentina, no hay datos recientes sobre las consecuencias económicas de la mastitis. De acuerdo a lo publicado por Calvinho y Tirante (2005) estimaciones del año 1970 sobre pérdidas anuales, sólo por la disminución en la producción de leche, fueron de alrededor de US$ 115 millones, mientras que en los años 80 fueron superiores a US$ 220 millones.

A pesar que la eliminación completa de la mastitis de un rodeo es imposible, se puede reducir el número de nuevas infecciones y disminuir la duración de las ya existentes. Por esta razón, la prevención de nuevas infecciones posee un beneficio mayor que la curación de casos clínicos, dado que el éxito de cura es limitado (Wattiaux, 1999).

A raíz de lo expresado anteriormente, el mejoramiento de la calidad de la leche y los derivados lácteos que se producen en el país es prioritario. Se deben tener en cuenta las enormes presiones del consumidor interno y las importantes implicancias comerciales debidas al potencial aumento de la capacidad exportadora del sector, principalmente en el marco del MERCOSUR (Calvinho y Tirante, 2005; Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación, 2013).

En este sentido y teniendo en cuenta la evidente ineficacia en los métodos actuales de prevención contra la mastitis bovina (Bradley, 2002), existe la necesidad urgente de aumentar la eficacia de los tratamientos preventivos hacia la misma (Gruet y col., 2001; Pyorala, 2002).

3.5. Medidas de prevención

Para controlar la mastitis bovina en el rodeo, la prevención de las nuevas infecciones presenta un beneficio mayor que el intentar curar los casos de mastitis clínicas. Aún así, a pesar de que el grado de la nueva infección se reduzca, el éxito de cura es limitado. De esta manera la lucha contra la mastitis, es un esfuerzo a largo plazo que debe ser persistente

debido a que es imposible prevenir completamente la transmisión de bacterias u otros organismos causantes de la enfermedad (Pyorala, 2002).

Considerando lo dicho en el párrafo anterior, las prácticas de higiene y manejo mejoradas son una forma efectiva de reducir el grado de nuevas infecciones (Wattiaux, 1999). Algunos de los procedimientos de higiene durante el ordeño son: la higiene personal (manos), el lavado de la ubre y pezones con agua potable, el secado con toallas desechables antes de cada ordeño y la higiene de la unidad de ordeño (especialmente en el interior de las pezoneras) (Ruegg, 2003).

Numerosos trabajos han demostrado que la antisepsia de los pezones antes del ordeño ("pre-dipping") es efectiva en reducir bacterias patógenas y en consecuencia disminuir el riesgo de contraer infecciones intramamarias por bacterias ambientales (Rasmussen y col., 1991; Goldeberg y col., 1992; Oliver y col., 1993; Ruegg y Rodrigues, 2007). Otro procedimiento clave es el uso de desinfectantes post-ordeño ("post-dipping"); que implica la inmersión de los pezones en antisépticos compuestos por productos iodados, hipoclorito de sodio, cloro ácido o clorheximida (Scaramelli y González, 2005). Esta práctica, también llamada "teat-dipping" (Ruegg, 2003), es considerada esencial en la práctica tambera y contribuye a la obtención de una buena calidad de leche además de mejorar la salud de los animales (Klostermann y col., 2010). Por último encontramos el sellado de los pezones con antibióticos intramamarios, estos pueden aplicarse durante el ordeño o en el período de secado del animal ("pomo al secado") y son una medida preventiva y terapéutica de gran utilización y efectividad (Ryan y col., 1999a). Este método, previene la transmisión de microorganismos entre vacas y disminuye la población microbiana sobre la piel del pezón (Ruegg, 2003).

Resumiendo, el Nacional Mastitis Council (NMC) (2003) postula que los principios de prevención pueden ser sintetizados en 13 puntos fundamentales:

1. Ordeñar vacas con pezones limpios y secos.
2. Evitar la transmisión de patógenos (contagio vaca - vaca), durante el ordeño.
3. Evitar daños a los pezones durante el ordeño.
4. Proporcionar un ambiente que permita a las vacas permanecer limpias entre ordeños.
5. Detección precoz de nuevas infecciones (clínicas y subclínicas).
6. Uso correcto de los medicamentos.
7. Controlar la duración de las infecciones.
8. Monitorear el estado de la mastitis.
9. Criar vacas de reposición, libre de mastitis.
10. Asumir que toda la reposición que se adquiera, está infectada.
11. Proporcionar alimentación adecuada para evitar que aumente la susceptibilidad a mastitis.

12. Controlar la presencia de moscas.
13. Asignar responsabilidades a todas las áreas de prevención de mastitis.

Desde el punto de vista económico, distintos estudios se han orientado a determinar la relación costo/beneficio de un programa preventivo para mastitis bovina. Los mismos establecieron que dicha relación es de 1/5, lo cual realza la importancia de aplicar un programa preventivo efectivo para evitar la mastitis en el rodeo lechero (Bachman y Schairer, 2003). En este sentido, y teniendo en cuenta que la desinfección de pezones por inmersión genera costos de aproximadamente € 1.40 vaca/año, se puede ahorrar un promedio de € 35 vaca/año en costos de enfermedad, lo que es un ahorro anual de € 3500 en un tambo con un promedio de 100 animales (Tiwari y col., 2013).

Terapias y medidas preventivas alternativas

A pesar de la eficacia de las medidas mencionadas en el punto anterior, uno de los mayores desafíos de la industria lechera moderna es aplicar terapias que reduzcan el uso de antibióticos en los animales productores de alimentos, conjuntamente con el retiro del animal enfermo del circuito productivo (Ruegg, 2003), con las drásticas consecuencias económicas que esto implica (Vangroenweghe y col., 2005). Es por esto que, existen en la actualidad numerosas líneas de investigación dirigidas a la búsqueda de métodos alternativos contra la mastitis.

La aplicación de vacunas (Giraudo y col., 1997; Pellegrino y col., 2008 y 2010) constituye una alternativa interesante, ya que su aplicación contribuye no solo a disminuir la frecuencia y severidad de las mastitis clínicas sino también a eliminar las mastitis crónicas. Este objetivo aún no ha podido ser alcanzado en su totalidad por ninguna vacuna, ya que la mayoría solamente reduce la incidencia y severidad de las mastitis clínicas pero no son efectivas en la erradicación de las mastitis crónicas ni en la disminución de la aparición de nuevas. Algunas de las vacunas más estudiadas son: "REDUMAST" elaborada con antígenos capsulares extraídos de cepas patógenas de *Staph. aureus* (Giraudo y col., 1997), "J5" elaborada con la bacterina de la cepa de *E. coli* J5 que la transforma en la vacuna para mastitis ambiental (contra coliformes) más probada en el mundo (Hogan y col., 1992), "MASTIVAC I" compuesta por tres cepas de campo de *Staph. aureus* (incluye fragmentos bacterianos insolubles de dos de las cepas y una fracción de sobrenadante que contiene antígenos de la tercera cepa) (Leitner y col., 2011), la "Bacterina/STARVAC" elaborada con la cepa de *E. coli* J5 inactivada más la cepa inactivada de *Staph. aureus* (CP8) SP140 que expresa un complejo asociado antigénico slime (Prenafeta y col., 2010) y la "cepa mutante avirulenta *Staph. aureus* RC122" (Bogni y col., 1997; Giraudo y col., 1997; Reinoso y col., 2002; Pellegrino y col., 2008 y 2010), entre otras.

Otras de las alternativas son los inmunomoduladores (Dallard, 2007; Bogni y col., 2011) y los microorganismos probióticos y sus metabolitos (Ryan y col., 1998 y 1999b; Ross y col., 1999; Twomey y col., 2000; Crispie y col., 2005 y 2008; Beecher y col., 2009; Klostermann y col., 2008 y 2010). Siendo estos últimos, no solo una alternativa para la prevención de algunas patologías animales (Rosmini y col., 2004), sino una interesante opción para prevenir infecciones intramamarias en vacas durante el período seco (Ryan y col., 1999a).

3.6. Medidas de control

En general, es necesario conocer a fondo el problema de cada tambo a fin de implantar el programa de control más adecuado. Los programas de control desarrollados en la década de los 60 y aplicados con éxito en todo el mundo, mejoran la calidad bacteriológica de la leche y controlan la mastitis causada por patógenos contagiosos, a pesar de tener poco impacto sobre la causada por patógenos ambientales (Scaramelli y González, 2005; Bogni y col., 2011).

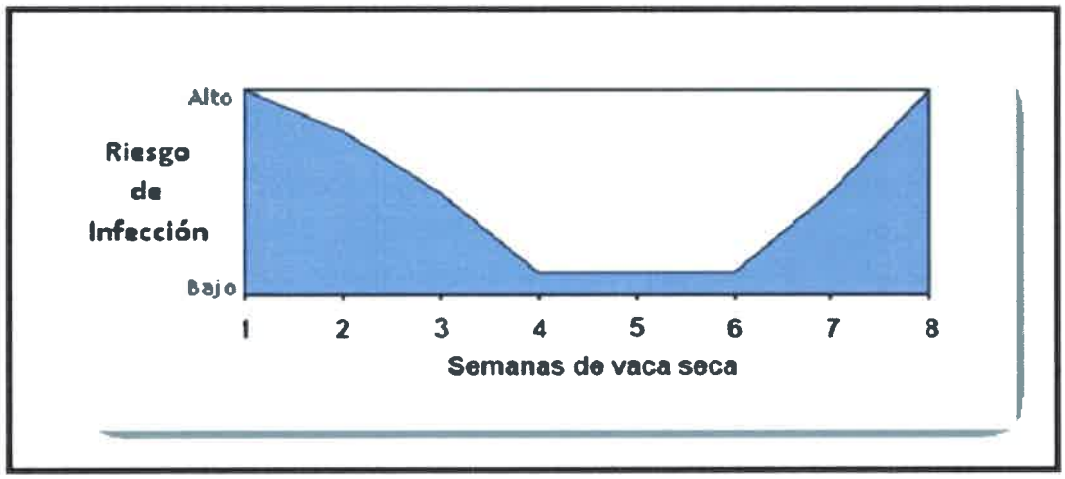
Desde los años '70 se ha venido implementando el conocido plan de los 5 puntos, descrito por el National Mastitis Council and Annual Meeting Proceedings (2003), para controlar exitosamente la mastitis bovina. El mismo se detalla a continuación:

- Uso de antisépticos *post-ordeño*.
- Terapia de vaca seca en todos los cuartos de todos los animales.
- Correcto tratamiento de todos los casos clínicos.
- Descarte de animales crónicos.
- Correcto mantenimiento del equipo de ordeño.

4. El período seco

El período seco, período de no ordeño que va desde el 7° al 9° mes de gestación, es una parte fundamental del ciclo de lactancia de los animales productivos y es considerado esencial para conseguir un rendimiento óptimo de la leche en el siguiente ordeño (Capuco y col., 1997; Bachman y Schairer, 2003). Este período, cuya duración ronda los 60 días (Gruet y col., 2001), es necesario para los procesos de remodelación de la glándula mamaria, es decir para la regresión (apoptosis), proliferación y diferenciación de las células mamarias, que llevan a la glándula a prepararse para la siguiente lactancia (Capuco y col., 1997; Bachman y Schairer, 2003). En otras palabras implica importantes cambios locales en la glándula (Smith y col., 1966), que de no ocurrir causarían una reducción de hasta un 20% en la producción de leche en el siguiente ordeño (Capuco y Akers, 1999; Bachman y Schairer, 2003).

Durante este período, las vacas lecheras son particularmente susceptibles a la mastitis (Ryan y col., 1999a). Diferentes investigadores, estiman que la susceptibilidad a las nuevas infecciones durante este período es 6 veces superior a la observada durante la lactancia, siendo las primeras tres semanas y las últimas dos, las más susceptibles a la infección (Ruegg, 2001) (Figura 7). En este sentido, un aumento en la incidencia de infecciones intramamarias durante la primera etapa del período de vaca seca resultaría en un número elevado de cuartos infectados durante la última etapa, antes del parto (Alderete, 2009).



Fuente: Ruegg, 2001.

Figura 7: Distribución y frecuencia de nuevas infecciones intramamarias durante el período seco bovino.

Una de las razones de la incidencia de infecciones intramamarias durante la primera etapa puede estar relacionada con el retraso en la formación del tapón natural de queratina en el canal del pezón. Este acontecimiento vuelve vulnerables a los pezones a la infección, mientras que el canal del pezón permanece abierto luego del último ordeño (Williamson y col., 1995). En este sentido, el uso de selladores internos de pezones durante el período seco disminuye la susceptibilidad a la infección intramamaria causada por este retraso en la formación del condensado de la queratina en el pezón (Serna y col., 2011). Además, hay que tener en cuenta que dos semanas antes del parto la concentración de lactoferrina disminuye, lo cual también incide en la aparición de infecciones intramamarias ya que representa una gran pérdida de propiedades antimicrobianas (Bachman y Schairer, 2003).

En resumen, este período le brinda al productor un tiempo propicio para aplicar prácticas de manejo adecuadas que prevengan enfermedades y aseguren una óptima producción de leche durante la lactación entrante (Ruegg, 2001).

4.1. Terapia al secado

La terapia al secado emplea, por lo general, el uso de antibióticos al momento del secado de los animales, siendo un importante medio de control de la mastitis bovina. Los antibióticos pueden ser administrados tanto por vía sistémica como por vía intramamaria (Ehinger y Kietzmann, 1998), aunque por lo general predomina la administración por vía parenteral intramamaria, ya que no hay preocupación por los períodos de suspensión y residuos de antibióticos en la leche (Eberhart, 1986).

El tipo de drogas que usualmente se formulan son de base oleosa (suspensiones de aceites), lo cual las hace apropiadas para la prevención dado su larga acción en el secado (Ehinger y Kietzmann, 1998). Dependiendo de los patógenos involucrados (distribución tisular y perfil de resistencia) se puede usar diferentes drogas tanto por vía intramuscular, subcutánea o por administración intramamaria, siempre que tengan esta indicación para su uso en ganado lechero. Estos incluyen: beta-lactámicos, aminoglucósidos, tetraciclinas, macrólidos, lincosamidas, polipéptidos, trimetoprim-sulfonamidas, combinaciones de ambos e incluso fluoquinolonas. La Tabla 1, muestra algunos de los antibióticos más usados en Argentina, Estados Unidos y en los Países Europeos.

Tabla 1: Antibióticos de uso común en Argentina, Estado Unidos y en países Europeos para el tratamiento intramamario de vacas al secado.

Antibióticos	País/es
Ampicilina	Argentina/Estados Unidos
Amoxixilina	Argentina
Cefalexina benzatina	Argentina/Países Europeos
Cefalonium	Países Europeos
Cefalosporina	Estados Unidos
Cefapirina	Argentina/Países Europeos
Cloxacilina benzatinica	Argentina/Estados Unidos/Países Europeos
Eritromicina	Argentina
Estreptomicina	Argentina/Estados Unidos
Nafcilina	Argentina
Neomicina sulfato + Spiramicina	Países Europeos
Oxacilina benzatina + Oxacilina sódica	Países Europeos
Penicilina G	Argentina/Estados Unidos/Países Europeos
Penicilina G + Novociocina sódica	Países Europeos
Penetamato	Argentina
Rifaximina	Países Europeos

Fuente: modificado de Gruet y col., 2001.

Actualmente existen dos métodos de terapia al secado: uno de ellos trata a todos los cuartos de todas las vacas (sistemático), mientras que el otro consiste en el tratamiento selectivo de los cuartos de cada vaca enferma (selectivo). Ambos métodos se aplican en

cuartos limpios, desinfectados e inmediatamente después del último ordeño. Según Ruegg (Ruegg, 2001) el método *sistemático* es más efectivo que el *selectivo*, aunque este último es menos costoso; y trabajos como los de Browning y col. (1994) informan que el tratamiento *selectivo* en cuartos de vacas infectadas es la estrategia preferida.

Se estima que la terapia al secado posee una eficacia curativa del 70% al 98% dependiendo de los tratamientos y los patógenos involucrados (Marco y col., 1995) y que ayuda a curar cerca del 50% de las mastitis causadas por *Staph. aureus* y 80% de los estreptococos ambientales. Un cuarto infectado que es tratado y curado al secado, producirá cerca del 90% de su potencial durante la nueva lactancia. Aún así, si un cuarto permanece infectado o es infectado durante el período seco, ese cuarto producirá solamente el 60 o 70% de su potencial (Wattiaux, 1999). En general se considera que la relación costo/beneficio de una eficaz terapia al secado es de 1/4 (Bachman y Schairer, 2003).

Perjuicios: multirresistencia y residuos en leche

Como se ha mencionado, la terapia al secado tiene un doble interés: por un lado tratar las infecciones intramamarias en cuartos contaminados al secado (efecto curativo), y por otro lado prevenir nuevas infecciones en el inicio del período seco (Gruet y col., 2001). Por esta razón, el uso intensivo de antibióticos en el tratamiento y control de la mastitis viene acompañado por un aumento considerable en la resistencia de los microorganismos a los antibióticos (Ryan y col., 1999a; Makovec y Ruegg, 2003; Turutoglu y col., 2009; Pellegrino y col., 2011). De esta manera, a pesar que la aplicación de esta terapia ha sido muy efectiva, la aparición de residuos en la leche en vacas tratadas, sumado a la resistencia de patógenos y microbiota indígena, le confieren grandes desventajas (Calvinho y col., 2002; Gentilini y col., 2002).

El problema de la multiresistencia bacteriana se agrava aún más si se considera que investigaciones, tanto clínicas como epidemiológicas, han demostrado que cada vez son menos las barreras que impiden la transferencia de genes de resistencia entre microorganismos patógenos, incluso entre bacterias de géneros y familias diferentes, como también la transferencia horizontal de bacterias resistentes de los animales al hombre y viceversa (Heisig y col., 1995; Molbak y col., 1999). Asimismo, existen suficientes antecedentes que demuestran que las bacterias son capaces de generar mecanismos de defensa frente a una exposición permanente a un determinado antimicrobiano (Aarestrup y col., 1998; Bager, 2000; Caprioli y col., 2000; Martel y col., 2000).

Ya en el año 1969, Philpot en sus investigaciones puso en evidencia que el uso y abuso indiscriminado de drogas antibacterianas llevaban a un aumento de la resistencia bacteriana. A pesar de esto, los antibióticos se han utilizado en las vacas durante muchos años para tratar infecciones comunes tales como la mastitis (Movassagh, 2011) y en muchos casos, los

antibióticos empleados para tratar la mastitis bovina también se han utilizado en los seres humanos (Barkema y col., 2006). Por esta razón, Browning y col., (1990) recomienda que la terapia al secado con antibióticos no debe ser usada como una medida rutinaria, sino por el contrario debe ser restringida solo al tratamiento de animales infectados; para de esta manera evitar la aparición de cepas como el *Staph. epidermidis* meticilina resistente, recientemente recuperada de leche en tambos orgánicos suizos (Walther y Perreten, 2007).

Por otra parte la Organización Mundial de la Salud, no solo señala que la antibioticoresistencia debe ser considerada un problema grave, complejo y de repercusión internacional, sino que además, recomienda poner en marcha un sistema globalizado de vigilancia de la resistencia bacteriana tanto en medicina humana como en veterinaria (WHO, 1994). Consecuentemente diferentes países en vías de desarrollo, han iniciado programas de monitoreo de resistencia bacteriana, fomentando el uso racional de antimicrobianos en animales de producción (Bager, 2000; Martel y col., 2000).

Por otro lado, en los últimos años se ha visto una mayor presión sobre los productores tamberos para aumentar la producción lechera (Movassagh, 2011). Esta presión a menudo ocasiona más infecciones en los animales, generando que los antibióticos intramamarios se hayan hecho muy populares en los tambos, debido a que son de fácil aplicación y generalmente no muy costosos. El uso indiscriminado de los mismos trae aparejado muchas veces la aparición de residuos en la leche (Magariños, 2000).

Ante lo expresado en el párrafo anterior, existen publicaciones que resaltan que los antibióticos, sulfamidas y nitrofuranos, cuando se encuentran presentes en la leche, ocasionan graves problemas para la salud humana y en los procesos tecnológicos de los derivados de leche (Magariños, 2000). Se ha demostrado que después de la administración de cualquier tratamiento veterinario, aparecen residuos de antibióticos en los productos comestibles obtenidos de los animales tratados (Noa-Lima y col., 2009). En este sentido, el grupo de los antibióticos beta-lactámicos es responsable de aproximadamente el 95% del total de contaminación de la leche con antibióticos (Movassagh, 2011). Estos residuos, contenidos en los alimentos, representan un peligro potencial para la salud del consumidor por causar: alergias (Movassagh, 2011), alteración de la flora intestinal, desarrollo de microorganismos patógenos, reducción de la síntesis de vitaminas y estimulación de bacterias antibiótico-resistentes; siendo esta última la de mayor importancia por la aparición de resistencia múltiple en bacterias patógenas al ser sometidas a bajas concentraciones sub-terapéuticas (Magariños, 2000).

En la actualidad no se conocen informes sobre intoxicaciones provocadas por la ingestión de leche contaminada con antibióticos de uso común. Esto se fundamenta en que sus concentraciones resultan ser muy bajas como para provocar un efecto tóxico, con la excepción

posiblemente del cloranfenicol que es capaz de producir, de acuerdo con algunos investigadores, anemia plástica por depresión de la médula ósea al suministrarse en bajas dosis por períodos cortos de tiempo. No obstante, existe la duda de que si el consumo de antibióticos por parte del hombre, a través de alimentos contaminados, pudiera alcanzar niveles que determinen una toxicidad de tipo crónico, sería un motivo más que suficiente para prohibir la presencia de éstos en los alimentos (Magariños, 2000).

Además de los peligros para la salud humana, los residuos antibióticos generan pérdidas considerables en la industria láctea, ya que los cultivos iniciadores empleados en la producción de derivados lácteos fermentados, tales como queso y yogurt, son extremadamente sensibles a bajas concentraciones de antibióticos en leche (Schiffmann, 1992; Movassagh, 2011). Por ejemplo, las bacterias empleadas en la fabricación de yogurt, *Lactobacillus (L.) bulgaricus* y *Strep. termophillus* resultan ser unas de las más sensibles a los antibióticos. Estas bacterias, experimentan cambios morfológicos y pueden darse situaciones en que estos cultivos iniciadores sean reemplazados por microorganismos indeseables, provocando la inutilización del producto o convertirlos en peligroso para su consumo (Magariños, 2000).

Además de los efectos en los productos lácteos fermentados, la industria se ve perjudicada en pruebas de control de calidad a la que es sometida la leche a nivel de recepción. Tal es el caso del test de tiempo de reducción del azul de metileno, que aumenta cuando la leche está contaminada con antibióticos, lo que trae como consecuencia un error en la clasificación de la leche. Por otra parte, aún persiste la creencia errónea de que los tratamientos térmicos a los cuales se somete a la leche destruyen las sustancias inhibidoras y, en forma particular, los antibióticos. Un informe de 1967 de la Federación Internacional de Lechería señala que la penicilina pierde solamente un 8% de su actividad luego de la pasteurización y un 20% si el tratamiento térmico es más exigente (90°C por 30 mi nutos) (Magariños, 2000).

En lo que respecta a "la calidad de un producto", cualquiera que sea su naturaleza, la misma está dada por disposiciones legales en sanidad, composición y la aceptación del consumidor (Ruvalcaba y col., 2011). Para el caso particular de la leche, la normativa Argentina vigente establece que la leche no debe contener residuos de antibióticos provenientes de los tratamientos suministrados al ganado para prevenir y/o tratar enfermedades (INTI, 2010). En otros países americanos también rige esta normativa, como es el caso de México, donde la leche ya sea cruda o pasteurizada no debe tener la presencia de inhibidores microbianos (NOM, 2002; COFOCALEC, 2004), aunque estudios realizados en este país demostraron la presencia de antimicrobianos en leche cruda destinada a la industria procesadora (Noa y col., 2009). En los Estados Unidos las normas orgánicas prohíben el uso de antibióticos intramamarios de larga duración y otros medicamentos sintéticos en los tambos orgánicos, aunque es una práctica muy adoptada por los productores lecheros de los tambos

convencionales (Pol y Ruegg, 2007; Ruegg, 2009). A diferencia de estos países, en la Unión Europea existen variaciones en las certificaciones y la mayoría no prohíbe el uso de antibióticos (Ruegg, 2009). En este sentido, el límite máximo de residuos para algunos antibióticos beta-lactámicos en la Unión Europea es: para Penicilina G 4 mg/l, Ampicilina 4 mg/l, Dicloxacilina 30 mg/L, Cefalexina 100 mg/l y Cepharin 60 ug/l (Ghidini y col., 2002).

Resumiendo, el desafío para el futuro es diseñar nuevos productos "naturales" para el secado que incrementen la protección contra las infecciones que ocurren al comienzo y final del período de vaca seca y al parto (Alderete, 2009).

5. Probióticos: definición, características y beneficios

El término probiótico, palabra de origen griego que significa "a favor de la vida", hace referencia a microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas confieren un efecto benéfico al anfitrión u hospedero (Naidu y col., 1999; FAO/OMS, 2001; Pineiro y Stanton, 2007). Se diferencia del término prebiótico, sustancia no digerible o nutriente seleccionado que fortalece el crecimiento y establecimiento selectivo de cepas bacterianas con efectos probióticos beneficiosos. Están presentes en vegetales y frutas como ajo, cebolla, puerro, espárrago, entre otras (Rosmini y col., 2004; Sáez Pérez, 2007).

Dentro de las características principales de un probiótico exitoso encontramos: la tolerancia al ácido y la bilis, la actividad antimicrobiana contra patógenos intestinales y la habilidad para adherirse y colonizar el tracto intestinal (Mishra y Prasad, 2005).

Los efectos benéficos más importantes de los probióticos son: el control de la diarrea (Reddy y col., 1998), la disminución de la intolerancia a la lactosa (Fonden y col., 2000), la inhibición de patógenos intestinales (Bhatia y col., 1989), la reducción de los niveles de colesterol (Agarbaek y col., 1995), la actividad antimutagénica y anticarcinogénica (Fuller y Gibson, 1997), el aumento de la respuesta inmune (Kimura y col., 1997) y la modulación de la misma demostrada en humanos y animales de laboratorio (Corthésy y col., 2007), entre otros. En función a esto último se ha observado que, en bacterias Gram positivas probióticas, la pared celular actuaría como activadora de la respuesta inmune (Ross y col., 1999). Además, se cree que la modulación de la respuesta inmune, probablemente se produzca a través de uno o una combinación de los siguientes mecanismos (Cross, 2002):

- Producción de ácido láctico localizado, que puede limitar el crecimiento de los patógenos.
- Producción de sustancias antibacterianas, como las bacteriocinas.
- Exclusión competitiva por los sitios de colonización.

- Producción de inmunomoduladores que estimulen la inmunidad.

De esta manera, la resistencia otorgada por los probióticos, contra la invasión de microorganismos patógenos, se logra mediante la generación de sustancias antimicrobianas como el ácido láctico y otros ácidos de cadena corta, metabolitos como peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas (Sanders, 2000; Marteau y col., 2001).

Conceptualmente, las bacteriocinas son péptidos biológicamente activos que tienen propiedades bactericidas contra especies bacterianas estrechamente relacionadas con la cepa productora. Sin embargo, este concepto ha sido modificado ya que se han encontrado acciones bactericidas contra cepas distanciadas filogenéticamente de la cepa productora (Sablon y col., 2000). En el año 1928 se logró aislar la primer bacteriocina, la nisina, a partir de una cepa de *Lactococcus (Lc.) lactis* subsp *lactis* (González Martínez y col., 2003). La misma se caracterizó por su acción destructiva sobre la integridad de la membrana citoplasmática, a través de la formación de poros, generando así la salida de compuestos intracelulares y alterando la fuerza motriz de protones necesaria para la producción de energía y síntesis de proteínas o ácido nucleicos (Chikindas y col., 1993; Montville y Chen, 1998; Sablon y col., 2000).

5.1. Criterios de selección

En la Tabla 2 se detallan las cualidades que debe tener un microorganismo para que se pueda clasificar como probiótico.

Tabla 2. Criterios de selección para microorganismos probióticos.

1. Criterio de origen: las cepas aisladas de humanos se utilizan en humanos y las aisladas de animales se utilizan en la especie de la que se aislaron.
2. Resistencia al tránsito intestinal: deben sobrevivir a las condiciones del tracto digestivo.
3. GRAS (del inglés, generaly recognized as safe): deben ser generalmente reconocidas como seguras.
4. Adhesión a la mucosa intestinal: pre-requisito para colonizar el tracto Intestinal y ejercer efectos benéficos.
5. Identificación bioquímica: deben estar plenamente identificados (fenotípicamente) hasta especie.
6. Estimulación del sistema inmunológico: deben ser capaces de estimular el sistema inmune.
7. No ser oportunista: aún en estado de inmunosupresión del huésped, no deben causar enfermedad.
8. Antagonismo contra patógenos: deben poseer efectos probados contra patógenos del tracto intestinal.
9. Soportar aplicación tecnológica: permanecer viables en procesos de elaboración de alimentos y durante el almacenamiento.

Fuente: Ouwehand y Conway, 1996.

Uno de los principales criterios de selección, para microorganismos probióticos, es la adhesión de las cepas a las mucosas, dado que es un requisito indispensable para la colonización (Iñiguez Palomares y Acedo Féliz, 2006). La mayoría de los estudios de adhesión se han realizado para el género *Lactobacillus,* en el epitelio intestinal (Maxwell y Stewart, 1995). Hay estudios que muestran que especies de este género, como *L. acidophilus* y *L. crispatus*, tienen proteínas de superficie (*S-layer*) o una capa proteica rodeando a la pared celular que les brinda adhesión al reconocer receptores intestinales (Sara y Uwe, 2000). Mientras que otros estudios han logrado caracterizar y purificar una proteína de superficie del *L. fermentum* 104R, que no formaría parte de las proteínas *S-layer*, y que sería capaz de unirse a la mucosa del intestino delgado de cerdos (Rojas y col., 2002).

5.2. Principales géneros

Actualmente los microorganismos más utilizados como probióticos, tanto en humanos como animales, pertenecen a los géneros: *Lactobacillus, Lactococcus, Bifidobacterium, Bacillus, Streptococcus, Pediococcus, Enterococcus,* levaduras como *Saccharomyces* y *Torulopsis* y hongos del género *Aspergillus* (Dunne y col., 2001), que son usados para restaurar el balance ecológico de las diferentes áreas mucosas de los organismos tratados, mejorando las propiedades de la flora indígena y protegiendo así al huésped (Szajewska y Mrukowics, 2001).

Todas las bacterias lácticas, son deficientes en muchas rutas metabólicas. En consecuencia presentan requerimientos nutricionales complejos que las obligan a restringirse a medio ambientes ricos en nutrientes, como la leche, y a degradar los carbohidratos a ácido láctico mediante distintas vías (Brock, 1998).

Una de estas vías es la ruta homofermentativa donde, mediante la vía de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) para la glucólisis, se genera ácido láctico como único producto (con un rendimiento de dos moles por uno de glucosa) con una activa participación de la enzima aldolasa. Otra es la ruta heterofermentativa, que resulta en la acumulación de etanol y CO_2 (en ocasiones también ácido acético) en cantidades equimolares al ácido láctico. Esta transformación ocurre a través de la vía de las pentosas (6-f-gluconato), con una activa participación de la enzima fosfocetolasa (Brock, 1998). De esta manera, los lactobacilos se agrupan en tres grandes grupos por la fermentación de hexosas y pentosas (Kandler y Weiss, 1984):

- **Grupo I:** homofermentadores obligados, fermentan las hexosas por la vía de EMP, pero no las pentosas ni el gluconato.

- **Grupo II:** heterofermentadores facultativos, fermentan hexosas por la vía de EMP y poseen una fosfocetolasa inducible que les permite degradar pentosas a lactato y acetato.
- **Grupo III:** heterofermentadores obligados, fermentan hexosas hacia ácido láctico, CO_2 y etanol (o ácido acético). Las pentosas son transformadas hacia ácido láctico y acético.

5.3. Una alternativa al uso de antibióticos

Durante los últimos 20 años, la investigación sobre los probióticos ha progresado considerablemente y se han realizado avances notables en la selección y caracterización de cultivos de probióticos (FAO/OMS, 2001; Nader Macías y col., 2011) con el fin de profundizar en la búsqueda de métodos alternativos a los antibióticos (Gillor y col., 2004; Sit y Vederas, 2008; Espeche y col., 2009; Espeche-Pellegrino y col., 2012). En este sentido, dado que las bacterias del ácido láctico bajo condiciones de estrés de la especie bovina son productoras de sustancias con potencial de inhibición contra varios microorganismos responsables de la mastitis bovina, son ampliamente evaluadas para los tratamientos preventivos de esta enfermedad (Serna y col., 2011).

Una de las bacterias lácticas más estudiadas por ser potencialmente probiótica son los lactobacilos, ampliamente investigados por presentar una gran variedad de aplicaciones, ya sea para el tratamiento de muchas enfermedades infecciosas de humanos como también por su gran potencial para el control de las especies que causan la mastitis bovina (Greene y col., 1991; Tagg y Dierksen, 2003). En este sentido, algunos de los trabajos publicados que se registran son los de Greene y col. (1991) que inoculó intramariamente *Lactobacillus* sin definir su especie ni características; los trabajos del grupo de Ryan y col. (1998 y 1999ab), Ross y col. (1999), Twomey y col. (2000), Crispie y col. (2005 y 2008), Beecher y col. (2009) y Klostermann y col. (2008 y 2010) quienes informan sobre una posible utilización intramamaria tanto de la cepa de *Lc. lactis* como de su bacteriocina, la lacticina 3147 (lantibiótico de dos componentes con un amplio espectro de actividad antimicrobiana).

De esta manera, las bacterias probióticas presentan muchas propiedades benéficas para el control de los microorganismos patógenos (Espeche y col., 2009; Bogni y col., 2011; Nader Macías y col., 2011; Espeche-Pellegrino y col., 2012). Estas incluyen, la capacidad de adherirse a receptores celulares y de reducir las bacterias patógenas adherentes, co-agregación, producción de ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, bacteriocina, entre otras (Gergor, 1999; Mami y col., 2008).

Como se ha mencionado, las bacteriocinas han sido muy estudiadas para su utilización como alternativas frente a la mastitis bovina. De ellas, dos de las más estudiadas y con un amplio espectro de inhibición contra bacterias Gram-positivas son la nisina (Cotter y col., 2005) y la lacticina 3147 (Ryan y col., 1996), ambas consideradas como antimicrobianos "naturales y de calidad alimentaria".

La nisina fue identificada por Rogers y Whittier (1928) y rápidamente fue asociada con una aplicación práctica para el tratamiento de la mastitis bovina (Sears y col., 1992). Estudios previos, señalan su uso como aditivo alimentario para inhibir patógenos y como agente terapéutico en el tratamiento de diversas enfermedades como el acné e infecciones gastrointestinales en humanos (Blackburn y col., 1994; Sears y col., 1995). En la actualidad, se destaca el uso de una variante, la nisina Z, para el tratamiento de vacas con mastitis clínica y subclínica (Cao y col., 2007; Wu y col., 2007) y además la combinación de la misma con la acción de la lisostafina (considerada como bacteriocina) generando así una acción inhibitoria sinérgica (Heng y col., 2007).

Por otro lado, la lacticina 3147 es otra de las bacteriocinas ampliamente estudiada y utilizada en los selladores *"teat dips"* para la prevención de la mastitis bovina (Ryan y col., 1996, 1998, 1999a; Twomey y col., 2000; Crispie y col., 2005). Ryan y col. (1999a) utilizaron la lacticina 3147 en combinación con un sellador de pezón (Teat seal; Cross Vetpharm Grupo Ltd., Dublín, Irlanda) con el fin de elaborar un producto no antibiótico para vacas secas. Este nuevo sellador esta formulado sobre la base de una sal inorgánica en aceite de parafina y cera, que forma un tapón en el seno del pezón y actúa efectivamente como una barrera física contra la infección durante la primera parte del período seco, mientras el canal del pezón permanece abierto (función comparable con la formación del tapón de queratina, que se forma naturalmente en los pezones durante el período seco) (Woolford y col., 1998).

De esta manera, las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas han sido objeto de intensas investigaciones científicas durante los últimos años (Ross y col., 1999) y recientemente una nueva bacteriocina, la lacticina NK34, está siendo investigada para controlar y prevenir la mastitis bovina (Kim y col., 2010).

En la actualidad existe una tendencia mundial basada en la producción de leche en tambos orgánicos, donde lo que se busca es reemplazar el uso de antibióticos al secado por una variedad de productos naturales capaces de mejorar la salud de la ubre (Pol y Ruegg, 2007). La mayoría de estos productos se aplican en los tambos orgánicos de Wisconsin (Estados Unidos) y entre ellos figuran: suplementos vitamínicos (vitamina C), extractos de ajo y geles de aloe vera como remedios contra mastitis (Agarry y col., 2005; Pol y Ruegg, 2007), extractos de ginseng capaces de estimular el sistema inmunológico (Karreman, 2007) y suero bovino de leche ultrafiltrado, entre otros (Roth y col., 2001). Según Ruegg (2009), muchas de estas

terapias alternativas, utilizadas para el tratamiento de mastitis, tienen cierta base teórica para su consideración de eficacia pero casi no existen estudios que demuestran su eficacia clínica.

Otro de los enfoques alternativos son: el uso de algunas vacunas, que se han elaborado para reducir la gravedad de la enfermedad aunque se ha demostrado que no controlan de manera eficiente la mastitis (Leitner y col., 2011), y el uso del quitosano (polisacárido) y antimicrobianos peptídicos aislados de plantas, que son novedosas alternativas descriptas por Moon y col. (2007) y Ochoa-Zarzosa y col. (2008) que permitirían una cura efectiva contra la mastitis, aunque hasta ahora sólo han sido eficaces en el tratamiento de la mastitis estafilocócica.

Por todo lo mencionado, la profundización en el conocimiento sobre el uso de los probióticos y su capacidad como medida alternativa al empleo de antibióticos para prevenir enfermedades ha dado como resultado una nueva visión en la industria farmacéutica (Rosmini y col., 2004). Principalmente por introducir una mirada global desde el aislamiento de probióticos de ecosistemas específicos tales como un hato o región geográfica, hasta la selección y caracterización de las bacterias responsables de la acción probiótica, para producirlas a escala industrial, procesarlas y reintroducirlas al animal o a su dieta (Rosmini y col., 2004). Además, es posible que las terapias a base de antibióticos destinadas a los animales se limiten en el futuro. Especialmente en lo que concierne a la utilización de diferentes agentes profilácticos (Twomey y col., 2000) ya que como lo remarca Ruegg (2009), las preferencias de los consumidores de productos lácteos se han traducido en un crecimiento exponencial del sector lechero orgánico y este crecimiento se espera continúe. En este sentido todas las preocupaciones al respecto han llevado a los organismos de salud pública a formular programas de recomendaciones mundiales para tratar de reducir el uso indiscriminado de antibióticos (WHO, 1994) y profundizar en la consideración de distintas terapias alternativas, para el control de la mastitis (Twomey y col., 2000).

Hipótesis

Planteo del problema

La mastitis bovina es la inflamación de la glándula mamaria que tiene por objetivo la eliminación del agente patógeno y la restauración de la funcionalidad del órgano. Es una de las enfermedades más costosas del ganado bovino lechero, actualmente considerada una de las causas principales de las deficiencias en la producción y calidad de la leche, que afecta las ganancias netas del productor y la industria láctea. Las prácticas de higiene y manejo mejoradas son una forma efectiva de reducirla; entre las que tenemos la antisepsia de los pezones antes del ordeño ("*pre-dipping*"), el uso de desinfectantes post-ordeño ("*post-dipping*") y el sellado de los pezones con antibióticos intramamarios. Estos últimos, de aplicación durante el ordeño o en el período de secado del animal ("*pomo al secado*"), han sido muy cuestionados debido a su uso indiscriminado tanto terapéutico como preventivo; lo que ha generado la aparición de alternativas para evitar su utilización como vacunas, inmunomoduladores y probióticos. Por tal motivo, existe una tendencia mundial basada en la producción de leche orgánica, donde lo que se busca es reemplazar el uso de antibióticos al secado por una variedad de productos naturales capaces de mejorar la salud de la ubre y de las personas.

Hipótesis General

Bacterias lácticas con capacidad probiótica pueden ser aisladas de leche de bovinos productivos. La administración intramamaria (IIM) de las mismas en el pezón bovino de vacas sanas en período de secado, previene la entrada de patógenos.

Hipótesis parciales

I. Las Bacterias Lácticas (BL) con capacidad probiótica forman parte de la microbiota indígena y pueden ser aisladas de la leche de bovinos sanos y con mastitis.
II. Las cepas de BL con capacidad probiótica seleccionadas, administradas en una concentración adecuada por vía IIM en bovinos al secado, son capaces de adherirse y colonizar el epitelio del canal del pezón sin ser inhibidas por los microorganismos más frecuentemente aislados de la flora microbiana autóctona de ese nicho ecológico.
III. La administración de BL no produce efectos adversos (inflamación, enrojecimiento o dolor), al ser administrada en el canal del pezón.

Objetivos

Objetivo General

Profundizar en el estudio de los mecanismos involucrados en el efecto protector de los probióticos en la glándula mamaria. La información que se generará permitirá sentar las bases del conocimiento científico para, en etapas futuras, diseñar un producto que pueda ser utilizado en la prevención de la mastitis bovina.

Objetivos Específicos

A. Aislar e identificar Bacterias Lácticas (BL) a partir de animales bovinos sanos y con cuadros de mastitis provenientes de tambos de la región centro-sur de la provincia de Córdoba.

B. Estudiar la flora microbiana normal del canal del pezón mamario bovino.

B.1 Aislar e identificar la flora predominante en el canal del pezón bovino.

C. Realizar estudios *in vitro* de cepas de BL aisladas en tambos de las provincias de Córdoba y de Tucumán, caracterizadas como potencialmente probióticas en el CERELA, que permitan determinar si las mismas presentan capacidades de exclusión de microorganismos y adherencia a células del pezón mamario bovino.

C.1 Determinar si las cepas de BL en estudio pueden inhibir a los microorganismos más frecuentemente aislados de la flora microbiana normal del canal del pezón y a las bacterias causantes de mastitis bovina.

C.2 Evaluar la capacidad de las cepas de BL para co-agregar bacterias causantes de mastitis bovina.

C.3 Determinar la adherencia de las cepas de BL a células epiteliales del canal y la cisterna del pezón mamario bovino.

C.4 Estudiar la capacidad de auto-inhibición de las cepas de BL.

D. A partir de los estudios anteriores, realizar la formulación de un producto probiótico en base a la selección de cepas de BL y estudiar su comportamiento por ensayos *in vitro* e *in vivo.*

D.1 Evaluar *in vitro* el comportamiento inhibitorio de la formulación frente a *Staph. aureus*, principal agente causal de mastitis bovina.

D.2 Determinar la dosis y concentración de cada BL seleccionada, que no produzca inflamación al ser inoculada en glándulas mamarias de bovinos en período de lactancia y al secado.

D.3 Evaluar a diferentes tiempos, la permanencia de cada BL luego de la inoculación intramamaria mediante ensayos de recuperación de microorganismos en placas.

D.4 Estudiar por análisis histológico, si la administración local de BL en el pezón de la glándula mamaria bovina induce alteraciones en la estructura del tejido epitelial del canal y la cisterna del pezón mamario bovino.

D.5 Determinar el efecto conjunto de las BL seleccionadas luego de la inoculación intramamaria en vacas en período de secado.

Materiales y Métodos

Materiales

1. Cepas Bacterianas

- Bacterias Lácticas (BL) potencialmente probióticas, utilizadas:

- *Lactobacillus (L.) perolens* **CRL 1724,** *Lactococcus (Lc.) lactis subsp. lactis* **CRL 1655:** cepas pertenecientes al cepario del Centro de Referencia de *Lactobacillus* de Tucumán (CERELA, Instituto dependiente del CONICET), aisladas del primer descarte de leche de vacas adultas Holstein, clínicamente sanas del noroeste de Tucumán, Argentina (Espeche y col., 2009).

- *L. plantarum* **CRL 1716,** *Enterococcus (Ent.) mundtii* **CRL 1656:** cepas pertenecientes al cepario del CERELA-Tucumán, aisladas del último descarte de leche de vacas adultas Holstein, clínicamente sanas del noroeste de Tucumán, Argentina (Espeche y col., 2009).

- *Ent. hirae* **CRL 1835,** *Ent. hirae* **CRL 1834,** *Weissella (W.) cibaria* **CRL 1833,** *Pediococcus (P.) pentosaceus* **CRL 1831**: cepas pertenecientes al cepario del CERELA-Tucumán, aisladas del primer descarte de leche de vacas adultas Holstein, clinicamente sanas del sur de Córdoba, Argentina (Espeche-Pellegrino y col., 2012).

- *W. cibaria* **CRL 1840,** *Ent. hirae* **CRL 1837,** *Ent. hirae* **7-3**: cepas pertenecientes al cepario del CERELA-Tucumán, aisladas del primer descarte de leche de vacas adultas Holstein, clinicamente con mastitis subclínica del sur de Córdoba, Argentina (Espeche-Pellegrino y col., 2012).

- *P. pentosaceus* **CRL 1832**: cepa perteneciente al cepario del CERELA-Tucumán, aislada del primer descarte de leche de una vaca adulta Holstein, con mastitis clínica del sur de Córdoba, Argentina (Espeche-Pellegrino y col., 2012).

- Bacterias consideradas flora microbiana normal, utilizadas:

- *Bacillus* spp. (n: 7), Enterobacterias no coliformes (n: 3), *Staphylococcus (Staph.)* spp. (n: 3), *Enterococcus* spp. (n: 1) y *Pseudomonas* spp. (n: 1): cepas pertenecientes al cepario del Laboratorio de Genética Microbiana, aisladas del canal del pezón de vacas Holando Argentino, de la región central de Córdoba, Argentina.

- Bacterias causantes de mastitis bovina, utilizadas:

- *Streptococcus (Strep.) agalactiae* **ATCC27956**, *Strep. dysgalactiae* **ATCC27957**, *Staph. aureus* **ATCC25923**, *Strep. uberis* **102**, *Strep. uberis* **ATCC27958**, *Strep. uberis* **19436**, *Strep. mitis* **ATCC98011**, *Strep. hyicus* **112249**, *Strep. bovis* **ATCC27960**, *Aerococcus viridans* **ATCC11563**, *Ent. faecalis* **19433**, *Ent. faecium* **35667**, *Escherichia (E.) coli* **ATCC35218** y

Klebsiella pneumoneae **ATCC10031**: cepas provistas por la Dra. Odierno (Universidad Nacional de Río Cuarto-Argentina). Además se utilizaron *Staph. aureus* **RC108** (marcada en el laboratorio de Genética Microbiana de la UNRC con resistencia a estreptomicina, derivada de la cepa RC18 aislada de una vaca con mastitis subclínica en un tambo de la región centro-sur de la provincia de Córdoba, Argentina (Reinoso y col., 2002)), *Staphylococcus* coagulasa negativos (SCN) **947,** *E. coli* (cepa de campo) y *Pseudomonas* spp. (cepa de campo): cepas aisladas en el Lab. de Genética Microbiana de la UNRC.

2. Animales de experimentación

Vacas Holando Argentino utilizadas para aislamiento de BL: lactantes, con diferentes números de pariciones y diversos grados de sanidad (sanas, con mastitis subclínica y mastitis clínica).

Vacas Holando Argentino utilizadas para ensayos *in vivo*: lactantes, mayoritariamente sanas (RCS $\leq$ 200.000 cel/ml y bacteriología negativa), en período de lactancia y secado principalmente, con diferente número de pariciones.

3. Medios de cultivos

Caldo Man Rogosa y Sharpe (MRS) (Biokar Diagnostic).

Caldo Tripticasa Soya (TSB) (Britania).

Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) (Oxoid).

Caldo Mueller-Hinton (Britania).

Caldo Rogosa (Biocar).

Medio Rojo Metilo-Voges Proskauer (RM/VP) (Britania).

Agar Citrato de Simons (Britania).

Los medios de cultivo utilizados fueron preparados según las recomendaciones del fabricante y se agregó agar (Britania), a razón de 15 gr/lt, a los caldos cuando fue necesario obtener medios sólidos.

Los medios preparados en el laboratorio fueron elaborados según se describe a continuación:

Medio basal OF de Hugh & Leifson (Britania).

Este medio fue elaborado según las recomendaciones del fabricante y fue necesario preparar una solución madre de azúcar (D(+)-glucosa), al 10% en agua destilada, que se esterilizó por filtración.

Agar sangre de carnero: se agregó sangre de carnero desfibrinada al 5% a un medio de cultivo base TSB agarizado, estéril, fundido y mantenido entre 45-50°C.

Medio BHI modificado:

BHI agar	5,2 g
Azida sódica	0,8 g
Cristal violeta	0,0008 g
Agua destilada	1000 ml

Caldo Nitrato:

Extracto de carne	5 g
Peptona	5 g
KNO_3	1 g
Agua destilada	1000 ml

Caldo Indol:

Peptona de Carne	10 g
Cloruro de Sodio	5 g
Agua Destilada	1000 ml

Agar Tripticasa Soya- Sal (TSA-SAL):

TSA comercial	4 g
Cloruro de Sodio	7 g
Agua Destilada	100 ml

Caldo Cloruro de Sodio (NaCl) 6,5%:

BHI	37 g
NaCl	60 g
Púrpura de bromocresól	0,016 g
Glucosa	10 g
pH	7-7,4

Caldo LAPTg:

Peptona	1,5 g
Triptona	1 g
Glucosa	1 g
Extracto de Levadura	1 g
Tween 80	0,1 ml
pH	6,5
Agua destilada	100 ml

Agar P:

Peptona	10 g
Extracto de Levadura	5 g
NaCl	5 g
Glucosa	1 g

Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

Medio OF modificado:

Peptona o triptona	5 g
NaCl	5 g
Azul de Bromotimol	5 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 ml

4. Medios y soluciones de conservación

Medio leche extracto de levadura (LEL):

Leche descremada	10 g
Extracto de levadura	0,5 g
Glucosa	1 g
Agua destilada	1000 ml

Para su elaboración se adicionaron 0,5 ml de glicerol cada 4,5 ml de LEL.

Solución Protectora:

Leche Descremada Reconstituida (LDR)	20%
Glutamato de sodio	10%

Para su elaboración se prepararon las soluciones en agua destilada estéril y se mezclaron por partes iguales. El Glutamato, se esterilizó por filtración.

Medio Eagl´e Minimal Essential Media (MEM) (Gibco).

Medio de montaje DPX (Merck).

Solución de conservación: caldo TSB/glicerol 20%:

Para su elaboración se adicionaron 200 µl de glicerol cada 800 µl de caldo TSB.

Azidiol: Conservante para Leche.

Anticoagulante (Wiener lab.): usado para la preservación, durante la obtención, del plasma de conejo.

5. Soluciones y reactivos

Solución fisiológica (SF al 0,8/0,9%):

NaCl	0,8/0,9 g
Agua destilada	100 ml

Alcohol (Porta) **70%:**

Alcohol	70 ml
Agua destilada	30 ml

Reactivo para RCS:

Azul de metileno	0,6 g
Alcohol etílico	54 ml
Tetracloroetano	40 ml
Ácido acético glacial	6 ml

Reactivos para la tinción de Gram:

Cristal violeta

Safranina

Lugol

Alcohol 100%

Agua oxigenada.

Reactivos para la prueba de reducción de nitratos:

Reactivo A

α-naftilamina	5 g
Ácido acético (5N) al 30%	1000 ml

Reactivo B

Ácido sulfanílico	8 g
Ácido acético (5N) al 30%	1000 ml

Reactivo de Zinc.

Reactivo de Kovacs (Britania).

Cloroformo (Cicarelli).

Solución de Buffer Fosfato (PBS):

NaCl	8 g
ClK	0,2 g
$NaHPO_4$	1,44 g
KH_2PO_4	0,24 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml
Etanol para llevar a pH	
pH	6,2/7,4

Solución de Azul de Trypan:

PBS	100 ml
Agua tridestilada	1000 ml
Azúl de trypan	5 g

Reactivo para la tinción de Hematoxilina:

Hematoxilina	2 g
Agua destilada	1000 ml

Reactivo para la tinción de Eosina:

Eosina	0,3 g
Ácido acético glacial	0,025 ml
Agua destilada	100 ml

Reactivos para tinción de Gram modificado:

-Solución CB

Stock Cristal violeta

Cristal violeta	1 g
Agua destilada	100 ml

Stock Bicarbonato de Na

Bicarbonato de Na	5 g
Agua destilada	100 ml

Para lograr la solución, mezclar 20 gotas del *stock cristal violeta* cada 5 gotas de *stock bicarbonato de Na*.

-Solución Y

Yodo	1 g
Yoduro de K	2 g
Agua destilada	300 ml

-Solución Fucsina

Fucsina básica	0,25 g
Agua destilada	100 ml

Para lograr la solución, diluir 0,1 ml de la misma en 100 ml de agua destilada.

-Solución PA

Ácido pícrico	0,1 g
Acetona	100 ml

Formaldehído 10%: en PBS 0,1 M pH 7,4.

Glutaraldehydo al 2,5% y 3,16%: en PBS 0,1 M pH 7,4.

Xilol (Cicarelli).

Parafina líquida (Merck).

Éter (Cicarelli).

Acetona (Cicarelli).

Gelatina al 1%:

Gelatina	1 g
Agua destilada	100 ml

Azul de Toluidina:

Azul de toluidina	1 mg

Agua destilada	1000 ml
Buffer fosfato (pH)	5,5

Etanol (Cicarelli).

Entellán (Merck).

Glicerol (Cicarelli).

Solución tampón S-collodine 0,2 M pH 7,4:

S-collodine	2,67 ml
Agua destilada	50 ml
ClH	9 ml
pH	7,4

Para lograr la solución llevarla a 100 ml con agua destilada.

Tetróxido de Osmio 1%: en Buffer Fosfato (PBS) 0,1 M pH 7,4

Resina Epoxi (EMbed 812).

Solución de α-naftol al 5%:

α-naftol	5 g
Alcohol etílico absoluto	100 ml

Solución de Hidróxido de Potasio (KOH) al 40%:

KOH	40 g
Agua destilada	100 ml

Reactivo Rojo de Metilo:

Rojo de metilo	0,1 g
Alcohol etílico	300 ml
Agua destilada	200 ml

Agua de Peptona:

Peptona de Carne	1 g
Agua destilada	1000 ml

Vaspar.

Solución de Hidróxido de Sodio (NaOH) 0,1 N (Cicarelli).

Verde de Malaquita.

Solución de Tetróxido de Osmio (O_sO_4) al 1%: en Buffer Fosfato (PBS) 0,1 M pH 7,4.

Cobertura de oro.

6. Drogas comerciales

Disco comercial con Furazolidona: para la prueba de la furazolidona (Becton Dickinson Argentina).

Disco comercial con Oxalato de p-amino-dimetilanilina: para la prueba de la oxidasa (Lab. Britania).

Discos Millipore de 0,22 µm: para filtrado de Glutamato.

Discos comerciales con oxacilina 1 µg, **eritromicina** 15 µg, **penicilina** 10 UI, **gentamicina** 10 µg y **rifampicina** 5 µg (Lab. Britania); **estreptomicina** 10 µg y **ampicilina/sulbactan** 10/10 µg (Rosco Diagnostics A/S): para la prueba de susceptibilidad a antibióticos de uso veterinario.

Sulfato estreptomicina (Sigma).

Carbonato de Calcio (Britania).

D (+)-glucosa (Merck).

Suspensión intramamaria al secado, Bovigam (Bayer):

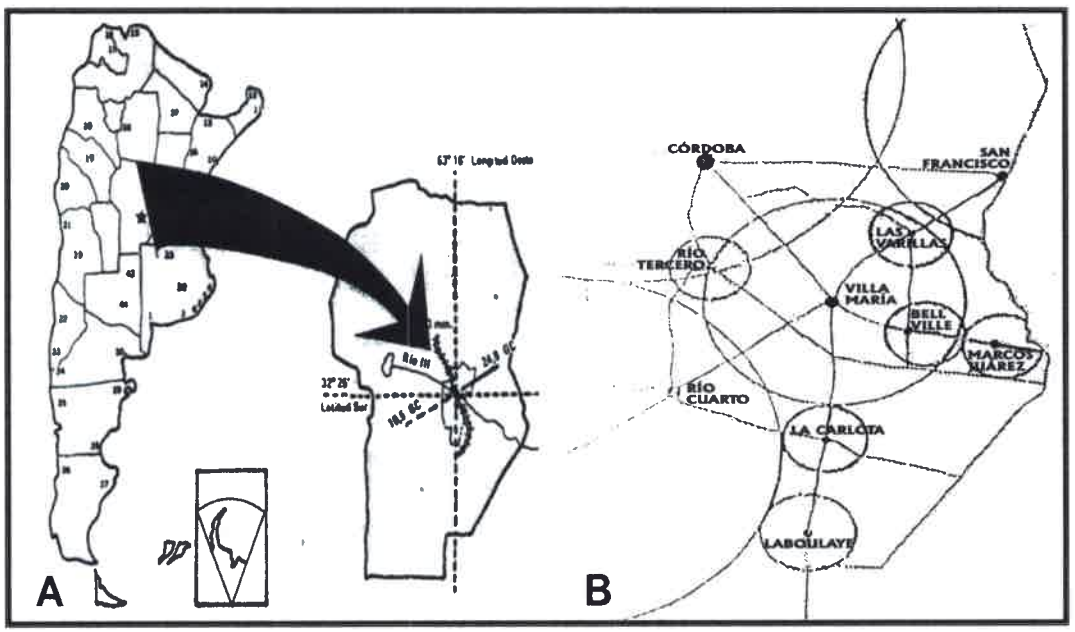
Cloxacilina benzatina	637,9 mg
Ampicilina trihidrato	288,7 mg
Excipientes c.s.p	4,5 g

Métodos

A. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS A PARTIR DE LECHE BOVINA

1. Relevamientos de tambos de la región centro-sur de la provincia de Córdoba

Con el objetivo de aislar bacterias lácticas (BL) con propiedades probióticas se llevó a cabo, durante el período Agosto-Octubre de 2007, el relevamiento de 8 tambos pertenecientes a la cuenca lechera de Villa María, provincia de Córdoba (Figura 8).



Fuente: Domínguez, 1996.

Figura 8: Ubicación geográfica de la cuenca lechera de Villa María. A) Dentro de la Argentina y de la provincia de Córdoba. B) Zona tambera de influencia dentro de la provincia de Córdoba.

Los tambos fueron seleccionados teniendo en cuenta la proximidad a la UNRC, para facilitar el traslado y la toma de muestras, los antecedentes de mastitis bovina y la representatividad de los mismos en la región.

De los tambos, se recolectaron los siguientes datos:

- Ubicación del tambo
- Números de vacas
- Frecuencia de ordeño
- Instalaciones:

- Tanque frío
- Cantidad de hectáreas
- Higiene del lugar

El muestreo fue sistemático y al azar (cada dos vacas se muestreo una), y correspondió a 51 animales en período de lactación. En cada tambo, se analizaron todas las muestras provenientes de vacas con mastitis clínica.

1.1. Toma de muestras y recuento celular somático

Para el aislamiento de las BL, se tomaron muestras de leche compuestas correspondientes a la primera porción de leche (despunte) de los cuatro cuartos mamarios. Las muestras fueron tomadas a 51 vacas en lactación, de tal manera de tener una muestra de leche por vaca muestreada.

Para su recolección se lavaron los pezones con alcohol al 70% y se colocó, en tubo estéril, la primer porción de leche correspondiente a los cuatro cuartos. Las muestras se transportaron refrigeradas al laboratorio para su procesamiento dentro de las 24h posteriores al muestreo.

Del mismo modo, se tomó otra muestra de leche en un segundo tubo estéril (conteniendo como conservante azidiol) para la determinación del recuento celular somático (RCS). Las muestras fueron enviadas, refrigeradas, al laboratorio de diagnóstico veterinario Villa María (propiedad del Médico Veterinario Cesar Bonetto) para su procesamiento, análisis y la determinación del grado de sanidad de cada ubre, mediante fluorocitometría Laser Somacount 300 (Bentley-USA, 1997).

1.2. Diagnóstico de mastitis

Para la detección de los casos de mastitis clínicas y subclínicas se consideraron los siguientes signos y pautas:

- *Mastitis clínica:* coágulos o grumos, sangre y elevado RCS en leche, sumado a anormalidades en la ubre (calor, hinchazón y dolor).
- *Mastitis subclínica:* elevado RCS (> 200.000 cel/ml) y aislamiento de microorganismos patógenos en leche, sin síntomas de anormalidades en la ubre y signos de alteración en la leche.

1.3. Aislamiento e identificación fenotípica de bacterias lácticas

Las muestras de leche compuesta (muestras de cuartos individuales mezcladas en partes iguales) fueron homogeneizadas a temperatura ambiente antes de su procesamiento. Las mismas fueron centrifugadas por 10 minutos a 2600 rpm y los pellet resuspendidos en 500 µl de agua de peptona. Una alícuota (100 µl) de cada muestra de leche compuesta fue sembrada

en profundidad en medio Agar Rogosa y MRS (De Man y col., 1960) para aislamiento de BL e incubadas 24-48h en microaerofilia. De la misma manera 100 µl de cada muestra de leche fueron sembrados, en superficie, en medio BHI modificado para aislamiento de cocos BL e incubados 24-48h a 37°C.

Las colonias aisladas, de aspecto circular, pequeñas, lenticulares, blancas amarillentas y de bordes definidos, fueron suspendidas en caldo MRS e incubadas durante 24-48h a 37°C. Una vez crecidas, se les realizó un fresco y una tinción de Gram. Microorganismos Gram positivos (+) y que no presentaron movilidad fueron sometidos a distintas pruebas metabólicas a fin de poder clasificarlos como BL:

- Producción de Catalasa: las BL son negativas para esta prueba.
- Prueba de Reducción de Nitratos: las BL son negativas para esta prueba.
- Prueba de Indol: las BL son negativas para esta prueba.

1.4. Conservación y envío de bacterias lácticas

Las colonias identificadas como BL fueron inoculadas en 5 ml de caldo MRS e incubadas a 37°C durante 24-48h. Los caldos con crecimiento bacteriano fueron centrifugados a 3000 rpm durante 20 minutos y los pellet obtenidos, se resuspendieron en 2 ml de medio LEL con glicerol al 11%. Cada suspensión se homogenizó y se fraccionó en crioviales individuales que fueron congelados y conservados a -20°C.

Las BL congeladas, fueron enviadas al CERELA-Tucumán a fin de completar la caracterización para considerarlas como BL potencialmente probióticas. Los estudios de caracterización realizados fueron:

- Estudios de propiedades superficiales: auto-agregación e hidrofobicidad.
- Estudios de propiedades antagónicas: producción de peróxido de hidrógeno, producción de sustancias antimicrobianas en sobrenadante de cultivo bacteriano (bacteriocinas) e inhibición a patógenos.

En función a estos estudios, las cepas que presentaron alguna propiedad probiótica fueron tipificadas. Las metodologías empleadas para la realización de ambos estudios, se encuentran descriptas en el trabajo publicado por Espeche y col. (2009).

1.5. Liofilización de cepas potencialmente probióticas enviadas desde el CERELA-Tucumán

Con la finalidad de confirmar la viabilidad y pureza de las cepas enviadas, las BL potencialmente probióticas fueron sometidas a distintas pruebas fenotípicas de rutina, tal como se mencionó anteriormente en el inciso 1.3. de esta sección. Además, se las conservó en medio LEL a -20°C, como se mencionara en el inciso 1.4. de esta sección y se las liofilizó para

favorecer su conservación y preservación. Para la liofilización, las cepas conservadas dentro de crioviales con medio LEL, fueron activadas mediante tres repiques sucesivos (de 200 µl cada uno) en 5 ml de caldo MRS e incubadas a 37ºC durante 18h. El último repique se llevó a cabo por cuadriplicado. Los caldos fueron centrifugados a 3000 rpm durante 20 minutos y los pellet resuspendidos, homogeneizados y concentrados 20 veces en una Solución Protectora, hasta un volumen final de 1 ml. Posteriormente, cada tubo se fraccionó en 2 ampollas de liofilización conteniendo 500 µl c/u. Las ampollas fueron colocadas en el recipiente o mamadera de liofilización y se las sometió durante 20 minutos a 4ºC, y luego 90 minutos a -20ºC. Finalmente las ampollas se liofilizaron un día y medio, se sellaron con soplete y fueron conservadas a temperatura ambiente, en un lugar fresco y seco.

B. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS PERTENECIENTES A LA FLORA MICROBIANA NORMAL DEL CANAL DEL PEZÓN BOVINO

1. Relevamiento de un tambo de la región central de la provincia de Córdoba

Con el objetivo de aislar microorganismos considerados habitantes normales del canal del pezón bovino para estudiar su comportamiento frente a las BL previamente aisladas, se llevó a cabo, durante el mes de Julio de 2008, el relevamiento de un tambo localizado en la región central de la provincia de Córdoba. El tambo fue seleccionado teniendo en cuenta la proximidad a la UNRC, para facilitar el traslado y la toma de muestras, los antecedentes de mastitis bovina y la representatividad del mismo en la región.

Del tambo, se recolectaron los siguientes datos:

- Ubicación del tambo
- Número de vacas
- Frecuencia de ordeño
- Instalaciones:
  - Tanque frío
  - Cantidad de hectáreas
- Higiene del lugar

El muestreo fue sistemático y al azar, al 25% de las vacas en lactación que se encontraban próximas al período seco (a un mes de su parición).

1.1. Toma de muestra

Para realizar el aislamiento de las bacterias pertenecientes a la flora microbiana normal del canal del pezón bovino, se tomaron muestras de raspado de pezón y de leche (foremilk) de los

cuatro cuartos mamarios de 25 vacas en período de lactación, próximas a su parición (entre el octavo y noveno mes de preñez). Antes de la toma de muestras, se desinfectó el esfínter de cada pezón con alcohol al 70%. Se usaron hisopos estériles individuales, que se introdujeron de 5 a 7 mm dentro del canal del pezón (Gill y col., 2006) y se realizaron movimientos rotatorios para tomar muestras pre-ordeño. Cada hisopo se depositó en tubos estériles para bacteriología, conteniendo 1 ml de agua de peptona y se transportaron refrigerados al laboratorio para su procesamiento dentro de las 24h posteriores al muestreo.

Adicionalmente, se realizó la prueba de California Mastitis Test (CMT) a partir del primer chorro de leche de cada cuarto mamario, para estimar la sanidad de la ubre. Se colocaron aproximadamente 2 ml de leche de cada cuarto muestreado en una paleta comercial y se mezclaron en partes iguales con una solución detergente. Como la leche de los cuartos infectados forma un gel al agregar el detergente, como consecuencia de la lisis de las células somáticas allí presentes, este test permite estimar de manera sencilla el contenido de ADN en la leche. Es así que, mientras más ADN hay en la muestra más elevada es la viscosidad del gel que se evalúa visualmente asignándole valores de trazas, 1, 2 y 3. En la Tabla 3, se observa que la reacción está directamente relacionada con el número de células somáticas presentes en la leche, lo que nos da un indicio, aproximado, de la presencia o no de una respuesta inflamatoria en la glándula mamaria.

Tabla 3. Interpretación de resultados de la prueba de California Mastitis Test.

Interpretación	Reacción	Número de células somáticas/ml. de leche
Negativo	Sin evidencia	0 - 200.000
Trazas	Precipitación leve	150.000 - 500.000
1	Sin formación de gel	400.000 - 1.500.000
2	Mezcla espesa	800.000 - 5.000.000
3	Formación de pico central	Más de 5.000.000

Fuente: modificado de Saran y Chaffer, 2000.

1.2. Aislamiento y caracterización bacteriológica

Antes de realizar el análisis bacteriológico, las muestras refrigeradas de raspado de canal del pezón (n: 100) fueron homogeneizadas y llevadas a temperatura ambiente. Se extrajeron cada uno de los hisopos de los tubos de ensayos, escurriendo su excedente contra las paredes del tubo y alícuotas de 100 µl y 50 µl, de cada muestra tomada, fueron sembradas por diseminación en placas de agar TSA-Ca^{++} al 0,1% y agar sangre de carnero al 5%, respectivamente. Las placas fueron incubadas a 37°C y examinadas dentro de 24-48h para determinación de morfología colonial, cuantificación y patrón hemolítico. Se realizó una identificación presuntiva y cuantificación (ufc/placa) de las colonias crecidas en placas de agar

TSA-Ca^{++}, sobre la base de la morfología y apariencia de la colonia, y una determinación del patrón hemolítico de estas colonias crecidas en placas de agar sangre. A cada colonia representativa se le realizó la tinción de Gram y se la clasificó, en un primer momento, en cocos y bacilos Gram positivo (+) y Gram negativo (-), para luego continuar con las pruebas bioquímicas correspondientes y así lograr una diferenciación más exhaustiva (Figura 9).

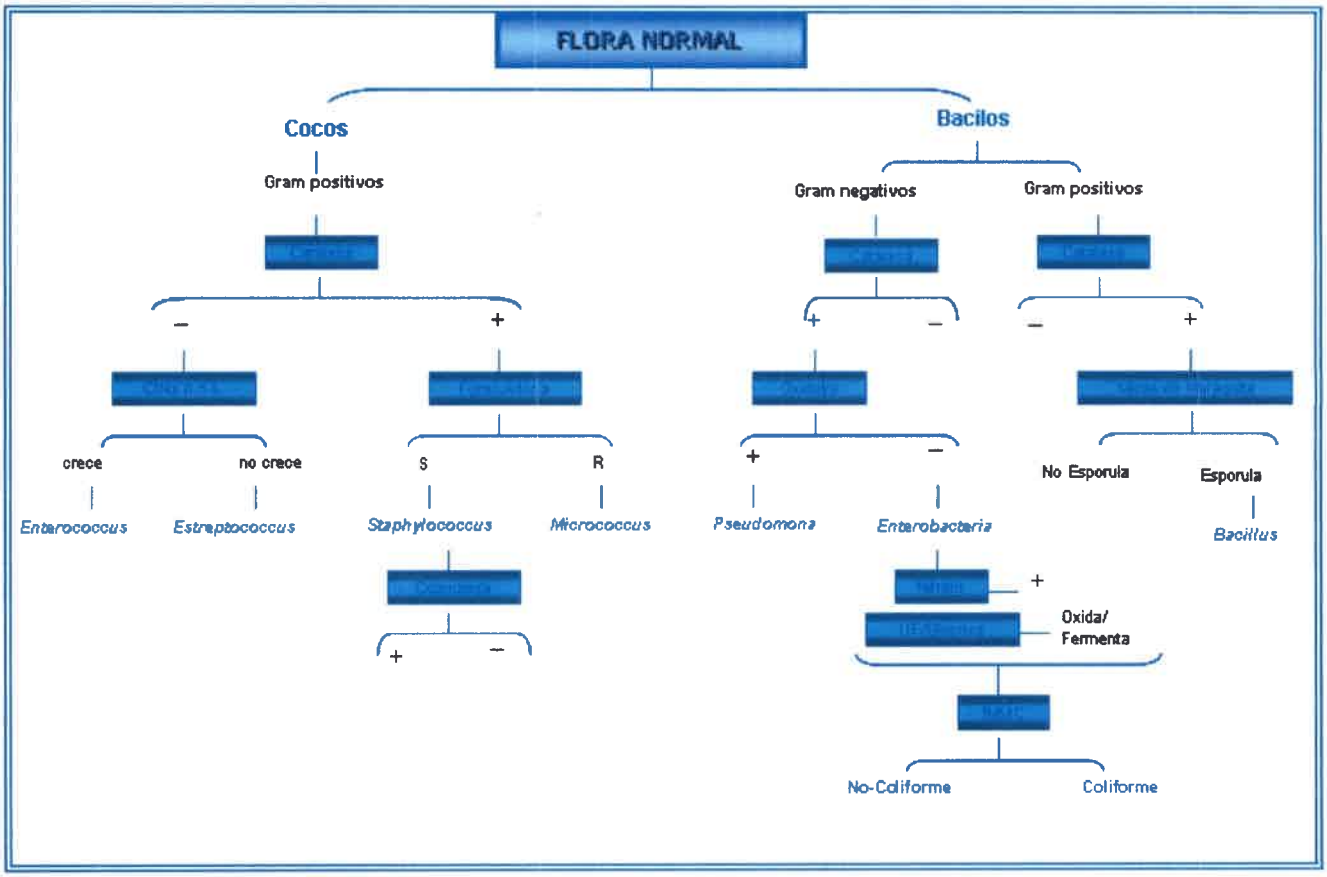


Figura 9: Esquema de tipificación para la identificación, en géneros y grupo, de bacterias pertenecientes a la flora microbiana normal; aislada de muestras de raspado de canal de pezón bovino pertenecientes a 25 vacas lactantes de la región central de la provincia de Córdoba. R: resistente; S: sensible; +: resultado positivo; -: resultados negativo.

1.3. Conservación de cepas

Las colonias más representativas (identificadas fenotipicamente), fueron congeladas y conservadas a -20°C en caldo TSB con glicerol al 20%.

C. ESTUDIOS *IN VITRO* CON BACTERIAS LACTICAS AISLADAS DE TAMBOS DE LAS PROVINCIAS DE CÓRDOBA Y TUCUMÁN, Y CARACTERIZADAS COMO POTENCIALMENTE PROBIÓTICAS

Para determinar capacidades de exclusión a microorganismos y adherencia a células del pezón, se realizaron los siguientes ensayos: ensayos de inhibición, de co-agregación, de adhesión y de auto-inhibición.

1. Ensayos de inhibición

1.1. Bacterias lácticas vs bacterias consideradas flora microbiana normal

Para este ensayo se trabajó con 12 BL potencialmente probióticas aisladas de leche de vacas de tambos de las provincias de Córdoba y Tucumán: *Ent. hirae* CRL 1837, *Ent. hirae* CRL 1835, *Ent. hirae* CRL 1834, *Ent. hirae* 7-3, *W. cibaria* CRL 1840, *W. cibaria* CRL 1833, *P. pentosaceus* CRL 1832 y *P. pentosaceus* CRL 1831 (aisladas en tambos de Córdoba, sección A) (Espeche-Pellegrino y col., 2012), y *L. perolens* CRL 1724, *L. plantarum* CRL 1716, *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 y *Ent. mundtii* CRL 1656 (aisladas en tambos de Tucumán por integrantes del CERELA-CONICET) (Espeche y col., 2009). Estas 12 BL fueron enfrentadas a 15 cepas consideradas flora microbiana normal del canal del pezón bovino, aisladas en tambos de Córdoba (sección B): *Bacillus* spp. (n: 7), Enterobacterias no coliformes (n: 3), *Staphylococcus* spp. (n: 3), *Enterococcus* spp. (n: 1) y *Pseudomonas* spp. (n: 1).

Técnica de estrías cruzadas

Se determinó la actividad antimicrobiana de cada una de las 12 BL mencionadas frente a las 15 cepas consideradas flora microbiana normal, mediante la técnica de estrías cruzadas en placas descripta por Barberis y col. (1997) y Hütt y col. (2006), con algunas modificaciones.
Cada BL fue probada de forma individual de la siguiente manera:

- Activación: se inoculó un tubo de 5 ml de caldo MRS con 200 µl de la BL, conservada previamente a -20°C en medio LEL, y se incubó a 37°C en aerobiosis por 18h. Posteriormente se realizaron dos repiques más, bajo las mismas condiciones mencionadas.
- Siembra de la BL: a partir del último repique activo, se tomó un inóculo con ansa calibrada y se sembró en placas de agar MRS al 1,2% realizando una estría central (vertical). Las placas se incubaron en microaerofilia a 37°C durante 24-48h y la cepa se inactivó con 1 ml de vapores de cloroformo durante 20 minutos.
- Siembra de la flora: se realizaron, por duplicado, estrías perpendiculares a la estría de siembra de la BL con cada una de las 15 cepas considerados flora microbiana normal del canal del pezón, previamente crecidas en 2 ml de caldo TSB a 37°C durante 18h en aerobiosis (título

aproximado de 10^8-10^9 ufc/ml). De esta manera, cada placa presentó una estría central de la BL, contra dos, tres o cuatro estrías perpendiculares de las cepas consideradas flora microbiana normal. Finalmente, las placas fueron incubadas a 37°C en aerobiosis durante 24h.

- Interpretación de resultados: los halos de inhibición (mm) del crecimiento bacteriano (distancia entre la estría horizontal y vertical sin crecimiento) fueron medidos considerando como: un efecto inhibitorio alto (+++), cuando el diámetro superó los 25 mm, intermedio (++) cuando fue de 13-25 mm, bajo (+) cuando estuvo entre 1-12 mm y nulo o no inhibitorio (-), cuando fue 0 mm. Este ensayo fue realizado por duplicado.

1.2. Bacterias lácticas vs bacterias causantes de mastitis bovina

Del mismo modo que en el ensayo *in vitro* anterior se evaluó por duplicado y mediante la técnica de estrías cruzadas (inciso 1.1. de esta sección), el comportamiento de las 12 BL frente a 16 bacterias causantes de mastitis bovina: *Strep. agalactiae* ATCC27956, *Strep. dysgalactiae* ATCC27957, *Staph. aureus* RC108, *Staph. aureus* ATCC25923, SCN 947, *Strep. uberis* 102, *Strep. uberis* ATCC27958, *Strep. uberis* 19436, *Strep. hyicus* 112249, *Strep. bovis* ATCC27960, *Ent. faecalis* 19433, *Ent. faecium* 35667, *Pseudomonas* spp., *E. coli*, *E. coli* ATCC35218 y *Klebsiella pneumoneae* ATCC10031; todas pertenecientes al cepario del Lab. de Genética Microbiana y en su mayoría aisladas de vacas con mastitis, provenientes de tambos de la cuenca lechera de la región centro-sur de la provincia de Córdoba. Además, se analizó la actividad inhibitoria de las BL frente a *Strep. mitis* ATCC98011 y *Aerococcus viridans* ATCC11563, dos cepas consideradas como agentes causales infrecuentes de mastitis bovina.

2. Ensayo de co-agregación

Para evaluar la interacción entre las 12 BL y las 18 bacterias causantes de mastitis bovina, mencionadas en los incisos anteriores, se siguió la metodología descrita por Reid y col. (1990) y Boris y col. (1998).

Cada BL fue probada de forma individual de la siguiente manera:

- Activación y lavado de la BL: la cepa BL, conservada en medio LEL a -20°C y activadas mediante tres repiques sucesivos en 5 ml de medio MRS a 37°C en aerobiosis durante 18h, fue lavada por centrifugación a 3000 rpm durante 15 minutos y ajustada a una concentración de 10^9 ufc/ml en 5 ml de PBS 1 M pH 6,2, antes del ensayo de co-agregación.

- Crecimiento de las bacterias causantes de mastitis: colonias aisladas de las diferentes cepas causales de mastitis fueron cultivadas de manera individual en 2 ml de caldo TSB en baño con agitación (100 rpm/minutos) durante 18-20h a 37°C hasta lograr una concentración de 10^9 ufc/ml.

- Mezcla de alícuotas: una alícuota de 500 µl de cada bacteria causante de mastitis, previamente lavada y resuspendida en PBS 1 M pH 6,2, fue mezclada con igual volumen de BL e incubada a 37°C durante 4h en baño con agitación (100 rpm/minutos). Un frotis de la suspensión fue teñido con Gram, por duplicado, y las muestras observadas bajo microscopio óptico.

- Interpretación de resultados: se consideró co-agregación positiva cuando las colonias de BL se observaron unidas a las bacterias causantes de mastitis y co-agregación negativa cuando ambos microorganismos se observaron en estado libre (Reid y col., 1990). Además, se informó como resultado 0 (-), cuando hubo ausencia de co-agregación en 5 campos observados al azar y como resultado 1 (+), 2 (++) y 3 (+++) cuando hubo presencia de co-agregación en 1, 2 o 3 y 4 o 5 campos de cinco observados al azar, respectivamente.

3. Ensayo de adhesión

La adherencia *in vitro* de las 12 BL, mencionadas en el inciso 1.1. de esta sección, frente a células epiteliales mamarias aisladas del canal y la cisterna del pezón bovino fue realizada siguiendo la metodología detallada a continuación:

3.1. Condiciones de cultivo

La cepa BL, conservadas en medio LEL a -20°C, fue activada mediante tres repiques sucesivos en 5 ml de medio MRS a 37°C en aerobiosis durante 18h, antes del ensayo de adhesión.

3.2. Aislamiento de células epiteliales del canal y la cisterna del pezón

Luego de desinfectar el esfínter del pezón con alcohol al 70%, las células epiteliales del canal y la cisterna del pezón bovino fueron aisladas en condiciones de esterilidad. Para este fin se raspó la pared del canal y de la cisterna, utilizando un cepillo citológico Medibrush XL (Medical Engineering Co. S.A, C.A. Bs. As. Argentina), Figura 10. Las células contenidas en el cepillo fueron sumergidas y depositadas en 1 ml de medio MEM a pH 7 y refrigeradas a 4°C hasta el ensayo de adhesión.

Figura 10: Representación gráfica del material necesario para el aislamiento de células epiteliales del canal y la cisterna del pezón bovino. Pezones mamarios bovinos y cepillos citológicos.

3.3. Preparación de la suspensión bacteriana y celular

Previamente al ensayo de adhesión, las suspensiones bacterianas y celulares fueron estandarizadas de la siguiente manera: el último repique de cada BL fue centrifugado a 3000 rpm durante 15 minutos y el pellet obtenido fue lavado dos veces en 5 ml de solución fisiológica al 0,8% y una vez en 5 ml de medio MEM a pH 7. Este último pellet fue finalmente resuspendido en medio MEM, de manera tal de lograr una concentración final de 10^7 ufc/ml de cada BL.

Por otro lado, las células epiteliales fueron lavadas para eliminar las bacterias contaminantes que pudieran haber sido aisladas conjuntamente con ellas, antes del ensayo de adhesión. Con este fin, las células epiteliales resuspendidas en 1 ml de medio MEM, fueron centrifugadas a 800 rpm durante 10 minutos, a temperatura ambiente. Luego de descartar el sobrenadante, el pellet restante, fue resuspendido en 10 ml de medio MEM y lavado tres veces bajo las mismas condiciones mencionadas. Finalmente, este último pellet, fue resuspendido en 2 ml de medio MEM de tal manera de alcanzar una concentración aproximada de 10^5 células vivas/ml.

Para lograr diferenciar correctamente las células epiteliales vivas de las muertas, 1 ml de las células epiteliales lavadas y resuspendidas en MEM, fue mezclado con 1 ml de una solución de Azúl de Trypan. Dicha mezcla fue homogeneizada por pipeteo y montada sobre una cámara de Neubauer para realizar el conteo celular, bajo microscopio óptico, y verificar la completa eliminación de las bacterias contaminantes.

3.4. Determinación del porcentaje e índice de adhesión

Para este ensayo, 500 µl de cada suspensión bacteriana (10^7 bacterias/ml), se añadieron a un microtubo con 500 µl de suspensión de células epiteliales (10^5 células/ml). Esta mezcla de 1 ml fue incubada a 37°C durante 1h en condiciones de baja agitación.

Por otro lado, dos muestras controles fueron preparadas. En una de ellas se sustituyó la alícuota de suspensión bacteriana por medio MEM y en la otra se sustituyó la alícuota de suspensión celular por medio MEM. El experimento fue realizado por duplicado para cada microorganismo.

Luego de la incubación, las bacterias no adheridas fueron removidas por centrifugación a 800 rpm durante 10 minutos, descartando el sobrenadante de la mezcla. El pellet restante, fue resuspendido en 1 ml de medio MEM y lavado tres veces en el mismo medio, bajo las condiciones antes mencionadas. El pellet lavado, fue resuspendido en 1 ml de medio MEM y una alícuota de esta solución fue teñida con Hematoxilina-Eosina (H-E), para visualizar mejor el núcleo y el citoplasma de las células epiteliales aisladas y con Gram para su examinación bajo el microscopio óptico.

Para la tinción con H-E, las muestras fueron primero coloreadas con Hematoxilina (para tinción nuclear, durante 2 minutos), luego lavadas con agua corriente 2 minutos, con agua destilada 2 minutos más y finalmente coloreadas con Eosina 0,5% (para tinción citoplasmática, durante 15-30 segundos) y lavadas con agua destilada durante dos minutos. La deshidratación se realizó con etanol 96% durante 2 minutos, etanol absoluto 2 veces (5 minutos por vez) y xilol 2 veces (5 minutos cada vez) para aclarar la muestra. Por último se las cubrió con un cubre objetos y se lo pegó con una sustancia adhesiva (Entellán), para observarlos al microscopio óptico.

El número total de células epiteliales, las células asociadas a bacterias y las bacterias adheridas a las células, fueron cuantificados a partir de la tinción de Gram. Los resultados obtenidos fueron expresados de la siguiente manera:

a) Porcentaje de adhesión: número de células epiteliales con bacterias adheridas, dividido por el número total de células epiteliales observadas, x 100. En 20 campos observados.

b) Índice de adhesión: número total de bacterias adheridas a las células epiteliales, dividido por el número de células con bacterias adheridas. En 20 campos observados.

La aplicación de estos dos parámetros permitió evaluar la eficiencia de adhesión de cada BL a las células epiteliales mamarias bovinas.

3.5. Microscopía electrónica de barrido

La microscopía electrónica de barrido fue aplicada para determinar y confirmar la adhesión de la BL a las células epiteliales mamarias bovinas. El método aplicado fue el descripto por

Otero y Nader Macías (2007), con algunas modificaciones, y el ensayo de adhesión fue realizado como se describió anteriormente (inciso 3.4. de esta sección), incluyendo los controles correspondientes.

Una vez removidas las bacterias no adheridas a las células epiteliales mamarias bovinas, el pellet de BL con células adheridas fue fijado con una solución de glutaraldehydo al 2,5% (5 veces el volumen del pellet) e incubado por 4h a 4°C. Del mismo modo se trató a las muestras controles. El volumen de solución de fijación utilizado fue 5 veces superior al tamaño del pellet y las muestras fueron homogeneizadas constantemente, para facilitar el contacto del pellet con el glutaraldehydo, durante el tiempo de incubación a temperatura de refrigeración.

Una vez que las muestras fueron fijadas, se descartó el sobrenadante por centrifugación a 1000 rpm durante 10 minutos y se resuspendieron los pellets en buffer fosfato a pH 7,4. Las muestras fueron centrifugadas bajo las mismas condiciones antes mencionadas y se repitió el procedimiento por segunda vez, con el fin de lograr la correcta eliminación del glutaraldehydo. Posteriormente los pellets fueron resuspendidos en 900 µl de glutaraldehydo 3,16% y conservados a 4°C hasta la post-fijación.

Finalmente las muestras fueron separadas del glutaraldehydo, mediante dos centrifugaciones a 1000 rpm durante 10 minutos, y fijadas nuevamente (post-fijación) con O_sO_4 al 1%. Una vez finalizadas las fijaciones, las muestras fueron deshidratadas con concentraciones crecientes de alcohol-acetona, secadas hasta su punto crítico, montadas y cubiertas con oro para su examinación bajo un microscopio electrónico de barrido Joel JSM35CF.

4. Ensayo de auto-inhibición

4.1. Bacterias lácticas vs bacterias lácticas

Para este ensayo se trabajó nuevamente con las ya mencionadas 12 BL potencialmente probióticas. En esta ocasión las BL fueron enfrentadas entre sí mediante la técnica de estrías cruzadas en placas, previamente descripta en el inciso 1.1. de esta sección, para poder determinar las potenciales cepas capaces de formar parte de la formulación del producto probiótico.

D. FORMULACIÓN DE UN PRODUCTO PROBIÓTICO EN BASE A LA SELECCIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS Y ESTUDIO DE SU COMPORTAMIENTO POR ENSAYOS *IN VITRO* E *IN VIVO*

Para desarrollar y evaluar la formulación probiótica, se realizaron diferentes ensayos *in vitro* e *in vivo* en establecimientos lecheros de la región.

1. Estudios *in vitro* con bacterias lácticas seleccionadas: comportamiento inhibitorio conjunto

Se estudió la capacidad conjunta de las BL seleccionadas: *Ent. hirae* CRL 1835, *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 y *L. perolens* CRL 1724 para inhibir *in vitro* a uno de los principales microorganismos patógenos contagiosos causantes de mastitis bovina, *Staph. aureus*. Para ello se empleó la cepa de colección, *Staph. aureus* ATCC25923.

1.1. Co-incubación

- Activación y lavado de las BL: una alícuota de 200 µl de *Ent. hirae* CRL 1835, *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 y *L. perolens* CRL 1724 conservados en medio LEL con glicerol a -20°C, fueron activados mediante tres repiques sucesivos en 5 ml de medio MRS a 37°C en aerobiosis durante 18h, de manera tal de alcanzar una concentración aproximada de 2.10^8 ufc/ml para cada uno, por separado. Las bacterias crecidas fueron lavadas por centrifugación a 3000 rpm durante 15 minutos y una vez descartado el sobrenadante, los pellets individuales de cada BL se resuspendieron y homogeneizaron con 5 ml de SF. Luego se realizaron diluciones en SF de manera tal de alcanzar concentraciones de 2.10^6 ufc/ml para cada BL. Partes iguales de cada dilución fueron mezcladas hasta lograr un volumen de 30 ml con 6.10^6 ufc/ml de las 3 BL, que fue conservado a 4°C, hasta el ensayo de co-incubación.

- Crecimiento de la bacteria causante de mastitis: un cultivo de toda la noche de *Staph. aureus* ATCC25923, crecido en 2 ml de TSB a 37°C, fue lavado por centrifugación a 3000 rpm durante 15 minutos y una vez descartado el sobrenadante el pellet fue resuspendido y diluido en SF hasta alcanzar una concentración de 3.10^6 ufc/ml, aproximadamente. Esta dilución fue conservada a 4°C, hasta el ensayo de co-incubación.

- Co-incubación: para el ensayo de co-incubación, 1 ml de 6.10^6 ufc/ml de las 3 BL y 3.10^6 ufc/ml de *Staph. aureus* ATCC25923 fueron colocados en 50 ml de caldo MRS e incubados durante 24h a 37°C. Durante este tiempo se fueron tomando alícuotas de 100 µl de medio con crecimiento, a diferentes tiempos y cada dos horas aproximadamente (T0, T2, T4, T6, T8, T12, T24), para determinar el título de *Staph. aureus* ATCC25923. Con este fin, diferentes diluciones realizadas en SF estéril y sembradas en agar selectivo TSA-SAL, fueron incubadas a 37°C

durante 24h. Este novedoso medio selectivo fue elaborado en nuestro laboratorio para determinar las ufc/ml de *Staph. aureus* ATCC25923. Al término del ensayo (T24), las diferentes diluciones también fueron sembradas en medio agar MRS para realizar recuento total de las 3 BL utilizadas.

Como control negativo, 1 ml de 3.10^6 ufc/ml de *Staph. aureus* ATCC25923 fue colocado en 50 ml de caldo MRS e incubado a 37°C durante el tiempo que duró el ensayo. Además, este medio con crecimiento fue titulado a diferentes tiempos y sembrado en medio TSA-SAL y MRS tal como se detalló anteriormente.

Al término del ensayo (T24) se midió el pH del medio del co-cultivo y el cultivo control.

1.2. Técnica de estrías perpendiculares

Cada una de las 3 cepas BL seleccionadas fue tratada de forma independiente, mediante la metodología empleada por Mulet Powell y col. (1998) y Ruiz y col. (2009).

- Activación: se inoculó un tubo de 5 ml de caldo MRS con 200 µl de cada BL, conservada previamente a -20°C en medio LEL, y se incubó a 37°C en aerobiosis por 18h. Posteriormente, se realizaron dos repiques más bajo las mismas condiciones mencionadas.

- Siembra de las BL: a partir del último repique, se tomó un inóculo con ansa calibrada y se sembró en placas de agar MRS al 1,2% realizando una estría vertical, con una de las BL, y otra horizontal, con otra de las BL. En total se utilizaron tres placas de manera tal de estudiar el comportamiento entre las 3 BL previamente seleccionadas. Las placas se incubaron en microaerofilia a 37°C durante 24-48h y las BL crecidas se inactivaron con 1 ml de vapores de cloroformo durante 20 minutos, aireándose 10 minutos.

- Siembra de la bacteria causante de mastitis: una suspensión de *Staph. aureus* ATCC25923, crecido previamente en 2 ml de TSB a 37°C durante 24h, fue diluida en 5 ml de SF estéril de manera tal de alcanzar una turbidez equivalente al tuvo N° 0,5 de la escala de McFarland ($1,5.10^8$ ufc/ml). Esta suspensión fue sembrada con hisopo estéril y se extendió en varias direcciones en el espacio comprendido entre las dos estrías de las BL. Por último, las placas se incubaron a 37°C, 24h en aerobiosis.

- Interpretación de resultados: a continuación se observaron las zonas de difusión de las sustancias antimicrobianas producidas por ambas BL (Figura 11), interpretándose como Sinergismo (Figura 11a) cuando la zona de inhibición del crecimiento bacteriano donde difunden las dos sustancias antimicrobianas es mayor que la inhibición del crecimiento bacteriano donde actúan las sustancias antimicrobianas en forma independiente; Antagonismo (Figura 11b) cuando en el ángulo donde difunden las dos sustancias antimicrobianas se observa la formación de una cuña de crecimiento bacteriano e Indiferencia (Figura 11c) cuando

en el ángulo de difusión de las sustancias antimicrobianas los halos de inhibición son iguales a los halos en forma independiente. Los experimentos fueron llevados a cabo por duplicado.

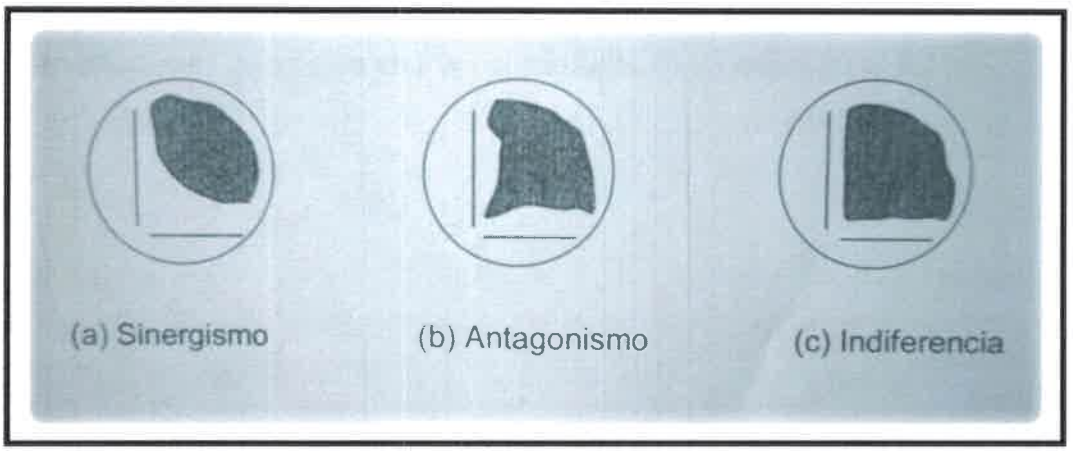


Figura 11: Representación esquemática para interpretar la interacción entre las bacterias lácticas (líneas negras verticales y horizontales) y el microorganismo patógeno causante de mastitis bovina (nube oscura). A) Sinergismo; B) Antagonismo; C) Indiferencia.

2. Liofilización de las bacterias lácticas seleccionadas

Con la finalidad de reacondicionar las cepas y asegurarnos una mejor conservación de las BL seleccionadas, en el tiempo, se llevó a cabo la metodología de liofilización ya descrita en el inciso 1.5. de la sección A.

3. Estudios *in vivo* con bacterias lácticas seleccionadas: comportamiento individual

3.1. Estudio de tolerancia

Con la finalidad de determinar si una dosis y concentración definida de 3 cepas potencialmente probióticas: *Ent. hirae* CRL 1835, *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 y *L. perolens* CRL 1724 (inoculadas dentro del canal del pezón bovino) podrían generar algún efecto o reacción indeseada en la glándula mamaria bovina, se plantea un ensayo de inoculación intramamario a campo en vacas lactantes y en período seco. En este ensayo, se buscó poder definir el título adecuado de cada una de las tres BL que no fuese capaz de generar ningún cuadro aparente de inflamación o alteración en la glándula mamaria bovina y recuperar individualmente a las BL inoculadas en el tiempo.

Animales utilizados en el ensayo

Se trabajó con cuatro vacas Holando Argentino, pertenecientes a un tambo de la región centro-sur de la provincia de Córdoba (granja experimental SIQUÉM, Figura 12), dos en

período de lactancia y dos en período de secado (octavo-noveno mes de preñez). Las vacas en período de lactancia fueron ordeñadas una vez al día.

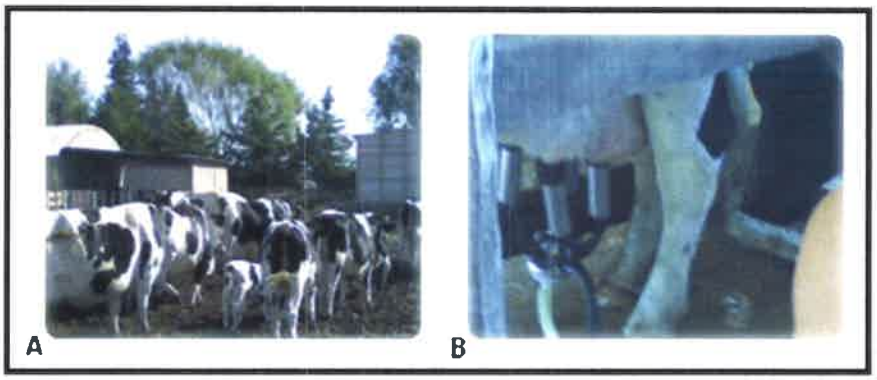


Figura 12: Fotografía representativa de la granja experimental SIQUÉM. A) Vacas Holando Argentino camino a la manga de ordeño. B) Máquina de ordeño automática.

Preparación del inóculo, dosis y técnica de inoculación

Inóculo

Una alícuota de 200 µl de *Ent. hirae* CRL 1835, *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 y *L. perolens* CRL 1724 conservados en medio LEL con glicerol a -20°C, fueron activados mediante tres repiques sucesivos en 5 ml de medio MRS a 37°C en aerobiosis durante 18h, de tal manera de alcanzar una concentración aproximada de 2.10^8 ufc/ml para cada una, por separado.

Cinco caldos de 5 ml de medio MRS, correspondientes al último repique activo de cada BL, fueron centrifugados a 3000 rpm durante 15 minutos. Una vez descartado el sobrenadante, los pellets individuales de cada BL se resuspendieron y homogeneizaron en SF de tal manera de lograr distintas concentraciones para inocular: 2.10^9 ufc/ml, 2.10^6 ufc/ml y 2.10^3 ufc/ml de *L. perolens* CRL 1724; 2.10^6 ufc/ml de *Ent. hirae* CRL 1835 y 2.10^6 ufc/ml de *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655, que fueron homogenizadas, fraccionadas en frascos estériles y almacenadas a 4°C.

Las distintas concentraciones fueron tituladas antes de su traslado (refrigerado) al campo para confirmar, viabilidad, concentración y pureza.

Dosis

En primer lugar, dos de las vacas (una en período lactante y otra en período seco) fueron inoculadas por única vez con 1 mililitro de 2.10^9 ufc/ml, 2.10^6 ufc/ml y 2.10^3 ufc/ml de *L. perolens* CRL 1724 en 3 de los cuatro cuartos mamarios, respectivamente. El cuarto restante de cada vaca no fue inoculado y fue considerado como control negativo.

En segundo lugar, los restantes animales fueron inoculados por única vez con dosis de 1 mililitro de 2.10^6 ufc/ml de *Ent. hirae* CRL 1835 y 2.10^6 ufc/ml de *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 en 2 de los cuatro cuartos mamarios de cada animal. Es decir, dos cuartos de cada vaca fueron inoculados con cada BL, dejando un tercero sin inocular (considerado control negativo). El cuarto restante, se encontraba infuncional.

Técnica y tiempo de inoculación

Previo a la inoculación de las vacas, fue necesario higienizar los cuatro cuartos mamarios de cada animal. Con este fin la totalidad de los mismos fue lavado, desinfectado con alcohol al 70% y secado con papel absorbente. Por otro lado, a fin de evitar posibles lesiones en los cuartos tratados, cada dosis fue introducida por vía intramamaria a una profundidad de 17 mm (dentro del canal de cada cuarto) mediante el empleo de una jeringa sin aguja (Ryan y col., 1999a; Crispie y col., 2008). Seguidamente los pezones fueron masajeados suavemente con la finalidad de favorecer el ascenso de la dosis. Todas las concentraciones o títulos fueron infundidos el día cero (D0) del comienzo del ensayo y post-ordeño, tal como se muestra en el esquema del ensayo de inoculación, Figura 13.

Recuperación y análisis de las bacterias lácticas seleccionadas

Toma de muestras

Como se mencionó anteriormente, los cuatro cuartos mamarios fueron higienizados con alcohol al 70% y secados con papel absorbente cada vez que se visitó el tambo para realizar la toma de muestras. Las mismas fueron colectadas en frascos estériles y transportadas refrigeradas al laboratorio para su procesamiento dentro de un lapso no superior a 3h, a fin de realizarles los estudios pertinentes para verificar la sanidad de cada cuarto mamario (RCS y análisis bacteriológico).

Siguiendo la metodología mencionada en el párrafo anterior, dos días antes y el día del comienzo del ensayo (D-2 y D0, respectivamente) se tomó una muestra de despunte (primer chorro de leche o foremilk) pre-ordeño de los cuatro cuartos mamarios de cada animal para confirmar la sanidad de los mismos y para registrar la presencia o no de BL de cada vaca. Estas muestras se trasladaron en frascos estériles y refrigerados al laboratorio para su procesamiento.

En lo que respecta a la frecuencia de muestreo, los días posteriores a la inoculación (D1, 2, 3, 6 y 7) se tomaron muestras de leche (foremilk) pre-ordeño en las vacas lactantes y de secreción en las vacas en período seco (dado que estas vacas, luego de ser inoculadas, fueron secadas), de los cuatro cuartos mamarios. Estas muestras se transportaron, bajo las mismas condiciones antes mencionadas, al laboratorio (Figura 13).

Los signos clínicos de la ubre (dolor, hinchazón, enrojecimiento, entre otros) y las características físicas de la leche, se registraron en una planilla de datos todos los días que se visitó el tambo con la colaboración de veterinarios.

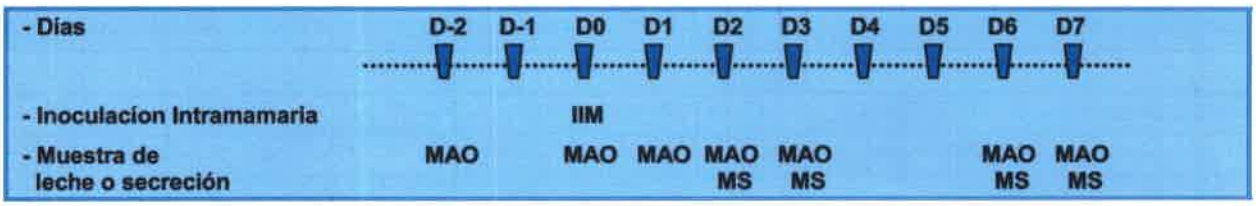


Figura 13: Esquema del ensayo de inoculación intramamario a campo y toma de muestra de leche y secreción de vacas seleccionadas para la inoculación de *Ent. hirae* CRL 1835, *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 y *L. perolens* CRL 1724. D: Día; IIM: Inoculación Intramamaria con 10^9, 10^6 y 10^3 ufc/ml/cuarto; MAO: Muestra de leche antes del ordeño; MS: Muestra de secreción.

Análisis clínico

A partir de las muestras colectadas, se llevaron a cabo los estudios a fin de determinar el RCS, análisis bacteriológico, identificación y recuento del *Ent. hirae* CRL 1835, *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 y *L. perolens* CRL 1724, en el tiempo.

Recuento celular somático

Para el RCS se utilizó el método descrito por la National Mastitis Council, 1999. Donde una alícuota de 100 µl de cada muestra de leche de cuarto se extendió sobre una superficie de 1cm^2 de un portaobjetos limpio. La muestra se dejó secar a temperatura ambiente aproximadamente 6h y se tiñó con el reactivo para RCS durante 10 minutos. Luego se retiró el exceso de colorante, se dejó secar durante 6-8h y se lavó con agua tibia para finalmente examinarlo al microscopio óptico. Se contaron las células somáticas en aproximadamente 50-100 campos y para obtener el número de células somáticas por mililitros de leche, se multiplicó el promedio de células encontradas en cada campo, por el Factor del Microscopio (FM).

Para calcular el FM se determinó el diámetro (mm) del campo del objetivo y luego el área del campo, mediante la fórmula: 3,1416 x r^2. Este valor, se convirtió en cm^2 y se determinó el número de campos en un cm^2, dividiendo 1 cm^2 por el área del campo.

Finalmente, dado que la cantidad de leche extendida sobre 1cm^2 fue de 100 µl, se multiplicó el número de campos por 100 para determinar el número de campos microscópicos por mililitro de leche.

Análisis bacteriológico

Una alícuota de 100 µl de cada muestra de cuarto, se sembró en superficie en placas de medio agar sangre al 5% y se incubó en aerobiosis durante 24h a 37°C, para corroborar la sanidad de cada cuarto mamario. Cuando fue necesario registrar la presencia o no de BL propias de cada vaca se utilizó la metodología antes mencionada, pero en medio MRS.

Recuperación, identificación y recuento de las bacterias lácticas seleccionadas

Perfil de resistencia a antibióticos

Para esta experiencia se aplicó el método de difusión en placa, utilizándose la técnica de Kirby-Bauer, estandarizada por el Nacional Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2003), pero sobre agar MRS tal como lo describe Otero y col. (2007).

Para la evaluación de la sensibilidad de *Ent. hirae* CRL 1835, *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 y *L. perolens* CRL 1724, frente a distintos antimicrobianos, las cepas congeladas y conservadas en medio LEL fueron subcultivadas en tres tiempos en caldo MRS a 37°C por 18h, para logar su activación. Posteriormente, se tomaron aproximadamente 65 µl de los caldos (últimos repiques) y se resuspendieron en 5 ml de SF estéril, de tal manera de lograr una turbidez equivalente al tubo N° 0,5 de la escala de McFarland (correspondiente a 1,5 x 10^8 ufc/ml), ajustando la DO (600 nm) alrededor de 0,084.

Las suspensiones obtenidas se sembraron, por duplicado y con hisopo estéril, sobre placas conteniendo agar MRS, realizando estrías en todas direcciones de manera tal de cubrirla completamente. Posteriormente, se colocaron los monodiscos con antibióticos sobre los inóculos de cada BL.

Los antimicrobianos ensayados fueron los más comúnmente usados en medicina veterinaria en Argentina. Los 7 monodiscos utilizados fueron: oxacilina 1 µg, eritromicina 15 µg, penicilina 10 UI, gentamicina 10 µg, rifampicina 5 µg, estreptomicina 10 µg y ampicilina/sulbactan 10/10 µg. Los mismos se depositaron en condiciones de esterilidad sobre las placas y se presionaron para asegurar el completo contacto con la superficie del agar. Se distribuyeron a razón de 4 discos, aproximadamente, en una placa de 100 mm, con una distancia de 24 mm desde el centro de un disco al centro del otro disco (vecino).

Las placas se incubaron invertidas en estufa a 37°C por 24-48h y las zonas de inhibición de crecimiento fueron interpretadas como susceptibles y resistentes.

Por otro lado, y en función de los resultados obtenidos frente a los siete antimicrobianos ensayados, se decidió la utilización de estreptomicina como antibiótico de "selección" para cada una de las 3 BL, producto de la resistencia otorgada hacia el mismo. Es por esto que, una vez seleccionado el antibiótico, se determinó la concentración adecuada para su utilización. Para lo cual se sembraron 100 µl de cada BL, en profundidad, en placas con agar MRS

suplementado con distintas concentraciones de estreptomicina: 5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml, 20 µg/ml, 50 µg/ml y 100 µg/ml y se incubaron por 24h en microaerofilia. Finalmente se determinó la concentración de antibiótico necesaria para poder distinguir a las cepas BL de posibles BL presentes en el canal o la cisterna de la glándula mamaria bovina.

Identificación y recuento

Una alícuota de 100 µl de cada muestra de cuarto se sembró, por duplicado y en profundidad, en medio MRS con agar al 1,5% sin antibiótico y con 10 µg/ml de estreptomicina. De esta manera se evitó contar, erróneamente, cepas BL que habitan normalmente el canal o la cisterna del pezón bovino.

Del mismo modo, se realizaron diluciones de cada muestra en SF (10^{-1}-10^{-4} ufc/ml) que se sembraron en placas bajo las mismas condiciones antes mencionadas y se incubaron por 24-48h en microaerofilia a 37°C.

A partir de las colonias aisladas, no solo se realizó el recuento de los microorganismos, sino que además, se hizo una identificación presuntiva de las colonias representativas, por tinción de Gram, prueba de la Catalasa, prueba del Nitrato y prueba de Indol (inciso 1.3. de la sección A) con el fin de asegurarnos que los microorganismos recuperados sean las 3 BL: *Ent. hirae* CRL 1835, *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 y *L. perolens* CRL 1724.

3.2. Estudio de eficacia

Con la finalidad de determinar si la dosis y concentración definida de las BL potencialmente probióticas seleccionadas era eficaz, al ser inoculada dentro del canal del pezón bovino, se planteó un nuevo ensayo de inoculación intramamario a campo empleando un mayor número de animales y escogiendo a una de las 3 BL: *L. perolens* CRL 1724.

Animales utilizados en el ensayo

Se trabajó con tres vacas Holando Argentino, pertenecientes a un tambo de la región centro-sur de la provincia de Córdoba (granja experimental SIQUÉM), todas ellas en período de lactancia y con RCS $\leq$ 200.000 cel/ml. Las vacas fueron cotidiana e ininterrumpidamente ordeñadas una vez al día.

Dosis e inoculación

A raíz de los resultados obtenidos en el estudio de tolerancia (inciso 3.1. de esta sección), se decidió utilizar una única dosis de 2.10^6 ufc/ml del lactobacilo. La misma fue debidamente preparada, tal como se detalla a continuación (optimización de la dosis a inocular) e inoculada el día 0 (D0) mediante la técnica antes descripta (técnica y tiempo de inoculación del inciso 3.1.

de esta sección). Cada dosis fue infundida, de forma independiente y por única vez a lo largo del ensayo, en tres de los cuartos mamarios de cada vaca, dejando un cuarto control (no inoculado) por vaca.

Optimización de la dosis a inocular

Con la finalidad de optimizar el procedimiento para alcanzar la concentración deseada de *L. perolens* CRL 1724 (2.10^6 ufc/ml), se realizó una curva de calibración que permitió correlacionar la densidad óptica con las unidades formadoras de colonias y el peso seco (*Ps*). El procedimiento aplicado fue el descripto por Santos (1983), con algunas modificaciones. Una alícuota de 200 µl de *L. perolens* CRL 1724, conservado en medio LEL con glicerol a -20°C, fue activada mediante tres repiques sucesivos en 5 ml de medio MRS a 37°C en aerobiosis durante 18h, hasta alcanzar una concentración de biomasa de 10^8 ufc/ml. Una dilución, 500 µl del medio con crecimiento (biomasa) en 99,5 ml de medio MRS fresco y estéril, fue colocada en un agitador orbital a 150 rpm y 37°C durante unas 5h aproximadamente. Finalizada la incubación se tomó una alícuota de cultivo y se midió la absorbancia (DO_{630nm}). Este valor se ajustó en un rango 0,4-0,8 a fin de cumplir con la ley de Lambert y Beer. En caso contrario se realizó una dilución con medio MRS fresco y se midió el valor de DO; el valor de DO obtenido se multiplicó por la dilución realizada para obtenerlo.

Alícuotas de 1 ml del cultivo fueron utilizadas para realizar distintas diluciones usando medio MRS fresco. De esta manera se obtuvieron 4 diluciones: 1/2, 1/4, 1/8 y 1/10. Cada ensayo fue realizado por triplicado. Se homogeneizó cada muestra y se midió el valor de DO_{630nm}. Es importante aclarar que a estas diluciones no se les determinó ni el valor de *Ps* ni el recuento en placas, ya que se asumió que los valores serían 1/2, 1/4, 1/8 y 1/10 del *Ps* y ufc/ml del cultivo inicial.

El volumen remanente del cultivo fue utilizado para titular, a fin de determinar el valor de ufc/ml, y por otro lado centrifugado a fin de determinar el valor de Ps.

Para la determinación del Ps se midió con exactitud el volumen final del medio ($\mathbf{V_A}$) y luego se centrifugó a 4000 rpm. Descartado el sobrenadante, el pellet fue colocado en un vidrio de reloj (limpio y seco) previamente pesado ($\mathbf{P_1}$) y fue llevado a una estufa de secado con una temperatura entre 70-100°C, aproximadamente, hasta logar un secado completo. Finalmente la muestra final fría, fue trasportada en un desecador con sílica gel para su pesado, hasta lograr el peso constante ($\mathbf{P_2}$). La fórmula aplicada para obtener el Ps correspondiente fue la siguiente:

$$Ps\ (g/ml) = \frac{\mathbf{P_2 - P_1}}{\mathbf{V_A}}$$

De esta manera, todas las veces que fue necesario elaborar la dosis de *L. perolens* CRL 1724 para llevar a inocular al campo, solo bastó con activar la cepa (de la misma manera que se detalló en "inóculo", inciso 3.1. de esta sección) y medir la DO_{630nm} final hasta alcanzar el valor correspondiente a la concentración deseada.

Toma de muestra y esquema de inoculación

Tal como se mencionó anteriormente, los cuatro cuartos de cada vaca fueron higienizados adecuadamente (alcohol al 70%/papel absorbente) y muestreados asépticamente, dos días antes de comienzo del ensayo (D-2). Es decir, una muestra de despunte (foremilk) de cada cuarto mamario fue tomada antes del ordeño, colectada en frasco estéril y transportada refrigerada al laboratorio (dentro de un lapso no superior a 3h) a fin de realizarle RCS, análisis bacteriológico y registrar la presencia o no de BL propias de la flora normal.

Al igual que en el primer ensayo a campo, el día D0 se tomó una muestra pre-ordeño de los cuatro cuartos mamarios para confirmar la sanidad de los mismos y la presencia o no de BL propias de cada vaca. Estas muestras se trasladaron en frascos estériles y refrigerados al laboratorio.

Los días posteriores a la inoculación (D1, 2, 5, 7 y 15) se tomaron muestras (foremilk) asépticamente de los cuatro cuartos mamarios (pre-ordeño) y se transportaron, bajo las mismas condiciones antes mencionadas, al laboratorio, siguiendo el esquema representado en la Figura 14.

Las características visuales de cada cuarto mamario y todo lo que se consideró relevante se registró en una planilla de datos, todos los días que se visitó el tambo. En este sentido, el asesoramiento veterinario fue indispensable.

Figura 14: Esquema del ensayo de inoculación intramamario a campo y toma de muestra de leche, de vacas seleccionadas para la inoculación con *L. perolens* CRL 1724. D: Día; IIM: Inoculación Intramamaria con 10^6 ufc/ml/cuarto; MAO: Muestra de leche antes del ordeño.

Análisis clínico

A partir de las muestras de leche receptadas en el laboratorio y siguiendo la metodología descripta en "análisis clínico" del inciso 3.1. de esta sección, se llevaron a cabo los estudios pertinentes para determinar el RCS, la bacteriología y la recuperación, identificación y recuento del lactobacilo en el tiempo.

3.3. Estudio histológico

Con la finalidad de determinar si la administración local de BL en el pezón de la glándula mamaria bovina induce alteraciones en la estructura del tejido epitelial del canal y la cisterna del pezón bovino, se planteó un tercer ensayo de inoculación intramamario a campo empleando una de las 3 BL: *L. perolens* CRL 1724.

Animales utilizados en el ensayo

Se trabajó con dos vacas Holando Argentino, pertenecientes a un tambo de la región centro-sur de la provincia de Córdoba (granja experimental SIQUÉM). Ambas de primera parición, en período de secado y destinadas a faena por problemas reproductivos.

Dosis e inoculación

De acuerdo a los resultados obtenidos en el primer y segundo ensayo de inoculación intramamaria, se decidió utilizar 2.10^6 ufc/ml de *L. perolens* CRL 1724. La misma fue preparada e inoculada el día 0 (D0), según se detalló en "técnica y tiempo de inoculación y optimización de la dosis a inocular" del inciso 3.1. de esta sección. Cada inoculación fue realizada de forma independiente y por única vez durante el ensayo, en tres de los cuartos mamarios de cada vaca dejando un cuarto control (no inoculado). El cultivo inoculado fue titulado antes de su traslado (refrigerado) al campo para confirmar, viabilidad, concentración y pureza.

Toma de muestra y esquema de inoculación

La toma de muestras y el esquema de inoculación se detallan en la Figura 15. Las muestras fueron colectadas y analizadas para determinar RCS y bacteriología del mismo modo que se mencionó en "toma de muestras" del inciso 3.1. de esta sección. Cada muestra fue analizada por duplicado.

Al igual que en el primer ensayo a campo, el día D0 se tomó una nueva muestra de leche, pre-ordeño, de los cuatro cuartos mamarios de cada animal para confirmar nuevamente la sanidad de los mismos y la presencia o no de BL propias de cada vaca. El D2 se tomó una muestra (de secreción) con la finalidad de controlar posibles variaciones en el RCS en los cuartos inoculados. Estas muestras se trasladaron nuevamente en frascos estériles y refrigerados al laboratorio.

Por otro lado, las características visuales de cada cuarto mamario y todo lo que se consideró relevante se registró en una planilla de datos, todos los días que se visitó el tambo.

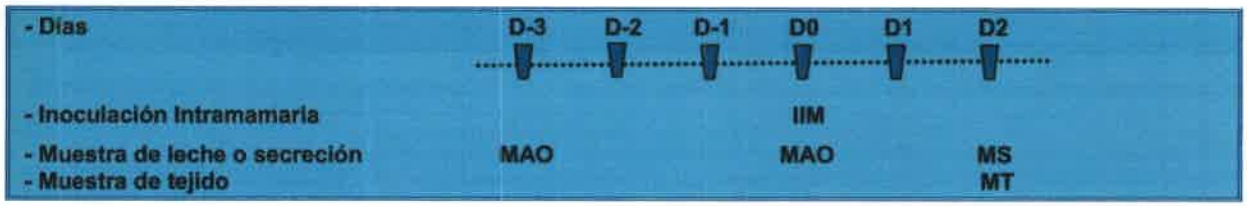


Figura 15: Esquema del ensayo de inoculación intramamario a campo y toma de muestra de leche y de tejido epitelial mamario, de dos vacas seleccionada para la inoculación con *L. perolens* CRL 1724. D: Día; IIM: Inoculación Intramamaria con 10^6 ufc/ml/cuarto; MAO: Muestra de leche antes del ordeño; MS: Muestra de secreción; MT: Muestra de tejido.

Análisis clínico

A partir de las muestras de leche o secreción receptadas en el laboratorio y siguiendo la metodología descripta en "análisis clínico" del inciso 3.1. de esta sección, se llevaron a cabo los estudios pertinentes para determinar el RCS, la bacteriología y la recuperación, identificación y recuento del lactobacilo al término del ensayo.

Toma de muestra de tejido epitelial mamario

Dos días posteriores a la inoculación (D2) e inmediatamente después de la faena de los animales, se tomaron dos muestras de tejido epitelial del canal y la cisterna del pezón bovino de cada uno de los cuartos inoculados (Figura 16). Las muestras histológicas fueron transportadas refrigeradas al laboratorio para su procesamiento.

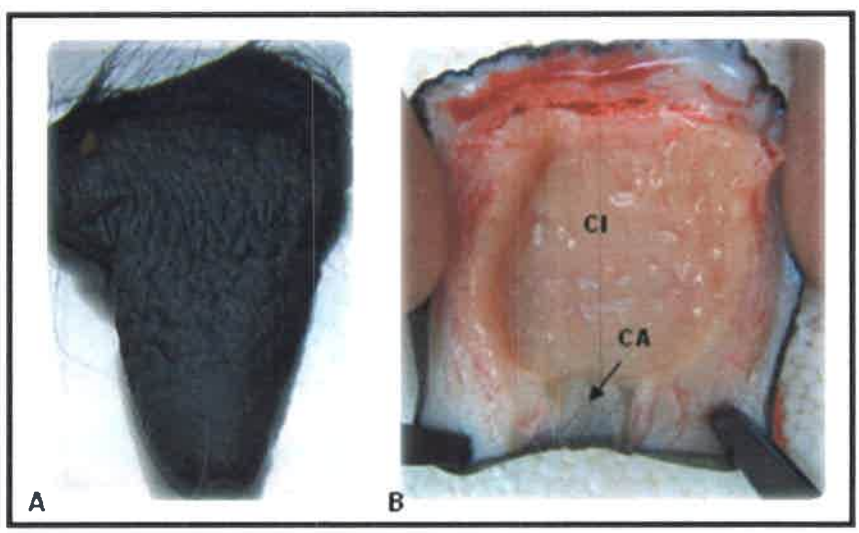


Figura 16: Fotografías de pezón bovino perteneciente a una vaca lactante en período de secado. A) Pezón sin corte. B) Pezón con corte longitudinal. CI: Cisterna del pezón; CA: Canal del pezón.

Las muestras de tejido recolectadas fueron cortadas de forma precisa, utilizando el material de cirugía correspondiente y procurando dejar bordes bien definidos y no desgarrados, en trozos pequeños (5mm x 5mm). Los cortes fueron realizados sobre un vidrio de reloj y de manera tal de obtener muestras por duplicado de los cuatro cuartos mamarios.

Las muestras obtenidas fueron sumergidas y fijadas en frascos conteniendo 20 ml de formaldehído 10% para análisis histológico y en 2 ml de glutaraldehído 2,5% para análisis por microscopías de alta definición. Estas últimas, se sumergieron unos 20-30 minutos en los 2 ml de glutaraldehido 2,5% y luego fueron extraídas y cortadas nuevamente sobre el vidrio de reloj con el fin de lograr fragmentos más pequeños para facilitar su procesamiento (2mm x 2mm). Finalmente, estas muestras de menor tamaño, fueron rápidamente sumergidas en una nueva solución de glutaraldehido 2,5%.

Procesamiento y preparación de cortes histológicos

Análisis histológico

Para el procesamiento histológico de las muestras de tejido se aplicó la metodología descripta por Townsend y col. (1960) con algunas modificaciones. Luego de la fijación, las muestras de canal y cisterna del pezón bovino fueron lavadas con soluciones crecientes en concentración de alcohol (0,5%-95%) para eliminar el exceso de fijador. Posteriormente los tejidos se aclararon, sumergiéndolos en xilol, se infiltraron con parafina líquida fundida a 60ºC y se mantuvieron a la misma temperatura (en estufa) entre 30 minutos y 6h. Las piezas de tejido embebidas en parafina, se montaron sobre un molde de madera rectangular y se dejaron solidificar a temperatura ambiente. De esta manera se logró disolver el medio de aclaración y formar un bloque sólido con el tejido en su interior ("taco"), este procedimiento es conocido como inclusión.

Una vez elaborado el taco, se prosiguió a cortarlo con micrótomo (con cuchilla de acero) en secciones lo suficientemente delgadas como para permitir el paso de la luz, entre 5 a 10 micrómetros de grosor aproximadamente. Se montaron las muestras cortadas sobre portaobjetos limpios, para lo cual previamente se sumergieron en un recipiente con gelatina al 1% a 38ºC y se "pescaron" con un portaobjetos de manera tal de lograr tener varios cortes sobre un mismo portaobjetos.

Finalmente los cortes montados fueron desparafinados con xilol, 3 veces 5 minutos cada vez, hidratados con series decrecientes de alcohol (utilizando primero etanol absoluto, luego etanol al 90%, etanol 70% y agua destilada, 5 minutos cada vez) y coloreados con H-E (inciso 3.4. de la sección C) y Gram modificado.

Para el análisis y la clasificación de los cortes histológicos en normales o levemente inflamados (con presencia de glóbulos rojos y glóbulos blancos) se tuvo en cuenta los siguientes estratos y parámetros:

- Epidermis y epitelio tubular: se analizaron y clasificaron como normales, aumentados o disminuidos.
- Tejido conectivo: se clasificó como normal o inflamado.
- Vasos sanguíneos: se analizó la hiperemia (vaso sanguíneo lleno, medio o casi vacío) y la presencia y número de polimorfonuclerares (PMN) y mononucleares (MN) por campos, con aumento de 40x.
- Intersticio: se analizó la presencia y número de células PMN y MN por campos, con aumento de 40x.

Sumado a este análisis histopatológico también se registró, de ser posible, la presencia de *L. perolens* CRL 1724 adheridos al tejido epitelial mamario.

Tinción con Gram modificado

Para la tinción de Gram modificado las muestras fueron primero coloreadas con la solución "CB" durante 1 minuto, lavadas y luego coloreadas con la solución "Y" durante 1 minuto más. Posteriormente los preparados se lavaron, se secaron adecuadamente y se sumergieron en una solución de éter-acetona en igual proporción. Luego se colorearon con la solución de "Fucsina", se lavaron, secaron con papel y se sumergieron en acetona. Finalmente las muestras fueron coloreadas con la solución "PA", durante 2-3 minutos, lavadas nuevamente con acetona, secadas adecuadamente y pasadas 3 veces por una solución de acetona-xilol (en igual proporción) y xilol puro una vez.

Por último los preparados fueron cubiertos con un cubre objetos, pegados con el sellador antes mencionado, y observados al microscopio óptico (Zeizz) con el fin de confirmar la presencia de *L. perolens* CRL 1724 adheridos al tejido epitelial mamario.

Análisis por microscopia de alta definición

Para el análisis por microscopía de alta definición, se aplicaron dos técnicas específicas: microscopía óptica de alta resolución (MOAR) y microscopía electrónica de transmisión (MET).

Microscopía óptica de alta resolución

Para llevar a cabo la técnica de MOAR, se partió de las muestras de tejido previamente cortadas (en tamaños de 2mm x 2mm) y sumergidas en glutaraldehido al 2,5%, como se explicó en "toma de muestra de tejido epitelial mamario" de esta sección. Estas muestras fueron nuevamente cortadas en el laboratorio, de manera tal de lograr cortes semifinos de ±

0,25 µm con un ultramicrótomo manual, y colocadas sobre un portaobjetos de vidrio. Posteriormente se tiñeron con una solución de azul de toluidina sobre una platina termostatizada, la cual cumple la función de permitir la entrada del colorante al tejido incluido en la resina. Por último, los cortes semifinos coloreados fueron montados en DPX (medio de montaje anhidro para microscopía o plástico sintético completamente transparente, de fácil cortado, utilizado para el montaje de preparaciones microscópicas) y observados a través de un microscopio óptico (Axiophot).

La adquisición de algunas de las imágenes obtenidas a partir del análisis histológico y de la totalidad de las imágenes obtenidas a partir del análisis por microscopias de alta definición se realizó mediante una cámara digital Powershot G6, 7.1 megapixels (Canon INC, Japón) adosada al microscopio óptico. El procesamiento de las mismas se realizó a través del software AxioVision Release 4.6.3 (Carl Zeiss, Alemania).

Microscopía electrónica de transmisión

De la misma manera que la metodología de MOAR, para llevar a cabo la MET se partió de las muestras de tejido previamente cortadas (en tamaños de 2mm x 2mm) y sumergidas en glutaraldehido al 2,5%, como se explicó en "toma de muestra de tejido epitelial mamario" de esta sección, pero en esta ocasión usando el glutaraldehido preparado en solución tampón S-collidine (0,2 M, pH 7,4). Luego del tiempo de fijación (durante 3h a 4ºC), las muestras fijadas se lavaron dos veces con la solución tampón S-collidine y se refijaron en tetróxido de osmio al 1% durante 1h a temperatura ambiente.

Una vez que las muestras fueron refijadas, se lavaron nuevamente dos veces en la solución tampón S-collidine y se deshidrataron en concentraciones crecientes de acetona, es decir, se realizó un pasaje en acetona al 30%, 50%, 70% y 90% durante 5 minutos cada uno y 3 pasajes en acetona al 100% durante 5 minutos cada uno.

Finalmente se realizó la preinclusión en resina epoxi 1:1 en acetona al 100%, durante toda la noche a temperatura ambiente, para luego llevar a cabo la inclusión con la resina epoxi a 56ºC durante 24h. De esta manera, los cortes procesados fueron observados y analizados utilizando un microscopio electrónico de transmisión (Elmiskop 101, Siemens).

4. Estudio *in vivo* a bacterias lácticas seleccionadas: comportamiento conjunto

4.1. Estudio de tolerancia de la formulación probiótica

Con la finalidad de determinar el efecto conjunto de las BL seleccionadas: *Ent. hirae* CRL 1835, *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 y *L. perolens* CRL 1724, luego de la inoculación intramamaria en una vaca en período de secado, se plantea un nuevo ensayo de inoculación

intramamario a campo. En el mismo, se buscó poder determinar si el título definido para las BL seleccionadas es incapaz de generar algún cuadro aparente de inflamación o alteración en la glándula mamaria bovina cuando se aplican las BL en conjunto. Además se evaluó si las BL seleccionadas pueden recuperase en el tiempo.

Animal utilizado en el ensayo

Se trabajó con una vaca sana Holando Argentino, perteneciente a un tambo de la región centro-sur de la provincia de Córdoba (granja experimental SIQUÉM), en período de secado.

Preparación del inóculo, dosis y técnica de inoculación

Inóculo

Una alícuota de 200 µl de *Ent. hirae* CRL 1835, *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 y *L. perolens* CRL 1724 conservados en medio LEL con glicerol a -20°C, fueron activados mediante tres repiques sucesivos en 5 ml de medio MRS a 37°C en aerobiosis durante 18h, de tal manera de alcanzar una concentración aproximada de 2.10^8 ufc/ml para cada una, por separado. Cinco caldos de 5 ml de medio MRS, correspondientes al último repique activo de cada BL, fueron centrifugados a 3000 rpm durante 15 minutos. Una vez descartado el sobrenadante, los pellets individuales de cada BL se resuspendieron y homogeneizaron en SF de tal manera de lograr una concentración de 6.10^6 ufc/ml, aproximadamente, de las tres cepas en conjunto (*Ent. hirae* CRL 1835 mas *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 mas *L. perolens* CRL 1724).

La concentración antes descripta fue homogenizada, fraccionada en frascos estériles, almacenada a 4°C y titulada antes de su traslado (refrigerado) al campo para confirmar viabilidad, concentración y pureza.

Viabilidad de la formulación

Para determinar la conservación a 4°C (en el tiempo) del título de 6.10^6 ufc/ml conformado por las tres BL seleccionadas y resuspendidas en SF estéril, se llevó a cabo un ensayo de titulación *in vitro*. La concentración elaborada y fraccionada en el frasco estéril, fue titulada a diferentes tiempos. Es decir, al momento de su elaboración (T0) y luego durante su conservación a 4°C en 6 horas consecutivas (T1-6) hasta las 24h de su elaboración.

Para medir la viabilidad de las colonias (ufc/ml) se realizaron distintas diluciones en SF y alícuotas de 100 µl, conteniendo las 3 BL juntas, fueron sembradas por duplicado con espátula de Drigalsky en medio agar MRS. Las placas se incubaron a 37°C en aerobiosis durante 18h. El experimento fue realizado por triplicado.

Dosis

Una dosis de 1 mililitro de 6.10^6 ufc/ml de *Ent. hirae* CRL 1835 más *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 más *L. perolens* CRL 1724, fue inoculada por única vez en dos de los cuatro cuartos mamarios. El tercer cuarto no fue inoculado y se lo consideró como control negativo. El cuarto restante, se encontraba infuncional.

Técnica y tiempo de inoculación

Previo a la inoculación de la vaca, se higienizaron los cuartos mamarios del animal: se lavaron, desinfectaron con alcohol al 70% y secaron con papel absorbente. La técnica de inoculación fue la misma que la descrita anteriormente en el inciso 3.1. de esta sección. Seguidamente los pezones se masajearon suavemente con la finalidad de favorecer el ascenso de la dosis. Todas las concentraciones se infundieron el día cero (D0) del comienzo del ensayo y post-ordeño, tal como se muestra en el esquema del ensayo de inoculación, Figura 17.

Recuperación y análisis de las tres bacterias lácticas

Toma de muestras

Como se mencionó anteriormente, los cuartos mamarios fueron higienizados con alcohol al 70% y secados con papel absorbente cada vez que se visitó el tambo para realizar la toma de muestras. Las mismas se colectaron en frascos estériles y se transportaron refrigeradas al laboratorio para su procesamiento dentro de un lapso no superior a 3h, a fin de realizarles los estudios pertinentes para verificar la sanidad de cada cuarto (RCS y análisis bacteriológico).

Siguiendo la metodología mencionada en el párrafo anterior, cinco días antes y el día del comienzo del ensayo (D-5 y D0, respectivamente) se tomó una muestra de despunte (primer chorro de leche o foremilk) pre-ordeño de los cuartos mamarios del animal para confirmar la sanidad de los mismos y registrar la presencia o no de BL propias de la vaca. Estas muestras se trasladaron en frascos estériles y refrigerados al laboratorio para su procesamiento.

En lo que respecta a la frecuencia de muestreo, los días posteriores a la inoculación (D1, 2, 5, 7, 17) se tomaron muestras de leche (foremilk) o secreción de los cuartos mamarios. Estas muestras se transportaron, bajo las mismas condiciones antes mencionadas, al laboratorio (Figura 17).

Los signos clínicos de la ubre (dolor, hinchazón, enrojecimiento, entre otros) y las características físicas de la leche, se registraron en una planilla de datos, todos los días que se visitó el tambo con la colaboración del veterinario.

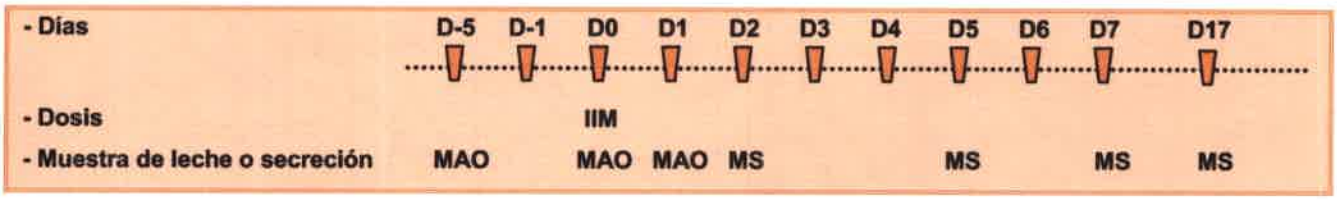


Figura 17: Esquema del ensayo de inoculación intramamario a campo y toma de muestra de leche o secreción, de una vaca seleccionada para la inoculación con *Ent. hirae* CRL 1835, *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 y *L. perolens* CRL 1724. D: Día; IIM: Inoculación Intramamaria con 10^6 ufc/ml/cuarto; MAO: Muestra de leche antes del ordeño; MS: Muestra de secreción.

Análisis clínico

A partir de las muestras de leche colectadas y siguiendo la metodología descripta anteriormente, inciso 3.1. de esta sección, se llevaron a cabo los estudios pertinentes para determinar el RCS, la bacteriología y la recuperación, identificación y recuento de las BL en el tiempo.

4.2. Estudio de eficacia de la formulación probiótica

Con la finalidad de determinar la eficacia conjunta de las BL seleccionadas: *Ent. hirae* CRL 1835, *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 y *L. perolens* CRL 1724, al ser inoculadas dentro del canal del pezón bovino, se planteó un nuevo ensayo de inoculación intramamario a campo empleando un mayor número de animales.

Animales utilizados en el ensayo

Se trabajó con 27 vacas en ordeño, Holando Argentino, perteneciente a un tambo de la región centro-sur de la provincia de Córdoba ubicado en la zona de Las Perdices. Todas en período de secado.

Preparación del inóculo, dosis y técnica de inoculación

El inóculo, dosis y técnica de inoculación fueron preparados y aplicados tal como se describió en el inciso 4.1. de esta sección. Del total de las vacas escogidas, 10 fueron inoculadas con 1 mililitro de la formulación probiótica en todos sus cuartos, 10 fueron inoculadas con la suspensión intramamaria al secado, Bovigam (Bayer), como se hace de rutina en el tambo al momento de secar los animales y los 7 animales restantes no fueron inoculados y se consideraron como controles. Las concentraciones se infundieron el día cero (D0) del comienzo del ensayo y post-ordeño, tal como se muestra en el esquema del ensayo de inoculación, Figura 18. Además, y si siguiendo la metodología aplicada rutinariamente en los tambos, posteriormente a las aplicaciones tanto de la dosis probiótica, la suspensión antibiótica

o los cuartos sin inocular, todos los pezones de los animales fueron sumergidos en el teat-dipping previo a liberación de los mismos a campo abierto.

Recuperación y análisis de las tres bacterias lácticas

Toma de muestras

El procedimiento llevado a cabo para la toma de muestra, no sufrió modificaciones respecto a lo mencionado en párrafos anteriores. La metodología de muestreo si fue diferente, debido al gran número de animales. Es decir, como se pretendía escoger animales sanos (RCS $\leq$ 200.000 cel/ml y bacteriología negativa), las vacas fueron muestreadas treinta días (D-30) y diez días (D-10) antes de la inoculación, para escoger las mejores vacas capaces de permitir realizar un ensayo masivo, representativo. Sumado a esto, el día del comienzo del ensayo (D0) se tomó también una muestra de despunte (foremilk) pre-ordeño de los cuartos mamarios de cada animal, como se venía realizando en los ensayos anteriores para confirmar la sanidad de los mismos y registrar la presencia o no de BL propias de la vaca. Estas muestras se trasladaron en frascos estériles y refrigerados al laboratorio para su procesamiento.

En lo que respecta a la frecuencia de muestreo, solo se tomaron muestras de leche (foremilk), postparto. Es decir, al término del período seco (D60 y D65, aproximadamente) para evaluar el posible comportamiento preventivo de la dosis probiótica. Las muestras de leche obtenidas se transportaron, bajo las mismas condiciones antes mencionadas, al laboratorio (Figura 18).

Los signos clínicos de las ubres (dolor, hinchazón, enrojecimiento, entre otros) y las características físicas de la leche, se registraron en una planilla de datos, todos los días que se visitó el tambo con la colaboración del veterinario.

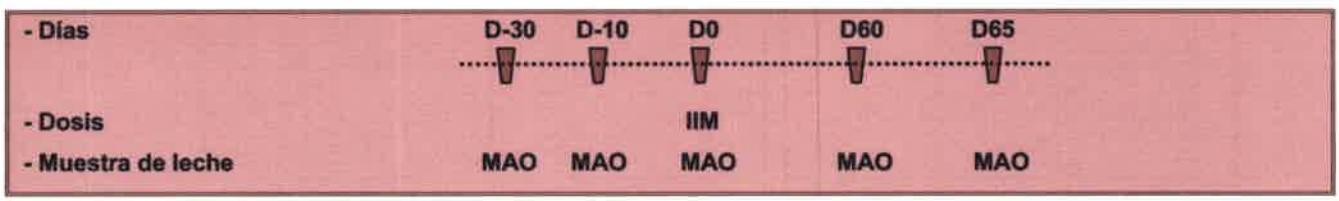


Figura 18: Esquema del ensayo de inoculación intramamario a campo y toma de muestra de leche a veintisiete vacas seleccionadas para la inoculación con *Ent. hirae* CRL 1835, *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 *y L. perolens* CRL 1724, o una suspensión intramamaria al secado. D: Día; IIM: Inoculación Intramamaria con 10^6 ufc/ml/cuarto o suspensión intramamaria al secado; MAO: Muestra de leche antes del ordeño.

Análisis clínico

A partir de las muestras de leche colectadas y siguiendo la metodología descripta anteriormente en el inciso 3.1. de esta sección, se llevaron a cabo los estudios pertinentes para

determinar el RCS, la bacteriología y la recuperación, identificación y recuento de las BL en el tiempo.

E. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La correlación entre las propiedades probióticas de las BL (hidrofobicidad y auto-agregación) fue determinada por cálculo del coeficiente Pearson.

El número de cepas aisladas de la flora microbiana normal del canal del pezón bovino por placa, fue expresado como logaritmo (Log_{10}). El análisis estadístico utilizado para comparar la mediana del número de cepas por placa, por géneros y grupo bacteriano, entre cuartos CMT positivos y CMT negativos fue el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Un *p-valor<0,05* fue considerado como indicador de diferencia estadísticamente significativa.

Los experimentos *in vitro* de inhibición, co-agregación y adhesión fueron realizados por duplicado.

En los experimentos *in vivo,* los valores de RCS obtenidos, fueron transformados a logaritmo natural y las diferencias entre las medias de RCS y las medias de recuperación de *L. perolens* CRL 1724 fueron analizadas usando el software INFOSTAT/Profesional versión 2.0 (2004). La condición del tratamiento utilizado (cuarto inoculado y no inoculado) y los días de muestreo, fueron incluidos como variables en el modelo de análisis. El análisis usado para comparar las medias fue ANOVA y las diferencias fueron consideradas como estadísticamente significativas, cuando el *p-valor <0,05.*

Se realizó una regresión lineal, utilizando el software Statistics Toolbox MATLAB Versión 7.2, en la curva de calibración realizada para la cepa de *L. perolens* CRL 1724, para obtener la equivalencia de DO_{630nm} vs ufc/ml y DO_{630nm} vs *Ps*/ml. Este permitió determinar la fórmula necesaria para estimar el valor de ufc/ml a partir del valor de DO_{630nm} registrado.

Por último, los valores de ufc/ml registrados durante el ensayo de viabilidad de la formulación probiótica a 4°C, fueron transformados a logaritmo natural y las diferencias entre las medias de recuperación de las 3 BL fueron analizadas usando el software INFOSTAT/Profesional versión 2.0 (2004). El análisis usado para comparar las medias fue ANOVA y las diferencias fueron consideradas como estadísticamente significativas, cuando el *p-valor <0,05.*

Resultados y Discusión

A. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS A PARTIR DE LECHE BOVINA

Con la finalidad de evaluar el efecto protector de las bacterias lácticas (BL) en la glándula mamaria bovina, fue necesario aislar un importante número de BL de leche. Para cumplir con este objetivo, integrantes del grupo de investigación de la Dra. Nader, pertenecientes al Centro de Referencia de *Lactobacillus* (CERELA-CONICET), y de la UNRC, realizaron el relevamiento de tambos en las provincias de Tucumán y Córdoba. Esta actividad se llevó a cabo en el marco de un convenio entre UNRC-CERELA firmado el 1° de septiembre del año 2008 y renovado en el año 2011.

Las BL aisladas de leche de los tambos de Córdoba y de Tucumán, fueron caracterizadas en CERELA en base a sus propiedades superficiales (*auto-agregación* e *hidrofobicidad*) y antagónicas (producción de peróxido de hidrógeno, producción de sustancias antimicrobianas en sobrenadante de cultivo bacteriano (bacteriocinas), inhibición de patógenos, entre otras) y aquellas con propiedades probióticas de importancia o consideradas potencialmente probióticas, identificadas a nivel de especie (Espeche y col., 2009; Espeche-Pellegrino y col., 2012). De esta manera, las cepas seleccionadas fueron remitidas a la UNRC para continuar con los ensayos previstos.

La Tabla 4 muestra los valores obtenidos del RCS para las muestras de leche analizadas (n: 51). El RCS de leche de tanque mostró un valor promedio de 450.000 cel/ml para los ocho tambos, por lo que, siendo el RCS un indicador del estado sanitario del tambo, se puede concluir que la salud mamaria de los bovinos fue deficiente, ya que el valor estimado como óptimo es ≤ 200.000 cel/ml.

Se determinó que el 17,6% del total de las muestras, correspondió a cuartos de vacas con mastitis clínica (MC). El 43,1% a cuartos con mastitis subclínica (MsC) y el 39,3% restante a cuartos de vacas que no presentaban ninguna patología (sanos).

Tabla 4. Porcentajes de muestras de leche compuesta de cuartos mamarios bovinos, analizadas en relación al recuento celular somático/ml y a la sintomatología clínica, de ocho tambos representativos de la región centro-sur de la provincia de Córdoba.

RCS	Síntomas clínicos	Clasificación	Número de muestras (%)
> 200.000 cel/ml	Si	MC	9 (17,6)
> 200.000 cel/ml	No	MsC	22 (43,1)
≤ 200.000 cel/ml	No	N	20 (39,3)

Referencias: RCS: recuento celular somático; MC: mastitis clínica; MsC: mastitis subclínica; N: normal.

Se aislaron un total de 117 cepas bacterianas a partir de las muestras de leche compuesta, sembradas en los medios selectivos para aislamiento de BL. Los microorganismos aislados pertenecieron a cocos, bacilos y coco-bacilos Gram positivos (+). La mayoría de las BL aisladas (n: 56) se obtuvieron de cuartos pertenecientes a ubres mamarias sanas, mientras que 45 y 16 BL se aislaron de leche de cuartos mamarios correspondientes a ubres con MsC y MC, respectivamente.

Resultados similares, fueron publicados por Espeche y col. (2009), quienes aislaron 102 BL de 87 muestras de leche de cuarto de vacas adultas Holstein, en tambos de la provincia de Tucumán, Argentina.

Las 117 BL aisladas fueron analizadas en base a sus propiedades superficiales, auto-agregación e hidrofobicidad, y a sus propiedades antagónicas, producción de peróxido de hidrógeno, producción de sustancias antimicrobianas en sobrenadante de cultivo bacteriano (bacteriocinas) e inhibición a patógenos. La Tabla 5 muestra los resultados obtenidos a partir de estos análisis para las 8 BL seleccionadas.

La selección de las BL se realizó teniendo en cuenta la presencia de propiedades probióticas de importancia (alta producción de peróxido de hidrógeno, bacteriocina, hidrofobicidad, auto-agregación e inhibición a patógenos) y alguna propiedad mencionada en el criterio empleado por Espeche y col. (2009), según el cual una cepa puede ser considerada como potencialmente probiótica si es capaz de cumplir con al menos tres de las cinco propiedades mencionadas a continuación:

- No ser un patógeno causante de mastitis.
- Ser aislado de cuartos mamarios sanos.
- Ser productor de sustancias inhibitorias contra patógenos causantes de mastitis.
- Presentar elevada *hidrofobicidad.*
- Presentar elevada *auto-agregación.*

Tabla 5. Propiedades probióticas benéficas de bacterias lácticas aisladas de leche compuesta de cuartos mamarios bovinos, provenientes de ocho tambos representativos de la región centro-sur de la provincia de Córdoba.

Cepas	Propiedades superficiales				Producción de sustancias inhibitorias			Origen de las muestras
	Hidrofobicidad		*Auto-agregación*		*Prod. H_2O_2*	*Inhibición a patógenos*	*Sustancia inhibitoria*	*Estado de salud mamario*
	(%)	Grupo	(%)	Grupo				
P. pentosaceus CRL 1831	0,00	Bajo	10,00	Bajo	AP	-	-	N
P. pentosaceus CRL 1832	12,90	Bajo	4,62	Bajo	AP	-	-	MC
Ent. hirae 7-3	1,66	Bajo	1,56	Bajo	AP	-	-	MsC
W. cibaria CRL 1833	82,91	Alto	8,41	Bajo	DP	-	-	N
W. cibaria CRL 1840	74,54	Alto	11,46	Bajo	DP	-	-	MsC
Ent. hirae CRL 1834	3,33	Bajo	7,89	Bajo	NP	*Listeria monocytogenes* Scott A, *Strep. dysgalactiae*	B	N
Ent. hirae CRL 1835	0,00	Bajo	4,93	Bajo	P	*Listeria monocytogenes* Scott A, *Strep. dysgalactiae*	B	N
Ent. hirae CRL 1837	2,38	Bajo	4,76	Bajo	NP	*Listeria monocytogenes* Scott A, *Strep. dysgalactiae*	B	MsC

Referencias: AP: alta productora; DP: débil productora; P: productora; NP: no productora; B: bacteriocina; N: normal; MC: mastitis clínica; MsC: mastitis subclínica.

En total, de las 117 cepas bacterianas, el 20,5% (n: 24) fueron seleccionadas por presentar propiedades probióticas. Este porcentaje fue bajo si tenemos en cuenta lo informado por Espeche y col. (2009), quienes de un total de 102 BL analizadas seleccionaron 39 (38%) ya que presentaron las propiedades buscadas y solamente 5 cumplieron con al menos tres de estas propiedades, siendo este último resultado inferior al obtenido en nuestro trabajo, donde el 33,3% (n: 8) de las cepas tipificadas lograron ser clasificadas como potencialmente probióticas.

Como se observó en la Tabla 5, de las 8 BL con propiedades probióticas de importancia, todas presentaron baja auto-agregación, mientras que 6 baja hidrofobicidad. En consecuencia, solo el 25% de las cepas (n: 2), presentaron elevada hidrofobicidad; una aislada de una vaca sana y otra de una vaca con MsC. Estos bajos valores son un reflejo de los observados en el gráfico de dispersión (Matriz de puntos, Figura 19), donde de la totalidad de las cepas aisladas (n: 117), la mayoría presentó baja hidrofobicidad (94,9%) y baja capacidad auto-agregante (100%), independientemente del estado de los cuartos mamarios de los cuales fueron aisladas.

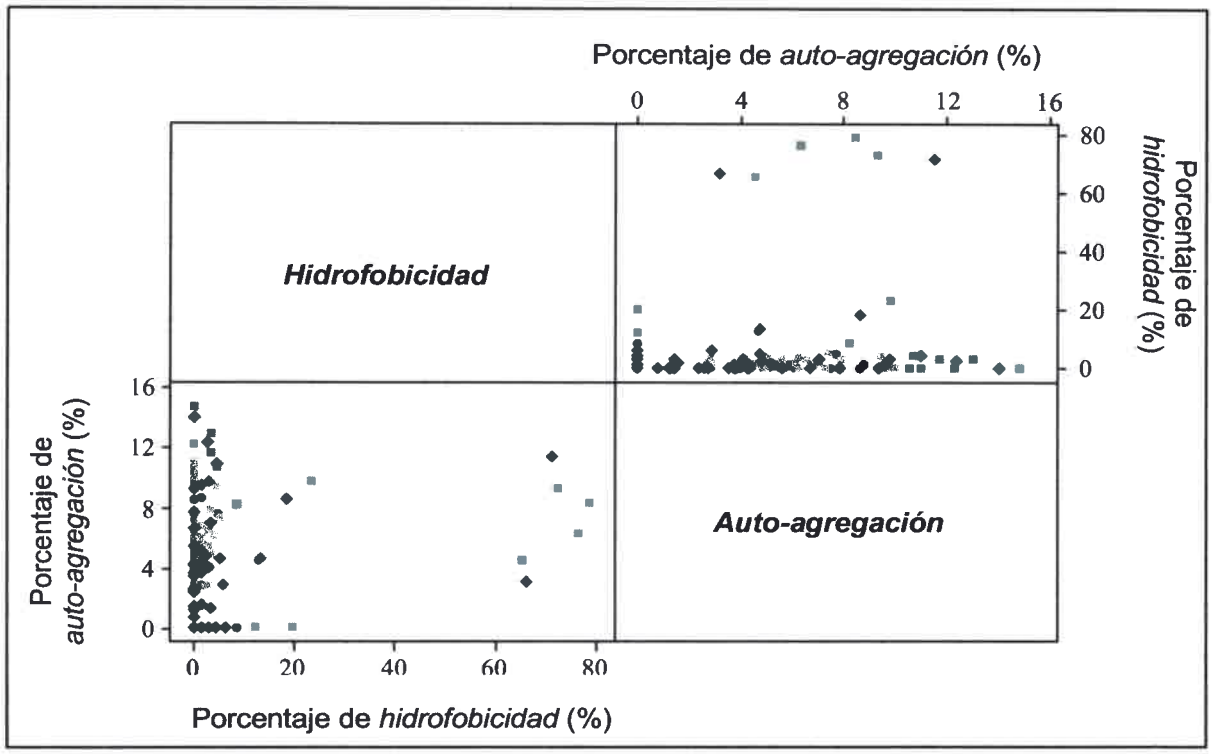


Figura 19: Matriz de puntos de dos propiedades probióticas (hidrofobicidad y auto-agregación) de cepas bacterias lácticas, aisladas de leche compuesta de cuartos mamarios bovinos, provenientes de ocho tambos representativos de la región centro-sur de la provincia de Córdoba. Relación entre estas propiedades y el estado sanitario de los cuartos mamarios de donde fueron aisladas. (●) Cuartos con mastitis clínica. (■) Cuartos sanos (♦) Cuartos con mastitis subclínica.

El análisis de las propiedades superficiales, mostró un coeficiente de correlación Pearson de 0.136. Este bajo valor registrado, denotó una nula correlación entre las dos propiedades analizadas, lo cual indicaría que las cepas (aisladas de leche compuesta bovina) presentan una baja capacidad de adherencia a las mucosas, sumado a la escasa capacidad de formar biofilms protectores.

A pesar de lo expresado anteriormente, existen trabajos realizados con cepas BL aisladas de vagina bovina, con baja hidrofobicidad y auto-agregación, que informan la presencia de glicoproteínas o péptidos glicosilados en sus superficies celulares (Otero y col., 2006; Otero y Nader Macías, 2007); los cuales podrían estar fuertemente ligados con la adherencia bacteriana.

Si comparamos los porcentajes obtenidos en el gráfico de dispersión con otros autores, podemos decir que nuestros resultados son similares a los publicado por Espeche y col. (2009), quienes no registraron correlación entre ambas propiedades. Esto indicaría que las BL aisladas de vacas lactantes poseen, en su mayoría, baja hidrofobicidad y auto-agregación lo cual sería una característica propia de las BL de este nicho ecológico. Esto si tenemos en

cuenta, que BL con elevada *hidrofobicidad* han sido aisladas en vagina humana, como lo registran los trabajos de Ocaña y col. (1999) y Ocaña y Nader Macías (2002).

Como se detalló en la Tabla 5, otras de las propiedades estudiadas fue el estudio de propiedades antagónicas. De las 8 cepas seleccionadas el 37,5%, 35,5% y 25% presentó una alta, baja y nula producción de peróxido de hidrógeno, respectivamente. Estas BL fueron, en su mayoría, aisladas de muestras de leche de cuartos con algún grado de mastitis. Estos resultados son muy interesantes si tenemos en cuenta que existen claras evidencias de que la producción de peróxido en BL provee un efecto protector contra el establecimiento de infecciones (Patterson y col., 2008).

Por otro lado, se conoce que las BL tienen la capacidad de inhibir microorganismos patógenos por la producción de ácido orgánico, peróxido de hidrógeno y/o bacteriocinas (Juárez Tomás y col., 2004). En este trabajo las BL fueron capaces de producir bacteriocinas como metabolito antagónico y de inhibir microorganismos patógenos como *Listeria monocytogenes* Scott A y *Strep. dysgalactiae.* De ellas, el 67% fueron aisladas de muestras de leche de cuartos sanos, mientras que el 33% restante fue aislado de muestras de leche de cuartos con MsC.

Espeche y col. (2009) informaron un 60% de cepas productoras de bacteriocinas en aquellas BL consideradas potencialmente probióticas.

B. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS PERTENECIENTES A LA FLORA MICROBIANA NORMAL DEL CANAL DEL PEZÓN BOVINO

La bibliografía relacionada al estudio de la flora microbiana normal de animales sanos o con algún grado de inflamación es muy escasa y difiere en cuanto a los resultados publicados (Woodward y col., 1987; White y col., 1989; Sandholm y Pyorala, 1995; Al-Qumber y Tagg, 2006; Gill y col., 2006). Con el objetivo de conocer las cepas del nicho ecológico del canal del pezón de vacas tamberas de nuestra región y con la finalidad de aislar cepas representativas, se llevó a cabo el relevamiento de un tambo modelo de la región central de la provincia cuyas características generales se detallan a continuación:

Los resultados obtenidos del CMT, realizados a las 100 muestras de leche analizadas, muestran que el 53% de las muestras fueron negativas para la prueba de CMT, mientras que el 47% restante presentó valores variables, desde trazas (27%) hasta un valor de 1 y 2 con el 18% y 2%, respectivamente. Estos resultados estarían indicando que, aproximadamente, la mitad de los cuartos muestreados estaban clínicamente sanos mientras que la otra mitad tenía cierto grado de inflamación.

Se aislaron un total de 18.259 (ufc/placa) colonias bacterianas aeróbicas a partir de las muestras individuales de raspado de pezón de los 100 cuartos mamarios analizados. Del total de microorganismos aislados, los bacilos Gram negativos, pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, fueron los predominantes (52,8%), seguidos por *Staphylococcus* spp. (20%) (SCN en su totalidad), *Enterococcus* spp. (19,1%), *Bacillus* spp. (7,9%) y *Pseudomonas* spp. (0,2%).

En total, 15 cepas fueron aisladas y agrupadas en cuatro géneros: *Bacillus* spp. (n: 7), *Staphylococcus* spp. (n: 3), *Enterococcus* spp. (n: 1) y *Pseudomonas* spp. (n: 1) y un grupo bacteriano: enterobacterias no coliformes (n: 3).

Las enterobacterias no coliformes fueron aisladas en al menos 3 de los cuatro cuartos (Tabla 6). Mientras que *Bacillus* spp. y *Enterococcus* spp. fueron aislados en al menos 2 y 1 cuarto de los cuatro cuartos, respectivamente, y *Staphylococcus* spp. y *Pseudomonas* spp. fueron encontrados en al menos 1 cuarto de los cuatro o no fueron aislados.

Tabla 6. Número de cuartos con aislamiento positivo de flora microbiana normal, en vacas de un tambo de la región central de la provincia de Córdoba.

	Número de cuartos colonizados por géneros y grupo bacteriano aislado				
Número de vaca*	Enterobacterias no coliformes	*Staphylococcus* spp.	*Enterococcus* spp.	*Bacillus* spp.	*Pseudomonas* spp.
6116	3	2	2	2	0
6115	3	4	3	3	0
2065	4	0	3	4	0
4170	3	0	2	4	1
5113	4	3	4	4	0
22255	3	2	3	4	1
4122	4	3	1	4	1
4065	4	2	4	2	1
1031	4	1	2	4	0
1019	4	3	3	3	0
1025	4	1	4	4	1
20321	4	0	2	4	0
2035	4	1	1	4	1
2137	4	0	1	4	0
1010	4	0	2	3	0
1018	4	2	3	2	0
2290	4	2	3	2	0
3044	4	1	3	4	0
4125	4	3	4	4	0
1039	4	2	3	4	0
1065	4	3	2	4	0
2145	4	3	3	3	1
1034	4	1	3	3	0
3017	4	1	3	3	1
9068	4	3	2	4	0

(*) Número de identificación de cada vaca (caravana).

Al presente no se registran trabajos científicos, tanto a nivel mundial como en la Argentina, que muestren un análisis de la flora microbiana normal que habita en el canal del pezón bovino. Sí existen publicaciones sobre aislamientos de microorganismos a partir del orificio del pezón. Woodward y col. (1987) informaron 284 aislamientos de bacterias aeróbicas (12 géneros) en el orificio del canal del pezón de 10 bovinos, siendo *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Bacillus* y *Acinetobacter* los géneros predominantes, además de otros géneros como *Pseudomonas*.

Los resultados obtenidos en este trabajo fueron similares a los informados por Woodward y col. (1987), donde los géneros predominantes fueron *Staphylococcus*, *Bacillus y Pseudomonas*. En este trabajo se aislaron bacterias pertenecientes al género *Enterococcus* y al grupo de enterobacterias no coliformes. Además, nuestros resultados concuerdan con los informados por Espeche y col. (2009), a partir de muestras de leche y raspado de pezón.

En cuanto a la procedencia, presencia y aislamiento de *Pseudomonas* spp., es importante aclarar que, por lo general, estas bacterias se hallan en el agua y son comúnmente aisladas de leche de tanque, lugar donde generan un gran deterioro de la leche (Suhren, 1989). Por lo tanto, puede que su aislamiento esté relacionado con condiciones de higiene deficientes de los animales de los tambos estudiados.

Por otro lado, en concordancia con lo hallado en el presente trabajo, Al-Qumber y Tagg (2006) aislaron 2800 colonias de raspados de pezón y muestras de leche de cuartos, de vacas sanas. Estos estudios, al igual que los de Woodward y col. (1987), mostraron el aislamiento de bacterias Gram (+) en la flora microbiana normal de las ubres.

Otros aportes importantes y similares a los de nuestro trabajo, son los realizados por Woodward y col. (1988) y White y col. (1989), tanto en piel, como en canal del pezón. Estos autores indican la presencia de SCN y bacilos Gram (+) catalasa [+] como *Bacillus* y *Pseudomonas*, aunque también registran la presencia de *Corynebacterium*, *Micrococcus* spp., *Acinetobacter* spp. y *Aerococcus* spp., géneros no identificados en nuestro estudio.

Con respecto a lo publicado por Sandholm y Pyorala (1995) lo informado en nuestro trabajo tiene cierta concordancia con sus registros, dado que ellos afirman que cuando el contenido de bacterias en leche es bajo, las bacterias Gram (+) predominan, en cambio cuando el contenido es elevado, las bacterias Gram (-) dominan, pudiendo representar hasta un 80% del total de la flora bacteriana.

En resumen, en función de los resultados obtenidos y lo expuesto por distintos investigadores, nuestros resultados coinciden, entre otras cosas, con lo expuesto por Gill y col. (2006), sobre la existencia de distintos géneros bacterianos en el canal del pezón bovino.

Otro interesante resultado encontrado fue que bacilos Gram (-) pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* y el género *Bacillus* spp fueron hallados en casi la totalidad de los cuartos mamarios muestreados. La Figura 20, muestra los valores obtenidos. Estos resultados

coinciden con los reportados por Woodward y col. (1987 y 1988), White y col. (1989), Sandholm y Pyorala (1995) y Gill y col. (2006).

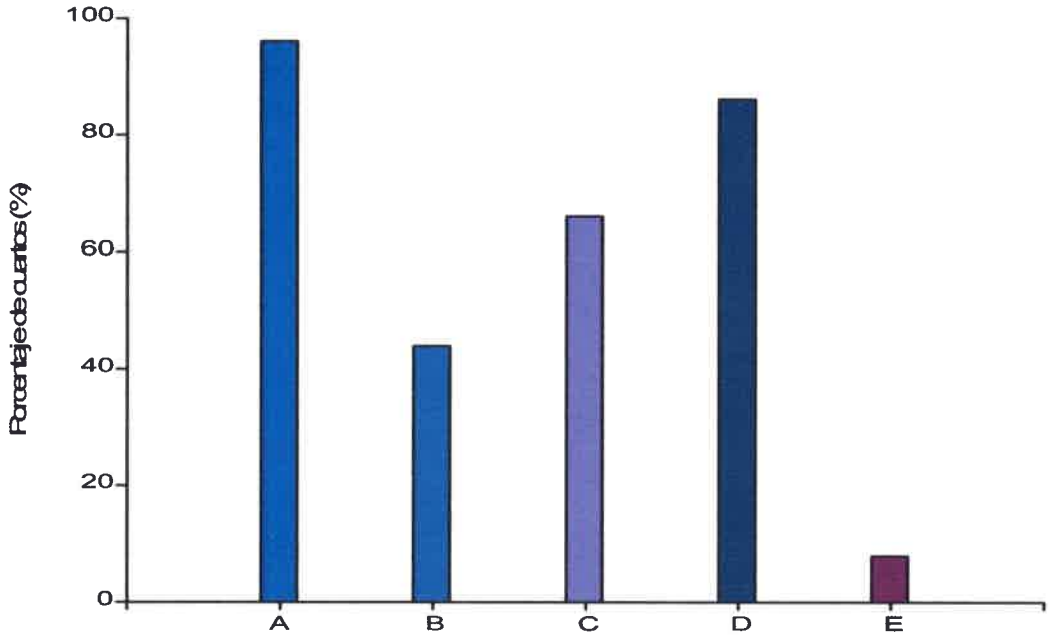


Figura 20: Porcentaje de cuartos mamarios con presencia de A: Enterobacterias no coliformes. B: *Staphylococcus* spp. C: *Enterococcus* spp. D: *Bacillus* spp. E: *Pseudomonas* spp., aislados de 100 muestras individuales de raspado de pezón bovino.

Por otro lado, los microorganismos pertenecientes a los géneros *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp. y los de la familia *Enterobacteriaceae* se encontraron en al menos un cuarto de la totalidad de las vacas muestreadas (n: 25); mientras que los géneros bacterianos como *Staphylococcus* spp. y *Pseudomonas* spp., solo se hallaron en al menos un cuarto de 20 y 8 vacas, respectivamente (Figura 21).

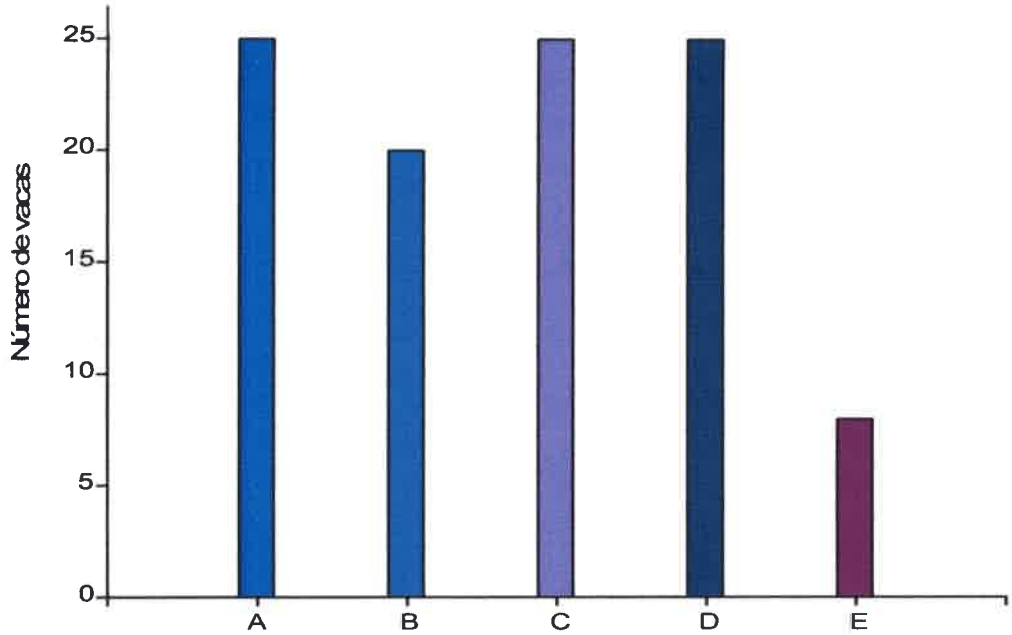


Figura 21: Número de vacas con presencia de A: Enterobacterias no coliformes. B: *Staphylococcus* spp. C: *Enterococcus* spp. D: *Bacillus* spp. E: *Pseudomonas* spp., aislados de 100 muestras individuales de raspado de pezón bovino.

Otro dato interesante fue la distribución de las 15 cepas mencionadas anteriormente entre un pezón y otro (n: 2-7) y de una vaca a otra (n: 5-11) que mostró medias de 4,5 y 8 para cada uno, respectivamente. Se puede observar claramente que el número de cepas que se encuentran en un cuarto mamario, difiere del número de cepas que se encuentra en una vaca, es decir en la sumatoria de los cuatro cuartos, lo que nos lleva a pensar que la distribución de la flora microbiana normal de pezón, varía considerablemente de un cuarto o pezón a otro.

En relación a lo expresado anteriormente, un estudio en bovinos (Woodward y col., 1987), muestra resultados inferiores a los nuestros, ya que informan medias de 7 y 28 para la flora aislada de pezón y de vaca, respectivamente. Pero teniendo en cuenta que en este estudio se pudieron identificar cerca de 12 géneros bacterianos, dato superior a lo informado en nuestro trabajo (n: 4), nuestros resultados no estarían tan alejados de lo informado por estos investigadores. Además, las variaciones registradas entre ambos trabajos podrían atribuirse, no solo a la diferencia de raza animal, sino también a la diversidad de habitad, manejo de rodeo (ordeño) y condiciones climáticas en el cuales habitan sendos rodeos.

La comparación del porcentaje de colonias aisladas, correspondientes a cada género y grupo bacteriano, entre cuartos CMT negativos y CMT trazas, 1 y 2 se observa en la Figura 22. De las 18.259 (ufc/placa) registradas, 11.408 ufc/placa fueron aisladas de cuartos CMT trazas, 1 y 2, y 6.851 ufc/placa de cuartos CMT negativos. De la totalidad de colonias aisladas de

cuartos CMT traza, 1 y 2, 6.232 ufc/placa correspondieron a enterobacterias no coliformes, mientras que 2.243, 2.085, 835 y 13 ufc/placa fueron para *Staphylococcus* (SCN), *Enterococcus*, *Bacillus* y *Pseudomonas*, respectivamente. En lo que respecta a los cuartos CMT negativos, enterobacterias no coliformes fue el más numeroso con 3.411 ufc/placa, mientras que 1.410, 1.406, 601 y 23 ufc/placa fueron para *Enterococcus*, *Staphylococcus* (SCN), *Bacillus* y *Pseudomonas*, respectivamente.

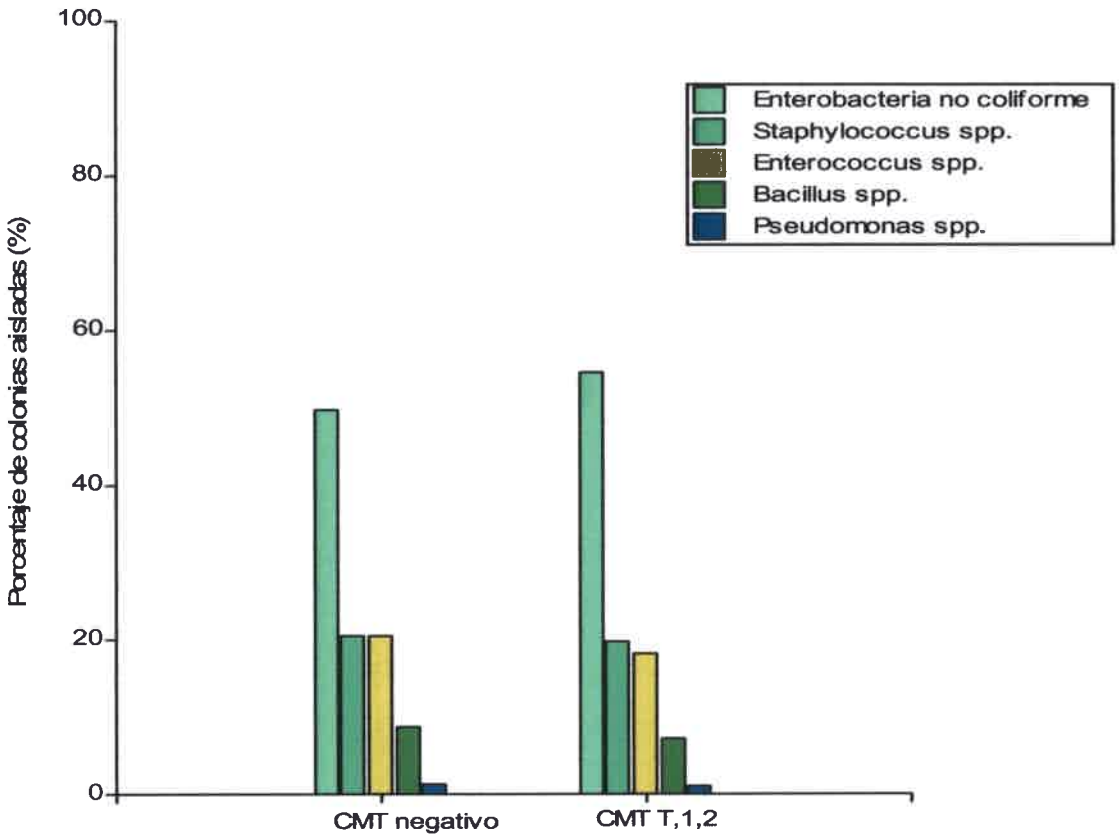


Figura 22: Porcentaje de colonias consideradas flora microbiana normal, por géneros y grupo bacteriano, aisladas de 100 muestras individuales de raspado de pezón bovino. Comparación entre cuartos sanos (CMT negativo) y cuartos con distintos grados de afección (CMT T, 1 y 2).

La Figura 22 refleja que no solo los 4 tipos de géneros y el grupo bacteriano fueron encontrados en la totalidad de los cuartos CMT negativos y CMT trazas, 1 y 2, sino que además los porcentajes de cepas halladas respecto a cada género y grupo bacteriano fueron similares entre cuartos CMT negativos y no negativos. Los resultados obtenidos estarían indicando que la flora microbiana normal, no presentaría variaciones cualitativas, entre cuartos sanos y cuartos con distintos grados de afección.

En la Figura 23, se observa que los diferentes géneros y el grupo bacteriano, aislados de la flora microbiana normal, se distribuyeron en forma similar en cuartos CMT positivos y negativos. Enterobacterias no coliformes fue el grupo bacteriano que mayor número de cuartos CMT positivos y negativos colonizó, seguido por los géneros *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp. y *Pseudomonas* spp., respectivamente.

Por otro lado, no existieron diferencias estadísticamente significativas (p-valor<0,05) entre las medianas de los recuentos (ufc) de las colonias flora normal, correspondiente a tres géneros y un grupo bacteriano (enterobacterias no coliformes, *Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp. y *Pseudomonas* spp.), entre cuartos CMT positivos y CMT negativos. Solamente para el género *Enterococcus* spp. se registraron diferencias significativas con el modelo estadístico aplicado (Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis). Además, se observó una gran dispersión de los recuentos (ufc) por encima de la mediana en el grupo enterobacterias no coliformes y los géneros *Staphylococcus* spp, principalmente, y *Enterococcus* spp. en los cuartos CMT positivos, respecto de los negativos. En cambio, la totalidad de los géneros y el grupo bacteriano no presentaron una marcada dispersión en los recuentos (ufc) por debajo del valor de la mediana.

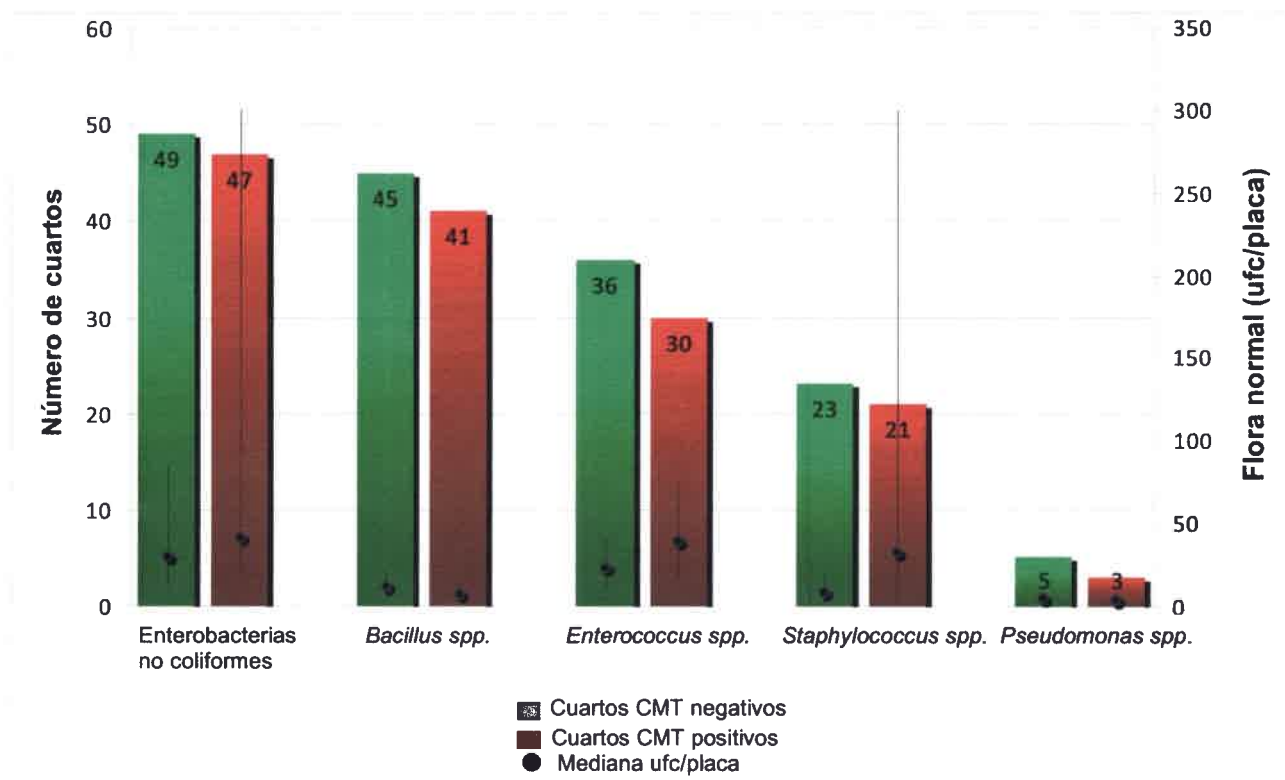


Figura 23: Número de cuartos CMT positivos y negativos y distribución del recuento de la flora microbiana normal (ufc/placa) por géneros y grupo bacteriano aislado (n: 5). Los extremos de las líneas (negras) corresponden a los valores del percentil 75 (superior) y 25 (inferior).

C. ESTUDIOS *IN VITRO* A BACTERIAS LÁCTICAS CARACTERIZADAS COMO POTENCIALMENTE PROBIÓTICAS

Con la finalidad de determinar si BL, aisladas de leche bovina, presentan capacidades de exclusión a diferentes microorganismos y adherencia a células del canal del pezón bovino se emplearon 12 BL, de las cuales 8 BL fueron aisladas en tambos representativos de la región centro-sur de la provincia de Córdoba (Tabla 5) y 4 BL en tambos representativos de la región noroeste de la provincia de Tucumán (Tabla 7).

Tabla 7. Bacterias lácticas aisladas de leche bovina en tambos del noroeste de Tucumán por integrantes del CERELA-CONICET y seleccionadas por sus características probióticas. Detalle de sus propiedades benéficas individuales.

Cepas	Propiedades superficiales				Producción de sustancias inhibitorias					Origen de las muestras		
	Hydrofobicidad		*Auto-agregación*		*Prod. H_2O_2*	*Acid. lác. (g/l)*	*Acid. acét. (g/ml)*	*Inhib. patóg.*	*Subs. Inhib.*	*O*	*F*	*ES*
	(%)	Grupo	(%)	Grupo								
L. plantarum CRL 1716	96,87	Alto	51,95	Medio	NP	5,6703	0,6135	4	AO	Le	Ms	S
L. perolens CRL 1724	75,09	Alto	5,55	Bajo	NP	10,0208	0,5694	2,4	AO	Le	Mf	S
Lc. lactis subsp. lactis CRL 1655	13,51	Bajo	14,37	Bajo	P	6,0571	0,5122	1,4,5, 6,10	B	Le	Mf	S
Ent. mundtii CRL1656	0,00	Bajo	11,11	Bajo	P	6,4923	0,4824	3	B	Le	Ms	S

Fuente: Espeche y col., 2009.

Referencias: O: origen; F: fracción; ES: estado de salud; P: productora; NP: no productora; 1: *Staph. aureus* ATCC 29740; 2: *Strep. dysgalactiae* ATCC 27957; 3: *Listeria monocytogenes* Scott A; 4: *Strep. uberis*; 5: *Staph. coagulasa negativo;* 6: *Staph. aureus*; *10: Strep. agalactiae* ATCC 27956; AO: ácido orgánico; B: bacteriocina; Le: leche; Mf: Muestra tomada del primer descarte de leche; Ms: Muestra tomada del último descarte de leche; S: sano.

1. Ensayos de inhibición

1.1. Bacterias lácticas vs bacterias consideradas flora microbiana normal

Teniendo en cuenta que la flora microbiana normal juega un rol importante dentro del canal del pezón bovino, ya sea influyendo en las variaciones de susceptibilidad a la mastitis (Woodward y col., 1987) o produciendo una amplia variedad de inhibidores contra bacterias Gram positivas y agentes patógenos de mastitis (Al-Qumber y Tagg, 2006), resultó de interés su aislamiento e identificación; y estudiar su comportamiento frente a las diferentes BL previamente aisladas. En este sentido y con la finalidad de determinar si las cepas BL seleccionadas como potenciales probióticos pueden inhibir a los microorganismos más

frecuentemente aislados de la flora microbiana normal del canal del pezón, se desarrolló un ensayo de inhibición *in vitro* entre las BL y las cepas aisladas del canal del pezón.

Como se observa en la Tabla 8, 7 de las 12 BL ensayadas presentaron inhibición intermedia-alta a 10 o más de las 15 cepas de flora normal ensayadas. De ellas, *Ent. hirae* CRL 1837 y *L. perolens* CRL 1724 fueron las cepas que mayor efecto inhibitorio produjeron, capaces de producir inhibición intermedia-alta frente a 14 de las 15 cepas (93,3%), seguido por *W. cibaria* CRL 1833 (12/15), *Ent. hirae* 7-3 (11/15), *Ent. mundtii* CRL 1656 (11/15), *W. cibaria* CRL 1840 (10/15) y *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 (10/15). *L. plantarum* CRL 1716 fue la cepa que menor efecto inhibitorio produjo (2/15), siendo incapaz de inhibir a 8 de las 15 cepas. En este sentido *P. pentosaceus* CRL 1831 y *L. plantarum* CRL 1716 no fueron capaces de inhibir a una cepa de *Enterococcus* spp.

En función a las características de las cepas utilizadas, su actividad antagónica estaría dada por la producción de algunos de sus metabolítos: ácido orgánico, peróxido de hidrógeno y/o bacteriocinas. Teniendo en cuenta que todas las cepas son productoras de ácidos orgánicos, existen investigaciones que asocian la elevada actividad antagónica de las BL con la producción de ácido orgánico y la consecuente disminución del pH del medio (Ouwehand y Vesterlund, 2004). En este sentido, Blom y Mørtvedt (1991) revelaron la correlación positiva que existe entre el pH, la producción de ácido láctico y la actividad antimicrobiana. Donde la inhibición del crecimiento microbiano por el ácido láctico puede ser explicada a partir del ingreso de iones hidrógenos a través de la membrana celular, que causa la acidificación del citoplasma y la disipación del gradiente de pH.

Tabla 8. Actividad antimicrobiana de 12 bacterias lácticas aisladas de leche bovina frente a 15 cepas consideradas flora microbiana normal, aisladas del canal del pezón bovino.

Microorganismos		Bacterias Lácticas											
		P. pentosaceus CRL 1831	*P. pentosaceus* CRL 1832	*W. cibaria* CRL 1840	*W. cibaria* CRL 1833	*Ent. hirae* 7-3	*Ent. hirae* CRL 1834	*Ent. hirae* CRL 1835	*Ent. hirae* CRL 1837	*Ent. mundtii* CRL 1656	*Lc. lactis subsp lactis* CRL 1655	*L. perolens* CRL 1724	*L. plantarum* CRL 1716
		Diámetro de la zona de inhibición en (mm*)											
Flora Microbiana Normal	**Cepas**												
Enterobacterias no coliformes	A	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-
	B	++	++	++	++	++	++	++	+++	++	++	++	+
	C	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+++	++
Staphylococcus spp.	D	+	++	++	++	++	+	+	++	++	++	++	-
	E	+	+	+	+	+	+	+	++	+	+	++	-
	F	+	++	+	++	+++	++	+	++	++	+	++	-
Enterococcus spp.	G	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	-
Pseudomonas spp.	H	+	++	++	++	++	+	+	++	++	++	++	-
Bacillus spp.	I	+	+	+	++	+	+	++	++	++	+	++	-
	J	++	+	++	++	++	+	++	++	++	++	++	-
	K	+	+	++	++	+	+	+	++	++	++	++	+
	L	++	++	++	++	++	+	+	++	++	++	++	+
	M	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+
	N	+	+	+	+	++	+	+	++	+	+	++	++
	O	+	++	++	++	++	++	++	++	+	++	+	+

(*) Interpretación del diámetro de las zonas de inhibición: -: no inhibición; +: 1 - 12 mm; ++: 13 - 25 mm; +++: más que 25 mm. Las determinaciones fueron realizadas por duplicado. Cepas A-O.

A pesar de que los resultados obtenidos no pueden ser comparados con otros trabajos, dado que consideramos que el mismo es el primero registrado hasta el momento, esta investigación aporta una valiosa información para poder tener una idea global sobre el futuro comportamiento de las BL dentro del canal del pezón bovino. Siempre teniendo en cuenta que, como lo afirma Gill y col. (2006), estas especies bacterianas consideradas flora microbiana normal del canal del pezón bovino son la primera barrera de defensa contra la invasión de patógenos en la glándula mamaria.

1.2. Bacterias lácticas vs bacterias causantes de mastitis bovina

Es sabido que son numerosos los microorganismos causantes de mastitis bovina, siendo su prevalencia muy cambiante dependiendo de la zona geográfica donde se encuentre el establecimiento lechero. Los tambos argentinos no están exentos de estos microorganismos, tanto contagiosos como ambientales, siendo *Staph. aureus, Strep. agalactiae*, *Staph.* coagulasa negativos (SCN), *Strep. dysgalactiae* y *Strep. uberis* los mas prevalentes en las mastitis subclínicas y clínicas (Calvinho y Tirante, 2005).

Durante el presente estudio, se ensayó *in vitro* la inhibición producida por las 12 BL mencionadas anteriormente contra dieciocho microorganismos. Dieciséis bacterias causantes de mastitis bovina: *Strep. agalactiae* ATCC27956, *Strep. dysgalactiae* ATCC27957, *Staph. aureus* RC108, *Staph. aureus* ATCC25923, SCN 947, *Strep. uberis* 102, *Strep. uberis* ATCC27958, *Strep. uberis* 19436, *Strep. hyicus* 112249, *Strep. bovis* ATCC27960, *Ent. faecalis* 19433, *Ent. faecium* 35667, *Pseudomonas* spp., *E. coli*, *E. coli* ATCC35218 y *Klebsiella pneumoneae* ATCC10031, todos aislados de vacas con distintos tipos de mastitis y pertenecientes a la cuenca lechera de la región centro-sur de la provincia de Córdoba; mas dos cepas infrecuentemente reconocidas como patógenos causantes de mastitis bovina: *Strep. mitis* ATCC98011, comúnmente aislado de leche contaminada con residuos antimicrobianos (Faría Reyes y col., 2002), y *Aerococcus viridans* ATCC11563, saprófito generalmente aislado del aire o del polvo. Ambos microorganismos se encuentran frecuentemente presentes en cultivos y muestras contaminadas, principalmente *Aerococcus viridans* (Owens y col., 1990; Devriese y col., 1999) (Tabla 9).

Tabla 9. Actividad antimicrobiana de 12 bacterias lácticas aisladas de leche bovina frente a 18 bacterias causantes de mastitis bovina.

Microorganismos	Bacterias Lácticas											
	P. pentosaceus CRL 1831	*P. pentosaceus* CRL 1832	*W. cibaria* CRL 1840	*W. cibaria* CRL 1833	*Ent. hirae* 7-3	*Ent. hirae* CRL 1834	*Ent. hirae* CRL 1835	*Ent. hirae* CRL 1837	*Ent. mundtii* CRL 1656	*Lc. lactis subsp lactis* CRL 1655	*L. perolens* CRL 1724	*L. plantarum* CRL 1716
	Diametro de la zona de inhibicion en (mm*)											
Staph. aureus ATCC25923	+	+	+	+	++	+	++	+	+	+	-	-
Staph. aureus RC108	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
SCN947	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+
Strep. agalactiae ATCC27956	++	+	+	+	++	+	+	+	++	+	+	-
Strep. dysgalacteae ATCC27957	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	++	++
Strep. uberis 102	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Strep. uberis ATCC27958	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Strep. uberis 19436	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Strep. hyicus 112249	+	+	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+
Strep. bovis ATCC27960	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Ent. faecalis 19433	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Ent. faecium 35667	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Pseudomonas spp.	+	+	+	+	+	+	++	+	++	+	+	++
E. coli	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+
E. coli ATCC35218	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+
Klebsiella pneumoneae ATCC10031	++	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+
Strep. mitis ATCC98011	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Aerococcus viridans ATCC11563	++	++	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++

(*) Interpretación del diámetro de las zonas de inhibición: -: no inhibición; +: 1 - 12 mm; ++: 13 - 25 mm; +++: más que 25 mm. Las determinaciones fueron realizadas por duplicado.

De la totalidad de las BL ensayadas, 2 presentaron inhibición intermedia-alta a 5 o más de las 18 cepas bacterianas causantes de mastitis bovina. *Ent. hirae* 7-3 fue la cepa de mayor efecto inhibitorio, presentando una inhibición intermedia-alta frente a 8 de las cepas bacterianas ensayadas (44,4%), seguido por *Ent. hirae* CRL 1835 que presentó una inhibición intermedia-alta frente a 5 cepas (27,7%). Ambas cepas mostraron inhibición intermedia-alta frente a dos de los patógenos más prevalentes en mastitis clínicas: *Staph. aureus* y *Strep. dysgalactiae*.

Del mismo modo que lo ocurrido en el ensayo de inhibición de las BL frente a la flora microbiana normal, en este ensayo 2 BL no fueron capaces de inhibir a las 18 cepas bacterianas causantes de mastitis bovina: *L. perolens* CRL 1724 no inhibió a 3 y *L. plantarum* CRL 1716 no inhibió a 10 de las 18.

Diferentes investigadores han estudiado la capacidad de inhibición de las BL a cepas patógenas causantes de diversas enfermedades, atribuyendo esta capacidad a la producción de sustancias inhibitorias que estas cepas generan. Este es el caso de Juárez Tomás y col. (2003), quienes atribuyeron la capacidad de *Lactobacillus* vaginales para inhibir patógenos urogenitales (como *Staph. aureus*, *Strep. agalactiae* y enterococos) a la producción de ácido láctico y por ende a la disminución del pH del medio. Los trabajos de Marsalková y col. (2004) y Hütt y col. (2006) demostraron el efecto inhibitorio de *L. plantarum* hacia diversos patógenos tanto mastíticos (*Staph. aureus, Strep. uberis* y *Strep. agalactiae*) como humanos (entéricos y urinarios); y el trabajo de Con y Gokalp (2000) quienes atribuyeron el efecto inhibitorio de las BL a diferentes metabolitos como ácido láctico, ácido acético, diacetilo, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas, entre otros.

En este sentido, y como lo afirma Perea Vélez y col. (2007), la actividad antimicrobiana producida por las cepas BL frente a los distintos patógenos cumple dos roles indispensables, por un lado evitar la invasión de diferentes cepas consideradas agentes causales de enfermedades y por otro lado prevenir nuevas infecciones.

2. Ensayo de co-agregación

La co-agregación es un método importante para evaluar la estrecha interacción entre las BL y las bacterias patógenas, ya que las BL (principalmente los lactobacilos) presentan proteínas de superficie de unión a superficies medio ambientales y a otras bacterias (Soleimani y col., 2010). Algunos autores (Reid y McGroarty, 1988) afirman que la co-agregación podría ser beneficiosa para aquellas BL que producen sustancias antimicrobianas, ya que produciría la muerte de aquellas bacterias patógenas que presentan un contacto más estrecho con las BL.

Se estudió la capacidad de las 12 BL para co-agregar con las 18 cepas bacterianas causantes de mastitis bovina.

Como se observa en la Tabla 10, 8 BL (67%) fueron capaces de co-agregar con la totalidad de las bacterias causantes de mastitis bovina ensayadas; y 5 BL mostraron presencia de co-agregación con 9 o más bacterias causantes de mastitis bovina: *Ent. hirae* CRL 1835 (9/18), *W. cibaria* (10/18), *P. pentosaceus* CRL 1831 (11/18), *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 (11/18) y *L. perolens* CRL 1724 (11/18) (Figura 24), lo que sugiere que el proceso de co-agregación dista de ser inespecífico.

La finalidad de este estudio fue conocer más sobre la capacidad individual de las cepas BL de auto-agregarse y co-agregarse, principalmente a bacterias consideradas agentes causales de mastitis bovina, ya que esta propiedad es una característica fundamental para la aplicación futura de las mismas en la prevención de la salud animal.

Existen relativamente pocas publicaciones sobre co-agregación de BL *in vitro*, por lo que resulta difícil comparar los resultados obtenidos con otros trabajos. Soleimani y col. (2010), informaron co-agregación positiva entre cuatro cepas de *Lactobacillus* (*L. acidophilus, L. plantarum, L. casei y L. reuteri*) y dos cepas de *Staph. aureus,* una aislada de mastitis bovina y una cepa de colección, *Staph. aureus* ATCC25923.

Por otro lado, existen trabajos que hacen referencia a la técnica aplicada. Uno de ellos es el de Pascual y col. (2008) quien atribuye que el efecto de la co-agregación generado por las cepas BL sería el de generar un área alrededor de las cepas patógenas para permitir el incremento de la concentración de las sustancias antimicrobianas producidas por ellas, favoreciendo así la eliminación de los patógenos invasores. Boris y col. (1998) expresan que la capacidad de las cepas BL de encerrar a las cepas patógenas, estaría altamente relacionada con prevenir la adherencia de los patógenos a los receptores de los tejidos. Este efecto evitaría la colonización de las cepas patógenas a las células epiteliales, favoreciendo su remoción.

En síntesis, la capacidad de las cepas BL de auto-agregarse y co-agregarse, principalmente a bacterias consideradas agentes causales de mastitis bovina, es una propiedad y una característica fundamental de las mismas para su aplicación futura en la prevención de la salud animal o de otros organismos.

Tabla 10. Co-agregación de 12 bacterias lácticas aisladas de leche bovina frente a 18 bacterias causantes de mastitis bovina.

Microorganismos	Bacterias Lácticas											
	P. pentosaceus CRL 1831	*P. pentosaceus* CRL 1832	*W. cibaria* CRL 1840	*W. cibaria* CRL 1833	*Ent. hirae* 7-3	*Ent. hirae* CRL 1834	*Ent. hirae* CRL 1835	*Ent. hirae* CRL 1837	*Ent. mundtii* CRL 1656	*Lc. lactis subsp lactis* CRL 1655	*L. perolens* CRL 1724	*L. plantarum* CRL 1716
	Presencia de co-agregación por campos observados al microscopio óptico (*)											
Staph. aureus ATCC25923	+++	+++	++	++	++	+++	++	+	+++	+++	++	++
Staph. aureus RC108	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++
SCN947	+++	+++	+++	-	+++	++	++	+	++	++	+++	+++
Strep. agalactiae ATCC27956	++	+	+++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+
Strep. dysgalacteae ATCC27957	++	+++	+++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	++
Strep. uberis 102	+++	++	++	++	+++	+	+++	+++	+++	+++	++	+
Strep. uberis ATCC27958	++	++	++	+	++	++	+++	++	++	+++	+++	++
Strep. uberis 19436	+	+	+++	++	+++	++	++	-	++	++	+++	++
Strep. hyicus 112249	++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	++	+++	+++
Strep. bovis ATCC27960	+++	++	+++	++	++	+++	+++	++	+	+++	+++	+++
Ent. faecalis 19433	+++	++	++	+++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
Ent. faecium 35667	+++	++	++	++	++	++	++	+++	++	+++	+++	+++
Pseudomonas spp.	+++	+++	+++	-	++	+++	+++	++	++	-	+	-
E. coli	+++	+++	+++	++	+	+++	+++	+++	++	+++	++	-
E. coli ATCC35218	++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	++	++	+++
Klebsiella pneumoneae ATCC10031	+++	++	+++	++	++	+++	+++	+	+++	+++	+	++
Strep. mitis ATCC98011	++	++	++	+	+++	+	+	++	+++	++	+++	-
Aerococcus viridans ATCC11563	+++	++	+	++	+++	+	+	++	++	++	+++	+++

(*) Interpretación de co-agregación en cinco campos observados al azar: -: ausencia; +: presencia en 1 campo; ++: presencia en 2-3 campos; +++: presencia en 4-5 campos. Las determinaciones fueron realizadas por duplicado.

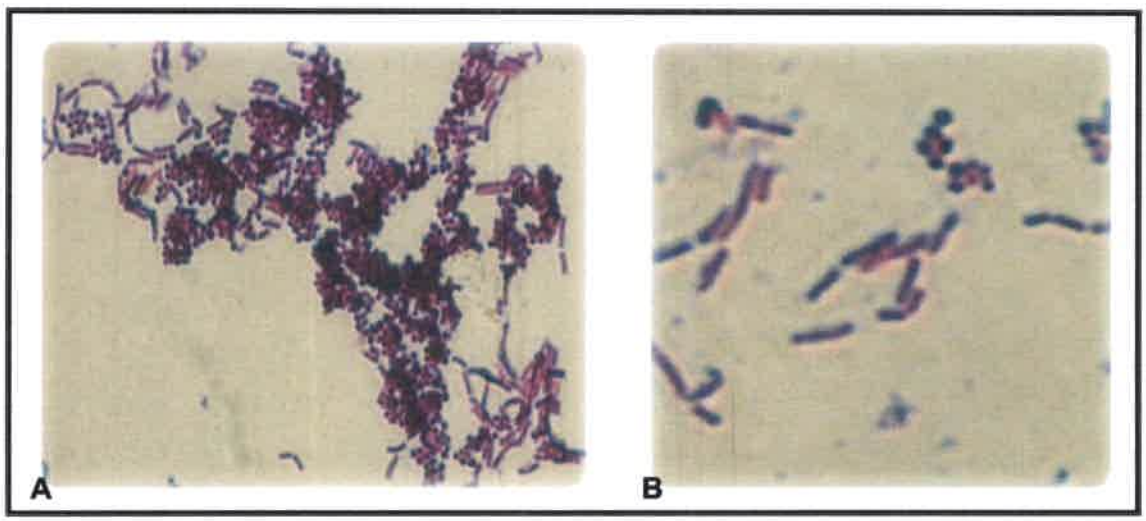


Figura 24: Microscopía óptica de tinción de Gram, mostrando la auto-agregación del *L. perolens* CRL 1724 y su co-agregación frente a *Strep. mitis* ATCC98011 (A) (40x); y la ausencia de co-agregación entre *L. plantarum* CRL 1716 y *Strep. mitis* ATCC98011 (B) (100x).

3. Ensayo de adhesión

Para llevar a cabo este ensayo fue necesario, aislar una gran cantidad de células epiteliales del canal y la cisterna del pezón bovino (Figura 25), llevando a cabo la metodología mencionada en el inciso 3.2. de la sección C de Métodos.

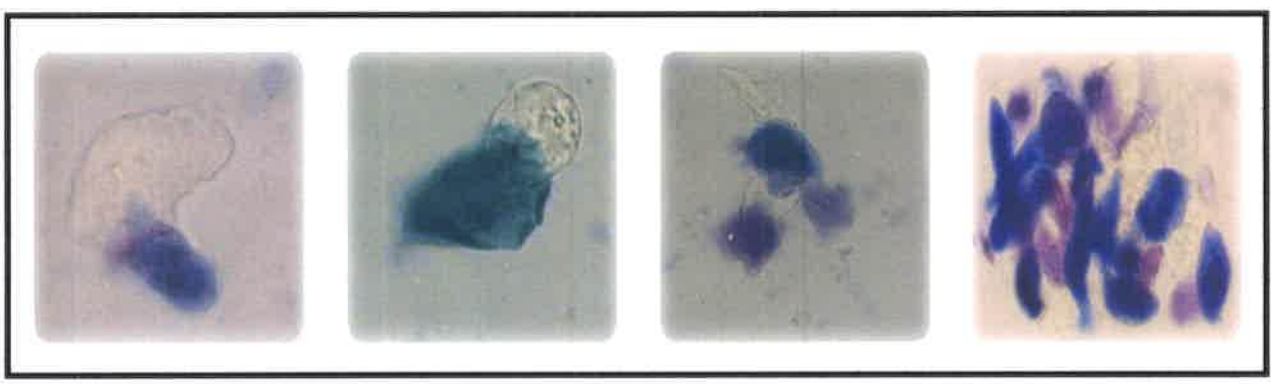


Figura 25: Microscopía óptica de fresco de células epiteliales mamarias bovinas, aisladas de raspado de canal y cisterna de pezón bovino, teñidas con azul de Trypan. Células viables sin coloración (traslúcidas) y células muertas de color azul-violáceo (100x).

A partir del aislamiento de las células del canal y la cisterna del pezón bovino, se llevó a cabo el ensayo de adhesión de las BL seleccionadas. Los valores obtenidos: porcentaje e índice de adhesión, se muestran en la Tabla 11 y se representan en la Figura 26.

Tabla 11. Porcentaje e índice de adhesión a células epiteliales del canal y la cisterna del pezón bovino de bacterias lácticas aisladas de leche bovina.

Análisis	Bacterias Lácticas											
	P. pentosaceus CRL 1831	*P. pentosaceus* CRL 1832	*W. cibaria* CRL 1840	*W. cibaria* CRL 1833	*Ent. hirae* 7-3	*Ent. hirae* CRL 1834	*Ent. hirae* CRL 1835	*Ent. hirae* CRL 1837	*Ent. mundtii* CRL 1656	*Lc. lactis subsp lactis* CRL 1655	*L. perolens* CRL 1724	*L. plantarum* CRL 1716
Porcentaje de Adhesión (%)	99	76	92	85	97	87	96	91	59	93	75	37
Indice de adhesión	9.3	6.9	21.1	7	23.4	8.6	36.7	20.6	8.1	27.9	14.4	7.4

De la totalidad de las cepas (n: 12), 6 presentaron porcentajes de adhesión superiores al 90%. De ellas, *P. pentosaceus* CRL 1831 mostró el mayor porcentaje (99%) y solo una de las cepas estudiadas presentó un porcentaje de adhesión inferior al 50%: *L. plantarum* CRL 1716.

Por otro lado, *Ent. hirae* CRL 1835 fue la cepa con mayor índice de adhesión (36.7) (Figura 26). Este valor, claramente superior al registrado por las demás cepas BL, nos da un claro indicio de la eficiencia de adhesión de esta cepa por sobre el resto. En contraste, *P. pentosaceus* CRL 1832 fue la cepa que menor índice de adhesión registró: 6.9.

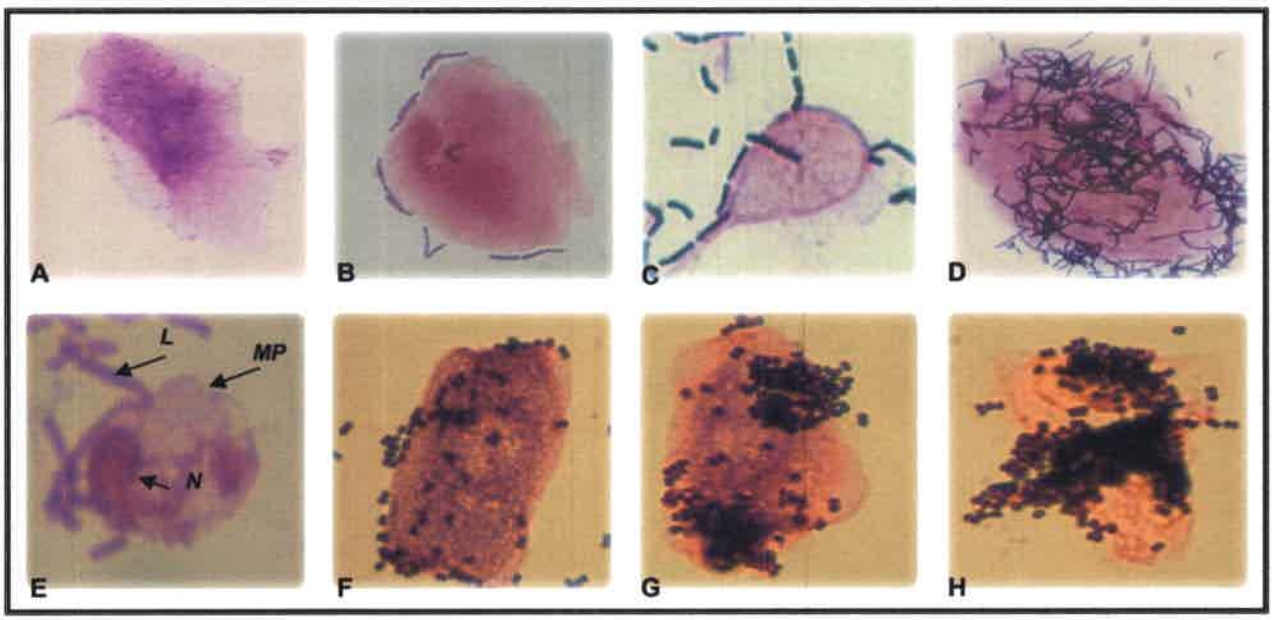


Figura 26: Microscopía óptica de tinción de Gram y H-E, mostrando la adhesión de *L. perolens* CRL 1724 y *Ent. hirae* CRL 1835 a células epiteliales mamarias bovinas, aisladas de raspado de canal y cisterna de pezón bovino. A) Célula epitelial control (Gram 100x). B) y C) Diferentes cantidades de *L. perolens* CRL 1724 adheridos a la superficie de las células epiteliales, mostrando una distribución irregular (Gram 100x). D) Agregación y *clusters* de *L. perolens* CRL 1724 adheridos a la superficie epitelial (Gram 100x). E) *L. perolens* CRL 1724 adherido a una célula epitelial mamaria bovina mostrando núcleo (*N*), lactobacilo (*L*) y membrana plasmática (*MP*) celular (H-E 100x). F) Diferentes cantidades de *Ent. hirae* CRL 1835 adheridos a la superficie de las células epiteliales, mostrando una distribución irregular (Gram 100x). G-H) Agregación y *clusters* de *Ent. hirae* CRL 1835 adheridos a la superficie epitelial que denotan el elevado índice de adhesión (Gram 100x).

En relación a la técnica empleada, numerosos son los trabajos relacionados al estudio de adherencia de las BL a las células epiteliales. Excepto por el trabajo de Bouchard y col. (2012), quienes mostraron la habilidad de cepas de *L. casei* para prevenir la invasión de *Staph. aureus* a células epiteliales mamarias bovinas (MAC-T), no existen en la actualidad trabajos que utilicen células epiteliales del canal y la cisterna del pezón bovino en ensayos de adherencia de BL.

Ocaña y Nader Macías (2001) y Otero y Nader Macías (2007) aislaron células epiteliales vaginales bovinas y las enfrentaron a diferentes cepas de *Lactobacillus* (*L. crispatus* CRL 1266, *L. gasseri* CRL 1412, *L. gasseri* CRL 1421 y *L. delbrueckii*) obteniendo resultados similares a los nuestros: porcentajes de adhesión entre 61%-100%, e índice de adhesión entre 10 y 22.

A lo largo de los años diferentes reportes han asociado la capacidad de adhesión de las BL a células epiteliales, con la presencia de receptores de diferente naturaleza. Este es el caso de Brooker y Fuller (1975) que lo relacionan con receptores de carbohidratos, o Henriksson y col. (1991) quienes hablan de receptores de naturaleza proteica. Por otro lado, Chan y col. (1985) y Otero y Nader Macías (2007) hacen referencia a esta capacidad con receptores de naturaleza de ácidos lipoteicoicos y glicoproteínas naturales, respectivamente.

Reid y col. (2003) destacan las características benéficas con las que cuentan los microorganismos considerados probióticos. Entre estas encontramos: la capacidad de producir sustancias antagónicas, la presencia de estructuras relacionadas con la adherencia a los tejidos del huésped y la capacidad de colonizar diferentes sitios de la mucosa. En este sentido, las propiedades con las que cuentan este tipo de microorganismos les otorgan un beneficio por sobre las demás cepas, como evadir y resistir diferentes mecanismos de desplazamiento generados tanto por factores internos como externos, siendo la adherencia al epitelio mamario, el primer paso en la formación de una barrera para prevenir la colonización de microorganismos indeseables (Bouchard y col., 2012).

3.1. Evaluación de adhesión por microscopía electrónica de barrido

A partir del análisis de los resultados de adhesión de las BL a las células epiteliales mamarias bovinas, se pudo observar que la totalidad de mismas fue capaz de adherirse a las células. Por esta razón, se decidió profundizar el estudio mediante el uso de microscopía electrónica de barrido, razón por la cual se escogió al azar una de las BL: *L. perolens* CRL 1724 para llevar a cabo un nuevo ensayo de adhesión que permitiese evidenciar más claramente la adherencia de la BL a la superficie epitelial.

La adherencia de las BL a células epiteliales del canal del pezón y la cisterna bovina, fue analizada por microscopía electrónica de barrido. En la Figura 27, las microfotografías obtenidas por microscopía de barrido, muestran la adherencia de *L. perolens* CRL 1724 a la

superficie de la célula epitelial bovina y la agregación bacteriana de las mismas (Figura 27 A-D).

Una particularidad se muestra en la Figura 27 D, donde se observa que *L. perolens* CRL 1724 solo se adhiere a las superficies celulares libres del recubrimiento rugoso observado. Este recubrimiento posiblemente podría ser queratina, dado que las células del canal del pezón bovino son potencialmente productoras de esta sustancia y es muy probable que la misma haya sido arrastrada con las células epiteliales durante su aislamiento.

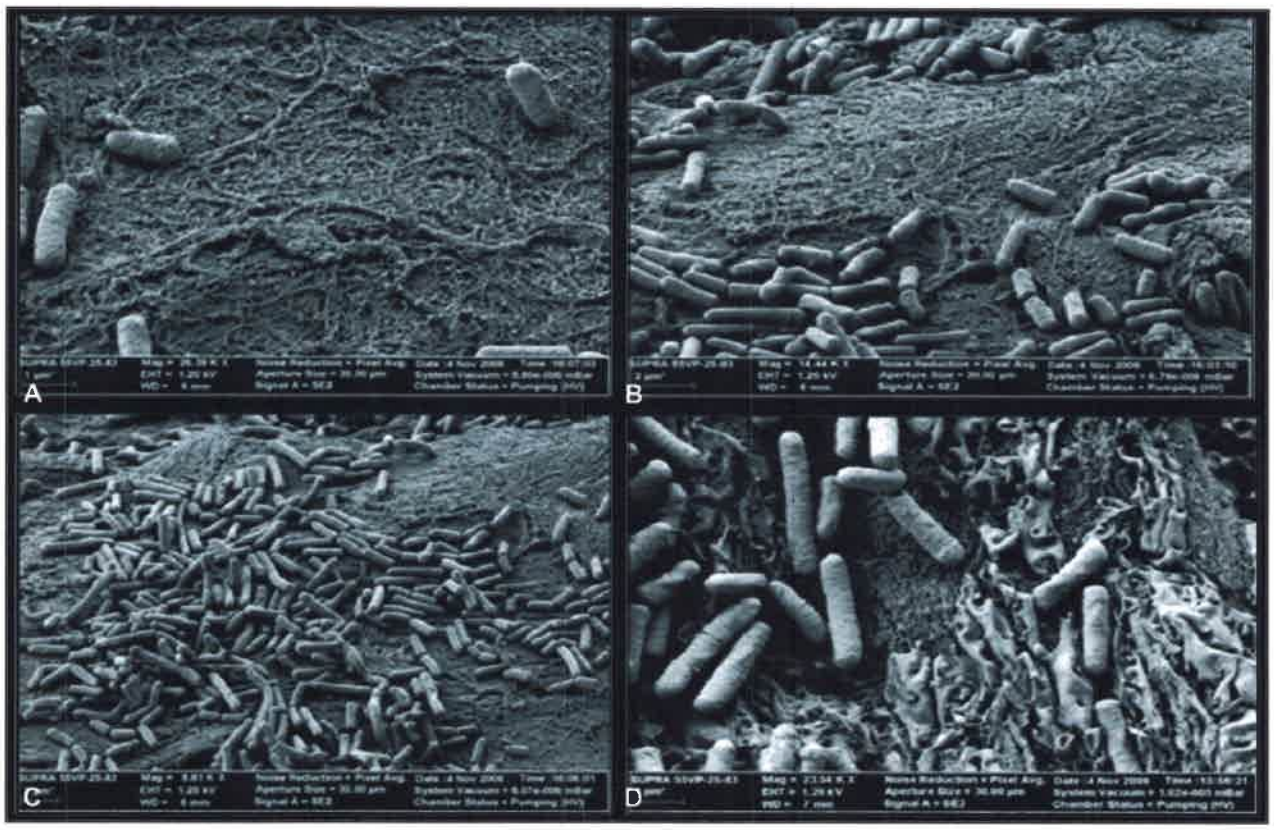


Figura 27: Adhesión de *L. perolens* CRL 1724 a células epiteliales mamarias bovinas por microscopía electrónica de barrido. A) Bacilos adheridos a la superficie celular (26390x); B-C) Bacilos adheridos y auto-agregados a la superficie de células epiteliales (14440x y 8610x, respectivamente); D) Adherencia de bacilos a la superficie celular libre del recubrimiento rugoso, posiblemente queratina (23540x).

4. Ensayo de auto-inhibición: bacterias lácticas vs bacterias lácticas

Con la finalidad de seleccionar las BL, para ser incluidas en un producto probiótico capaz de ser utilizado en la prevención de la mastitis bovina, se decidió realizar un estudio para determinar *in vitro* la capacidad de las cepas para auto-inhibirse. Para este ensayo se llevo a cabo el método de estrías cruzadas (inciso 4. de la sección C de Métodos) y se aplicó entre las 12 BL ya mencionadas.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 12, donde claramente se observa que de la totalidad de las cepas (n: 12) solo dos fueron capaces de auto-inhibirse: *Ent. hirae* 7-3 frente a *Ent. mundtii* CRL 1656 y *W. cibaria* CRL 1833 frente a *Ent. mundtii* CRL 1656.

A partir de los resultados obtenidos, resulta inviable mezclar estos pares de BL en el futuro producto probiótico, dado que la auto-inhibición limitaría el efecto deseado. Por el contrario, cualquier otra combinación podría realizarse con las demás cepas ya que no tienen la capacidad de auto-inhibirse.

Tabla 12. Actividad auto-inhibitoria de bacterias lácticas potencialmente probióticas aisladas de leche bovina.

Bacterias Lácticas	Cepas inhibidas (si/no)											
	Ent. hirae 7-3	*Ent. hirae* CRL 1835	*Ent. mundtii* CRL 1656	*Ent. hirae* CRL 1837	*P. pentosaceus.* CRL 1831	*P. pentosaceus* CRL 1832	*L. plantarum* CRL 1716	*Ent. hirae* CRL 1834	*L. perolens* CRL 1724	*Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655	*W. cibaria* CRL 1840	*W. cibaria* CRL 1833
Ent. hirae 7-3	-	no	**si**	no	no	no	no	no	no	no	no	no
Ent. hirae CRL 1835	no	-	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
Ent. mundtii CRL 1656	no	no	-	no	no	no	no	no	no	no	no	no
Ent. hirae CRL 1837	no	no	no	-	no	no	no	no	no	no	no	no
P. pentosaceus CRL 1831	no	no	no	no	-	no	no	no	no	no	no	no
P. pentosaceus CRL 1832	no	no	no	no	no	-	no	no	no	no	no	no
L. plantarum CRL 1716	no	no	no	no	no	no	-	no	no	no	no	no
Ent. hirae CRL 1834	no	no	no	no	no	no	no	-	no	no	no	no
L. perolens CRL 1724	no	no	no	no	no	no	no	no	-	no	no	no
Lc. lactis subsp. lactis CRL 1655	no	no	no	no	no	no	no	no	no	-	no	no
W. cibaria CRL 1840	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	-	no
W. cibaria CRL 1833	no	no	**si**	no	no	no	no	no	no	no	no	-

5. Selección de bacterias lácticas potencialmente probióticas

5.1. Criterio de selección de bacterias lácticas

Sin perder de vista la finalidad de este trabajo de investigación: "seleccionar las mejores BL potencialmente probióticas para ser incluidas en un futuro producto natural probiótico para la prevención de la mastitis bovina" se planteó un criterio capaz de seleccionar 3 de las 12 BL potencialmente probióticas aisladas de leche de bovinos de tambos de Córdoba y Tucumán.

La Tabla 13 sintetiza los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* llevados a cabo con las 12 BL seleccionadas a partir de los aislamientos realizados en tambos de Córdoba y Tucumán.

Tabla 13. Propiedades probióticas benéficas de 12 bacterias lácticas, aisladas de leche de cuartos mamarios bovinos, provenientes de tambos representativos de la región centro-sur de la provincia de Córdoba y del noroeste de Tucumán, Argentina.

N° Selección	Bacterias Lácticas	Características					N° de patógenos inhibidos (%)			N° de flora microbiana normal inhibida (%)			N° de patógenos co-agregados (%)	Adhesión a células epiteliales mamarias bovinas	
		O (*)	H (%)	A (%)	PI (**)	PP	(+)	(++)	(+++)	(+)	(++)	(+++)		IA	A (%)
1°	*Ent. hirae* CRL 1835	Vaca* sana	Baja (0,00)	Baja (4,93)	3,4**	P	65	30	5	53	40	7	100	36.7	96
2°	*Ent. hirae* CRL 1837	Vaca* MsC	Baja (2,38)	Baja (4,76)	3,4**	NP	80	15	5	7	80	13	95	20.6	91
3°	*P. pentosaceus* CRL 1831	Vaca* sana	Baja (0,00)	Baja (10,00)	-	AP	80	20	0	53	33	7	100	9.3	99
4°	*P. pentosaceus* CRL 1832	Vaca* MC	Baja (12,90)	Baja (4,62)	-	AP	80	20	0	40	53	7	95	6.9	76
5°	*Ent. hirae* CRL 1834	Vaca* sana	Baja (3,33)	Baja (7,69)	3,4**	NP	85	15	0	60	33	7	100	8.6	87
6°	*W. cibaria* CRL 1840	Vaca* MsC	Alta (74,54)	Baja (11,46)	-	DP	95	5	0	33	60	7	100	21.1	92
7°	*W. cibaria* CRL 1833	Vaca* sana	Alta (82,91)	Baja (8,41)	-	DP	95	5	0	20	73	7	85	7	85
8°	*Ent. hirae* 7-3	Vaca* MsC	Baja (1,66)	Baja (1,56)	-	AP	50	50	0	27	60	13	100	23.4	97
1°	*Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655	Vaca sana	Baja (13,51)	Baja (14,37)	1,5,6, 7,8**	P	90	5	5	33	60	7	95	27.9	93
2°	*Ent. mundi* CRL 1656	Vaca sana	Baja (0,00)	Baja (11,11)	3,4**	P	75	20	5	27	67	6	100	8.1	59
3°	*L. perolens* CRL 1724	Vaca sana	Alta (75,09)	Baja (5,55)	1,2	NP	67	11	0	7	86	7	100	14.4	75
4°	*L. plantarum* CRL 1716	Vaca sana	Alta (96,87)	Media (51,95)	1	NP	28	17	0	33	13	0	83	7.4	35

Fuente: modificado de Espeche y col., 2009 y Espeche-Pellegrino y col., 2012.

Referencias: O: origen; (*): cepa aislada de tambos de la provincia de Córdoba; MC: mastitis clínica; MsC: mastitis subclínica; H: hidrofobicidad; A: auto-agregación; PI: patógenos inhibidos; (**) inhibición por producción de bacteriocinas; 1: *Strep. uberis*; 2: *Strep. dysgalactiae* ATCC 27957; 3: *Listeria monocytogenes Scott. A*; 4: *Strep. dysgalactiae*; 5: *Staph. aureus* ATCC 29740; 6: *Staph.* coagulasa negativo; 7: *Staph. aureus*; 8: *Strep. agalactiae* ATCC27956; PP: producción de peróxido; AP: alta productora; DP: débil productora; P: productora; NP: no productora; (+): 1-12 mm; (++): 13-25 mm; (+++): >25 mm; IA: índice de adhesión; A: adhesión.

El criterio de clasificación detallado a continuación, permitió la selección de las BL para ser incluidas en el futuro probiótico:

1- Elevada inhibición a patógenos considerados agentes causales de mastitis bovina por producción de bacteriocina y ácidos orgánicos.
2- Elevado índice y porcentaje de adhesión a células epiteliales del canal y cisterna del pezón bovino.
3- Elevado porcentaje de co-agregación a patógenos considerados agentes causales de mastitis bovina.
4- Incapacidad para barrer totalmente los microorganismos considerados flora microbiana normal del pezón bovino.

Teniendo en cuenta que el objetivo de un producto probiótico es su aplicación en tambos de diferentes regiones, se planteó como estrategia escoger la mejor cepa potencialmente probiótica de cada región: una de Córdoba y otra de Tucumán. En este sentido, las cepas que cumplieron con los 4 puntos antes mencionados fueron: *Ent. hirae* CRL 1835, aisladas de tambos de Córdoba y *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655, aislada de tambos de Tucumán.

Es importante aclarar que las demás BL estudiadas tuvieron características similares a las BL elegidas. *Ent. hirae* 7-3 presentó elevados índices y porcentajes de adhesión a células epiteliales bovinas y co-agregación a patógenos. Sin embargo, se tomó la decisión de excluirla del grupo de selección debido a que contiene el gen *vanB* (Espeche-Pellegrino y col., 2012) que le confiere resistencia a vancomicina. Según Eaton y Gasson (2001), la presencia de genes de virulencia y de resistencia a antibióticos es más común en cepas de *Enterococcus* de muestras clínicas que en muestras alimenticias. A pesar de esto, los enterococos resistentes a la vancomicina generan un importante problema de salud a causa de que la resistencia puede ser trasferida a otros microorganismos por conjugación. Asaduzzaman y Sonomoto (2009) también hacen referencia en su trabajo sobre la presencia de bacterias resistentes a los antimicrobianos, en particular enterococos resistentes a vancomicina.

Hasta la fecha, diferentes investigadores plantean distintos criterios de selección para considerar a una cepa como potencialmente probiótica: ser considerada como segura, producir sustancias antagónicas, no ser agente causal de mastitis, inhibir a patógenos causantes de mastitis, presentar elevada hidrofobicidad y auto-agregación, carecer de genes de resistencia a antibióticos, entre otros (Saarela y col., 2000; Espeche y col., 2009; Espeche-Pellegrino y col., 2012). En función a nuestros objetivos, nosotros pretendemos que las cepas seleccionadas no solo tengan la capacidad de producir sustancias antimicrobianas frente a los patógenos causantes de mastitis bovina sino también tener una alta capacidad de adherencia a las células

epiteliales mamarias bovinas. Esta adherencia ha sido definida como una característica esencial para la selección de cepas probióticas (Havenaar y col., 1992; McGoarty, 1993; Salminen y col., 1998; Bouchard y col., 2012). Es por esto que consideramos destacar a las dos cepas mencionadas anteriormente como primordiales a la hora de formar parte de la formulación del producto probiótico contra la mastitis bovina.

Además de las BL seleccionadas: *Ent. hirae* CRL 1835 y *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655, se decidió escoger una tercer cepa y se pensó en la cepa *L. perolens* CRL 1724. Esta decisión fue tomada no solo como consecuencia de sus diversas características *in vitro* y por ser una de las cepas más estudiada *in vivo* a lo largo de esta investigación, sino también porque son incapaces de auto-inhibirse, lo cual es fundamental para que las mismas puedan co-existir en un mismo producto.

En síntesis, las BL seleccionadas para formar parte de la formulación probiótica fueron: *Ent. hirae* CRL 1835, *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 y *L. perolens* CRL 1724, todas aisladas del mismo nicho ecológico dentro del cual se piensa aplicar el "nuevo producto probiótico" y respaldadas científicamente por los resultados obtenidos en esta investigación y en los trabajos anteriormente publicados: Espeche y col. (2009) y Espeche-Pellegrino y col. (2012). Esta especificidad de huésped a la cual se hace referencia, ya ha sido demostrada, en distintos epitelios y por diferentes investigadores, en numerosas investigaciones (Dogi y Perdigón, 2006; Zoetendal y col., 2006).

D. FORMULACIÓN DE UN PRODUCTO PROBIÓTICO Y ESTUDIO DE SU COMPORTAMIENTO POR ENSAYOS *IN VITRO* E *IN VIVO*

Con la finalidad de evaluar el comportamiento de la formulación probiótica, se llevaron a cabo diferentes ensayos *in vitro,* e *in vivo* en establecimientos lecheros.

1. Estudios *in vitro* a bacterias lácticas seleccionadas: comportamiento inhibitorio conjunto

Una de las funciones importantes de las bacterias probióticas es la producción de compuestos inhibitorios que antagonizan el crecimiento de las bacterias patógenas (Nemcova, 1997; Jacobsen, 1999). En este sentido, antes de realizar el "ensayo *in vivo* de inoculación intramamaria a campo" fue necesario estudiar el comportamiento *in vitro* de las cepas seleccionadas en co-cultivo. Es decir, poder determinar si las tres cepas podrían ser capaces, en conjunto y en suspensión, de inhibir total o parcialmente a un microorganismo causante de mastitis bovina. Por esta razón, se profundizó el estudio para determinar si *Ent. hirae* CRL 1835

Lc. lactis subsp. lactis CRL 1655 y *L. perolens* CRL 1724 son capaces de inhibir al patógeno contagioso más importante de esta mastitis bovina: *Staph. aureus.*

El *Staph. aureus* es considerado uno de las principales agentes causales de mastitis crónica y clínica en el preparto (Nickerson y col., 1995; Waage y col., 1995; Bouchard y col., 2012). La bacteria es capaz de adaptarse a sobrevivir dentro de la glándula mamaria y establecer una infección, estimulando la respuesta inflamatoria (Bradley, 2002; Bouchard y col., 2012). Produce muchos factores de virulencia, como alfa y beta toxinas, proteína A, coagulasa, entre otras, que le permiten colonizar y dañar la glándula mamaria (Palma y col., 1999; Coelho y col., 2009). A pesar de que la terapia antibiótica para el control de la mastitis bovina es efectiva, *Staph. aureus* puede ser perjudicial también, debido a la aparición de cepas resistentes a los antibióticos (Naheed y Mehdi, 2006).

1.1. Co-incubación

En la Tabla 14, se observa la inhibición de *Staph. aureus* ATCC25923 por el co-cultivo de 3 BL potencialmente probióticas, en comparación con el cultivo control. El crecimiento de *Staph. aureus* fue completamente inhibido luego de 24h de co-cultivo con las BL, en comparación con la curva de crecimiento del microorganismo en condiciones normales, donde alcanzó una concentración de 3,26 x10^4 ufc/ml.

Por otro lado, el título de BL obtenido a las 24h (T24) fue de 2,5.10^8 ufc/ml, lo cual permite inferir que concentraciones similares a esta serían necesarias *in vivo* para lograr un *efecto bactericida*. Estos resultados son muy importantes ya que podrían predecir el comportamiento y la *eficacia bactericida* de las 3 cepas BL dentro del canal y la cisterna del pezón bovino.

Tabla 14. Eficacia bactericida de tres bacterias lácticas seleccionadas: *Ent. hirae* CRL 1835, *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 y *L. perolens* CRL 1724 frente a una cepa de *Staph. aureus* ATCC25923.

Duración del ensayo (horas)	Co-incubación	
	Staph. aureus ATCC25923	*Staph. aureus* ATCC25923/ *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655/ *Ent. hirae* CRL 1835/*L. perolens* CRL1724
	Recuperación de Staph. aureus ATCC25923 (x10^4 ufc/ml ± D.E)	
0	5 ± 0,4	5 ± 0,2
2	27 ± 8	25 ± 2
4	81 ± 2	19 ± 2
6	327 ± 25	88 ± 2
8	667 ± 15	313 ± 15
12	3767 ± 58	225 ± 5
24	3267 ± 251	0 ± 0

Referencias: D.E.: Desvío Estándar.

Se sabe que las BL son capaces de inhibir a microorganismos patógenos a partir de la producción de diferentes sustancias antimicrobianas: producción de ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas (Juárez Tomás y col., 2004). En este sentido, el pH registrado en el co-cultivo y el cultivo control al término del ensayo presentó valores de 3 y 6, respectivamente. Esto indicaría que una de las posibles causas del efecto inhibitorio observado, es la reducción del pH del medio. Esta observación concuerda con los resultados presentados anteriormente donde las BL seleccionadas son productoras de diferentes ácidos orgánicos:

- *Ent. hirae* CRL 1835: ácido láctico (cantidad no determinada), peróxido de hidrógeno y bacteriocina (no identificada) (Espeche-Pellegrino y col., 2012).
- *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655: ácido láctico (6,06 g/l), ácido acético (0,51 g/ml), peróxido de hidrógeno y bacteriocina (nisina Z, variante de la nisina A) (Espeche y col., 2009).
- *L. perolens* CRL 1724: ácido láctico (10,02 g/l) y ácido acético (0,56 g/ml) (Espeche y col., 2009).

Dentro de los ácidos orgánicos más comúnmente producidos por las BL encontramos el ácido láctico y el ácido acético, ambos asociados con la elevada actividad antagónica de las BL (*Lactobacillus*) y la consecuente disminución del pH del medio (Ouwehand y Vesterlund, 2004).

El peróxido de hidrógeno también jugaría un rol importante, ya que posee un gran poder oxidante, lo que lo hace muy reactivo frente a las bacterias patógenas. Presenta un amplio rango de acción y un buen poder bactericida. Su mecanismo de acción consiste en la oxidación de grupos sulfidrilos y dobles enlaces de enzimas bacterianas; esto provoca una modificación conformacional de las proteínas que forman dichas enzimas, causando la pérdida de la función enzimática y por lo tanto, la muerte celular (Vilamajó, 2007).

Por último, los antimicrobianos más importantes en efecto inhibitorio y ampliamente estudiados son las bacteriocinas, sustancias antimicrobianas de naturaleza proteica que inhiben el crecimiento de especies bacterianas relacionadas o no y que han sido exitosamente probadas en la prevención y/o tratamiento de diversas enfermedades infecciosas, complementado o reemplazando a los antibióticos (Reid y Burton, 2002; Reid y col., 2003). En este sentido, y teniendo en cuenta que dos de las tres cepas utilizadas son productoras de bacteriocinas: *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 (Espeche y col., 2009) y *Ent. hirae* CRL 1835 (Espeche-Pellegrino y col., 2012), las mismas también podrían estar implicadas en el efecto inhibitorio hacia la cepa de *Staph. aureus* ATCC25923. Además, *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 es productora de nisina Z (Espeche y col., 2009) y existen trabajos como el de Ryan y col.

(1996) que remarcan que la nisina es una bacteriocina muy importante con capacidad bactericida para una amplia gama de bacterias Gram positivas como *Staph. aureus*.

Un trabajo similar al informado en este trabajo es el de Soleimani y col. (2010), quienes probaron la actividad inhibitoria en co-cultivo de cuatro cepas de *Lactobacillus* (*L. acidophilus, L. plantarum, L. casei y L. reuteri*) frente a una cepa de *Staph. aureus* aislada de mastitis bovina y una cepa de *Staph. aureus* ATCC25923. Estos investigadores informaron inhibiciones de 68%-87% para ambos microorganismos patógenos aunque sin lograr un 100% de inhibición. En este sentido, Millettee y col. (2006) afirma que el efecto antimicrobiano de las BL (lactobacilos) en co-cultivo con bacterias patógenas es debido principalmente a la producción de ácidos orgánicos (que se traduce en la reducción del pH) y a otras sustancias antimicrobianas producidas por las BL. Sumado a esto, en un trabajo similar Klostermann y col. (2010) mostraron que un fermento conformado por leche descremada reconstituida conteniendo una cepa de *Lc. lactis* DPC 3251 productora de la bacteriocina lacticina 3147 fue capaz de eliminar *in vitro* patógenos como *Staph. aureus* (30 minutos) y *Strep. dysgalactiae* (15 minutos) y de disminuir el crecimiento de *Strep. uberis*. Es importante destacar que, a diferencia de nuestro trabajo, en este ensayo 10 ml del fermento (10^8 ufc/ml) fueron puestos en contacto con 1 ml (10^5 ufc/ml) de cada uno de los patógenos, lo que demuestra que nuestro resultado es aún muy alentador.

1.2. Técnica de estrías perpendiculares

Teniendo en cuenta que *Ent. hirae* CRL 1835, *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 y *L. perolens* CRL 1724 fueron capaces de eliminar a *Staph. aureus* ATCC25923 24h después de su co-incubación, se decidió profundizar en el conocimiento del comportamiento conjunto de las tres BL. En este sentido, se desarrolló un nuevo ensayo *in vitro* empleando la técnica de estrías perpendiculares para determinar si el efecto inhibitorio hacia *Staph. aureus* ATCC25923, generado por las sustancias antimicrobianas producidas por las BL, era de tipo sinérgico, indiferente o en su defecto antagónico.

Como puede observarse en la Figura 28, las tres BL presentan un efecto sinérgico hacia *Staph. aureus* ATCC25923, tal como lo muestra la Figura 11 de referencia presentada en el inciso 1.2. de la sección D. de Métodos.

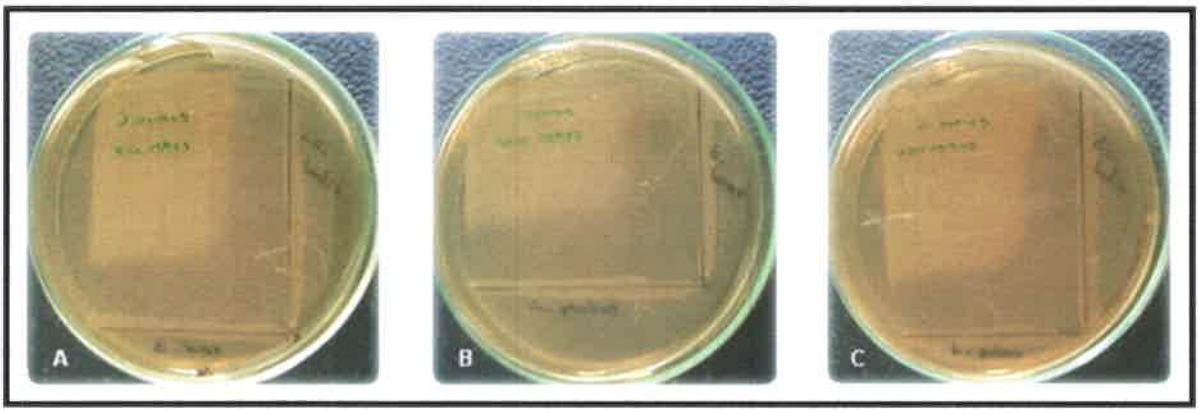


Figura 28: Efecto sinérgico, en placas de MRS, entre 3 bacterias lácticas: *Ent. hirae* CRL 1835, *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 y *L. perolens* CRL 1724 (estrías horizontales y verticales) y una cepa de *Staph. aureus* ATCC25923 (nube de crecimiento central). A. *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 y *Ent. hirae* CRL 1835. B. *Ent. hirae* CRL 1835 y *L. perolens* CRL 1724. C. *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 y *L. perolens* CRL 1724.

Los resultados *in vitro* obtenidos, nos permiten estimar el modo de acción de las sustancias antimicrobianas producidas por las tres BL. Como lo indica Ruiz y col. (2009), el trabajo presentado por Mulet Powell y col. (1998) es el primero en describir interacciones entre sustancias antimicrobianas (principalmente bacteriocinas) de BL. De manera similar a los resultados registrados en nuestro trabajo, Ruiz y col. (2009), mostraron actividad sinérgica entre sustancias antimicrobianas de 2 BL (dos bacteriocinas: L23 y L60 producidas por *L. fermentum* y *L. rhamnosus*, respectivamente) y una cepa de *Enterobacter cloacae* de origen urogenital humano. Mientras que Mulet Powell y col. (1998) mostraron actividad antagónica entre bacteriocinas de BL.

2. Estudios *in vivo* a bacterias lácticas seleccionadas: comportamiento individual

Generalmente, a nivel de asesoramiento veterinario, todas las recomendaciones para la terapia y la profilaxis de la mastitis bovina se han dirigido principalmente hacia el uso de antibióticos. Como se explicó, se sabe que el uso indiscriminado de los antibióticos para el tratamiento de la mastitis bovina es la principal preocupación pública, dado que algunos microorganismos sensibles pueden hacerse resistentes y propagar los genes de resistencia a otros microorganismos relacionados (Barkema y col., 2006). Además, estos residuos de antibióticos pueden llegar a la cadena de comercialización (productos lácteos) y producir diversos trastornos, no solo a nivel de la salud, sino también ocasionando fracasos en los procesos de fermentación.

En los últimos años nuevas formulaciones antimicrobianas, empleando microorganismos vivos (probióticos) o sus bacteriocinas, han sido consideradas para su utilización en la

prevención de la mastitis bovina; es por esto que, teniendo en cuenta los estudios *in vitro* realizados a *Ent. hirae* CRL 1835, *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 y *L. perolens* CRL 1724, se diseñaron ensayos de inoculación intramamario a campo en la granja experimental SIQUÉM con el fin de determinar el comportamiento de las BL seleccionadas en vacas lecheras lactantes y en período seco.

2.1. Estudio de tolerancia

***L. perolens* CRL 1724**

Con la finalidad de determinar el título y la dosis final de inoculación de las BL seleccionadas, fue necesario realizar un estudio de tolerancia de cada BL en glándulas mamarias bovinas. Con este propósito se tomó como primera medida probar a una de las 3 BL seleccionadas (*L. perolens* CRL 1724) para estudiar su comportamiento en la glándula y una vez definido el título y la dosis, probar las restantes BL.

Se inoculó por única vez una dosis de un mililitro de diferentes títulos de *L. perolens* CRL 1724: 2.10^3 ufc/ml, 2.10^6 ufc/ml y 2.10^9 ufc/ml en tres de los cuartos mamarios de dos vacas, una en período lactante y la otra en período seco, dejando un cuarto como control sin inocular. Esta decisión fue tomada teniendo en cuenta que en diferentes ensayos de inoculación intramamaria, utilizando un mililitro de SF, no se observó alteración alguna (RCS, irritación, ardor o hinchazón del pezón) comparada con el cuarto sin inocular (datos no mostrados).

Los resultados mostraron que, en ambos animales, no se registraron signos de inflamación ni alteraciones de la leche en los cuartos inoculados con concentraciones de 2.10^3 ufc/ml y 2.10^6 ufc/ml. La inoculación de 2.10^9 ufc/ml produjo alteraciones en el color (amarillenta) y composición de la leche (coágulos y grumos) que duraron aproximadamente 72h.

En relación a la concentración de microorganismo utilizada en este trabajo, es difícil realizar una comparación teniendo en cuenta que ningún autor utiliza las mismas cepas. Resultados similares fueron publicados por Greene y col. (1991), quienes inocularon (por vía intramamaria) un producto probiótico comercial (Lacto-bac) con un título de 9.10^7 microorganismos viables de *L. acidophylus* y *L. casei,* en cuartos de vacas lactantes. Nuestros resultados difieren de los publicados por Crispie y col. (2008) y Klostermann y col. (2008), quienes inocularon 10^9 ufc/ml de *Lc. lactis* en vacas lactantes sanas y con mastitis, respectivamente, sin observar alteración alguna.

Por otro lado, al cabo de los siete días del ensayo, no se aislaron microorganismos patógenos (en placas de agar sangre) en ninguno de los cuartos tratados (Tabla 15 y 16).

Tabla 15. Determinación de recuento de células somáticas, bacterias patógenas de mastitis y recuperación de *L. perolens* CRL 1724 en muestras de leche de vaca al secado, antes y después de la inoculación con *L. perolens* CRL 1724.

Análisis	Vaca en período Seco																											
	Cuarto inoculado con 10^3 ufc/ml de *L. perolens* CRL1724							Cuarto inoculado con 10^6 ufc/ml de *L. perolens* CRL1724							Cuarto inoculado con 10^9 ufc/ml de *L. perolens* CRL1724							Cuarto Control						
	Duración del ensayo (Días)																											
	-2	0	1	2	3	6	7	-2	0	1	2	3	6	7	-2	0	1	2	3	6	7	-2	0	1	2	3	6	7
RCS ($x10^3$ml)	200	300	350	410	430	460	460	200	310	380	390	240	100	95	200	360	35000	60000	60000	46000	45000	200	300	320	300	350	320	300
Bacterias (ufc/ml)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacterias Lácticas (ufc/ml)	0	0	20	0	0	25	1	0	0	0	0	0	10	3	0	0	1900	130	900	30	25	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 16. Determinación de recuento de células somáticas, bacterias patógenas de mastitis y recuperación de *L. perolens* CRL 1724 en muestras de leche de vaca lactante, antes y después de la inoculación con *L. perolens* CRL 1724.

Análisis	Vaca en período Lactante																											
	Cuarto inoculado con 10^3 ufc/ml de *L. perolens* CRL1724							Cuarto inoculado con 10^6 ufc/ml de *L. perolens* CRL1724							Cuarto inoculado con 10^9 ufc/ml de *L. perolens* CRL1724							Cuarto Control						
	Duración del ensayo (Días)																											
	-2	0	1	2	3	6	7	-2	0	1	2	3	6	7	-2	0	1	2	3	6	7	-2	0	1	2	3	6	7
RCS ($x10^3$ml)	100	90	130	100	100	240	240	200	200	290	270	240	150	140	200	240	60000	60000	45000	2000	2000	200	310	390	420	400	390	370
Bacterias (ufc/ml)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacterias Lácticas (ufc/ml)	0	0	20	0	15	0	5	0	0	0	20	10	0	5	0	0	1800	115	450	0	10	0	0	0	0	0	0	0

Como se observa en las Tablas 15 y 16, los valores de RCS registrados a partir de leche de cuartos inoculados con concentraciones de 2.10^6 ufc/ml y 2.10^9 ufc/ml, presentaron una tendencia en baja en ambas vacas, al final del ensayo. Es decir, el valor del RCS fue disminuyendo con el transcurso de los días. A pesar de esto, y como era de esperarse, los resultados obtenidos con el título de 2.10^9 ufc/ml fueron excesivamente elevados al compararlos con el número de células observadas en las vacas inoculadas con 2.10^3 ufc/ml y 2.10^6 ufc/ml. Los cuartos inoculados con títulos de 2.10^3 ufc/ml arrojaron, sorpresivamente, un aumento paulatino durante los siete días en ambas vacas.

Al igual que en nuestro trabajo, Crispie y col. (2008) registraron elevados valores de PMN y linfocitos al inocular títulos 10^9 ufc/ml de *Lc. lactis* vivo, en vacas lactantes. En diversos estudios, tanto de aplicación intramamaria de bacterias probióticas (Greene y col., 1991) como de aplicación de selladores con bacteriocinas (Ryan y col., 1999a), se logró incrementar por un corto tiempo el RCS en la leche de bovinos tratados.

En ambas vacas, los cuartos controles mostraron variaciones en el RCS durante los siete días del ensayo. Estos resultados podrían deberse a que el RCS es un valor dinámico que puede variar en forma natural como consecuencia de por ejemplo, incorporación de leche calostral, leche de animales muy cercanos al secado, baja producción, pequeños accidentes y estrés (Dutto, 2004).

A nuestro entender este trabajo es el primero en la Argentina y en el mundo que inocula en el pezón de bovinos BL aisladas de leche bovina. Por este motivo, y para facilitar el reconocimiento y la diferenciación de la cepa BL inoculada de otras cepas BL presentes en el canal del pezón de bovinos, fue necesario estudiar el perfil de resistencia a antibióticos de la misma. De esta manera, se determinó el grado de resistencia o susceptibilidad de *L. perolens* CRL 1724 frente a siete antibióticos de uso frecuente en medicina veterinaria: oxacilina, eritromicina, penicilina, gentamicina, rifampicina, estreptomicina y ampicilina/sulbactan.

Los resultados obtenidos en este estudio se representan en la Figura 29, donde se aprecia claramente que la cepa de *L. perolens* CRL 1724 presentó resistencia solamente a uno de los siete antibióticos probados en el ensayo, estreptomicina. Ante esto, se decidió utilizar 10 µg/ml de estreptomicina, como agente selectivo en las placas de cultivo de *L. perolens* CRL 1724, teniendo en cuenta que esta concentración es inhibitoria para el resto de la flora del canal del pezón.

Este estudio es el primero en describir el perfil de susceptibilidad a distintos antimicrobianos de uso frecuente en mastitis, de una cepa de *L. perolens* CRL 1724 aislada de leche bovina. Estudios similares como los de Ocaña y col. (2006) y Otero y col. (2007), han intentado estandarizar un método para determinar la susceptibilidad de distintas cepas de *Lactobacillus* utilizando como medio MRS. Por otro lado, dado que la sensibilidad a los diferentes antibióticos

depende de cada cepa y teniendo en cuenta que no existen trabajos de investigación con esta cepa en particular, no se pueden contrastar los resultados obtenidos.

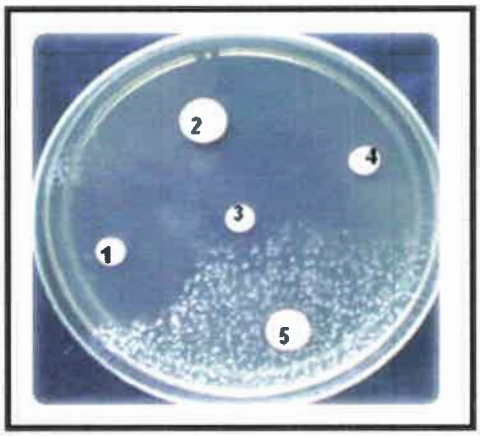


Figura 29: Perfil de resistencia de *L. perolens* CRL 1724 a distintos antibióticos de uso veterinario en placa con medio MRS. 1) Penicilina 2) Ampicilina/Sulbactan.3) Rifampicina. 4) Oxacilina. 5) Estreptomicina.

Por último, en las Tablas 15 y 16 se puede apreciar que *L. perolens* CRL 1724 fue recuperado de todos los cuartos inoculados. Los mayores valores obtenidos correspondieron a los cuartos inoculados con el título de 2.10^9 ufc/ml, siendo el día 1 el de mayor recuperación en ambas vacas, y los días 6 y 7 los de menor recuperación de este microorganismo. No se observó crecimiento de otras bacterias lácticas en las placas de agar MRS.

En ambas vacas (Tabla 15 y 16), la tendencia de aislamiento de *L. perolens* CRL 1724 fue en disminución para las tres concentraciones. A pesar de esto, los valores de recuperación correspondientes a los título de 2.10^3 ufc/ml y 2.10^6 ufc/ml, fueron muy inferiores a los obtenidos en los cuartos inoculados con 2.10^9 ufc/ml. En este caso particular de la vaca lactante, los recuentos fueron ligeramente inferiores a lo observado en la vaca seca, resultado esperado debido al barrido ocacionado por el ordeño.

Si bien la recuperación de *L. perolens* CRL 1724 en el tiempo mostró aislamientos positivos, los mismos fueron inconstantes en los dos animales. No todos los días que se visitó el tambo hubo recuperación del lactobacilo. Esto puede deberse a diversos factores como: la multiplicación de la bacteria dentro de pezón bovino o la posible adherencia de la misma al epitelio del pezón.

Los cuartos controles, como era de esperarse, se mantuvieron libres de bacterias lácticas durante el ensayo.

La bibliografía relacionada a la inoculación intramamaria en bovinos utilizando *Lactobacillus* es escasa, por lo que resulta difícil contrastar los resultados obtenidos. Solo se destaca el trabajo de Beecher y col. (2009) quienes inocularon cuartos mamarios con 10^8 ufc/ml de *Lc. lactis,* logrando recuperarlo en un lapso de tiempo inferior a los tres días post-inoculación.

***Ent. hirae* CRL 1835 y *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655**

Se inoculó por única vez una dosis de un mililitro de 2.10^6 ufc/ml de *Ent. hirae* CRL 1835 y *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 en dos de los cuatro cuartos mamarios de cada vaca, una en período lactante y la otra en período seco; dejando un tercer cuarto control sin inocular. La concentración de bacterias a inocular fue definida en base a los resultados obtenidos de la inoculación intramamaria realizada con la cepa de *L. perolens* CRL 1724 (inciso 2.1. de esta sección).

Los resultados mostraron que, en ambos animales, no se registraron signos de mastitis clínica como grumos, coágulos o sangre en leche, ni inflamación, ardor, dolor o temperatura elevada en los animales ensayados. Es decir, la concentración utilizada para ambas BL fue bien tolerada por los animales. En este sentido, los resultados obtenidos fueron comparables con los registrados con la cepa de *L. perolens* CRL 1724.

Como se observa en las Tablas 17 y 18, en dos de los cuartos inoculados, un cuarto de cada animal, se aislaron microorganismos asociados a mastitis bovina (en placas de agar sangre). Curiosamente ambos cuartos presentaron bacteriología positiva al momento de la inoculación a pesar que desde un principio se consideraron cuartos sanos para realizar el ensayo de tolerancia. Se aisló una cepa de SCN en el cuarto de la vaca en período de secado inoculada con *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655, y una cepa de *Bacillus* spp. en el cuarto de la vaca en período lactante inoculado con *Ent. hirae* CRL 1835. Es probable que estos cuartos se hayan infectado dentro de los días posteriores al primer análisis de leche (análisis que se realiza para seleccionar los animales) y previo a la inoculación intramamaria.

Tabla 17. Determinación de recuento de células somáticas, bacterias patógenas de mastitis y recuperación de *Ent. hirae* CRL 1835 y *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 en muestras de leche de vaca al secado, antes y después de la inoculación con ambas bacterias lácticas.

Análisis	Vaca en periodo Seco																				
	Cuarto inoculado con 10^6 ufc/ml de *Ent. hirae* CRL 1835							Cuarto inoculado con 10^6 ufc/ml de *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655							Cuarto Control						
	Duración del ensayo (Días)																				
	-2	0	1	2	5	7	17	-2	0	1	2	5	7	17	-2	0	1	2	5	7	17
RCS ($x10^3$/ml)	150	200	4250	6500	6500	7000	4800	100	450	7500	7200	450	800	750	200	200	180	200	380	450	300
Bacterias (ufc/ml)	0	0	0	0	0	0	0	0	410*	75*	95*	35*	25*	680*	0	0	0	0	0	0	0
Bacterias Lácticas (ufc/ml)	0	0	400	180	40	30	20	0	0	1100	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Referencia: (*) ufc/ml de *Staph.* coagulasa negativo (SCN); RCS: recuento de células somáticas.

Tabla 18. Determinación de recuento de células somáticas, bacterias patógenas de mastitis y recuperación de *Ent. hirae* CRL 1835 y *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 en muestras de leche de vaca lactante, antes y después de la inoculación con ambas bacterias lácticas.

Análisis	Vaca en periodo Lactante																				
	Cuarto inoculado con 10^6 ufc/ml de *Ent. hirae* CRL 1835							Cuarto inoculado con 10^6 ufc/ml de *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655							Cuarto Control						
	Duración del ensayo (Días)																				
	-2	0	1	2	5	7	17	-2	0	1	2	5	7	17	-2	0	1	2	5	7	17
RCS ($x10^3$/ml)	250	300	400	4000	100	50	50	230	190	3250	11000	100	100	50	250	200	300	280	250	220	225
Bacterias (ufc/ml)	0	270*	30*	0	10*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacterias Lácticas (ufc/ml)	0	0	600	200	10	10	10	0	0	400	85	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Referencia: (*) ufc/ml de *Bacillus* spp.; RCS: recuento de células somáticas.

Como se observa en las Tablas 17 y 18, un cuarto de cada vaca presentó bacteriología positiva al momento de la inoculación intramamaria. La cepa de *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 fue capaz de causar un efecto inhibitorio (sin inhibirlo completamente) sobre la cepa de SCN que colonizaba el cuarto de la vaca seca, ya sea por elevación del RCS o por la producción de diferentes sustancias antagónicas (ácido láctico, ácido acético, peróxido de hidrógeno y bacteriocina). A los 17 días posteriores a la inoculación, los recuentos de SCN volvieron a mantenerse. En contraposición, al cabo de los 17 días del ensayo, *Ent. hirae* CRL 1835 fue capaz de inhibir completamente el crecimiento de la cepa de *Bacillus* spp. que colonizaba el cuarto de la vaca lactante.

Por otro lado, los cuartos controles y un cuarto de cada vaca, uno inoculado con *Ent. hirae* CRL 1835 (vaca en período de secado) y el otro inoculado con *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 (vaca en período lactante) presentaron bacteriología negativa a lo largo del ensayo.

Es importante aclarar que, a pesar de que los resultados obtenidos aportan interesantes datos de cara al futuro, en ningún momento se buscó realizar un ensayo terapéutico. Lo que se pretende es realizar una formulación probiótica natural capaz de prevenir la mastitis bovina en vacas sanas al secado, para disminuir el uso indiscriminado de los antibióticos.

Por otro lado, los valores de RCS registrados a partir de leche de cuartos inoculados con concentraciones de 2.10^6 ufc/ml de ambas BL, mostraron una tendencia en disminución, es decir el valor del RCS fue bajando con el transcurso de los días. A pesar de esto los dos cuartos de la vaca seca mostraron elevados RCS a lo largo del ensayo.

En la vaca en período seco (Tabla 17), la inoculación de *Ent. hirae* CRL 1835 produjo un incremento de 21 veces el RCS a las 24h, respecto del valor del recuento el día 0 (DO). Mientras que, *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 fue capaz de elevar el RCS 17 veces más respecto al valor registrado pre-inoculación (DO). Probablemente el elevado valor de RCS registrado en este último cuarto, este influenciado por la presencia de la bacteriología positiva, previa a la inoculación.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos, diversos autores han informado aumentos fisiológicos en los RCS de $1,8.10^7$ cel/ml al séptimo día del período seco. Estos elevados recuentos son seguidos por menores concentraciones los días 14 y 21 y por otro aumento entre los días 21 y 28 (Jensen y Eberhart, 1981). Según Mc Donald y Anderson (1981), los mayores tipos celulares presentes en la secreción del período seco temprano de la glándula mamaria bovina son: macrófagos, linfocitos y PMN, y al final del periodo seco temprano ellos representaron aproximadamente 43%, 38% y 19% de las células respectivamente.

Por otro lado, en la vaca lactante (Tabla 18) ambas cepas mostraron comportamientos similares. Es decir, fueron capaces de elevar significativamente el valor de RCS durante 48h post-inoculación.

Las 3 BL seleccionadas produjeron una elevación significativa del RCS durante los dos días posteriores a la inoculación intramamaria y luego una tendencia en disminución. Esta tendencia se hace más notoria en las vacas lactantes dado que el ordeño mecánico favorece aún más el barrido de las células somáticas. En las vacas secas, al no presentar este barrido diario de leche, el RCS tiende a mantenerse elevado por un período mayor de tiempo; lo que beneficiaría a los animales en relación a mantener sus defensas naturales en "alerta" ante el posible ingreso de algún microorganismo patógeno durante este período de susceptibilidad a la infección (Beecher y col., 2009). En el caso particular del cuarto inoculado con *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 (vaca seca) la presencia del SCN pudo ser también la causante de mantener el RCS elevado, y el *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 el agente causal de la disminución del microorganismo patógeno durante unos días. Estudios futuros de inoculación intramamaria y desafíos, podrán determinar la participación de las BL en la eliminación de los patógenos.

Diferentes trabajos han hecho mención al efecto sobre las células somáticas ejercido por las BL dentro de la glándula mamaria bovina: Woodward y col. (1988), registraron aumentos en el RCS al aplicar bacterias probióticas en bovinos con la finalidad de prevenir la mastitis bovina, y Ryan y col. (1999a) y Crispie y col. (2008), lograron incrementar por un corto tiempo el RCS en la leche de bovinos tratados.

En todos los ensayos realizados, los cuartos controles mostraron pequeñas variaciones en el RCS durante los días del ensayo.

Del mismo modo que con la cepa de *L. perolens* CRL 1724, para facilitar el reconocimiento y la diferenciación de *Ent. hirae* CRL 1835 y *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 se determinó el grado de resistencia o susceptibilidad de las mismas frente a los siete antibióticos mencionados anterioemnte (inciso 2.1. de esta sección).

Los resultados mostraron que tanto *Ent. hirae* CRL 1835 como *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 presentaron resistencia a estreptomicina, siendo 10 µg/ml la concentración utilizada como agente selectivo.

Como se puede apreciar en las Tablas 17 y 18, las dos cepas de BL fueron recuperadas en todos los cuartos inoculados. Los mayores valores obtenidos correspondieron al primer día post-inoculación, para ambas cepas y en las dos vacas inoculadas. *Ent. hirae* CRL 1835 fue aislado durante todos los días que duró el ensayo, a diferencia de *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 que solamente permaneció alrededor de 48h en glándula. En este sentido, y como se mostró en la Tabla 13, *Ent. hirae* CRL 1835 fue la cepa que presentó un mayor porcentaje e índice de adhesión *in vitro,* lo cual refuerza la elección de la cepa por su capacidad para permanecer dentro del pezón bovino.

Los cuartos controles no mostraron presencia de BL y no se observó crecimiento de otras bacterias lácticas.

Los resultados obtenidos en este ensayo difieren con los de Beecher y col. (2009) quienes, luego de inocular una cepa de *Lc. lactis* en cuartos mamarios a una concentración de 10^8 ufc/ml, pudieron recuperarla por un período inferior a los tres días post-inoculación.

2.2. Estudio de eficacia

Con la finalidad de profundizar en el estudio del efecto y la permanencia de las BL en la glándula mamaria bovina en un número mayor de animales en producción, se planteó un nuevo ensayo de inoculación intramamario considerado estudio de eficacia. Para este ensayo solo se probó una de las 3 BL seleccionadas: *L. perolens* CRL 1724 (seleccionada al azar) y en vacas en período lactante, a pesar de que la aplicación del lactobacilo estaba prevista en vacas en período seco. Esta decición fue tomada como consecuencia del reducido número de animales con los que contaba la granja experimental SIQUÉM en el momento de la realización del ensayo.

Para tal fin, una dosis optimizada de 1 ml de 2.10^6 ufc/ml de *L. perolens* CRL 1724 fue inoculada en tres cuartos de tres vacas lactantes dejando 3 cuartos controles, uno de cada animal sin inocular.

En relación a la optimización del procedimiento para alcanzar la concentración adecuada de BL a inocular, la curva de calibración realizada permitió cuantificar en forma rápida y precisa la concentración celular adecuada de *L. perolens* CRL 1724 para los ensayos de inoculación. Los resultados de la regresión lineal permitieron determinar las fórmulas para la determinación del peso seco (Ps) y ufc/ml a partir de los distintos valores de densidad óptica (DO) registrados: DO = 936,195 x Ps + 0,0369162 y DO = $3,26174.10^{-11}$ x cfu/ml + 0,0369162, respectivamente.

Como era de esperarse, la inoculación de *L. perolens* CRL 1724 no produjo síntomas de mastitis clínica en ninguno de los animales durante el período del ensayo (15 días). Tampoco se observó alteración en el aspecto de la leche producida, ni se aislaron microorganismos patógenos en placas de agar sangre durante los quince días del ensayo.

Siguiendo el esquema de inoculación y muestreo (Figura 14) y tal como se aprecia en la Figura 30, se observó un aumento significativo (*p-valor <0,05*) del RCS en los cuartos tratados los días 1 y 2 post-inoculación, respecto de los días 0, 5, 7 y 15, mientras que no se observaron diferencias significativas entre los cuartos inoculados y no inoculados (controles) durante los 15 días de muestreo.

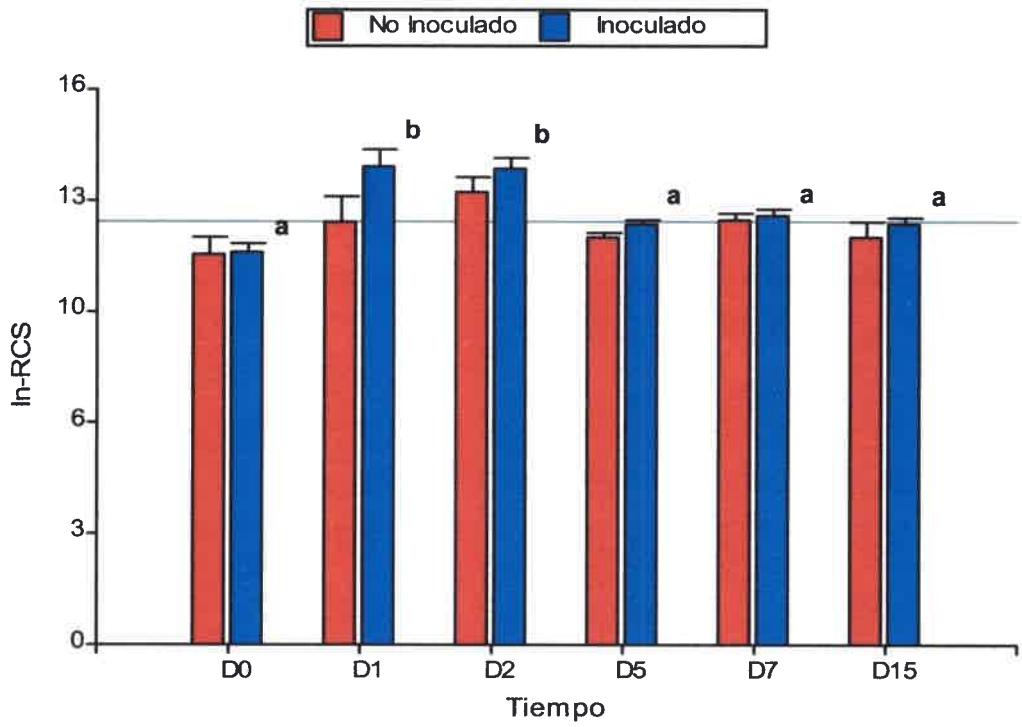


Figura 30: Recuentos celulares somáticos en muestras de leche de tres vacas lactantes Holando Argentino inoculadas con *L. perolens* CRL 1724. Línea de corte: 200.000 cel/ml. D: Días. *Letras diferentes, indican diferencias significativas entre cuartos inoculados (*p-valor* <0,05).

El número de cuartos mamarios inoculados (n: 9) permitió un mejor análisis del efecto de la inoculación de 10^6 ufc/ml de *L. perolens* CRL 1724 en la glándula mamaria bovina. El aumento observado en el RCS, de cuartos inoculados los días 1 y 2, coincide con lo observado por Crispie y col. (2008) quienes informaron un incremento en los valores de PMN, los dos primeros días post-inoculación ($1{,}78.10^6$ cel/ml) y una caída abrupta de los mismos los días 5 y 7.

Por otro lado, se observó una disminución en el RCS los días 5, 7 y 15, y no se registraron diferencias significativas entre los cuartos inoculados y los controles durante todo el ensayo. Estos resultados son muy importantes y nos estarían indicando que *L. perolens* CRL 1724 genera una leve efecto sobre las células somáticas, manteniendo en alerta al sistema de defensa sin generar inflamación.

Si bien el ensayo fue realizado en vacas en período de lactancia, que sufren un barrido mecánico constante de leche, se pretende lograr que la BL mantenga en alerta el sistema de defensa sin generar un aumento considerable (en el tiempo) del RCS. Es decir, generar una rápida respuesta inmune que induzca un reclutamiento sustancial de PMN y/o linfocitos para "limpiar" a la glándula de una posible infección generada por microorganismos patógenos. Beecher y col. (2009) registraron incrementos importantes en la expresión de genes inmunes

(IL-1*B* e IL-8) que coincidieron con los valores máximos de RCS (hasta 1.10^{12} cel/ml) obtenidos al inocular una cepa de *Lc. lactis* en vacas lactantes sanas.

Con respecto a los cuartos controles y como era de esperar, no hubo diferencias significativas entre ellos a lo largo del ensayo, aunque si se observaron pequeñas variaciones de RCS. En este sentido y como se mencionó anteriormente estas pueden deberse a la propia fisiología del animal o a alguna posible lesión que hayan sufrido en alguno de sus cuartos, ya que hay que tener en cuenta que los animales nunca fueron apartados del rodeo.

Sumado a lo mencionado en el párrafo anterior, Beecher y col. (2009), también registraron aumentos insignificantes del RCS en los cuartos controles, además de un mínimo aumento en la expresión de genes pro-inflamatorios, al inocular *Lc. lactis* DPC 3147 en vacas Holstein-Friesian lactantes sanas; y atribuyeron sus resultados a lo expresado por Berry y Meaney (2006), quienes plantean que estos aumentos probablemente se deban al ultimamente mencionado "cross-talk o comunicación cruzada" entre los cuatro cuartos mamarios de una misma vaca.

El *L. perolens* CRL 1724 fue recuperado de todos los cuartos mamarios inoculados y ninguna otra bacteria fue aislada (no hubo aislamiento de bacterias lácticas residentes).

Como se puede apreciar en la Figura 31, el aislamiento se mantuvo durante los 15 días que duró el ensayo. El valor máximo de *L. perolens* CRL 1724 fue alcanzado a las 24h post-inoculación, con 83 ufc/ml de promedio en todos los cuartos inoculados. Este valor, fue estadísticamente significativo (*p-valor <0,05*) respecto de los valores registrados los días siguientes. Los cuartos controles se mantuvieron libres de bacterias.

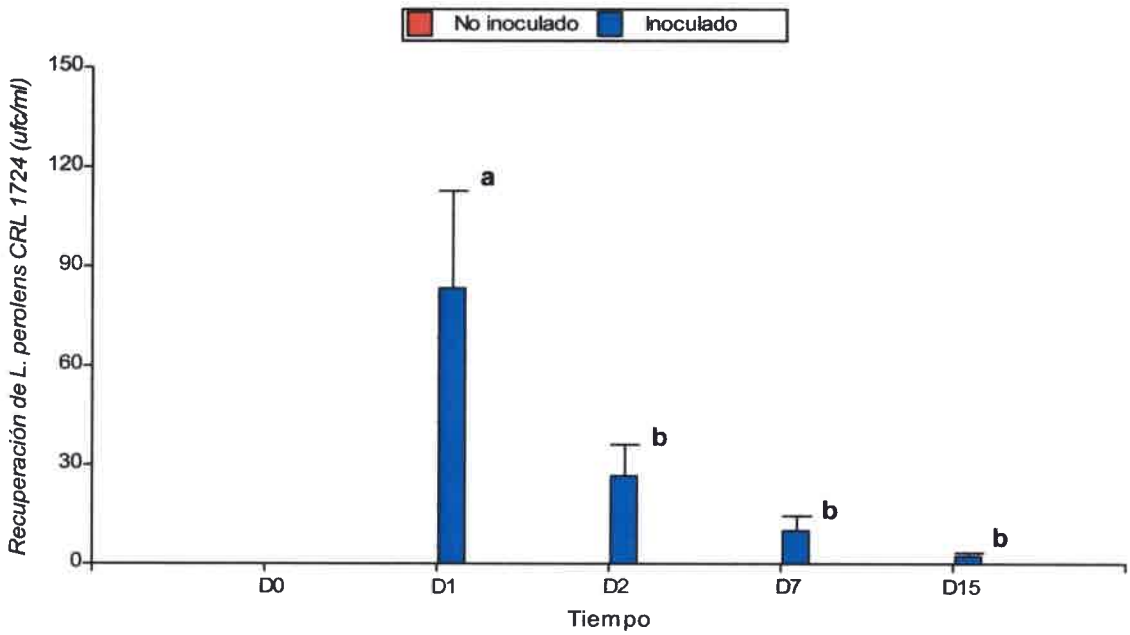


Figura 31: Recuperación de *L. perolens* CRL 1724 (expresado en ufc/ml) en muestras de leche de tres vacas lactantes Holando Argentino, durante quince días posteriores a su inoculación. Comparación entre cuartos inoculados con no inoculados. D: Días. * *Letras diferentes, indican diferencias significativas entre cuartos inoculados (*p-valor <0,05*).

Los resultados obtenidos son muy importantes dado que estarían indicando una posible permanencia de la cepa (en el tiempo) dentro de la glándula mamaria. Esto cobra aún más importancia si consideramos que la inoculación se realizó en vacas lactantes y que el ordeño mecánico favorece enormemente el barrido de la misma. Por otro lado, *L. perolens* CRL 1724 presenta elevados porcentajes de hidrofobicidad y auto-agregación (Espeche y col., 2009) que le estarían otorgando la facultad de permanecer dentro de la glándula mamaria; ya sea adheridos a las células epiteliales del canal y la cisterna del pezón bovino y/o formando biofilms.

Si analizamos los resultados en función al porcentaje total de cuartos mamarios con aislamiento positivo de *L. perolens* CRL 1724 durante los 15 días de muestreo, vemos que el primer día (D1) la cepa fue recuperada en la mayoría de los cuartos inoculados, es decir en 8 de 9 cuartos (88,9%). Mientras que los días 2, 7 y 15 fue recuperada en el 77,8% (7/9), 55,6% (5/9) y 22,2% (2/9) de los cuartos, respectivamente.

Como se expresó en los párrafos anteriores, existen estudios de inoculación intramamaria en animales (Crispie y col., 2008) donde solo se registraron mediciones de valores de RCS dentro de 7 días, sin informar sobre la recuperación o recuento del microorganismo utilizado.

Klostermann y col. (2008) al inocular vacas con mastitis con la cepa de *Lc. lactis* DPC 3147 solo lograron recuperarla en un tiempo inferior a las dos semanas post-inoculación. Beecher y col. (2009), en su ensayo de inoculación intramamaria a campo en vacas lactantes con *Lc. lactis,* solo lograron recuperar al microorganismo dos días después del comienzo del ensayo. Por ende, nuestros resultados de recuperación del *L. perolens* CRL 1724, en al menos 15 días post-inoculación, nos brinda una ventaja respecto a las demás cepas probadas hasta el momento, en cuanto a la permanencia dentro del canal del pezón bovino.

Los resultados del estudio de eficacia permitieron avalar la inclusión del *L. perolens* CRL 1724 en su formulación.

2.3. Estudio histológico

Con el fin de evaluar si la administración local de BL en el pezón de la glándula mamaria bovina induce alteraciones en la estructura del tejido epitelial del canal y la cisterna del pezón bovino, se planteó un ensayo de inoculación intramamaria en dos vacas lactantes empleando a una de las tres cepas seleccionadas: *L. perolens* CRL 1724.

Con este fin, una sola dosis de 1 ml de 2.10^6 ufc/ml de *L. perolens* CRL 1724 fue inoculada en tres cuartos de cada una de dos vacas lactantes en período de secado libres de microorganismos patógenos y con RCS promedio de 170.000 cel/ml. Es decir, una condición sanitaria óptima para realizar el ensayo.

Por otro lado, no se detectó la presencia de ningún microorganismo patógeno (bacteriología negativa) ni se observó ningún tipo de alteración en leche o sintomatología clínica en los cuartos inoculados a lo largo de todo el ensayo. Las muestras de secreción obtenidas de los cuartos inoculados (D2) sufrieron un aumento del RCS que alcanzó un valor promedio de $4{,}5.10^6$ cel/ml (15 ln-RCS) y presentaron aislamiento positivo de *L. perolens* CRL 1724 (25 ufc/ml). Estos resultados fueron similares a los obtenidos en el estudio de eficacia realizado en vacas lactantes (inciso 2.2. de esta sección).

Análisis histológico

La Figura 32, muestra los cortes histológicos de canal y cisterna bovina teñidos con Hematoxilina-Eosina (H-E). Como se observa en las muestras representativas obtenidas de uno de los cuartos controles, Figura 32, el canal de pezón bovino presenta un epitelio escamoso (células planas) estratificado con una capa externa de posiblemente queratina (A-C), mientras que la cisterna del pezón muestra un epitelio revestido con una o dos capas de células cúbicas o columnares sin capa de queratina (D-F).

Estas observaciones coinciden con la bibliografía consultada (Bacha y Word, 1998; Paulrud, 2005; Seanq, 2009).

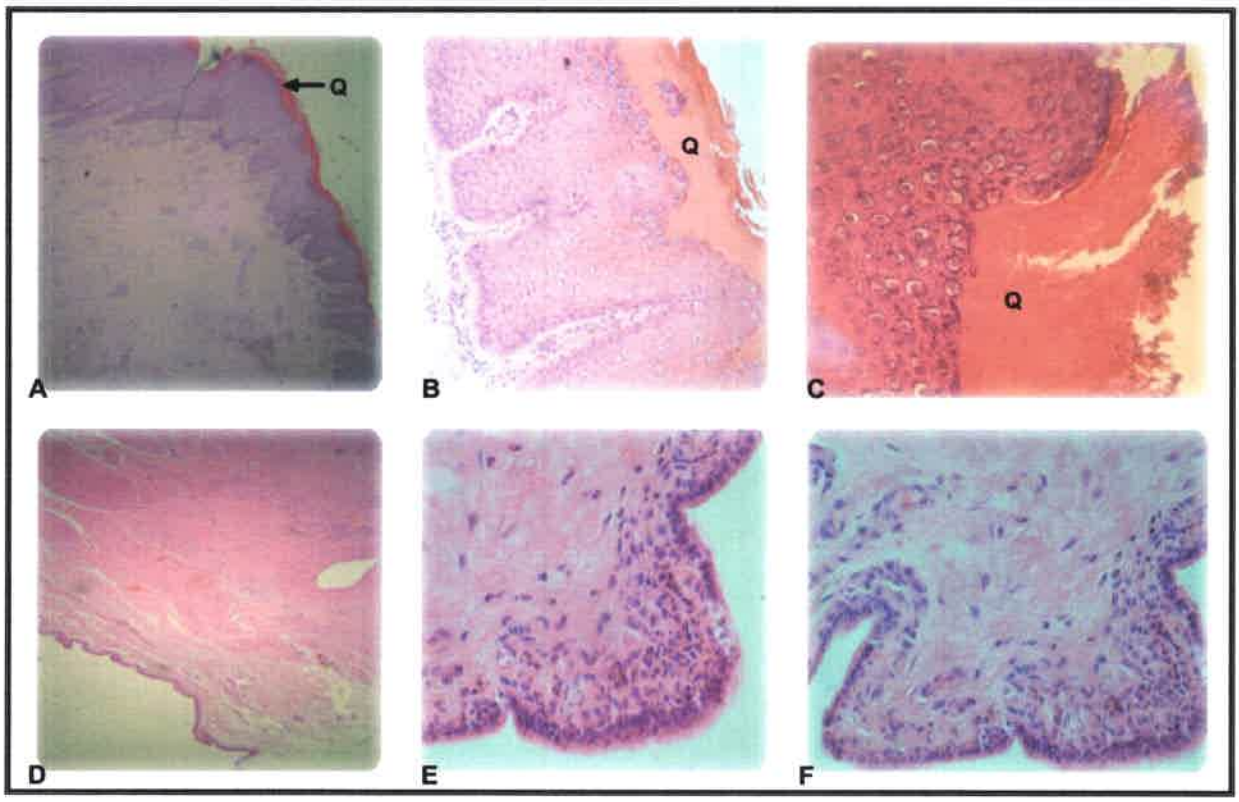


Figura 32: Microscopía óptica representativa de cortes histológicos, teñidos con Hematoxilina-Eosina, de un cuarto control de pezón bovino. A-B-C) Epitelio queratinizado de canal del pezón bovino en 10x, 40x y 100x, respectivamente. D-E-F) Epitelio no queratinizado de cisterna del pezón bovino en 10x, 40x y 40x, respectivamente. Q: Queratina.

En lo que respecta particularmente al epitelio del canal del pezón bovino hay que tener en cuenta que el pezón es una invaginación de la piel (Paulrud, 2005; Seanq, 2009; Unión ganadera regional de Jalisco, 2010) y por esta razón, las fotografías obtenidas del epitelio del canal, son similares a las fotografías de la capa externa o epidermis de la piel (Gázquez Ortiz y Blanco Rodríguez, 2004). Sumado a esto, el epitelio del canal presenta una gran semejanza con epitelios tisulares de otros mamíferos. Un ejemplo de lo mencionado es la piel de ratón (*Mus musculus*), no solo por la importante presencia de queratina sino por los diferentes estratos con los que cuenta (Atlas de Histología Vegetal y Animal, 2009).

Como se observa en la Figura 33 A, B y C, las muestras representativas de tejido de canal de pezón no presentaron variaciones ni modificaciones estructurales en el tejido epitelial interno que lo recubre, entre cuartos inoculados y no inoculados. Los resultados mostraron que no hubo ningún tipo de modificación en los 5 estratos analizados. Es decir, en epidermis (se mantuvo normal), tejido conectivo (se mantuvo normal), vasos sanguíneos (se mantuvieron casi vacíos, con mínima presencia de glóbulos rojos y ausencia de PMN o MN) e intersticio (sin presencia de PMN o MN), entre cuartos controles e inoculados.

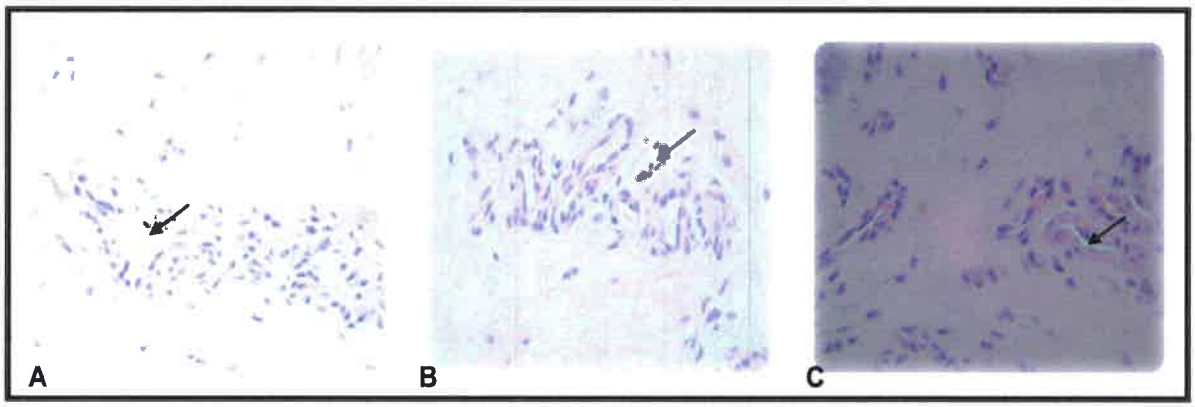


Figura 33: Microscopía óptica representativa de cortes histológicos, teñidos con Hematoxilina-Eosina, de tejido conectivo de canal de pezón bovino comparando cuartos inoculados con *L. perolens* CRL 1724 y no inoculado. A) Corte de canal de cuarto control mostrando vaso sanguíneo vacío de eritrocitos (flecha negra) (40x). B-C) Cortes de canal de cuartos inoculados mostrando vasos sanguíneos vacíos (flechas negras) (40x).

Las muestras de tejido de cisterna de cuartos inoculados tampoco presentaron modificaciones estructurales en su tejido epitelial interno, en comparación con el cuarto no inoculado. No se observó daño tisular o necrosis. En el tejido conectivo de los cuartos inoculados, se observó una leve reacción inflamatoria, sumado a una hiperemia (con los tres estados: lleno, medio y casi vacío, con glóbulos rojos deformados) (Figura 34 C y D) con presencia de PMN (n: 1-10) en vasos sanguíneos (D) y presencia de PMN (n: 1-30) en

intersticio cercanos a la zona epitelial (E y F). Mientras que no se registraron modificaciones en el epitelio tubular, respecto al cuarto control. Además, cabe destacar que en el total de los cortes de cisterna no se observó la presencia de epidermis, que si se observó en el canal, producto de que éste último es una consecuencia de la invaginación de la piel.

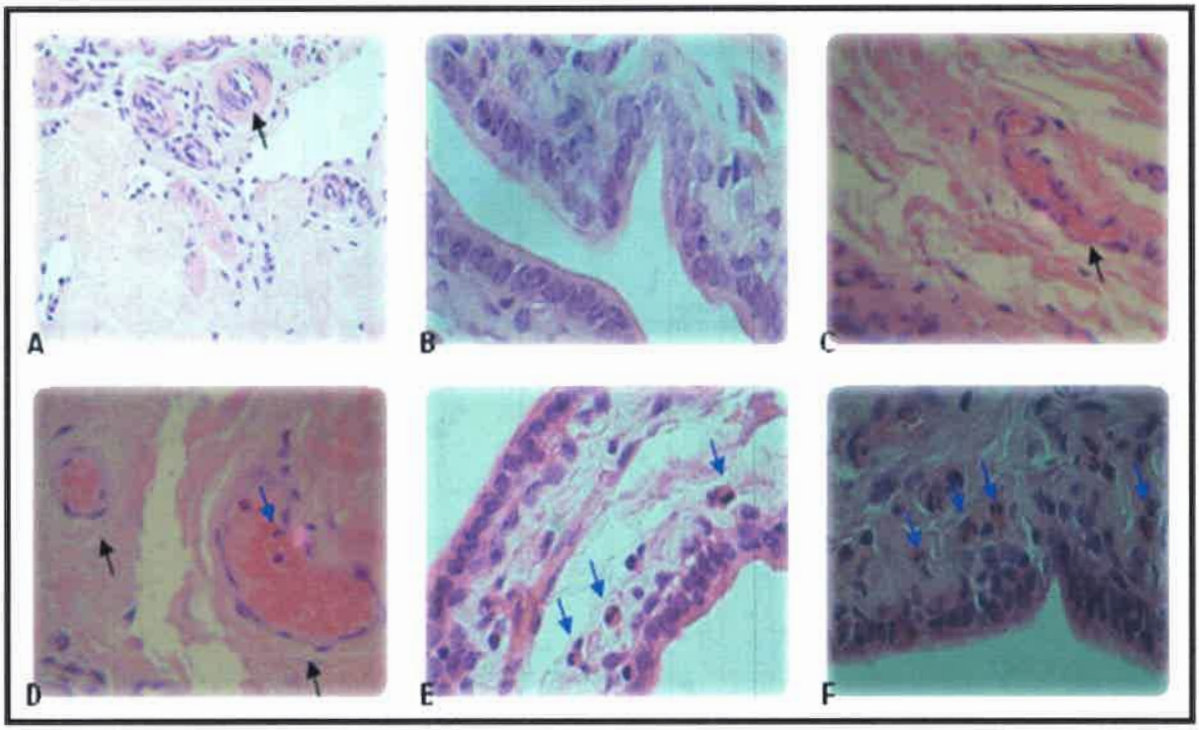


Figura 34: Microscopía óptica representativa de cortes histológicos, teñidos con Hematoxilina-Eosina, de cisterna de pezón bovino comparando cuartos inoculados con *L. perolens* CRL 1724 y no inoculado. A-B) Cortes de cuarto control, mostrando la presencia de un vaso sanguíneo vacío de eritrocitos (flechas negras) y epitelio mamario (40x y 100x, respectivamente). C-D-E-F) Cortes de cuartos inoculados, mostrando la presencia de vasos sanguíneos llenos de eritrocitos (flechas negras) y la presencia de PMN en tejido conectivo cercano al epitelio y en vasos sanguíneos (flechas azules) (100x).

En la Figura 34 E y F, se observa la presencia de PMN próxima a la zona epitelial. La glándula mamaria bovina se proteje por una varidad de mecanismos de defensa (Sordillo y Streicher, 2002), uno de ellos es la inmunidad innata o defensa no específica, que incluye las barreras físicas del pezón, la presencia de macrófagos, neutrófilos, células natural killer y ciertos factores solubles. Por ende, la observación de PMN en la zona epitelial estaría en concondancia con los resultados obtenidos en el estudio de eficacia, respecto al aumento del RCS registrado, y se podría inferir que la inoculación intramamaria del *L. perolens* CRL 1724 induciría una respuesta transitoria del sistema de defensa frente a una posible infección.

Es importante destacar que se logró registrar la presencia de *L. perolens* CRL 1724 en el epitelio mamario de la cisterna de los cuartos inoculados de uno de los animales (Figura 35 A-

G). Este resultado fue confirmado mediante una tinción diferencial (tinción de Gram modificado) (D-G).

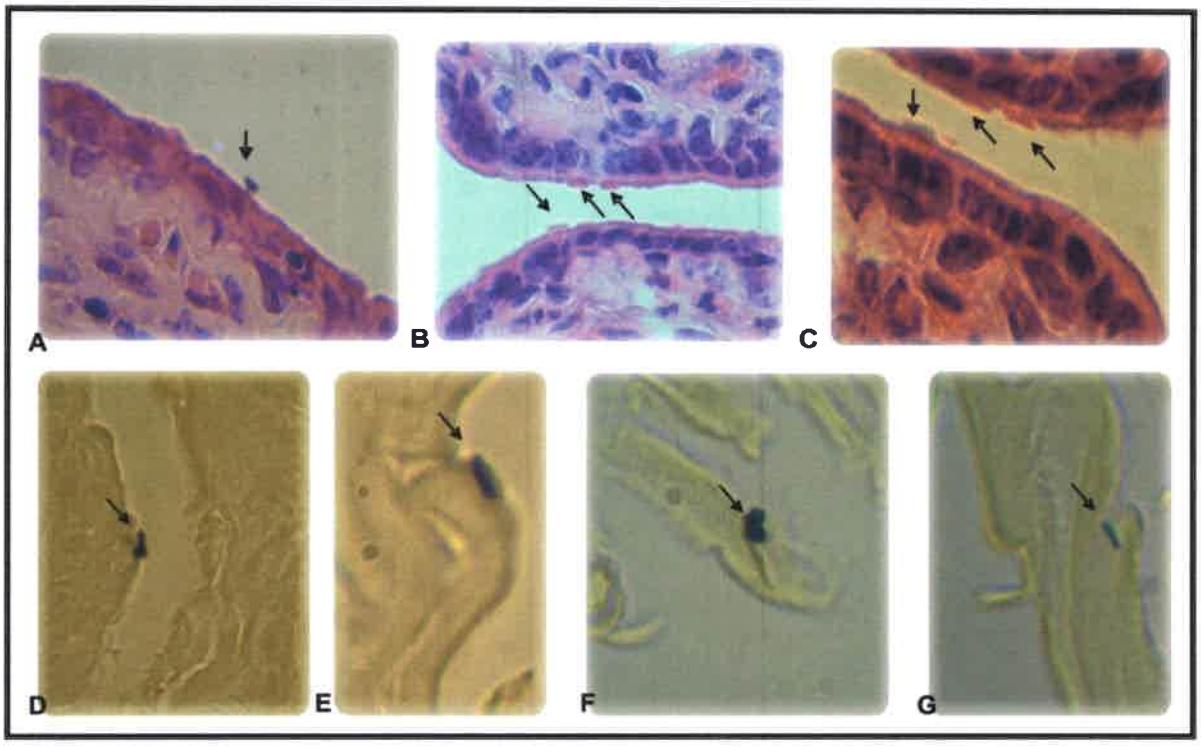


Figura 35: Microscopía óptica representativa de cortes histológicos de cisterna del pezón bovino, teñidos con H-E (A, B y C) y Gram modificado (D, E, F y G), mostrando la adherencia de *L. perolens* CRL 1724 al tejido epitelial mamario (flechas negras) (100x).

Por otro lado, y a diferencia de lo observado en la cisterna del pezón, en el canal del pezón no se registró la presencia del *L. perolens* CRL 1724. Esto probablemente se deba a la gran capa de queratina que presenta dicho tejido, la cual impediría su adherencia a la superficie epitelial, como lo expresa Sandholm y Korhonen (1995).

En resumen, el análisis de los cortes histológicos mostraron que la inoculación de *L. perolens* CRL 1724 en una concentración de 2.10^6 ufc/ml en la glándula mamaria bovina, no causa daño tisular. Además, la presencia de la bacteria en el tejido estaría confirmando los resultados previamente obtenidos en los ensayos de adherencia *in vitro* a células epiteliales mamarias. Por otro lado, estos hallazgos contribuyen a reafirmar el criterio de selección aplicado para considerar al *L. perolens* CRL 1724 como una cepa potencialmente probiótica, dado que la adherencia a células epiteliales es un criterio fundamental para la elección de una cepa probiótica (Ouwehand y col., 1999).

Análisis por microscopía de alta definición

Con el fin de confirmar que el *L. perolens* CRL 1724 no produce ningún tipo de modificación en la estructura del tejido epitelial del canal y la cisterna del pezón bovino y lograr una mayor definición de los cortes histológicos, se llevo a cabo microscopía óptica de alta resolución (MOAR) y microscopía electrónica de transmisión (MET).

En la Figura 36 se observa la MOAR realizada sobre tejido epitelial correspondiente al canal del pezón bovino, comparando un cuarto control (A) con uno inoculado (B-D).

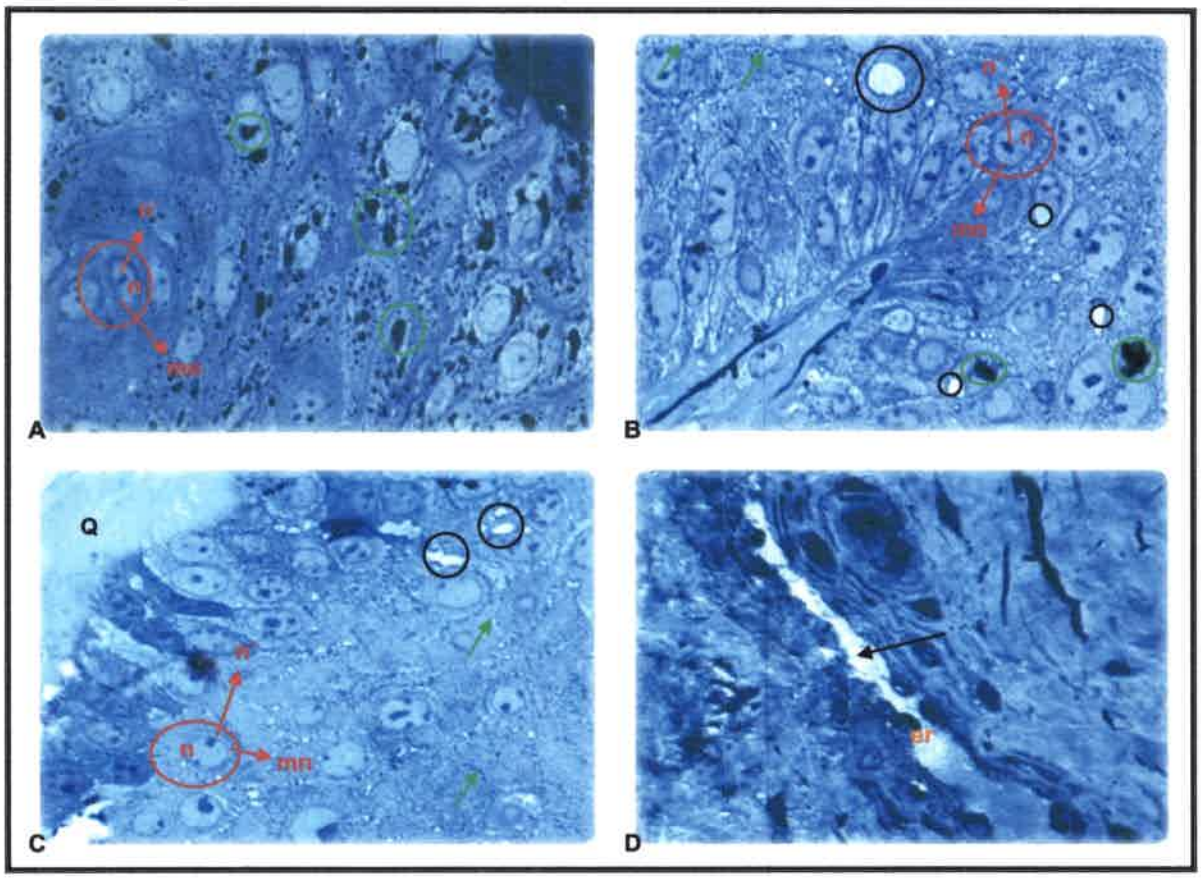


Figura 36: Microscopía óptica de alta resolución representativa de cortes histológicos, teñidos con azul de toluidina, de canal de pezón bovino comparando cuartos inoculados con *L. perolens* CRL 1724 y no inoculado. A) Corte de cuarto control mostrando núcleo (n), nucleolo (n´) y membrana nuclear (mn) de células epiteliales (círculo rojo), y depósitos de colorante (círculos verdes) (100x). B-C-D) Cortes de cuartos inoculados mostrando núcleos (n), nucleolos (n´) y membrana nuclear (mn) de células epiteliales (círculo rojo). Además se observan depósitos de resina (círculo negro), la presencia de posibles interconexiones celulares entre las membranas plasmáticas de las células (flecha verde) y de vasos sanguíneos (flecha negra) casi vacíos de eritrocitos (er) (100x). Q: Queratina.

Las fotografías obtenidas permitieron observar con mayor claridad y definición de las estructuras celulares que conforman el canal del pezón bovino, principalmente la zona cercana a su epitelio. Como puede observarse, los cuartos inoculados no presentaron modificaciones

estructurales respecto del control. Además, no se registró necrosis o apoptosis en las células epiteliales analizadas; es decir no se percibió retracción nuclear, condensación de la cromatina (picnosis), estallido del núcleo (cariorexis) o la aparición de pequeñas vacuolas en el citoplasma generadas por acumulación de agua. Estos trastornos, sumados a la turbidez citoplasmática (evidenciada por presencia de gránulos) son indicadores de alteraciones celulares y se podrían haber puesto de manifiesto con modificaciones o desplazamiento nuclear. Como consecuencia, al no haber observado modificación celular, ya sea en núcleo, nucleolo, membrana nuclear, membrana citoplasmática, entre otros, esto nos lleva a pensar que *L. perolens* CRL 1724 no es capaz de generar en el canal del pezón bovino ningún tipo de modificación celular en la células que forman parte de su epitelio. Resultado que concuerda con lo informado por Bouchard y col. (2012) al estudiar la habilidad de *L. casei* para prevenir la invasión de *Staph. aureus* en células epiteliales mamarias bovinas *in vitro*.

Además, la microscopía de alta definición permitió poner de manifiesto la presencia de pequeñas interconexiones entre las membranas plasmáticas celulares que se observan en forma de pequeños puntos entre las células analizadas. Señal de que las funciones celulares se desarrollan normalmente. Por otro lado, y de la misma manera que los tejidos del canal teñidos con H-E, con esta técnica MOAR se observó nuevamente la presencia de la capa de queratina y los vasos sanguíneos caracterizados por la escasez de eritrocitos en su interior (Figura 36 C y D, respectivamente).

La Figura 37 muestra al tejido epitelial del canal del pezón bovino de un cuarto control (A y B) y de un cuarto inoculado (C y D), con MET.

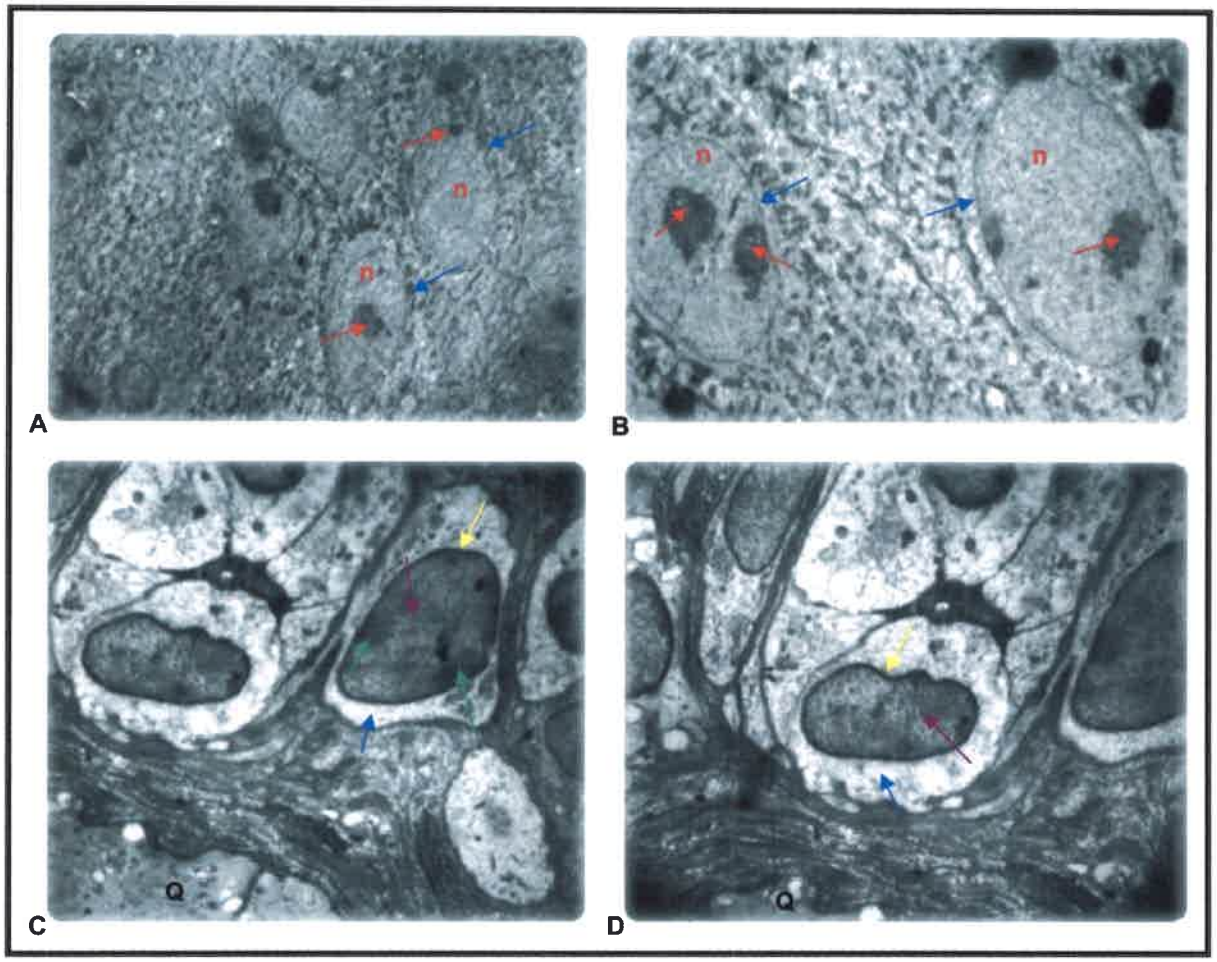


Figura 37: Microscopía electrónica de transmisión representativa de cortes histológicos de canal de pezón bovino comparando cuartos inoculados con *L. perolens* CRL 1724 y no inoculado. A-B) Cortes de cuarto control, mostrando núcleos (n), nucleolos (flechas rojas) y membrana nuclear (flechas azules) de células epiteliales (4000x). C-D) Cortes de cuartos inoculados, de mayor grosor, mostrando núcleos (flechas violetas) nucleolos (flechas verdes), membrana nuclear (flechas amarillas) y citoplasma (flechas azules) de células epiteliales (6000x). Q: Queratina.

La MET permitió confirmar lo obtenido por microscopía óptica, ya que no se registraron modificaciones estructurales, necrosis tisular o deformación nuclear entre las células del tejido control y el inoculado. Por otro lado, y de la misma manera que los tejidos de canal teñidos con H-E, en esta técnica MET se observó nuevamente la presencia de la capa de queratina (Figura 37 C y D).

Por último en la Figura 38 se observa la MOAR realizada sobre tejido epitelial correspondiente a la cisterna del pezón bovino, comparando un cuarto control (A) con uno inoculado (B-D).

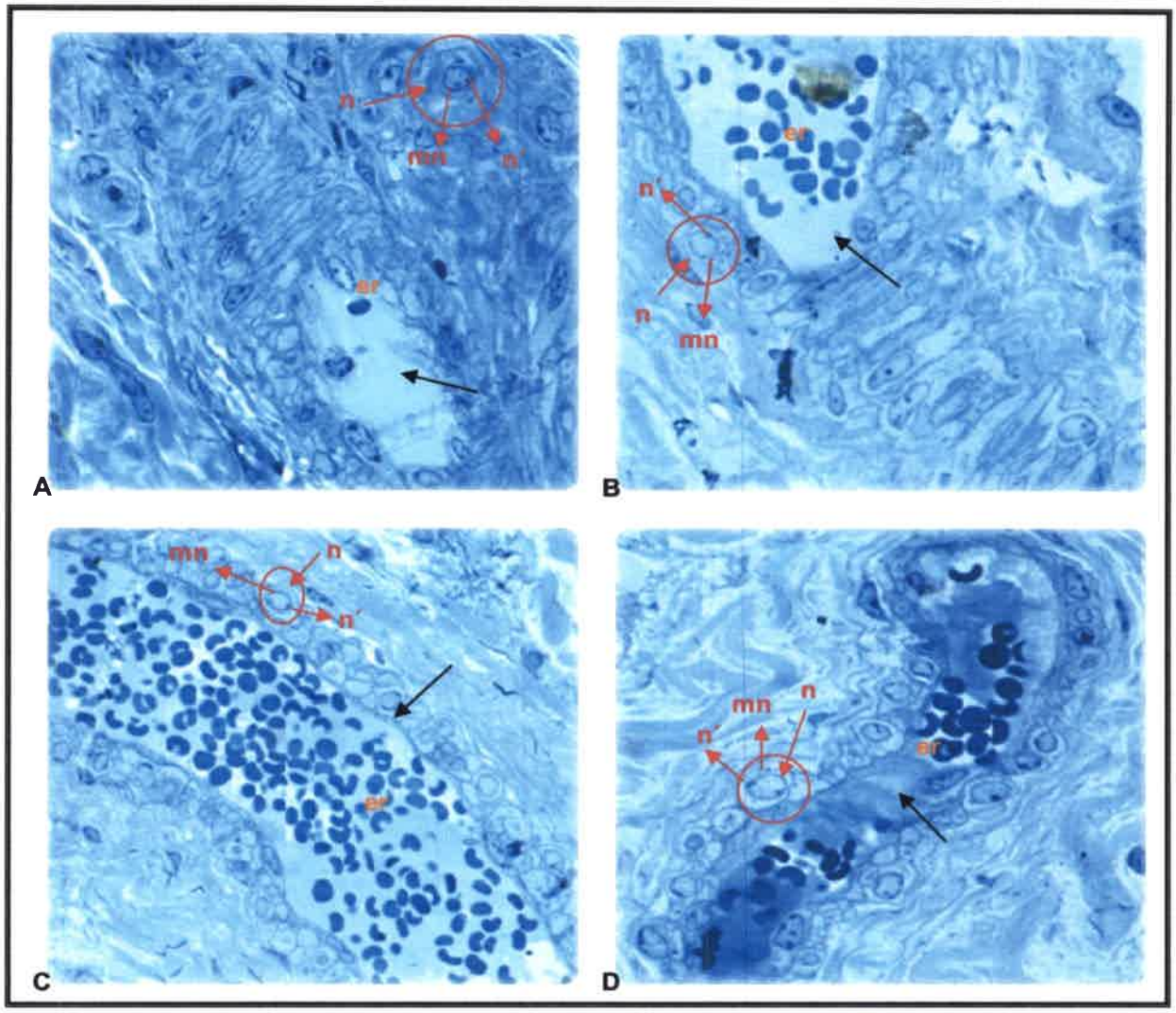


Figura 38: Microscopía óptica de alta resolución representativa de cortes histológicos, teñidos con azul de toluidina, de cisterna de pezón bovino comparando cuartos inoculados con *L. perolens* CRL 1724 y no inoculado. A) Corte de cuarto control mostrando núcleo (n), nucleolo (n´) y membrana nuclear (mn) de células que rodean al vaso sanguíneo (círculo rojo), y vaso sanguíneo (flecha negra) casi vacío de eritrocitos (er) (100x). B-C-D) Cortes de cuartos inoculados mostrando núcleos (n), nucleolos (n´) y membrana nuclear (mn) de células que rodean al vaso sanguíneo (círculo rojo), y vaso sanguíneo (flecha negra) casi vacío de eritrocitos (er) (100x).

Los resultados de MOAR en los cortes de cisterna de pezón bovino, mostraron la ausencia de modificaciones estructurales, apoptosis o necrosis en las células analizadas como consecuencia de la inoculación del *L. perolens* CRL 1724. Es decir, al igual que los resultados obtenidos en los cortes de canal de pezón, no se observaron trastornos degenerativos celulares. Por otro lado, las fotografías obtenidas terminaron de corroborar los resultados registrados con la tinción de H-E, ya que se observó una importante hiperemia en los vasos sanguíneos inoculados, con una importante presencia de eritrocitos, respecto del control.

3. Estudio *in vivo* a bacterias lácticas seleccionadas: comportamiento conjunto

3.1. Estudio de tolerancia de la formulación probiótica

En los últimos años, nuevas formulaciones antimicrobianas empleando microorganismos vivos (probióticos) o sus bacteriocinas, han sido consideradas para su utilización en la prevención de la mastitis bovina, siendo una alternativa de tendencia mundial prioritaria para el reemplazo de los antibióticos en los tambos de todo el mundo.

Sin perder de vista el objetivo general de este trabajo de investigación "Diseñar un producto que pueda ser utilizado en la prevención de la mastitis bovina", se realizó un nuevo ensayo de inoculación intramamario a campo conocido nuevamente como estudio de tolerancia. El mismo fue llevado a cabo teniendo en cuenta los estudios *in vitro* realizados a las BL seleccionadas en conjunto, sumados a los estudios *in vivo* de tolerancia, eficacia e histología mencionados; pero empleando la formulación probiótica compuesta por las 3 BL seleccionadas: *Ent. hirae* CRL 1835, *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 y *L. perolens* CRL 1724.

Viabilidad de la formulación

Con la finalidad de tener mayor seguridad en cuanto a la concentración final de la formulación probiótica destinada a la inoculación a campo, fue necesario medir el título de la misma en el tiempo. Es decir, una vez preparada la fórmula, resuspendida en solución fisiológica y conservada a 4°C, se midió el título a diferentes tiempos. Este ensayo nos permitió tener una noción real de la concentración final a inocular en el campo.

Las tres BL seleccionadas (resuspendidas en solución fisiológica estéril) permanecieron con un título superior a 1.10^6 ufc/ml durante 5h a temperatura de refrigeracíon. Este valor, no pudo mantenerse en el tiempo y cayó significativamente (*p-valor* $<0,05$) a las 24h de conservación ($2,5.10^4$ ufc/ml).

Los resultados obtenidos nos permitieron determinar que la dosis de formulación probiótica a inocular, debe ser utilizada en un lapso de tiempo no superior a las 5h de su elaboración.

Determinación de la concentración, dosis y efecto de la formulación

Para la determinación del título y la posible dosis final de inoculación de la "formulación probiótica" se tuvieron en cuenta los antecedentes de la inoculación intramamaria individual de cada BL. Se inoculó por única vez una dosis de un mililitro de 6.10^6 ufc/ml de *Ent. hirae* CRL 1835 más *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 y *L. perolens* CRL 1724 en dos de los cuatro cuartos de una vaca en período seco.

Al igual que los resultados mostrados con las cepas individuales, las 3 BL en conjunto mostraron un comportamiento similar, es decir no se registraron signos de inflamación ni alteraciones de la leche en los cuartos inoculados; resultado muy satisfactorio, teniendo en

cuenta que a nuestro entender este es el primer ensayo (registrado hasta el momento) que emplea la utilización de tres BL aplicadas dentro del pezón bovino.

Como se muestra en la Tabla 19, uno de los cuartos presentó bacteriología positiva al momento de la inoculación: una cepa de SCN, a pesar que desde un principio se había considerado como cuarto sano para realizar el estudio de tolerancia. Es probable que este cuarto se haya infectado dentro de los días posteriores al primer análisis de leche (análisis que se realiza para seleccionar los animales) y previo a la inoculación intramamaria.

La formulación probiótica fue capaz de causar un efecto inhibitorio sobre la cepa de SCN que colonizaba el cuarto de la vaca seca durante los dos días posteriores a la inoculación. Transcurrido ese tiempo, el SCN logró recuperarse y perdurar en la glándula. Es bien conocido que esta clase de microorganismos potencialmente patógenos presenta la particularidad de internalizar en las células somáticas (PMN) lo cual imposibilitaría a la formulación probiótica a eliminar completamente al patógeno.

Como lo expresa Petersson Wolfe y col. (2010) una de las particularidades del *Staphylococcus* es la capacidad de escapar de los efectos letales de algunos antimicrobianos (antibióticos) debido a su internalizado en los neutrófilos (glóbulos blancos) y de otras células huésped. En este sentido y para evitar la acción del neutrófilo, *Staphylococcus* se inactiva y sobrevive dentro de él. Transcurrido uno o dos días, los glóbulos blancos mueren y *Staphylococcus* se libera para reanudar el proceso de infección.

A pesar de la aclaración anterior y ante la duda de si verdaderamente las BL puedan haber sido las causantes o no de la inhibición de los patógenos aislados, tanto en el ensayo anterior con las cepas individuales (inciso 2.1. de esta sección) como en este nuevo estudio de tolerancia con las cepas en conjunto, se realizó un sencillo ensayo de inhibición por estrías cruzadas. Esta prueba fue realizada entre las 3 BL seleccionadas y las tres cepas patógenas aisladas durante los ensayos; y evidenció que solo dos (*Ent. hirae* CRL 1835 y *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655) presentaron capacidad de inhibir a las tres cepas potencialmente patógenas (dos cepas de *Staphylococcus* coagulasa negativo y una cepa de *Bacillus* spp.). Este resultado nos brinda una idea del posible comportamiento *in vivo* de las cepas dentro de la glándula mamaria, sin perder de vista el hecho de que las BL aumenten el RCS y esto pueda ser una consecuencia real de la inhibición de estas bacterias.

Tabla 19. Determinación del recuento celular somático, análisis bacteriológico y recuperación de las bacterias lácticas en el tiempo de muestras de leche de cuartos mamarios de una vaca Holando Argentino en período de secado, antes y después de ser inoculada con la formulación probiótica.

Análisis	Vaca en período Seco																				
	Cuarto inoculado con Formulación Probiótica **							Cuarto inoculado con Formulación Probiótica							Cuarto Control						
	Duración del ensayo (Días)																				
	-5	0	1	2	5	7	17	-5	0	1	2	5	7	17	-5	0	1	2	5	7	17
RCS ($x10^3$/ml)	100	4200	4000	7500	30000	12000	8500	50	200	3100	6100	4300	2500	800	250	200	330	350	370	480	320
Bacterias (ufc/ml)	0	13000*	50*	0	13000*	10000*	1300*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacterias Lácticas (ufc/ml)	0	0	200	10	0	0	0	0	0	7500	1600	140	0	10	0	0	0	0	0	0	0

Referencia: (*) ufc/ml de *Staph.* coagulasa negativo (SCN); (**) *Ent. hirae* CRL 1835, *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 y *L. perolens* CRL 1724; RCS: recuento de células somáticas.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo expresado por Reid y col. (2004) quienes, a nivel urogenital, afirmaron que las bacterias lácticas son capaces de interferir con los patógenos por diferentes mecanismos, dentro de los cuales incluyeron: la exclusión de la superficie celular, la producción de compuestos biosurfactantes capaces de inhibir la adhesión, producción de compuestos antimicrobianos, auto-agregación, hidrofobicidad de superficie y co-agregación con otras especies bacterianas. Es este sentido, las 3 BL seleccionadas cumplen con gran parte de estas características, las cuales, según Burton y col. (2003) son características fundamentales para la selección de cepas como potenciales probióticos.

En lo que concierne al segundo cuarto inoculado y al cuarto control, ambos presentaron bacteriología negativa hasta el final del ensayo.

Otros resultados interesantes que se observan en la Tabla 19, son los valores de RCS registrados de leche de los dos cuartos inoculados. En ambas vacas, el valor del RCS fue disminuyendo al final del ensayo. A pesar de esto, uno de los cuartos de la vaca seca inoculado, presentó un elevado RCS al momento de la inoculación. Por esta razón, este cuarto no fue parámetro para analizar el efecto de la formulación probiótica en el RCS. Podemos decir que el elevado valor de RCS registrado en el mismo pudo ser concencuencia de la bateriología positiva registrada en él, donde este aumento sería uno de los mecanismos de defensa del animal para contrarrestar el efecto nocivo causado por el agente causal de mastitis, nombrado.

Por otro lado, la formulación probiótica inoculada en el segundo cuarto fue capaz de elevar el RCS 15 veces, respecto del valor del recuento el día 0 (D0) las primeras 24h posteriores a la inoculación y 30 veces más a las 48h. Teniendo en cuenta que el objetivo principal de la inoculación intramamaria con la formulación probiótica es emplearla en animales en período de secado, el registrar un significativo aumento del RCS durante este período de no ordeño y en un corto tiempo, de ninguna manera estaría afectando la producción lechera del tambero, sino por el contrario permitiría reforzar las defensas naturales del animal. Esto a consecuencia de que a nivel producción y comercialización de leche, el RCS es un parámetro para la estimación de la inflamación de la glándula mamaria contando el número de neutrófilos que pasan a la leche como consecuencia de una alteración o infección (Dutto, 2004), por lo cual la venta de leche con un RCS elevado significa pérdida económica para el productor tambero.

Del mismo modo que el ensayo anterior, el cuarto control mostró pequeñas variaciones en el RCS durante los días del ensayo. Ante esto, Berry y Meaney (2006) plantean que estos aumentos probablemente se deban al últimamente mencionado "cross-talk o comunicación cruzada" entre los cuatro cuartos mamarios de una misma vaca.

Los resultados de RCS obtenidos, a lo largo de dos ensayos *in vivo*, reflejan claramente que el comportamiento individual de las cepas es similar al registrado cuando las cepas están en conjunto. Es decir, existe un efecto de las 3 BL a elevar significativamente el RCS durante

los 2 días posteriores a la inoculación intramamaria y luego se observa una tendencia en disminución. En este sentido, los trabajos que más se asemejan al resultado obtenido son los de Ryan y col. (1999a) y Crispie y col. (2008) quienes lograron incrementar, por un corto tiempo, el RCS en la leche de bovinos tratados con bacterias probióticas.

Sumado a lo dicho en el párrafo anterior, hay que remarcar nuevamente que los elevadísimos valores de RCS registrados en este período particular del animal coinciden con lo informado por Jensen y Eberhart (1981).

Recuperación, identificación y recuento de la formulación

En la Tabla 19 se observa que en los dos cuartos inoculados fue posible recuperar las cepas de la formulación probiótica. El mayor valor obtenido se registró en el cuarto que presentaba bacteriología negativa al momento de la inoculación y fue de $7{,}5.10^3$ ufc/ml.

Las BL inoculadas en el cuarto con bacteriología negativa, fueron recuperadas hasta el final del ensayo (D17) lo cual refuerza los resultados de adherencia *in vitro* obtenidos y presentados en la Tabla 13, mientras que el cuarto control se mantuvo libre de bacterias a lo largo del ensayo.

En la actualidad son escasos los trabajos que utilizan una cepa viva, homóloga (es decir, aplicada en el mismo nicho ecológico del cual se aisló) en ensayos de recuperación; por lo que resulta difícil comparar los resultados.

Los trabajos de Ryan y col. (1998), demostraron que una formulación a base de un sellador de pezón conteniendo una bacteriocina (lacticina 3147) pudo ser eficaz en el control de la mastitis clínica en un modelo de desafío experimental en vacas secas después de la exposición con *Streptococcus dysgalactiae* durante un ensayo de 8 días; Twomey y col. (2000), quienes vieron que un sellador similar al anterior (con lacticina 3147) fue eficaz en reducir significativamente el número de *Staph. aureus* DPC5246 en un modelo de infección artificial en vacas lactantes. Klostermann y col. (2008) inocularon vacas con mastitis con la cepa de *Lc. lactis* DPC 3147 y solo lograron recuperarla en un tiempo inferior a las dos semanas post-inoculación. Beecher y col. (2009) lograron recuperar una cepa de *Lc. lactis,* inoculada en cuartos mamarios con un título de 10^8 ufc/ml en un lapso de tiempo inferior a los tres días post-inoculación; y últimamente Klostermann y col. (2010) desarrollaron un "teat deep" (desinfectante post-ordeño) a base de una cepa de *Lc. lactis* DPC 3251 productora de la bacteriocina lacticina 3147 capaz de reducir patógenos mastíticos en vacas lactantes.

3.2. Estudio de eficacia de la formulación probiótica

Teniendo en cuenta todos los estudios llevados a cabo con las BL potencialmente probióticas, principalmente los estudios *in vitro* e *in vivo* con la formulación probiótica

compuesta por las 3 BL seleccionadas: *Ent. hirae* CRL 1835, *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 y *L. perolens* CRL 1724, se decidió realizar un ensayo de inoculación intramamario a campo empleando un importante número de animales: estudio de eficacia.

Este ensayo se diseñó con la finalidad de tener una dimensión real del efecto preventivo generado por la formulación probiótica estudiada y fue llevado a cabo en un tambo representativo de la región centro-sur de la provincia de Córdoba. Por esta razón, se seleccionaron 27 animales de acuerdo a su condición sanitaria y estado fisiológico (secado) y se separaron en tres grupos. Un grupo (n: 10) fue inoculado por única vez con una dosis de 1 mililitro de 6.10^6 ufc/ml de *Ent. hirae* CRL 1835 más *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 y *L. perolens* CRL 1724 en todos sus cuartos; otro grupo (n: 10) fue inoculado con el antibiótico intramamario utilizados de rutina (Bovigam) en todos sus cuartos; y el último grupo (n: 7) fue dejado como control, sin inocular ninguno de sus cuartos.

De esta manera, los grupos se escogieron para poder comparar tres formas de secar los animales: utilizando antibióticos (rutina aplicada en la mayoría de los tambos del país), utilizando probióticos (rutina para evaluar el comportamiento preventivo de BL) y dejando los animales sin aplicación (rutina no habitual en los tambos argentinos). Con este fin se buscó, pasados unos 60-65 días de la inoculación de cada dosis (tiempo aproximado que dura el período seco), evaluar el comportamiento de los animales en términos preventivos de mastitis bovina.

Como se observa en la Tabla 20 los análisis de muestras de leche, previo a la inoculación (D0), denotan que todas la vacas utilizadas no mostraron condiciones sanitarias óptimas (RCS $\leq$ 200.000 cel/ml y bacteriología negativa). Es decir, de la totalidad de los cuartos muestreados (n: 108), 60 presentaron RCS $\leq$ 200.000 cel/ml y bacteriología negativa, 37 RCS > 200.000 cel/ml y bacteriología negativa, 8 RCS > 200.000 cel/ml y bacteriología positiva y 3 RCS $\leq$ 200.000 cel/ml y bacteriología positiva. Esto demuestra que, a pesar de que se pretenda seleccionar vacas en determinadas condiciones, en un tambo de producción continua la selección de animales es muy difícil. Lo cual reafirma el hecho de llevar a cabo un ensayo a campo, donde los resultados obtenidos muchas veces distan de lo registrado en el laboratorio, debido a las innumerables variables que se presentan. Por otro lado, arroja resultados reales que permiten tener una clara noción del efecto generado por el producto que se está probando.

Tabla 20. Determinación del recuento celular somático y análisis bacteriológico en el tiempo. Análisis de muestras de leche de cuartos mamarios de 27 vacas en período de secado, antes y después de ser inoculada con la formulación probiótica o antibióticos de rutina.

Números de cuartos mamarios inoculados con distintas formulaciones											
Formulación Probiótica				**Antibióticos**				**Sin inocular**			
Día 0 (D0)											
RCS > 2.10⁵ cel/ml		*RCS ≤ 2.10⁵ cel/ml*		*RCS > 2.10⁵ cel/ml*		*RCS ≤ 2.10⁵ cel/ml*		*RCS > 2.10⁵ cel/ml*		*RCS ≤ 2.10⁵ cel/ml*	
Bact. (+)	Bact. (-)	Bact. (+)	Bact. (-)	Bact. (+)	Bact. (-)	Bact. (+)	Bact. (-)	Bact. (+)	Bact. (-)	Bact. (+)	Bact. (-)
6	18	0	16	0	4	0	36	2	15	3	8
Días 60-65 (D60-D65)											
RCS > 2.10⁵ cel/ml		*RCS ≤ 2.10⁵ cel/ml*		*RCS > 2.10⁵ cel/ml*		*RCS ≤ 2.10⁵ cel/ml*		*RCS > 2.10⁵ cel/ml*		*RCS ≤ 2.10⁵ cel/ml*	
Bact. (+)	Bact. (-)	Bact. (+)	Bact. (-)	Bact. (+)	Bact. (-)	Bact. (+)	Bact. (-)	Bact. (+)	Bact. (-)	Bact. (+)	Bact. (-)
1	22	1	**16**	**1**	**9**	0	30	**5**	**17**	2	4

Referencia: RCS: recuento de células somáticas; Bact. (+): bacteriología positiva; Bact. (-): bacteriología negativa.

En lo que respecta a los cuartos inoculados con la formulación probiótica, al cabo de los 60-65 días, se obtuvieron resultados muy interesantes y alentadores, ya que los 16 cuartos que presentaban condición sanitaria óptima el D0, mantuvieron esta condición al término del ensayo. Por otro lado, de los 6 cuartos mamarios con RCS > 200.000 cel/ml y bacteriología positiva (*Streptococcus* (n: 2), *Bacillus* (n: 2), SCN (n: 1) y *Staph.* coagulasa positivo (n: 1)) registrados el D0, solo un cuarto (*Bacillus*) presentó esta condición al término del ensayo. Resultado que demuestran la eficacia de la formulación probiótica.

A diferencia de los cuartos inoculados con la formulación, en los cuartos inoculados con el antibiótico de utilización rutinaria, sorprendentemente no se observaron los resultados esperados; ya que al cabo de los 60-65 días, de los 36 cuartos que presentaban condición sanitaria óptima el D0, 30 mantuvieron esta condición al término del ensayo. Es decir, 6 cuartos presentaron un RCS > 200.000 cel/ml y uno de ellos se infectó con una cepa de SCN.

Por último, y como era de esperarse, los cuartos controles sin ningún tipo de aplicación intramamaria mostraron resultados negativos desde el punto de vista de la sanidad. Es decir, al cabo de los 60-65 días, de los 8 cuartos que presentaron condición sanitaria óptima el D0, solo

4 mantuvieron esta condición al término del ensayo. Sumado a esto, el D0, 17 cuartos presentaban RCS > 200.000 cel/ml y dos de ellos bacteriología positiva (*Streptococcus* (n: 1) y SCN (n: 1)); al término del ensayo este valor ascendió a 22 cuartos, de ellos en 5 se aislaron bacterias: *Streptococcus* (n: 2), SCN (n: 1), *Staph.* coagulasa positivo (n: 1) y *E. coli* (n: 1). Lo cual demuestra la importancia de la aplicación intramamaria al secado, lo susceptible que se encuentra el animal en este período y las condiciones en las cuales se encuentran los tambos en la actualidad.

Al igual que en los ensayos anteriores, los animales inoculados con la formulación probiótica no registraron signos de inflamación ni alteraciones de la leche en los cuartos inoculados. Aunque a diferencia de lo informado previamente, en este ensayo no se pudo aislar ninguna de las 3 cepas BL inoculadas al comienzo del mismo.

Diferentes estrategias de prevención han sido aplicadas para minimizar la incidencia de la mastitis bovina, incluyendo la optimización de las prácticas de ordeño, el sacrificio de los animales, la desinfección de los pezones post-ordeño y el tratamiento con antibióticos (Zecconi y col., 2003). Si bien el uso de antibióticos constituye una herramienta exitosa para la prevención y eliminación de la mastitis, existe una tendencia mundial muy marcada a limitar el uso de antibióticos en el ganado lechero con el fin de reducir sus residuos en la leche (Pellegrino y col., 2008). Es por esto que, actualmente en Nueva Zelanda existe un producto comercial para sellar pezones sin la adición de antibióticos. Este producto es aplicado rutinariamente en vacas con menos de 150.000 cel/ml al momento del secado (Twomey y col., 2000).

Desde la perspectiva de los alimentos, los consumidores son cada vez más conscientes de las fuentes, los contenidos y la producción de alimentos; lo cual es evidente a partir de la creciente demanda de productos lácteos naturales orgánicos (McElroy, 2008). En este sentido, un producto natural y sin productos químicos sería sin duda de gran beneficio para la industria láctea (Klostermann y col., 2010). Por esta razón, estos ensayos a pesar de no tener una connotación estadística dado que solo se trató de ensayos a pequeña escala nos permitieron tener una noción general sobre el efecto de tres BL potencialmente probióticas y de una formulación elaborada con ellas. Es decir, sin perder de vista el objetivo general y teniendo en cuenta que lo que se pretendió desde un principio fue elaborar una formulación probiótica para ser aplicada en vacas al secado sanas (bacteriología negativa, RCS $\leq$ 200.000 cel/ml e historial libre de mastitis) reemplazando en las mismas el uso indiscriminado de antibióticos intramamarios para prevenir la mastitis bovina, podemos decir que se ha logrado un gran adelanto (Figuras 39-40).

Como lo informa Beecher y col. (2009), se logró obtener un efecto inmunomodulador dentro de la glándula mamaria, dado que la formulación probiótica indujo incrementos en los valores de RCS. Estos aumentos fueron registrados por cortos períodos de tiempo y en vacas secas, lo cual indica que de ninguna manera podría afectar la producción lechera del tambero, sino por el contrario permitiría reforzar las "defensas naturales" del animal. Esto a consecuencia de que a nivel de producción y comercialización de leche, el RCS estima la inflamación de la glándula mamaria contando el número de neutrófilos que pasan a la leche como resultado de una alteración o infección (Dutto, 2004), por lo cual la venta de leche con un RCS elevado significa una importante pérdida económica para el productor tambero.

Los resultados obtenidos en este trabajo contribuyen al conocimiento científico, brindando una valiosa información sobre el comportamiento *in vivo* e *in vitro* de BL con propiedades probióticas tanto de manera individual como conjunta. Además, sienta las bases para una futura elaboración comercial de un ***"novedoso producto probiótico natural formado por tres BL"***, inocuo para el animal y capaz de prevenir la mastitis causada por microorganismos patógenos en animales al secado, sin dejar residuos peligrosos o nocivos en la leche destinada a consumo humano. Por ende y teniendo en cuenta que diferentes estudios realizados bajo control han demostrado que el 35% de las infecciones intramamarias ocurren durante el período seco, particularmente durante los periodos críticos de alto-riesgo: primeras dos o tres semanas del comienzo del período seco y las últimas dos semanas del mismo, antes del parto, los resultados de la presente investigación sientan las bases para el diseño de nuevos ensayos a campo que ratifiquen los resultados obtenidos.

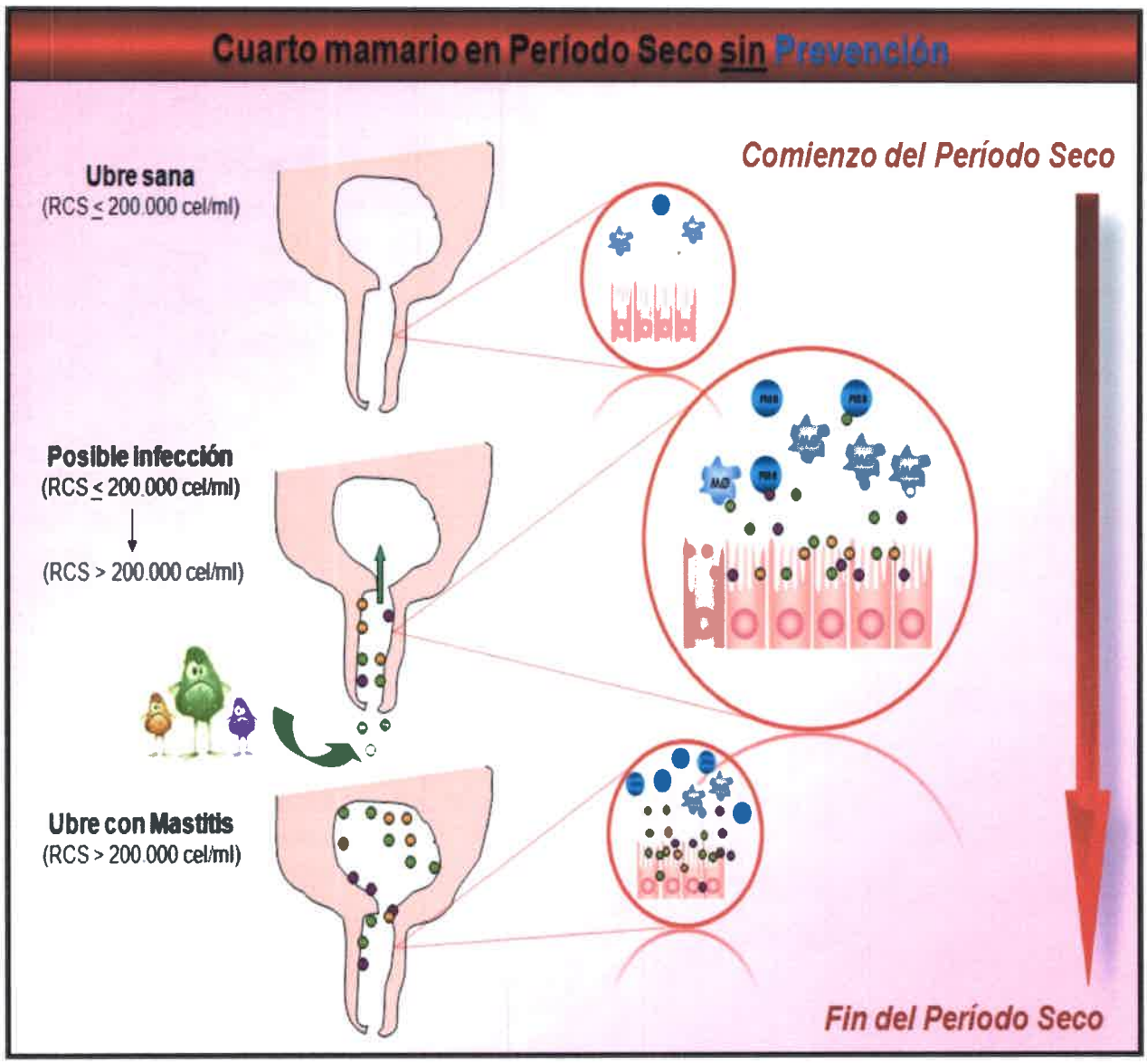


Figura 39: Esquema de cuarto mamario bovino, en período seco, sin aplicación intramamaria preventiva.

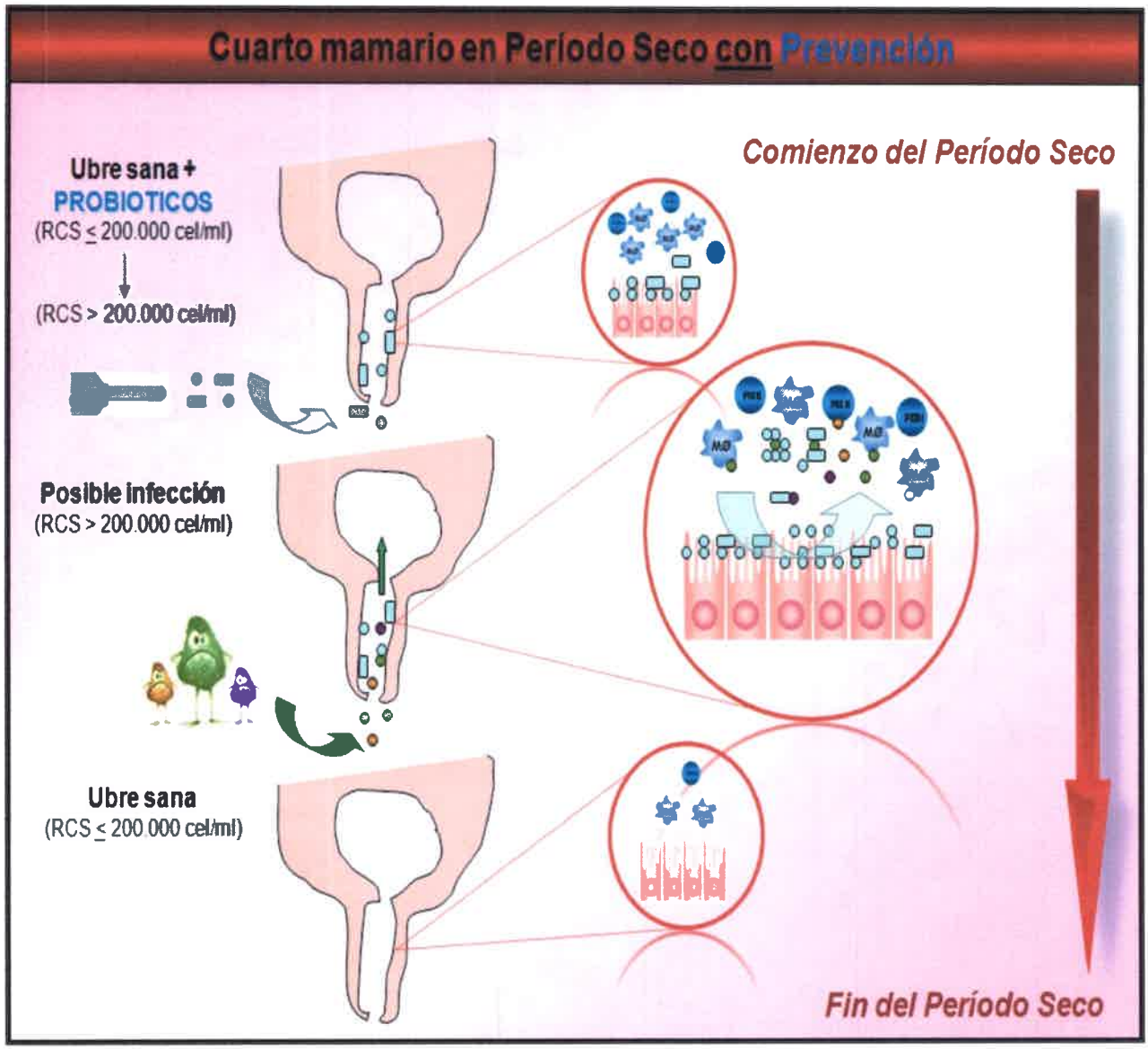


Figura 40: Esquema de cuarto mamario bovino, en período seco, con aplicación intramamaria preventiva. Fórmula probiótica: 1 mililitro de 6.10^6 ufc/ml de *Ent. hirae* CRL 1835 más *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 y *L. perolens* CRL 1724.

Conclusiones

Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, se pudo concluir que:

- Las BL con capacidad probiótica forman parte de la microbiota indígena de la glándula mamaria bovina y su aislamiento no estaría relacionado con la condición sanitaria de la ubre, ya que pueden ser aisladas en igual proporción de leche de bovinos sanos y con mastitis; lo que ratifica la primera hipótesis planteada. Por otro lado, estas BL presentan baja hidrofobicidad y baja auto-agregación; dichas características serían particulares del nicho ecológico del cual fueron aisladas y no estarían relacionadas con la condición sanitaria de la ubre.

- La flora microbiana normal que habita el canal del pezón mamario bovino estaría constituida mayoritariamente por bacilos Gram negativos pertenecientes a la familia *Enterobactereaceae*, seguidos por SCN, *Enterococcus* spp., *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp., en muy baja proporción. No existirían diferencias cuantitativas y cualitativas en el aislamiento de diferentes géneros bacterianos de flora microbiana normal entre animales con distinto grado de inflamación.

- Las BL potencialmente probióticas aisladas de leche de tambos de la provincia de Córdoba y Tucumán presentan capacidades de exclusión de microorganismos y adherencia a células del pezón mamario bovino; lo que ratifica la segunda hipótesis planteada. En este sentido, *Ent. hirae* CRL 1835, *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 y *L. perolens* CRL 1724 son las cepas que mejor desempeño presentan para: a) no barrer totalmente a los microorganismos considerados flora microbiana normal del pezón mamario bovino; b) inhibir y co-agregar a patógenos considerados agentes causales de mastitis bovina; c) adherirse a células epiteliales del canal y la cisterna del pezón mamario bovino sin ocasionar modificaciones en la morfología o ultra-estructura celular y d) no auto-inhibirse *in vitro*. Los ensayos realizados, permitieron seleccionar a *Ent. hirae* CRL 1835, *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 y *L. perolens* CRL 1724 para la formulación probiótica de uso en animales al secado.

- Las tres cepas seleccionadas, *Ent. hirae* CRL 1835, *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 y *L. perolens* CRL 1724, son capaces de ejercer un efecto inhibitorio conjunto y sinérgico (*in vitro)* sobre *Staph. aureus*, principal agente causal de mastitis bovina.

- *Lactobacillus perolens* CRL 1724 es incapaz de producir modificaciones estructurales en el tejido epitelial interno que recubre el canal y la cisterna del pezón bovino, en concentraciones no superiores a 10^6 ufc/ml. A esta concentración es capaz de generar una leve reacción inflamatoria en el tejido conectivo de la cisterna del pezón mamario bovino, causando hiperemia en vasos sanguíneos y reclutando PMN hacia vasos, intersticio y hacia la región cercana al epitelio de la cisterna del pezón bovino, estimulando así las defensas naturales de la glándula mamaria bovina. Además, es capaz de adherirse *in vivo* al epitelio que recubre la cisterna del pezón mamario bovino, y no así a la capa de queratina que recubre el canal del mismo, sin causar modificaciones estructurales, necrosis o apoptosis en las células epiteliales del canal y la cisterna del pezón mamario bovino.

- Ratificando la tercera hipótesis planteada, ninguna de las BL mencionadas anteriormente es capaz de producir sintomatología ni signos clínicos de mastitis en la glándula mamaria bovina, cuando se aplican por vía intramamaria en concentraciones de 10^6 ufc/ml, tanto de forma individual como conjunta. Ambas son capaces de generar incrementos significativos del RCS durante los dos días posteriores a su inoculación, presentando una sobrevida mínima de quince días dentro de la glándula mamaria bovina en período de lactación y secado.

- Las tres cepas seleccionadas *Ent. hirae* CRL 1835, *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 y *L. perolens* CRL 1724, aplicadas de forma intramamaria en concentraciones de 10^6 ufc/ml, son capaces de prevenir la infección en la glándula mamaria bovina en vacas al secado. Demostrado por la capacidad de la formulación para mantener las condiciones sanitarias óptimas (RCS $\leq$ 200.000 cel/ml y bacteriología negativa) de los animales tratados, en comparación con la aplicación de antibióticos y los cuartos sin tratamiento.

Conclusiones Finales

- Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis permitieron seleccionar a tres bacterias lácticas consideradas como potencialmente probióticas: *Ent. hirae* CRL 1835, *Lc. lactis subsp. lactis* CRL 1655 y *L. perolens* CRL 1724 aisladas del mismo nicho ecológico al cual estaría destinada su aplicación, para su inclusión en una formulación de uso veterinario. La aplicación de esta formulación en vacas en período seco, permitió mantener la condición sanitaria óptima de la ubre en comparación con la medida de prevención convencional de la enfermedad, antibiótico terapia.

Perspectivas Futuras

- Desarrollar una formulación intramamaria que permita mantener la concentración de las bacterias probióticas en el tiempo para aumentar la eficacia del producto.

- Realizar nuevos estudios para evaluar el comportamiento *in vitro* e *in vivo* de las tres cepas potenciales probióticas mencionadas, combinadas con un sellador de pezón utilizado en vacas al secado.

Bibliografía

- Aarestrup, F.M., Bager, F., Jensen, N.E., Madsen, M., Meilyng, A., Wegener, H.C. 1998. Resistance to antimicrobial agents used for animal therapy in pathogenic, zoonotic and indicator bacteria isolated from different food animals in Denmark: a baseline study for the Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring Programme (DANMAP). APMIS. 106: 745-770.

- Agarbaek, M., Gerdes, L.U., Richelsen, B. 1995. Hypocholesterolemic effect of a new fermented milk product in healthy middle aged men. Eur. J. Clin. Nutr. 49: 346-352.

- Agarry, O.O., Olaleye, M.T., Bello-Michael, C.O. 2005. Comparative antimicrobial activities of aloe vera gel and leaf. Afr. J. Biotechnol. 4: 1411-1414.

- Agro. 2012. La producción de leche argentina crecería 2,5%. La Voz de San Justo. Suplementos especiales. Artículo 31 de Enero de 2012. Disponible en Internet: http://www.lavozdesanjusto.com.ar/subsitios/articulo_suplemento_ampliado.php?id_articulo_suplemento=406. Activo en Noviembre 2012.

- Alderete, A. 2009. Prevención de residuos de antibióticos en leche. Disponible en Internet: http://www.misionrg.com.ar/antiblec.htm. Activo en Noviembre de 2012.

- Al-Qumber, M. y Tagg, J.R. 2006. Commensal bacilli inhibitory to mastitis pathogens isolated from the udder microbiota of healthy cows. J. Appl. Microbiol. 101: 1152-1160.

- Asaduzzaman, S.M. y Sonomoto, K. 2009. Lantibiotics: Diverse activities and unique modes of action. J. Biosci. Bioeng. 107: 475-487.

- Atlas de Histología Vegetal y Animal. 2009. Departamento de biología funcional y ciencias de la salud. Facultad de Biología. Universidad de Vigo, Pontevedra, España. Disponible en Internet: http://webs.uvigo.es/mmegias/inicio.html. Activo en Diciembre de 2012.

- Avila Téllez, S. y Gutiérrez Chávez, A. 2010a. Producción de leche con ganado bovino. Anatomía y Fisiología de la glándula mamaria. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnica. Universidad Nacional Autónoma de México. 6: 217-250.

- Avila Téllez, S. y Gutiérrez Chávez, A. 2010b. Producción de leche con ganado bovino. Mastitis: Diagnóstico, tratamiento y control. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnica. Universidad Nacional Autónoma de México. 8: 1-123.

- Bacha, W.J. y Word, L.M. 1998. Atlas color de Histología Veterinaria. Tegumento. Ed. Inter-Médica. 12: 93-97.

- Bachman, K.C. y Schairer, M.L. 2003. Invited review: bovine studies on optimal lengths of dry periods. J. Dairy Sci. 86: 3027-3037.

- Bager, F. 2000. Danmap: monitoring antimicrobial resistance in Denmark. Int. J. Antimicrob. Agents. 14: 271-274.

- Barberis, I.L., Pájaro, M.C., Godino, S.D., Aichino, C. 1997. Inhibición *in vitro* del crecimiento de *G. vaginalis* por bacteriocinas producidas por cepas de *P. aeruginosa*. Enf. Infec. Microbiol. Clin. 15 (9): 473-476.

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

- Bedolla, C.C., Castañeda, V.H., Wolter, W. 2007. Métodos de detección de la mastitis bovina. RedVet. 8 (9): 1-17.

- Beecher, C., Daly, M., Berry, D.P., Klostermann, K., Flynn, J., Meaney, W. 2009. Administration of a live culture of *Lactococcus lactis* DPC 3147 into the bovine mammary gland stimulates the local host immune response, particularly IL-1 and IL-8 gene expression. J. Dairy Res. 76 (3): 340-348.

- Berry, D.P. y Meaney, W.J. 2006. Interdependence and distribution of subclinical mastitis and intramammary infection among udder quarters in dairy cattle. Prev. Vet. Med. 75: 81-91.

- Bhatia, S.J., Kochar, N., Abraham, P. 1989. *Lactobacillus acidophilus* inhibits growth of *Compylobacter in vitro*. J. Clin. Microbiol. 27: 2328-2330.

- Blackburn, P., Projan, S.J., Goldberg, E.B. 1994. Pharmaceutical bacteriocin compositions and methods for doing the same. US Patent. 5: 304-540.

- Blom, H. y Mørtvedt, C. 1991. Anti-microbial substances produced by food associated micro-organisms. Biochem. Soc. T. 19: 694-698.

- Blowey, R. y Edmondson, P. 1995. Mastitis control in dairy herds: an Illustrated and practical guide. Ipswich, UK: Farming Press Books. pp: 32-68.

- Bogni, C., Raspanti, C., Odierno, L., Giraudo, J., Calzolari, A., Nagel, R. 1997. Síntesis de enterotoxinas y resistencia a antibióticos de estafilococos aislados de mastitis bovina. Rev. Med. Vet. 78: 4-10.

- Bogni, C., Odierno, L., Raspanti, C., Giraudo, J., Larriestra, A., Reinoso, E., Lasagno, M., Ferrari, M., Ducrós, E., Frigerio, C., Bettera, S., Pellegrino, M., Frola., Dieser, S., Vissio, C. 2011. War against mastitis: Current concepts on controlling bovine mastitis pathogens. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. Microbiology Book Series. Ed. Elsevier Sci. Ltd. pp: 483-493.

- Boris, S., Suarez, J., Velazquez, F., Barbés, C. 1998. Adherence of human lactobacilli to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens. Infect. Immun. 66: 1985-1989.

- Bouchard, D.S., Rault, L., Berkova, N., Le Loir, Y., Even, S. 2012. Inhibition of *Staphylococcus aureus* invasion into bovine mammary epithelial cells by contact with live *Lactobacillus casei*. Appl. Environ Microbiol. 79 (3): 877-885.

- Bradley, A. 2002. Bovine mastitis: an evolving disease. Vet. J. 164: 116-128.

- Brock, T.D. 1998. Biología de los Microorganismos, octava edición. Prentice Hall Internacional. Ed. Omega, Barcelona. 16: 718-724.

- Brooker, B.E. y Fuller, R. 1975. Adhesion of lactobacilli to the chicken crop epithelium. J. Ultrastruct. Res. 52: 21-31.

- Browning, J.W., Mein, G.A., Barton, M., Nicholls, T.J., Brightling, P. 1990. Effects of antibiotic therapy at drying off on mastitis in the dry period and in early lactation. Austr. Vet. J. 67: 440-442.

- Browning, J.W., Mein, G.A., Brightling, P., Nicholls, T.J., Barton, M. 1994. Strategies for mastitis control: dry cow therapy and culling. Aust. Vet. J. 71: 179-181.

- Buelink, D., Schaller, A., Labriola, S. 1996. Principales cuencas lecheras argentinas. Secretaría de Agricultura, Pesca y Alimentación. Subsecretaría de alimentación. Departamento de lechería. Buenos Aires, Argentina. Segunda edición. pp: 54.

- Burton, J.P., Cadieux, P., Reid, G. 2003. Improved understanding of the bacterial vaginal microbiota of women before and after pro-biotic instillation. Appl. Environ. Microbiol. 69: 97-101.

- Calvinho, L.F., Toselli, F.G., Weimann, W.R., Canavesio, V.R., Neder, V.E., Iguzquiza, I.A. 2002. Antimicrobial sensitivity of coagulase-positive staphylococcal strains isolated from bovine mastitis in the central dairy catchment area of Argentina. Rev. Argent. Microbiol. 34: 171-175.

- Calvinho, L.F. y Tirante, L. 2005. Prevalencia de microorganismos patógenos de mastitis bovina y evolución del estado de salud de la glándula mamaria en Argentina en los últimos 25 años. FAVE-Ciencias Veterinarias. 4 (1-2): 29-40.

- Cao, L.T., Wu, J.Q., Xie, F., Hu, S.H., Mo, Y. 2007. Efficacy of nisin in treatment of clinical mastitis in lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 90 (8): 3980-3985.

- Caprioli, A., Busani, L., Martel, J.L., Helmuth, R. 2000. Monitoring of antibiotic resistance in bacteria of animal origin: epidemiological methodologies. Int. J. Antimicrob. Agents. 14: 295-301.

- Capuco, A.V., Akers, R.M., Smith, J.J. 1997. Mammary growth in Holstein cows during the dry period: Quantification of nucleic acids and histology. J. Dairy Sci. 80: 477-487.

- Capuco, A.V. y Akers, R.M. 1999. Mammary involution in dairy animals. J. Mamm. Gland Biol. Neo. 4: 137-144.

- Centro de la Industria Lechera. 2003. La lechería Argentina: Situación coyuntural y perspectivas. CIL. pp: 1-19. Disponible en Internet: http://www.quesosargentinos.gov.ar/paginas/Documento2.PDF. Activo en Octubre de 2012.

- Centro de la Industria Lechera. 2010. Aseguran que la producción de leche crecerá un 5%. Proyecciones del CIL. Disponible en Internet: http://ongimpacto.org/campoemprende/?p=96. Activo en Diciembre de 2012.

- Chan, R.V., Reid, G., Irvin, J., Bruce, A., Costerton, W. 1985. Competitive exclusion of uropathogens from human uroepithelial cells by lactobacilli whole cells and cell wall fragments. Infect. Immun. 47: 84-89.

- Chaves, J. 2009. Calidad de leche y mastitis bovina. Curso: Sistemas de producción lechera de Argentina y Cuba. Facultad de Ciencias Veterinarias de la UBA. Chaves & Asoc., Olivos, Buenos Aires, Argentina. Comisión Técnica de Almast. Aprocal. Disponible en Internet: http://www.aprocal.com.ar/wp-content/uploads/mastitis_bobina.htm.pdf. Activo en Noviembre de 2012.

- Chikindas, M.L., García-Garcera, M.J., Driesessen, A.J.M., Ledeboer, A.M, Nissen-Mejer, J., Nes, I.F., Abee, T., Konings, W.N., Venema, G. 1993. Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0 forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. Appl. Environ. Microbiol. 59: 3577-3584.

- Coelho, S.M.O., Reinoso, E., Pereira, I., Soares, L.C., Demo, M., Bogni, C., Souza, M.M.S. 2009. Virulence factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Rio de Janeiro. Pesq. Vet. Bras. 29 (5): 369-374.

- COFOCALEC. 2004. Norma Mexicana NMX-F-700-COFOCALEC. Sistema producto leche. Alimento lácteo. Leche cruda de vaca. Especificaciones fisicoquímicas, sanitarias y métodos de prueba. Organismo Nacional de Normalización del COFOCALEC.

- Con, A.H. y Gokalp, H.Y. 2000. Production of bacteriocin-like metabolites blactic acid cultures isolated from sucuk samples. Meat Sci. 55: 89-96.

- Concha Bascuñán, C. 2008. Lechería: Mastitis bovina: Nuevos aspectos de diagnóstico, tratamiento y control. Universidad de Chile. Disponible en Internet: http://www.villaymoreno.com.ar/Mercado_Detalle.asp?ID=313&page=6. Activo en Agosto de 2013.

- Corthésy, B., Gaskins, H.R., Mercenier, A. 2007. Cross-talk between probiotic bacteria and the host immune system. J. Nutr. 137: 781-790.

- Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P. 2005. Bacterial lantibiotics: Strategies to improve therapeutic potential. Curr. Protein Pept. Sci. 6: 61-75.

- Crispie, F., Twomey, D., Flynn, J., Hill, C., Ross, P., Meaney, W. 2005. The lantibiotic lacticin 3147 produced in a milk-based medium improves the efficacy of a bismuth-based teat seal in cattle deliberately infected with *Staphylococcus aureus*. J. Dairy Res. 72: 159-167.

- Crispie, F., Alonso-Gómez, M., Collette O'Loughlin, Klostermann, K., Flynn, J., Arkins, S., Meaney, W., Ross, R.P., Hill, C. 2008. Intramammary infusion of a live culture for treatment of bovine mastitis: effect of live lactococci on the mammary immune response. J. Dairy Res. 75: 374-384.

- Cross, M.L. 2002. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. FEMS Immun. Med. Microbiol. 1442: 1-9.

- Cruz Alamilla, M. 2007. La mastitis bovina y su impacto en la calidad de la leche. Ponencia presentada en el quinto encuentro ganadero de VIPRESA Tepatitlán, Jalisco, 20 de Abril 2007. Publicada con autorización de VIPRESA.

- Dallard, B. 2007. Estudio histofisiológico del efecto de un agente inmunomodulador intramamario en la involución de la glándula mamaria bovina. Tesis Doctoral.

Doctorado en Ciencias Biológicas. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe.

- De Man, J.C., Rogosa, M., Sharpe, M.E. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. J. Appl. Bacteriol. 23: 130-135.

- Devriese, L.A., Hommez, J., Laevens, H., Pot, B., Vandamme, P., Haesebrouk, F. 1999. Identification of aesculin-hydrolyzing streptococci, lactococci, aerococci and enterococci from subclinical intramammary infections in dairy cows. Vet. Microbiol. 70: 87-94.

- Doggi, C.A. y Perdigón, G. 2006. Importance of the host specificity in the selection of probiotic bacteria. J. Dairy Res. 73: 357-366.

- Dohoo, I.R. y Leslie, K.E. 1991. Evaluation of changes in somatic cell counts as indicators of new intramammary infections. Prev. Vet. Med. 10: 225-237.

- Domínguez, C.O. 1996. Proyecto Institucional 2th ed. Universidad Nacional de Villa María. Disponible en Internet: http://webs.satlink.com/usuarios/i/iiunvm/proy_unvm.htm. Activo en Diciembre de 2012.

- Dunne, C., O´Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrisen, D., O´Halloran, S., Feeney M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O´Sullivan, G., Shanahan, F., Collins, J.K. 2001. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. Am. J. Clin. Nutr. 73: 386-392.

- Dutto, L. 2004. Recuento de células somáticas. La castración de vacas. Disponible en Internet: http://www.vet-uy.com/articulos/artic_bov/050/0037/bov037.htm. Activo en Enero de 2013.

- Eaton, T.J. y Gasson, M.J. 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. Appl. Environ. Microbiol. 67: 1628-1635.

- Eberhart, R.J. 1986. Management of dry cows to reduce mastitis. J. Dairy Sci. 69: 1721-1732.

- Ehinger, A.M. y Kietzmann, M. 1998. Aspectos farmacocineticos de la terapia antimastitica. Berl. Munich. Tierärztl. Wschr. 111 (9): 337-343.

- Eroski Consumer. 2009. La leche de vaca. Se trata de un alimento esencial en todas las etapas de la vida. Disponible en Internet: http://www.consumer.es/web/es/alimentacion/guia-alimentos/leche-y-derivados. Activo en Agosto de 2013.

- Espeche, M.C., Otero, M.C., Sesma, F., Nader-Macias, M.E.F. 2009. Screening of surface properties and antagonistics substances production by lactic acid bacterial isolated from the mammary gland of healthy and mastitic cows. Vet. Microbiol. 135: 346-357.

- Espeche, M.C.-Pellegrino, M., Frola, I., Larriestra, A., Bogni, C., Nader-Macías, M.E.F. 2012. Lactic acid bacteria from raw milk as potentially beneficial strains to prevent bovine mastitis. Anaerobe. 18: 103-109.

- FAO/OMS. 2001. Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. Informe de la consulta de expertos FAO/OMS sobre evaluación de las propiedades saludables y nutricionales de los probióticos en los alimentos, incluida la leche en polvo con bacterias vivas del ácido láctico. 85: 1-49. Disponible en Internet: http://whqlibdoc.who.int/publications/2006/9253055138_spa.pdf. Activo en Octubre de 2012.

- Faría Reyes, J., García Urdaneta, A., Izquierdo Corser, P., Allara Cagnasso, M., Kutchynskaya Valera, L. 2002. Aislamiento de bacterias Gram positivas de leche cruda con residuos de antimicrobianos. Arch. Latin. Nutr. Disponible en Internet: http://www.scielo. org.ve/scielo.php?pid=S0004-06222002000100010&script= sci_ arttext. Activo en Enero de 2013.

- Fonden, R., Mogensan, G., Tanaka, R., Salminen, S. 2000. Effect of culture containing dairy products on intestinal micro flora, human nutrition and health-current knowledge and future perspectives. IDF Bull. 352: 4-30.

- Fox, L.K. y Cumming, M.S. 1996. Relationship between thickness, chapping and *Staphylococcus aureus* colonization of bovine teat tissue. J. Dairy Res. 63: 369-375.

- Fuller, R. y Gibson, G.R. 1997. Modification of intestinal microflora using probiotics and prebiotics. Scand. J. Gastroenterol. 222: 28-31.

- García, A. 2007. Mastitis contagiosa vs. ambiental. South Dakota State University. Disponible en Internet: http://www.extension.org/pages/Mastitis_Contagiosa_vs._ Ambiental. Activo en Enero de 2013.

- Gázquez Ortiz, A. y Blanco Rodríguez, A. 2004. Tratado de Histología Veterinaria. Piel y anejos cutáneos. Ed. Mansson, S.A., Barcelona, España.

- Gentilini, E., Denamiel, G., Betancor, A., Rebuelto, M., Rodríguez Fermepin, M., De Torrest, R.A. 2002. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative *staphylococci* isolated from bovine mastitis in Argentina. J. Dairy Sci. 85: 1913-1917.

- Gergor, R. 1999. The scientific basis for probiotic strain of *Lactobacillus*. Appl. Environ. Microbiol. pp: 3763-3766.

- Ghidini, S.M., Zanardi, E., Varisco, G., Chizzolini, R. 2002. Prevalence of molecules of ß-lactam antibiotics in bovine milk. In Lombardia and Emili Romagna (Italy). Ann. Fac. Medi. Vet. di Parma. 22: 245-252.

- Gill, J.J., Sabour P.M., Jianhua Gong, Yu Hai, Ken, E. Leslie, W., Griffiths, M. 2006. Characterization of bacterial populations recovered from the teat canals of lactating dairy and beef cattle by 16S rRNA gene sequence analysis. FEMS Microbiol. Ecol. 56: 471-481.

- Gillor, O., Kirkup, B.C., Riley, M.A. 2004. Colicins and microcins: The next generation antimicrobials. Adv. Appl. Microbiol. 54: 129-146.

- Giraudo, J.A., Calzolari, A., Rampone, H., Rampone, A., Giraudo, A.T., Bogni, C., Larriestra, A., Nagel, R. 1997. Field trials of a vaccine against bovine mastitis. 1. Evaluation in heifers. J. Dairy Sci. 80 (5): 845-53.

- Goldberg, J.J., Wildman, E.E., Pankey, J.W., Kunkel, J.R., Howard, D.E., Murphy, B.M. 1992. The influence of intensively managed rotational grazing, traditional continuous grazing and confinement housing on bulk tank milk quality and udder health. J. Dairy Sci. 75: 96-104.

- González Martínez, B.E., Gómez-Treviño, M., Jiménez-Salas, Z. 2003. Bacteriocinas de probióticos: características, propiedades antibacterianas y modos de acción. Rev. Salud Pública Nutr. 4 (2): 1-4.

- Greene, W.A., Gano, A.M., Smith, K.L., Hogan, J.S., Todhunter, D.A. 1991. Comparison of probiotic and antibiotic intramammary therapy of cattle with elevated somatic cell counts. J. Dairy Sci. 74: 2976-2981.

- Gruet, P., Maincent, P., Berthelot, X., Kaltsatos, V. 2001. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. Adv. Drug Deliv. Rev. 50: 245-259.

- Hans Andresen, S. 2001. Mastitis: prevención y control. Rev. Investig. Vet. Perú. 12 (2): 55-64.

- Hansen, P.J., Soto, P., Natzke, R.P. 2004. Mastitis and fertility in cattle-possible involvement of inflammation or inmune activation in embryonic mortality. Am. J. Reprod. Immunol. 51: 294-301.

- Havenaar, R., Brink, B.T., Huisin´tveld, J.H.J. 1992. Selection of strains for probiotics use. In: R. Fuller (ed.). Probiotics. The scientific basis. Chapman and Hall, London. pp: 209-223.

- Heisig, P., Kratz, B., Halle, E., Graser, Y., Altwegg, M., Rabsch, W., Faber, J.P. 1995. Identification of DNA gyrase a mutations in ciprofloxacin-resistant isolates of *Salmonella typhimurium* from men and cattle in Germany. Microb. Drug Res. 1: 211-218.

- Heng, N.C., Wescombe, P.A., Burton, J.P., Jack, R.W., Tagg, J.R. 2007. The diversity of bacteriocins in Gram-positive bacteria. In Eckey, C. (ed.), Bacteriocins. Ecology and Evolution. Berlin: Springer.

- Henriksson, A., Szewzyk, R., Conway, P.L. 1991. Characteristics of the adhesive determinants of *Lactobacillus fermentum* 104. Appl. Environ. Microbiol. 57: 499-502.

- Hillerton, J.E. y Berry, E.A. 2005. Treating mastitis in the cow-a tradition or an archaism. A review. J. App. Microbiol. 98: 1250-1255.

- Hogan, J.S., Weiss, W.P., Todhunter, D.A., Smith, K.L., Schoenberger, P.S. 1992. Efficacy of an *Escherichia coli* J5 mastitis vaccine in an experimental challenge trial. J. Dairy Sci. 75: 415-422.

- Hütt, P., Shchepetova, J., Lõivukene, K., Mikelsaar, M. 2006. Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero- and uropathogens. J. Appl. Microb. 100 (6): 1324-1332.

- INFOSTAT. 2004. InfoStat, versión 2004. Manual del usuario. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. 1th ed. Editorial Brujas Argentina.

- INTA. 2007. Hoja informativa sectorial. Proyecto lechero. Disponible en Internet: http://www.inta.gov.ar/rafaela/info/documentos/economia/prod_lechera_nivel_nacional.pdf. Activo en Enero de 2013.

- INTI. 2010. Programa de pruebas de desempeño de productos. Leche UAT (ultra alta temperatura) larga vida. Disponible en Internet: http://www.inti.gob.ar/productos/pdf/informe_lecheUAT.pdf. Activo en Diciembre de 2012.

- Iñiguez Palomares, C. y Acedo Féliz, E. 2006. Mecanismos de adhesión al tracto intestinal y antagonismo de *Bifidobacterium*. Universidad Autónoma de Nuevo León. Respyn. 7 (2): 1.

- Jacobsen, C.N. 1999. Screening of probiotic activities of forty-seven strain *Lactobacillus* spp. by *in vitro* techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. Appl. Environ. Microbiol. 65: 4949-4956.

- Jensen, D.L. y Eberhart, R.J. 1981. Total and differential cell counts in secretions of the nonlactating bovine mammary gland. Am. J. Vet. Res. 42: 743-747.

- Juárez Tomás, M.S., Ocaña, V.S., Wiese, B., Nader-Macías, M.E. 2003. Growth and lactic production by vaginal *Lactobacillus* acidophilus CRL 1259, and inhibition of uropathogenic *Escherichia coli*. J. Med. Microbiol. 52: 1117-1124.

- Juárez Tomás, M.S., Otero, M.C., Ocaña, V.S., Nader-Macías, M.E. 2004. Production of antimicrobial substances in lactic acid bacteria: determination of hydrogen peroxide. In: Spencer, J.F.T., Ragout de Spencer, A.L. (ed.), Methods in Molecular Biology. Public Health Microbiology: Methods and Protocols, Humana Press Inc, New Jersey. 268: 337-346.

- Kandler, O. y Weiss, N. 1984. Regular, non-sporing Gram-positive rods. In P.H.A. Sneath, M.S. Mair, M.E. Sharpe, and J. G. Holt (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, Md. pp: 1208-1260.

- Karreman, H.J. 2007. Phytotherapy for dairy cows. Mosby, Inc, an affiliate of Elsevier Inc Publications, Missouri. USA. Veterinary Herbal Medicine. pp: 441-451.

- Kastli, P. 1967. Definition of Mastitis. A Bull. Int. Dairy Fed. Part. II: 1.

- Kerr, D.E. y Wellnitz, O. 2003. Mammary expression of news genes to combat mastitis. J. Anim. Sci. 81 (3): 38-47.

- Kim, S.Y., Shin, S., Koo, H.C., Youn, J.H., Paik, H.D., Park, Y.H. 2010. *In vitro* antimicrobial effect and *in vivo* preventive and therapeutic effects of partially purified lantibiotic lacticin NK34 against infection by *Staphylococcus* species isolated from bovine mastitis. J. Dairy Sci. 93 (8): 3610-3615.

- Kimura, K., McCartney, A.L., McConnel, M.A., Tannock, G.W. 1997. Analysis of fecal population of bifidobacteria and lactobacilli and investigation of the immunological responses of their human hosts to predominant strains. Appl. Environ. Microbiol. 63: 3394-3398.

- Klostermann, K., Crispie, F., Flynn, J., Ross, R.P., Hill, C., Meaney, W. 2008. Intramammary infusion of a live culture of *Lactococcus lactis* for treatment of bovine mastitis: Comparison with antibiotic treatment in field trials. J. Dairy Res. 75 (3): 365-373.

- Klostermann, K., Crispie, F., Flynn, J., Meaney, W.J., Paul Ross, R., Hill, C. 2010. Efficacy of a teat dip containing the bacteriocin lacticin 3147 to eliminate Gram-positive pathogens associated with bovine mastitis. J. Dairy Res. 77: 231-238.

- Leavens, H., Deluyker, H., Schukken, Y.H., De Meulemeester, L., Vandermeersch, R., De Muelenaere, E., De Kruif, A. 1997. Influence of parity and stage of lactation on somatic cell count in bacteriologically negative dairy cows. J. Dairy Sci. 81: 3219-3226.

- Leitner, G., Krifucks, O., Kiran, M.D., Balaban, N. 2011. Vaccine development for the prevention of staphylococcal mastitis in dairy cows. Vet. Immunol. Immunopathol. 142 (1-2): 25-35.

- Lescourret, F. y Coulon, J.B. 1994. Modeling the impact of mastitis on milk production by dairy cows. J. Dairy Sci. 77 (8): 2289-2301.

- Leslie, K.E., Schukken, Y.H., Saògeanl, J., Oitchell, M. 1997. Inhibitor violations during 10 years in Ontario. Association with somatic cell count reduction program. Report to the Ontario Buro of Veterinary drugs.

- Ma, Y., Ryan, C., Barbano, D.M., Galton, D.M., Rudan, M.A., Boor, K.F. 1999. Effects of somatic cell count of quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. J. Dairy Sci. 83: 264-274.

- Magariños, H. 2000. Producción higiénica de la leche cruda. Una guía para la pequeña y mediana empresa. pp: 1-95. Disponible en Internet: http://www.educapalimentos.org/libros/leche_all.pdf. Activo en Enero de 2013.

- Makovec, J.A. y Ruegg, P.L. 2003. Antimicrobial resistance of bacteria isolated from dairy cow milk samples submitted for bacterial culture: 8.905 samples (1994-2001). J. Am. Vet. Med. Assoc. 222 (11): 1582-1589.

- Mami, A., Henni, J.E., Kihal, M. 2008. Antimicrobial activity of *Lactobacillus* species isolated from algerian raw goat's milk against *Staphylococcus aureus.* World J. Dairy Food Sci. 3 (2): 39-49.

- Marco, J.C., Escobal, I., Aduriz, J.J. 1995. Efficacy of different dry cow preparations in the control of mastitis, in: Proceedings of the 3rd International Mastitis Seminar. Tel. Aviv. pp: 122-123.

- Marsalková, S., Cízek, M., Vasil, M., Bomba, A., Nad, P., Datelinka, I., Jonecová, Z., Rimková, S., Kalinácová, V., Styriak, I., Bugarsky, A., Gréserová, G. 2004. Testing two *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus* strains for their suitability as a lipoid probiotic. Berl. Münch.Tierärztl.Wschr. 117: 145-147.

- Marteau, P., Vrese, M., Cellier, C.J., Schrezenmeir, J. 2001. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiótics. Am. J. Clin. Nut. 73: 430-436.

- Martel, J.L., Tardy, F., Brisabois, A., Lailler, R., Coudert, M., Chaslusdancla, E. 2000. The French antibiotic resistance monitoring programmers. Int. J. Antimicrob. Agents. 14: 275-283.

- Maxwell, F.J. y Stewart, C.S. 1995. Microbiology gut: the neonatal pig development and survival. M.A. Varley (ed.). CAB Internacional (Editorial) Gran Bretaña. pp: 162-174.

- McDonald, J.S. y Anderson, A.J. 1981. Total and differential somatic cell counts in secretions from non-infected bovine mammary glands. The early nonlactating period. Am. J. Vet. Res. 42: 1360-1365.

- McElroy, B. 2008. Global statistics of the organic market. Ecological farming conference, pacific grove CA, USA.

- Mc Goarty. 1993. Probiotic use of lactobacilli in the human female urogenital tract. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 6: 251-264.

- Millette, M., Luquet, F.M., Lacroix, M. 2006. *In vitro* growth control of selected pathogens by *Lactobacillus* acidophilus and *Lactobacillus* casei-fermented milk. Lett. Appl. Microbiol. pp: 314-319.

- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación. 2013. Subsecretaría de Lechería. Lechería. Estadística. Producción por provincias. Disponible en Internet: http://www.minagri.gob.ar/site/index.php. Activo en Agosto de 2013.

- Mishra, V. y Prasad, D.N. 2005. Application of *in vitro* methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. Int. J. Food Microbiol. 103: 109-115.

- Molbak, K., Baggesen, D.L., Aarestrup, F.M. 1999. An outbreak of multidrugresistant, quinolone-resistant *Salmonella* enterica serotype *thyphimurium* DT104. New Engl. J. Med. 341: 1420-1425.

- Montville, T.J. y Chen, Y. 1998. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. Appl. Microbiol. Biotechnol. 50: 511-519.

- Moon, J.S., Kim, H.K., Koo, H.C., Joo, Y.S., Nam, H.M., Park, Y.H., Kang, M.I. 2007. The antibacterial and immunostimulative effect of chitosan-oligosaccharides against infection by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. Appl. Microbiol. Biotechnol. 75: 989-998.

- Movassagh, M.H. 2011. Study of antibiotics residues in cow raw milk by copan milk test in Parsabad region, Ardabil province, Iran. Annals Biol. Res. 2 (4): 355-359.

- Muelas, R., Días, J.R., Duch Marti, X., Romero, G. 2004. Anatomía y morfología del pezón en ganado vacuno. Bovis. 118: 8-16. Disponible en Internet: http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=997097. Activo en Enero de 2013.

- Mulet-Powell, N., Lacoste-Armynoty, A.M., Viñas, M., Simeon de Buochberg, M. 1998. Interaction between pairs of bacteriocins from lactic bacteria. J. Food Protect. 61: 1210-1212.

- Myllys, V., Honkanen-Buzalski, T., Virtanen, H., Pyorala, S., Muller, H.P. 1994. Effect of abrasion of teat orifice epithelium on development of bovine staphylococcal mastitis. J. Dairy Sci. 77: 446-452.

- Nader-Macías, M.E.F., Bogni, C., Sesma, F.J.M., Espeche, M.C., Pellegrino, M., Saavedra, L., Frola, I. 2011. Probiotics, bioactive compounds and vaccines. Alternative approaches for the prevention of bovine mastitis. Nova Science Publishers, Inc. Chapter VII. pp: 1-33.

- Naheed, M. y Mehdi, P.A. 2006. *In vitro* inhibition of mastitis pathogens by bacteriocin RN 86 Produced by an Indigenous *Lactobacillus casei* isolate. J. Appl. Sci. 6 (12): 2629-2634.

- Naidu, A.S., Bidlack, W.R., Clemens, R.A. 1999. Probiotics spectra of lactic acid bacteria (LAB). Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 38: 13-126.

- National Mastitis Council. 1999. Laboratory handbook on bovine mastitis. Madison, WI. National Mastitis Council. pp: 222.

- National Mastitis Council. 2003. Current concepts of bovine mastitis. 4th ed. National Mastitis Council, W.D. Hoard and Sons Co., Fort Atkinson, WI. pp: 39-44.

- National Mastitis Council. 2004. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality. 4th ed. Inc., Arlington, VA, USA. pp: 1-47.

- NCCLS. 2003. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard, 6th ed. NCCLS document M7-A6. NCCLS. Wayne. Pa.

- Nemcova, R. 1997. Critera for selection of lactobacilli for probiotic use. Vet. Med. 42: 19-27.

- Nickerson, S.C., Owens, W.E., Boddie, R.L. 1995. Mastitis in dairy heifers: initial studies on prevalence and control. J. Dairy Sci. 78: 1607-1618.

- Noa, M., Ruvalcaba, S., Morales, H. 2009. Frecuencia de residuos de antibióticos en leche cruda en Jalisco. Agrociencia 2009. Disponible en Internet: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2009000100006. Activo en Febrero de 2013.

- Noa Lima, E., Noa, M., González, D.G., Landeros, P., Reyes, W. 2009. Evaluación de la presencia de residuos de antibióticos y quimioterapéuticos en leche en Jalisco, México. Rev. Salud Anim. 31 (1): 29-33.

- NOM. 2002. Productos y servicios. Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado. NOM-184-SSA1. Especificaciones sanitarias, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 23 de Octubre de 2002. Disponible en Internet: http://www.cednna.oaxaca.gob.mx/pdf/normatividad/Reglas_div/rd8.pdf. Activo en Diciembre de 2012.

- Ocaña, V.S., Bru, E., Ruiz Holgado, A., Nader-Macías, M.E. 1999. Surface characteristics of lactobacilli isolated from human vagina. J. Gen. Appl. Microbiol. 45: 203-212.

- Ocaña, V. y Nader-Macías, M.E. 2001. Adhesión of *Lactobacillus* vaginal strains with probiotic properties to vaginal epithelial cells. Biocell. 25 (3): 265-273.

- Ocaña, V.S. y Nader-Macías, M.E. 2002. Vaginal lactobacilli: self and co-aggregation. Br. J. Biomed. Sci. 59: 183-190.

- Ocaña, V., Silva, C., Nader-Macías, M.E. 2006. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic vaginal lactobacilli. Review Article. Infect. Dis. Obstet. Gynecol. pp: 1-6.

- Ochoa Zarzosa, A., Loeza-Ángeles, H., Sagrero-Cisneros, E., Villagomez-Gómez, E., Lara-Zárate, L., Lòpez-Meza, J.E. 2008. Anti-bacterial activity of thionin thi 2.1 from *Arabidopsis thaliana* expressed by bovine endothelial cells against *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. Vet. Microbiol. 127: 425-430.

- Oliver, S.P., Lewis, M.J., Ingle, L., Gillespie, B.E., Mathews, K.R. 1993. Prevention of bovine mastitis by a premilking teat disinfectant containing chlorous acid and chlorine dioxide. J. Dairy Sci. 76: 287-292.

- Ordoqui, M.S., Mogni, F., Hervias, D. 2005. Características de la producción lechera argentina. Facultad de Agronomía. UBA. Apuntes Agroeconómicos. Disponible en Internet: http://www.agro.uba.ar/apuntes/no_2lechera.htm. Activo en Enero de 2013.

- Otero, M.C., Morelli, L., Nader-Macías, M.E. 2006. Probiotic properties of bovine vaginal lactic acid bacteria to prevent metritis. Lett. Appl. Microbiol. 43: 91-97.

- Otero, M.C. y Nader-Macías, M.E. 2007. *Lactobacillus* adhesion to epithelial cells from bovine vagina. Commun. Curr. Res. Educ. Topics Trends Appl. Microbiol. pp: 749-757.

- Otero, M.C, Silva de Ruiz, C., Nader-Macías, M.F. 2007. Susceptibility of probiotic bovine vaginal *Lactobacillus* to antimicrobial agents. J. Anim. Vet. Adv. 6 (1): 132-138.

- Ouwehand, A.C. y Conway, P.L. 1996. Purification and characterization of a component produced by *Lactobacillus fermentum* that inhibits the adhesion of K88 expressing *Escherichia coli* to porcine ileal mucus. J. Appl. Bacteriol. 80: 311-318.

- Ouwehand, A.C., Kirjavainen, P.V., Isolauri, E., Salminen, S.J. 1999. Probiotics: mechanisms and established effect. Int. Dairy J. 9: 43-52.

- Ouwehand, A.C. y Vesterlund, S. 2004. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects ed. Salminen, S.A., Von Wright, A., Ouwehand, A.C. New York: Marcel Dekker. pp: 375-395.

- Owens, W.E., Watts, J.L., Greene, B.B., Ray, C.H. 1990. Minimum inhibitory concentrations and disk diffusion zone diameter for selected antibiotics against streptococci isolated from bovine intramammary infections. J. Dairy Sci. 73: 1225-1231.

- Palma, M., Haggar, A., Flock, J. 1999. Adherence of *Staphylococcus aureus* is enhanced by an endogenous secreted protein with broad binding activity. J. Bacteriol. 181 (9): 2840-2845.

- Pascual, L.M., Daniele, M.B., Ruiz, F., Giordano, W., Pájaro, C., Barberis, L. 2008. *Lactobacillus rhamnosus* L60, a potential probiotic isolated from the human vaginal. J. Gen. Appl. Microbiol. 54: 141-148.

- Patterson, J.L., Girerd, P.H., Karjane, N.W., Jefferson, K.K. 2008. Effect of biofilm phenotype on resistance of *Gardnerella vaginalis* to hydrogen peroxide and lactic acid. Am. J. Obstet. Gynecol. 197 (2): 170.

- Paulrud, C.O. 2005. Basic concepts of the bovine teat canal. Vet. Res. Commun. 29 (3): 215-245.

- Pellegrino, M., Giraudo, J., Raspanti, C., Nagel, R., Odierno, L., Primo, V., Bogni, C. 2008. Experimental trial in heifers vaccinated with *Staphylococcus aureus* avirulent mutant against bovine mastitis. Vet. Microbiol. 127: 186-190.

- Pellegrino, M., Giraudo, J., Raspanti, C., Odierno, L., Bogni, C. 2010. Efficacy of immunization against bovine mastitis using a *Staphylococcus aureus* avirulent mutant vaccine. Vaccine 28 (28): 4523-4528.

- Pellegrino, M., Frola, I., Odierno, L., Bogni, C. 2011. Mastitis bovina: resistencia a antibióticos de cepas de *Staphylococcus* aisladas de leche. RedVet. 12 (7): 1-14.

- Perea Vélez, M., Hermans, K., Verhoeven, T.L.A., Lebeer, S.E, Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S.C.J. 2007. Identification and characterization of starter lactic acid bacteria and probiotics from Columbian dairy products. J. Appl. Microbiol. 103: 666-674.

- Pérez, C.G., Bedolla, C.C., Castañeda, V.H. 2005. Importancia del conteo de células somáticas en la cría sustentable de vacas productoras de leche. Universidad de Guadalajara, Jalisco, México. Sustentabilidad. 3 (1): 86-94.

- Pérez-Cabal, A. 2010. ¿Por qué seleccionar vacas lecheras resistentes a la mastitis clínica?. Disponible en Internet: http://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/4883/ART%C3%8DCULOS-RUMIANTES-ARCHIVO/seleccionar-vacas-lecheras-resistentes-mastitis-clinica.html. Activo en Febrero de 2013.

- Petersson-Wolfe, C.S., Mullarky, I.K., Jones, G.M. 2010. *Staphylococcus aureus* mastitis: causas, detección y control. Dairy Sci. Virginia Tech. Disponible en Internet: http://translate.google.com.ar/translate?hl=es&langpair=en|es&u=http://pubs.ext.vt.edu/404/404-229/404-229.html. Activo en Febrero de 2012.

- Philpot, W.N. 1969. Role of therapy in mastitis control. J. Dairy Sci. 52: 708-713.

- Pineiro, M. y Stanton, C. 2007. Probiotic bacteria: legislative framework- requirements to evidence basis. J. Nutr. 137: 850-853.

- Pol, M. 2009. Las mastitis ambientales y su prevención. Lactodiagnóstico sur. Universidad de Buenos Aires. Aprocal, asociación pro calidad de leche y sus derivados. Disponible en Internet: www.motivar.com.ar. Activo en Febrero de 2013.

- Pol, M. y Ruegg, P.L. 2007. Treatment practices and quantification of antimicrobial usage in conventional and organic dairy farms in Wisconsin. J. Dairy Sci. 90: 249-261.

- Prenafeta, A., March, R., Foix, A., Casals, I., Costa, L. 2010. Study of the humoral immunological response after vaccination with a *Staphylococcus aureus* biofilm-embedded bacterin in dairy cows: possible role of the exopolysaccharide specific antibody production in the protection from *Staphylococcus aureus* induced mastitis. Vet. Immunol. Immunopathol. 134 (3-4): 208-217.

- Pyorala, S. 2002. New strategies to prevent mastitis. Reprod. Domest. Anim. 37: 211-216.

- Ramos, A.C. 2009. Breve introducción a la anatomía de la ubre y a la fisiología del ordeño. Disponible en Internet: http://ocw.upm.es/produccion-animal/ordeno-mecanico/Tema_1._Anatomia_y_Fisiologia/breve-introduccion-a-la-anatomia-de-la-ubre-y-a-la-fisiologia-del-ordeno. Activo en Enero de 2013.

- Rasmussen, M.D., Galton, D.M., Peterson, L.G. 1991. Effects of premilking teat preparation on spores of anaerobes, bacteria, and iodine residues in milk. J. Dairy Sci. 74: 2472-2478.

- Reddy, N.R., Roth, S.M., Eigel, W.N., Pierson, M.D. 1998. Foods and food ingredients for prevention of diarrhea diseases in children in developing countries. J. Food Prot. 51: 66-75.

- Reid, G. y McGroarty, J.A. 1988. *Lactobacillus* inhibitor production against *Escherichia coli* and co-aggregation ability with uropathogens. Can. J. Microbol. 34: 344-351.

- Reid, G., Mac Groarty, J., Chow, A., Bruce, A., Eisen, A., Costerton, W. 1990. Coaggregation of urogenital bacteria *in vitro* and *in vivo*. Curr. Microbiol. 20: 47-52.

- Reid, G. y Burton, J. 2002. Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. Microb. Infect. 4: 319-324.

- Reid, G., Jass, J., Sebulsky, M.T., McCormick, J.K. 2003. Potential use of probiotics in clinical practice. Clin. Microbial. Rev. 16: 652-658.

- Reid, G., Burton, J., Devillard, E. 2004. The rationale for probiotics in female urogenital healthcare. Med. Gen. Med. 6 (1): 49-62.

- 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 (4): 285-288.

- Roberson, J.R., Fox, L.K., Hancock, D.D., Gay, J.M., Besser, T.E. 1994. Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms. J. Dairy Sci. 77: 3354-3364.

- Rogers, L.A. y Whittier, E.O. 1928. Limiting factors in lactic fermentation. J. Bacteriol. 16: 211-14.

- Rojas, M., Ascencio, F., Conway, P. 2002. Purification and characterization of a surface protein from *Lactobacillus fermentum* 104R that binds to porcine small intestinal mucus and gastric mucin. Appl. Environm. Microbiol. 68: 2330-2336.

- Rosmini, M.R., Sequeira, G.J., Guerrero-Legarreta, I., Martí, L.E., Dalla-Santina, R., Frizzo, L., Bonazza, J.C. 2004. Producción de probióticos para animales de abasto: Importancia del uso de la microbiota intestinal indígena. Rev. Mex. Ing. Quím. 3: 181-191.

- Ross, R.P., Galvin, M., McAuliffe, O., Morgan, S., Ryan, M., Twomey, D., Meaney, W., Hill, C. 1999. Developing applications for lactococcal bacteriocins. Antonie van Leeuenhoek. 76: 337-346.

- Roth, J.A., Frank, D.E., Weighner, P., Weighner, M. 2001. Enhancement of neutrophil function by ultrafiltered bovine whey. J. Dairy Sci. 84: 824-829.

- Ruegg, P.L. 2001. Calidad de leche y manejo sanitario de la vaca seca. University of Wisconsin, Madison. Disponible en Internet: http://milkquality.wisc.edu/wp-content/uploads/2011/09/calidad-de-leche-y-manejo-sanitario-de-las-vaca-seca_spanish.pdf. Activo en Enero de 2013.

- Ruegg, P. 2003. El papel de la higiene en el ordeño eficiente. Ordeño y calidad de leche nº 406. Instituto Babcock. Universidad de Wisconsyn.

- Ruegg, P. y Rodrigues, A.C. 2007. Implementing milk quality programs on-farms: lessons learned from milk money. NMC 46th Annual Meeting Proceedings. San Antonio, Texas. pp: 21-24.

- Ruegg, P.L. 2009. Management of mastitis on organic and conventional dairy farms. J. Anim. Sci. 87: 43-55.

- Ruiz, F., Gerbaldo, G., Asurmendi, P., Pascual, L.M., Giordano, W., Barberis, I.L. 2009. Antimicrobial activity, inhibition of urogenital pathogens, and synergistic interactions between *Lactobacillus* strains. Curr. Microbiol. 59 (5): 497-501.

- Ruvalcaba, S., Noa, M., Pérez, G. 2011. Ciencia de la leche: una visión integral para México. Universidad de Guadalajara, México. Editorial Universitaria, primera edición.

- Ryan, M.P., Rea, M., Hill, C., Ross, R.P. 1996. An application in cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147. Appl. Environ. Microbiol. 62: 612-619.

- Ryan, M.P., Meaney, W.J., Ross, R.P., Hill, C. 1998. Evaluation of lacticin 3147 and a teat seal containing this bacteriocin for inhibition of mastitis pathogens. Appl. Environm. Microbiol. 64 (6): 2287-2290.

- Ryan, M.P., Flynn, J., Hill, C., Ross, R.P., Meaney, W.J. 1999a. The natural food grade inhibitor lacticin 3147 can prevent mastitis in non-lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 82: 2625-2631.

- Ryan, M.P., Jack, R.W., Josten, M., Jung, G. 1999b. Extensive posttranslational modification, including serine to d-alanine conversion, in the two-component lantibiotic, lacticin 3147. J. Biol. Chem. 274: 37544-37550.

- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., Mattila-Sandholm, T. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. J. Biotechnol. 84 (3): 197-215.

- Sablon, E., Contreras, B., Vandamme, E. 2000. Antimicrobial peptides of lactic acid bacteria: mode of action, genetic and biosynthesis. In Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. 68: 22-60.

- SABRE. 2006. A European integrated research project on cutting edge genomics for sustainable animal breeding. Farm Animal Genetics and Genomics Faraday Partnership. Disponible en Internet: http://www.sabre-eu.eu/Portals/0/SABRE%20Publications/SABRE_Brochure_11p.pdf. Activo en Agosto de 2013.

- Sáez Pérez, E. 2007. Probióticos, prebióticos y alimentos funcionales. Disponible en Internet: http://www.elmundo.es/yodona/2007/06/13/babyblog/1181748511.html. Activo en Noviembre de 2012.

- Salminen, S., Deighton, M.A., Benno, Y., Gorbach, S. 1998. Lactic acid bacteria in health and disease. In: Salminen S. von Wright A (ed.). Lactis acid bacterial: microbiology and functional aspects. 2th ed. Marcel Dekker, Inc. New York, Hong Kong. 7: 211-254.

- Sanders, M.E. 2000. Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health. J. Nut. 130: 384-390.

- Sandholm, M. y Korhonen, H. 1995. Antibacterial defense mechanisms of the udder. In: The bovine udder and mastitis. Ed. Sandholm, M., Honkanen- Buzalski, T., Kaartinen, L., Pyorala, S. Iyvaskyla, Finland: Gummerus Kirjapaino Oy. pp: 37-48.

- Sandholm, M. y Pyorala, S. 1995. Diagnostics of mastitis. Clinical examination of a mastitis cow. In: The bovine udder and mastitis. Ed. Sandholm, M., Honkanen- Buzalski, T., Kaartinen, L., Pyorala, S. Iyvaskyla, Finland: Gummerus Kirjapaino Oy. pp: 83-88.

- Santos, V. 1983. Producción de xantano. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

- Sara, M. y Uwe, B.S. 2000. S-layer proteins. J. Bacteriol. 182: 859-868.

- Saran, A. y Chaffer, M. 2000. Mastitis y calidad de leche. Inter-Médica. Buenos Aires. Argentina. pp: 194.

- Scaramelli, A. y González, Z. 2005. Prevención y control de la mastitis bovina. Manual de ganadería doble propósito. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela. Barquisimeto-Venezuela. pp: 335-339. Disponible en Internet: http://avpa.ula.ve/docuPDFs/libros_online/manual-ganaderia/seccion5/articulo10-s5.pdf. Activo en Noviembre de 2012.

- Schällibaum, M. 2001. Impact of SCC on the quality of fluid milk and cheese, in: annual meeting National Mastitis Council, 40, Reno, 2001. Proceedings. Madison: National Mastitis Council. pp: 38-46.

- Schepers, A.J., Lam, T.J., Schukken, Y.H., Wilmink, J.B., Hanekamp, W.J. 1997. Estimation of variance components for somatic cell counts to determine thresholds for uninfected quarters. J. Dairy Sci. 80: 1833-1840.

- Schiffmann, A.P. 1992. Methodological and legal problems relating to the detection of inhibitory substances in milk. Thesis Thierarztliche Hochschule Hannover, Germany.

- Seanq, R. 2009. Mastitis en ganado bovino. Disponible en Internet: http://buendato.ning.com/profiles/blogs/mastitis-en-ganado-bovino. Activo en Febrero de 2013.

- Sears, P.M., Smith, B.S., Stewart, W.K., Gonzalez, R.N., Rubino, S.D., Gusik, S.A., Kulisek, E.S., Projan, S.J., Blackburn, P. 1992. Evaluation of a nisin-based germicidal formulation on teat skin of live cows. J. Dairy Sci. 75: 3185-3190.

- Sears, P.M., Peele, J., Lassauzet, M., Blackburn, P. 1995. Use of antimicrobial proteins in the treatment of bovine mastitis. In: Proceedings of the 3rd International Mastitis Seminar. Tel-Aviv, Israel. pp: 17-18.

- Serna, L., Valencia, L.J., Campos, R. 2011. Lactic acid bacteria with antimicrobial activity against pathogenic agent causing of bovine mastitis. Rev. Bio. Agro. 9 (1): 97-104.

- Sit, C.S. y Vederas, J.C. 2008. Approaches to the discovery of new antibacterial agents based on bacteriocins. Biochem. Cell Biol. 86: 116-123.

- Smith, A., Wheelock, J.V., Dodd, A.F. 1966. Effect of milking throughout pregnancy on milk yield in the succeeding lactation. J. Dairy Sci. 49: 895-902.

- Soleimani, N.A., Kermanshahi, R.K., Yakhchali, B., Sattari, T.N. 2010. Antagonistic activity of probiotic lactobacilli against *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. Afric. J. Microbiol. Res. 4 (20): 2169-2173.

- Sordillo, L.M., Shafer-Weaver, K., De Rosa, D. 1997. Immunobiology of the mammary gland. J. Dairy Sci. 80: 1851-1865.

- Suhren, G. 1989. Producer microorganisms. Enzymes of psychrotrophs in raw food. McKellar RC (ed.). CRC Press, Boca Raton, FL. pp: 3-34.

- Szajewska, H. y Mrukowics, J.Z. 2001. Probiotics in the treatment and prevention of acute infectious diarrea in infants and children: a systematic review of published randomized, double blind, placebo controlled trials. J. Pediat. Gastroenterol. Nuts. 33 (2): 17-25.

- Tagg, J.R. y Dierksen, K.P. 2003. Bacterial replacement therapy: adapting germ warfare to infection prevention. Trends Biotechnol. 21: 217-223.

- Tikofsky, L.L., Barlow, J.W., Santisteban, C., Schukken, Y.H. 2003. A comparison of antimicrobial susceptibility patterns for *Staphylococcus aureus* in organic and conventional dairy herds. Micro. Drug Resistance. 9: 39-45.

- Tiwari, J.G., Babra, C., Tiwari, H.K., Williams, V., De Wet, S., Gibson, J., Paxman, A., Morgan, E., Costantino, P., Sunagar, R., Isloor, S., Mukkur, T. 2013. Trends in therapeutic and prevention strategies for management of bovine mastitis: an overview. J. Vaccines Vaccin. 4 (2): 1-11.

- Townsend, F.M., Ambrogi, L.P., Silliphant, W.M. 1960. Manual of histology and specific techniques. McGrav-Hill Book Company (ed.).

- Turutoglu, H., Hasoksuz, M., Ozturk, D., Yildirim, M., Sagnak, S. 2009. Methicillin and aminoglycoside resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis and sequence analysis of their mecA genes. Vet. Res. Commun. 33: 945-956.

- Twomey, D.P., Wheelock, A.I., Flynn, J., Meaney, W.J., Hill, C., Ross, R.P. 2000. Protection against *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cows using a bismuth-based teat seal containing the bacteriocin, lacticin 3147. J. Dairy Sci. 83 (9): 1981-1988.

- Unión Ganadera Regional de Jalisco. 2010. Introducción al sistema mamario. Disponible en Internet: http://www.ugrj.org.mx/index.php?option=com_content&task=view&id=459&Itemid=579. Activo en Enero de 2012.

- Vangroenweghe, F., Lamote, I., Burvenich, C. 2005. Physiology of the periparturient period and its relation to severity of clinical mastitis. Domest. Anim. Endocrinol. 29 (2): 283-293.

- Vilamajó, M. 2007. El peróxido de hidrógeno en la desinfección y el mantenimiento de la higiene de las instalaciones de agua en las granjas. Disponible en Internet: http://www.3tres3.com/los-expertos-opinan/el-peroxido-de-hidrogeno-en-la-desinfeccionde-de-instalaciones-de-agua_1840/. Activo en Diciembre de 2012.

- Waage, S., Mork, T., Roros, A., Aasland, D., Hunshamar, A., Odegaard, S.A. 1995. Bacteria associated with clinical mastitis in heifers. J. Dairy Sci. 82: 712-719.

- Walther, C. y Perreten, V. 2007. Methicillinresistant *Staphylococcus epidermidis* in organic milk production. J. Dairy Sci. 90 (12): 5351.

- Wattiaux, M.A. 1999. Esenciales Lecheras. Prevención y detección de la mastitis. Instituto Badcock para la Investigación y Desarrollo Internacional de la Industria Lechera. Universidad de Wisconsin-Madison. Disponible en Internet: http://www.agrobit.com/Info_tecnica/Ganaderia/enfermedades/GA000008en.htm. Activo en Agosto de 2013.

- White, D.G., Harmon, R.J., Matos, J.E., Langlois, B.E. 1989. Isolation and identification of coagulase-negative *Staphylococcus* species from bovine body sites and streak canals of nulliparous heifers. J. Dairy Sci. 72: 1886-1892.

- WHO. 1994. Scientific working group on monitoring and management of bacterial resistance to antimicrobial agents. World Health Organization, Geneva. 1 (1): 37.

- Williamson, J.H., Woolford, M.W., Day, A.M. 1995. The prophylactic effect of a dry-cow antibiotic against *Streptococcus uberis*. N. Z. Vet. J. 43: 228-234.

- Woodward, W.D., Besser, T.E., Ward, A.C., Corbeil, L.B. 1987. *In vitro* growth inhibition of mastitis pathogens by bovine teat skin normal flora. Can. J. Vet. Res. 51: 27-31.

- Woodward, W.D., Ward, A.C., Fox, L.K., Corbeil, L.B. 1988. Teat skin normal flora and colonization with mastitis pathogen inhibitors. Vet. Microbiol. 17: 357-365.

- Woolford, M.W., Williamson, J.H, Day, A.M., Copeman, P.J.A. 1998. The prophylactic effect of a teat sealer on bovine mastitis during the dry period and the following lactation. N.Z. Vet. J. 46: 12-19.

- Wu, J., Hu, S., Cao, L. 2007. Therapeutic effect of nisin Z on subclinical mastitis in lactating cows. Antimicrob. Agents Chemother. 51 (9): 3131-3135.

- Zecconi, A., Piccinini, R., Fox, L.K. 2003. Epidemiologic study of intramammary infections with *Staphylococcus aureus* during the program control in nine commercial dairy herds. J. Am. Vet. Med. Assoc. 223 (5): 684-688.

- Zoetendal, E.G., Vaughan, E.E., De Vos, W.M. 2006. A microbial world within us. Mol. Microbiol. 59 (6): 1639-1650.

Producción Científica

Journal of Dairy Research (2012) **79** 84–92.
doi:10.1017/S0022029911000835

Effects of intramammary inoculation of *Lactobacillus perolens* CRL1724 in lactating cows' udders

Ignacio D Frola[1], Matías S Pellegrino[1], María C Espeche[3], José A Giraudo[2], María EF Nader-Macias[3] and Cristina I Bogni[1]*

[1] Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Cs. Ex. Fco-Qcas y Naturales, University of Río Cuarto, Ruta 36 Km 601, X5804ZAB Río Cuarto, Córdoba, Argentina
[2] Departament of Animal Pathology, Faculty of Agronomy and Veterinary, University of Río Cuarto, Ruta 36 Km 601, X5804ZAB Río Cuarto, Córdoba, Argentina
[3] CERELA-CONICET (Centro de Referencia para Lactobacilos-Consejo Nacional de Investigaciones Científícas y Técnicas de Argentina), Departament of Preventive Microbiology, Chacabuco 145, 4000 San Miguel de Tucumán, Argentina

Received 29 July 2011; accepted for publication 23 September 2011; first published online 14 November 2011

Bovine mastitis is the most important infectious disease on dairy farms. Conventional antibiotic therapy is often unsatisfactory and alternative treatments are continually under investigation. *Lactobacillus (Lb.) perolens* CRL 1724 and *Lactobacillus plantarum* CRL 1716 were previously isolated from milk of dairy cows and selected according to their potential probiotic properties. In the present work the in-vitro capacity of *Lactobacillus* strains to adhere to bovine teat canal epithelial cells (BTCEC) and to inhibit and co-aggregate 14 mastitis-causing pathogens (MCPs) was investigated. The effect of *Lb. perolens* CRL 1724 after intramammary inoculation in lactating cows was evaluated through determination of clinical signs of mastitis, milk appearance, somatic cell counts and *Lb. perolens* CRL 1724 recovery from milk. *Lb. perolens* CRL 1724 was able to inhibit 12 of 14 MCPs (85·7%) in vitro, especially those considered to be major pathogens. In addition, *Lb. perolens* CRL 1724 co-aggregated with all of them. *Lb. plantarum* CRL 1716 was able to inhibit 7 of 14 MCPs (50%) in vitro and showed co-aggregation ability similar to *Lb. perolens* CRL 1724. *Lb. perolens* CRL 1724 showed a higher efficacy of adhesion to BTCEC (values of percentage of adhesion and adhesion index of 75% and 14·4, respectively) than *Lb. plantarum* CRL 1716 (37% and 7·4, respectively). *Lb. perolens* CRL 1724 was recovered from all mammary quarters and no clinical signs or teat damage were observed after the inoculation of 10^6 cfu/ml. The udders presented a normal aspect and there were no changes in the appearance of the milk. The results obtained will serve as the basis for further trials to evaluate the potential of *Lb. perolens* CRL 1724 to be included in a non-antibiotic formulation for the prevention of bovine mastitis.

Keywords: Bovine mastitis, probiotic, *Lactobacillus perolens*, *Lactobacillus plantarum*, milk.

Mastitis, defined as an inflammation of the mammary gland, is one of the most expensive diseases in dairy farming, affecting the net earnings of milk producers all over the world (Fetrow, 2000). In Argentine herds, the main causative agents are *Staphylococcus (Staph.) aureus, Streptococcus (Str.) dysgalactiae* and *Streptococcus uberis* (Acuña et al. 2001; Calvinho & Tirante, 2005). These bacteria are very important, especially because they infect the udder shortly after drying off and before calving, when immunosuppression of cows increases the incidence of mastitis compared with the incidence during lactation (Sordillo, 2005). The conventional methods of controlling mastitis are based upon adoption of preventive control strategies including diagnosis, segregation of the animals and the use of improved hygiene and therapeutic protocols. Even though these current management practices contribute to the decrease in the occurrence of the disease, the treatment for bovine mastitis relies heavily on the use of antibiotics.

During the last three decades, long-acting intramammary antibiotics have been used routinely for the treatment of existing infections and also for preventing new infections mainly at drying off (Calvinho et al. 1991). However, while dry-cow antibiotic therapy has helped to reduce the incidence of mastitis, the emergence of antibiotic-resistant

*For correspondence; e-mail: cbogni@exa.unrc.edu.ar

pathogens has been increasingly problematic (McDougall et al. 2009).

In order to reduce antibiotic residues in dairy products and in agreement with global pressures to limit their use in dairy cattle, research has been focused on enhancing cows' natural defence mechanisms through the development of innovative methods for the treatment and the prevention of bovine mastitis (Ryan et al. 1999; Meaney et al. 2001; Crispie et al. 2008; McDougall et al. 2009; Pellegrino et al. 2010).

The use of probiotic bacteria, live microorganisms that when administered in adequate amounts confer a beneficial effect to the host (FAO & WHO, 2008), has been widely studied as a novel approach to prevent infections in animals, especially in the gastrointestinal and vaginal tract (Otero & Nader-Macías, 2007; Walsh et al. 2008). Probiotics may exert their beneficial effects on the health of the host by different and several mechanisms: adhesion to epithelial cells, colonization, biofilm formation, production of biosurfactants, aggregation and co-aggregation, production of antagonistic metabolites (organic acids, hydrogen peroxide, bacteriocins), competition for nutrients, production of enzymes and/or immune system modulation. It is likely that microorganisms may exert their effects as a result of one or more of these mechanisms (Espeche et al. 2009). In a previous study, Espeche et al. (2009) isolated several lactic acid bacteria (LAB) from bovine milk with the aim of studying their properties for the design of a probiotic product. Two of these strains, *Lactobacillus perolens* CRL 1724 and *Lactobacillus plantarum* CRL 1716 were selected for further studies to determine their beneficial properties against bovine mastitis.

The aim of the present study was to investigate the in-vitro capacity of *Lactobacillus* to adhere to bovine teat canal epithelial cells (BTCEC) and to inhibit and co-aggregate mastitis-causing pathogens (MCPs). The effect of *Lb. perolens* CRL 1724 after intramammary inoculation in lactating cows, through the determination of udder clinical signs, milk appearance, somatic cell counts (SCC) and recovery of *Lb. perolens* CRL 1724 in milk, was also evaluated.

Materials and Methods

Bacterial strain and culture conditions

Lactobacillus strains used in this study were isolated from milk of healthy Holstein cows from Tucumán, Argentina, and genetically identified by 16S rRNA gene sequencing as *Lb. perolens* CRL 1724 and *Lb. plantarum* CRL 1716. These strains were selected as potentially probiotic because of their high hydrophobicity index, moderate autoaggregation ability and ability to produce organic acid (Espeche et al. 2009).

Lb. perolens CRL 1724 and *Lb. plantarum* CRL 1716, resistant to streptomycin, were grown in Man, Rogosa and Sharpe (MRS, Britania) broth at 37 °C for 18 h, and stored in milk yeast extract (MYE) (10 g low-fat milk, 0·5 g yeast extract and 1 g glucose per 100 ml) with 12% glycerol at −20 °C. Before performing additional studies, bacterial were subcultured three times, every 12–14 h at 37 °C in MRS broth.

The following indicator bacteria were used to assess antagonistic activity and co-aggregation: *Str. agalactiae* ATCC27956, *Str. dysgalactiae* ATCC27957, *Str. uberis* 102, *Str. uberis* ATCC27958, *Staph. hyicus* 112249, *Str. bovis* ATCC27960, *Enterococcus (Ec.) faecalis* 19433, *Ec. faecium* 35667, *Escherichia (Esch.) coli* ATCC35218, *Klebsiella (K.) pneumoniae* ATCC10031 and *Staph. epidermidis* ATCC14990 provided by Dr Odierno (Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina). *Staph. aureus* RC108, *Esch. coli* 345 and *Pseudomonas* spp. 224 were isolated from milk of cows with bovine mastitis and identified in our laboratory. All these strains were cultivated on trypticase soy agar (TSA, Britania) at 37 °C for 18 h and stored in trypticase soy broth (TSB, Britania) with 20% glycerol at −20 °C.

Antimicrobial activity

Antimicrobial activity of *Lactobacillus* strains against MCPs in vitro was assayed by the streak line method (Hütt et al. 2006). The inhibitory effect was estimated as the width of the inhibition zone and ranked as high (>25 mm), intermediate (13–25 mm), low (1–12 mm) and no inhibition (0 mm). The assay was performed in duplicate.

Co-aggregation assay

To assess the interaction between *Lactobacillus* strains and MCPs, the method described by Reid et al. (1990) was used. A suspension of *Lactobacillus* spp. adjusted to a concentration of 10^9 cfu/ml in 1 m-phosphate-buffered saline (PBS) (pH 6·2) was mixed with 500 µl of 10^8 cfu/ml of each MCP and incubated at 37 °C in an orbital shaker at 2 **g** for 4 h. Suspensions, in duplicate, were Gram-stained and observed under an optical microscope. Pure cultures were used as negative controls.

Adhesion to BTCEC

Adhesion of *Lactobacillus* strains to BTCEC was determined by the methodology described previously by Otero & Nader-Macías (2007) with modifications. Overnight cultures of *Lactobacillus* strains were centrifuged and the bacterial pellet was washed twice with saline solution (0·8% NaCl), once with Eagle's minimum essential media (MEM; Gibco; pH 7·0), and finally suspended in MEM to obtain a concentration of 10^7 cfu/ml.

To isolate BTCEC, cows' udders were obtained from an abattoir. At the laboratory, udders were washed with water and the teat orifice was disinfected with 70% ethanol. BTCEC were obtained by scraping the teat canal wall with a Medibrush XL (Medical Engineering Co.) and suspended immediately in 1 ml MEM (pH 7·0). The suspension was

centrifuged for 10 min at 120 *g* and the pellet washed three times with 10 ml MEM and finally suspended in MEM at 10^5 cells/ml. Differential cell counts were carried out microscopically by using Wright stained smears. Cell viability was determined by the trypan blue exclusion method. The results were expressed as follows: (number of viable cells/number of total cells) × 100. BTCEC were stored refrigerated until the adhesion assay. This assay was performed in triplicate to ensure the test reproducibility.

Equal volumes (500 µl) of BTCEC and lactobacilli suspensions were mixed and incubated under low agitation conditions at 37 °C for 1 h. A tube with MEM was used as control. To remove non-adherent bacteria, tubes were centrifuged for 10 min at 120 *g* and the pellet was washed four times in 1 ml MEM. Bacterial binding to BTCEC were examined by optical microscopy (Gram stain) and results expressed as (1) percentage of adhesion: (number of BTCEC with bacteria adhered/total number of BTCEC) × 100; and (2) adhesion index: (total number of bacteria attached to BTCEC/total number of cells with bacteria adhered). The application of the index allowed us to evaluate the efficiency of adhesion.

Scanning electron microscopy

Scanning electron microscopy was applied to illustrate the adhesion capabilities of *Lb. perolens* CRL 1724 to BTCEC and the bacterial aggregation. The adhesion assay was performed as previously described and the methodology utilized for scanning electron microscopy was described previously by Otero & Nader-Macías (2007) with slight modifications. Briefly, after adhesion assay pellets were fixed with 3·16% glutaraldehyde in 0·1 mol/l phosphate buffer (pH 7·4), incubated for 4 h at 4 °C and homogenized. Fixed samples were centrifuged for 10 min at 300 g, washed twice with phosphate buffers (pH 7·2) and the pellet treated with 1% OsO_4 buffer. The samples were dehydrated with increasing acetone-ethanol concentrations, critically point dried mounted and mineralized. Samples were examined in a Joel JSM35CF scanning electron microscope.

Intramammary inoculation of Lb. perolens *CRL 1724*

Five Holando-Argentino lactating cows were used for the assays. Cows were clinically healthy, free of milk major MCPs and with somatic cell counts (SCC) in individual quarters <200 000 cells/ml. Before intramammary inoculation, the animals were removed from the herd and maintained separately during the rest of the trial. The bacterial inoculum was prepared as follows: a culture of the strain (10^9 cfu/ml) incubated for 18 h at 37 °C in MRS broth was centrifuged and the bacterial pellet was washed twice with saline solution (0·8% NaCl). Cells were suspended in 5 ml of saline solution to obtain a concentration of 10^9 cfu/ml. The concentrated preparation was serially diluted in saline solution to 10^3 cfu/ml and 10^6 cfu/ml. The inocula were fractionated and stored at 4 °C until inoculation was performed (a period no longer than 2 h). All animals were inoculated after evening milking. Before inoculation, udders were cleaned with 70% ethanol and allowed to dry. Bacterial suspensions were infused directly into the teat via the streak canal to a depth of 17 mm using a syringe with a blunted smoothed tip to prevent injury to the teat.

Two cows were first used to determine the maximum bacterial concentration that did not produce udder inflammation. Three quarters of each cow were infused with 1 ml containing 10^3, 10^6 or 10^9 cfu of *Lb. perolens* CRL 1724. The remain quarter was used as control. To minimize animal handling and conform to animal welfare best practices, no infusion was made in the control quarter.

Another three lactating cows were used to evaluate the effect of intramammary inoculation through the determination of udder clinical signs, milk appearance, SCC and recovery of *Lb. perolens* CRL 1724 in milk. Three quarters of each cow were infused once on day 0 (D0), with 1 ml of the maximum bacterial concentration that did not produce udder inflammation selected as described in the former assay. One quarter was used as control.

Sampling and bacterial recovery

Before inoculation, foremilk samples were collected from each quarter according to the National Mastitis Council procedure (National Mastitis Council, 2004) immediately before milking. Milk samples were transported refrigerated (a period no longer than 2 h) to the laboratory and immediately 10 µl was plated onto blood-agar (TSA with 5% of sheep blood) and incubated at 37 °C for 24 h. Bacteria were characterized by standard biochemical tests (Bergey & Holt, 1994). SCC were determined with a Somacount 300 (Bentley) according to the revised protocol of the 148A method C, fluoro-opto-electronic (International Dairy Federation Laboratory, 1995). Milk samples were collected 2 d before infusion (D2), immediately prior to infusion (D0) and post-infusion, as outlined below.

Serial dilutions of milk in saline solution were streaked on MRS agar plates in duplicate and incubated at 37 °C for 24–48 h under microaerophilic conditions (5% CO_2, 95% air) for *Lactobacillus* isolation. The isolated colonies were identified as *Lb. perolens* CRL 1724 by phenotypic tests (Gram stain, morphology, catalase activity, nitrate reduction, indole production) and by streptomycin resistance determination.

Clinical observations and animal care

Clinical signs were monitored throughout the experiment by a veterinarian, every 8 h during the first 24 h, and subsequently every time the cows were milked. General attitude and appetite were observed. The udders were palpated for soreness, swelling, hardness and heat and the appearance of milk was assessed visually for clots and changes in colour or composition every time the cows were milked. All animals involved in this investigation were cared for in accordance

Table 1. Antimicrobial activity of *Lactobacillus perolens* CRL 1724 and *Lactobacillus plantarum* CRL 1716 against 14 mastitis-causing pathogens (MCP)

	Lactic acid bacteria	
	Lactobacillus perolens CRL 1724	*Lactobacillus plantarum* CRL 1716
	Inhibition zone, mm†	
Mastitis-causing pathogens		
Staphylococcus aureus RC108	+	−
Staphylococcus hyicus 112249	+	+
Streptococcus agalactiae ATCC27956	+	−
Streptococcus dysgalactiae ATCC27957	++	++
Streptococcus uberis 102	+	−
Streptococcus uberis ATCC27958	+	−
Streptococcus bovis ATCC27960	+	−
Enterococcus faecalis 19433	−	−
Enterococcus faecium 35667	−	−
Pseudomonas spp. 224	+	++
Escherichia coli ATCC35218	+	+
Escherichia coli 345	+	+
Klebsiella pneumoniae ATCC10031	+	+
Staphylococcus epidermidis ATCC14990	+	+

†Interpretation of zone diameter of inhibition: −, no inhibition; +, 1–12 mm; ++, 13–25 mm; +++, >25 mm

with The International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals (1985).

Statistical analysis

Differences among Ln-SCCs and means of recovered *Lb. perolens* CRL 1724 were analysed using the software INFOSTAT (2004). Treatment and days of sampling were the initial variables included in the model for each analysis. Means were compared by analysis of variance (ANOVA). Differences were considered significant at P value $<0{\cdot}05$.

Results

Antagonistic activity

The antagonistic activity of *Lactobacillus* strains against 14 MCPs was evaluated through the growth inhibition values. *Str. dysgalactiae* ATCC27957, *Pseudomonas* spp.224, *Esch. coli* ATCC35218, *Esch. coli* 345, *Str. epidermidis* ATCC14990, *Str. hyicus* 112249 and *K. pneumoniae* ATCC10031 were inhibited by both *Lactobacillus* strains, albeit with different growth inhibition values (Table 1). *Lb. perolens* CRL 1724 was able to inhibit 12 of 14 MCPs (85·7%) in vitro, especially those considered to be major pathogens; whereas *Lb. plantarum* CRL 1716 was able to inhibit 7 of 14 MCPs (50%) in vitro. *Ec. faecalis* 19433 and *Ec. faecium* 35667 were not inhibited by either strain.

Co-aggregation

Lb. perolens CRL 1724 showed co-aggregation with all of the MCPs assayed. A similar co-aggregation of MCPs was observed with *Lb. plantarum* CRL 1716 except that no co-aggregation was observed against *Pseudomonas spp.*224 and *Esch. coli* 345 (data not shown).

Adhesion capacity of lactobacilli

A high number of epithelial cells could be isolated from the bovine teat canal with the method set up in our laboratory, and no bacterial contaminants were observed after Gram staining. The two strains of lactobacilli were able to adhere to BTCEC. The percentages of adhesion and the adhesion index were different for the strains. *Lb. perolens* CRL 1724 showed a higher capability of adhesion (75% and 14·4 respectively) than *Lb. plantarum* CRL 1716 (37% and 7·4, respectively). *Lb. perolens* CRL 1724 aggregated to BTCEC as can be seen in Fig. 1. Figures 1B and 1C show different numbers of bacterial adherent to the surface of epithelial cells, showing an irregular pattern of distribution on the cell surface. Figure 1D demonstrate auto-aggregative pattern and adherence of lactobacilli as clusters on the cell surface.

The microphotographs obtained by scanning microscopy illustrate the adhesion and aggregation of *Lb. perolens* CRL 1724 on the surface of BTCEC (Figs 2A, 2B and 2C) without producing morphological or ultrastructural modifications of the epithelial cells. Also the scanning electron microscopy shows *Lb. perolens* CRL 1724 aggregated and adhered on the surfaces of the eukaryotic cells but not on keratin (Fig. 2D).

Intramammary inoculation of Lb. perolens *CRL 1724*

To evaluate the in-vivo performance of *Lb. perolens* CRL 1724, the tolerance of udders to the inoculation of different

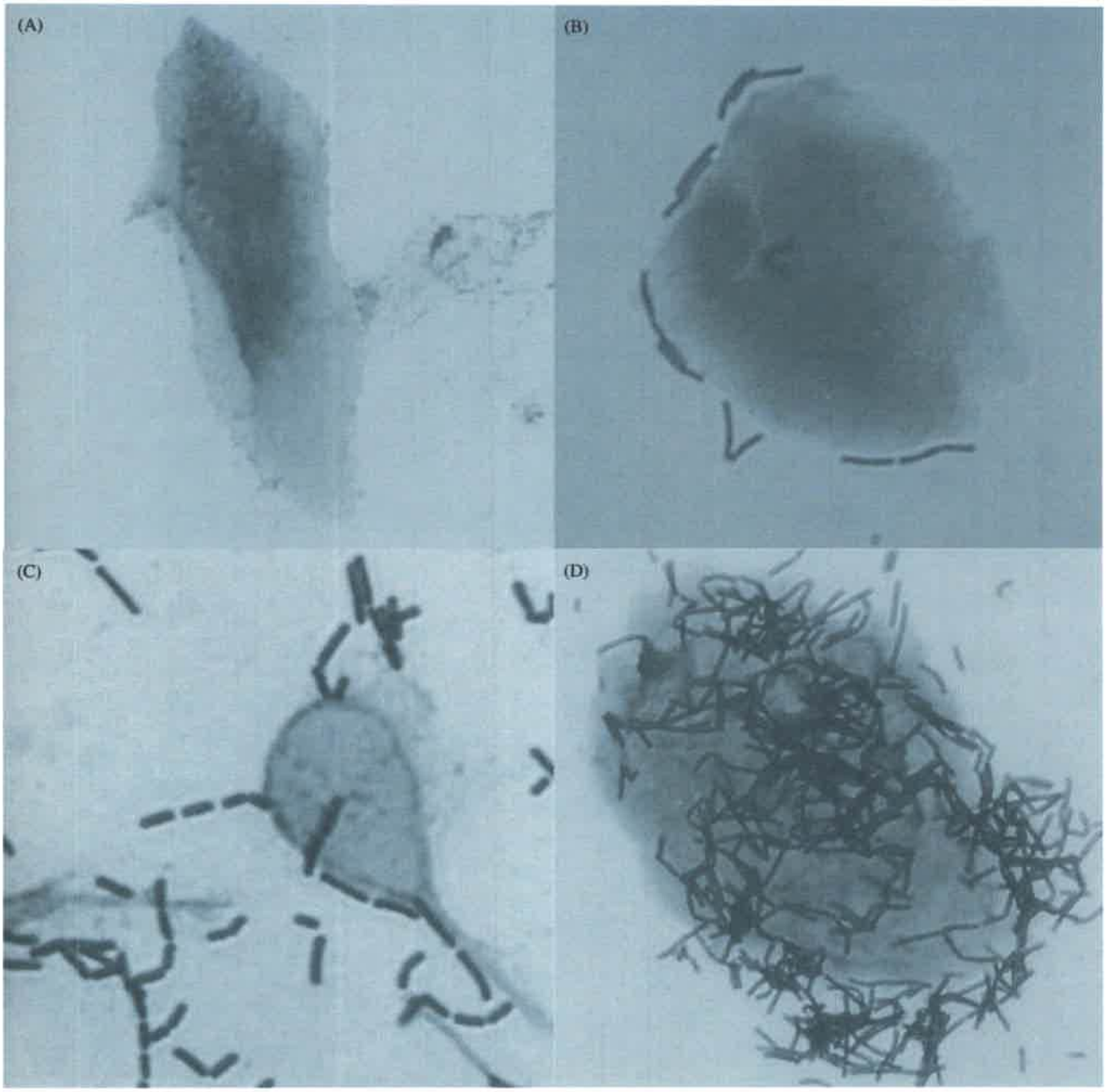


Fig. 1. Light photomicrographs showing Gram-stained *Lactobacillus perolens* CRL 1724 adherent to bovine teat canal epithelial cells. (A) Control. (B) and (C) Different numbers of bacterial adherent to the surface of epithelial cells, showing an irregular pattern of distribution on the cell surface. (D) Autoagreggative pattern and adherence of lactobacilli as clusters on the cell surface (1000×).

concentrations of lactobacilli was first determined in two cows. Concentrations of 10^3 and 10^6 cfu/ml of lactobacilli were well tolerated by the animals. No clinical signs or teat damage were observed in the inoculated quarters and the udders presented a normal aspect. The appearance of the milk from these inoculated animals was normal, without clots, lumps, blood or any changes in the colour. After the inoculation of 10^9 cfu/ml, changes in the appearance of the milk (clots and lumps) were observed. These changes disappeared 48 h after inoculation.

SCC in milk samples from cows inoculated with 10^3 and 10^6 cfu/ml increased 2-fold with respect to the control quarters after 24 h of intramammary inoculation, decreasing to normal values (2×10^5 cells/ml) after day 2 and remaining low until the end of the assay (data not shown). The greatest SCC (6×10^6 cells/ml) was observed in milk samples inoculated with 10^9 cfu/ml on day 1 after inoculation. *Lb. perolens* CRL 1724 was recovered until the end of the assay and from all inoculated quarters. The highest bacterial recovery value (10^3 cfu/ml) was obtained 24 h after

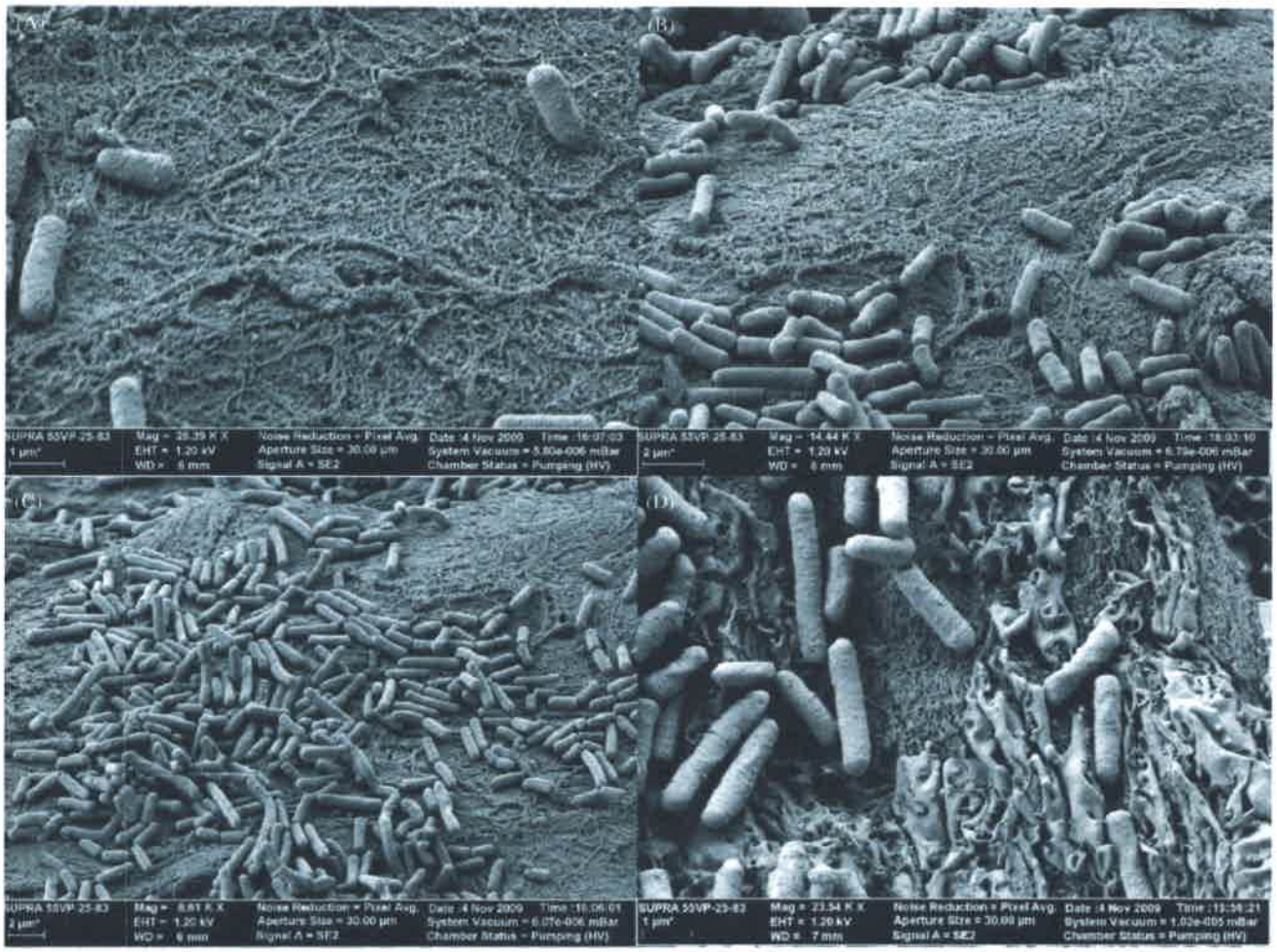


Fig. 2. Adhesion of *Lactobacillus perolens* CRL 1724 to epithelial cells isolated by teat canal wall scraping observed by scanning electron microscopy. (A), (B) and (C) Bacilli adherent to and aggregated on the surface of epithelial cells (26 390 ×, 14 440 × and 8610 ×, respectively). (D) Bacilli adherent to and aggregated on the surface of epithelial cells and surrounded by keratin (23 540 ×).

intramammary inoculations in the quarters inoculated with 10^9 cfu/ml. All quarters inoculated were negative for MCP isolation after the 7-d trial.

Taking into account the results obtained above, 10^6 cfu/ml of *Lb. perolens* CRL 1724 were inoculated into nine quarters of three lactating cows. There was a significant increase ($P<0{\cdot}05$) in the SCC of all inoculated quarters 24 h after inoculation (Fig. 3). This increase was observed until 48 h post inoculation. After this, SCCs decreased to the control value (2×10^5 cells/ml) at day 5. No significant differences were observed between the SCCs of inoculated and control (not inoculated) quarters during the trial. *Lb. perolens* CRL 1724 was recovered during the 15-d trial from 88·9%, 77·8% and 55·6% of the inoculated quarters on days 1, 2 and 7, respectively. At the end of the trial (D15), 22·2% of the inoculated quarters continued to shed the lactobacilli inoculated. Recovery of *Lb. perolens* CRL 1724 on day 1 showed a significant increase ($P<0{\cdot}05$) with respect to the other days. No MCPs were isolated from milk during the trial.

Discussion

During the last two decades, several studies of disease prevention by normal microbiota manipulation have been studied in domestic animals (gastrointestinal of pigs, chickens and turkeys). More relevant to these studies, *Corynebacterium bovis* has been used to colonize the teat canal for protection against mastitis. The mechanism of defence in this case is thought to be due to increased somatic cell count rather than to direct bacterial inhibition (Brooks & Barnum, 1984).

The intramammary immune system's ability to eliminate infections naturally depends on a rapid and competent response to pathogens (Burvenich et al. 1994) and the primary phagocytic cells of the bovine mammary gland, polymorphonuclear (PMN) and macrophages, comprise the first line of defence against invading bacteria (Crispie et al. 2008). Indeed, impairment of the immune response is associated with increased susceptibility to mastitis infection (Burvenich et al. 1994). In this sense, the use of a product capable of

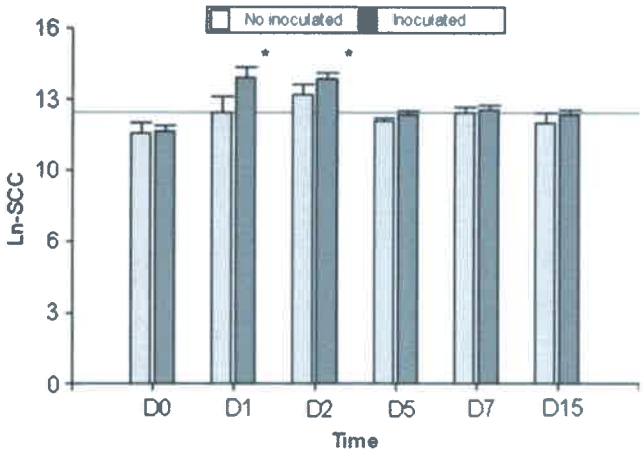


Fig. 3. Mean Ln-somatic cell counts (Ln-SCC) recovered after inoculation of lactating cows with 10^6 cfu/ml *Lactobacillus perolens* CRL 1724. Cut-line: 200 000 cells/ml. D, days. * $P < 0{\cdot}05$.

eliciting a rapid immune response can provide host protection against mastitis infection (Crispie et al. 2008).

Among the parameters to take into account in designing a probiotic, the origin of the strains, based on the host specificity of the indigenous microbiota (Kotarsky & Savage, 1979), the capability to produce antagonistic substances, adhesion to host tissues and colonization to different sites of the host surfaces are the most important features to exert a beneficial effect (Nader-Macias et al. 2008; Espeche et al. 2009).

In a previous report (Espeche et al. 2009), 102 LAB strains were isolated from the teat canal and milk samples of healthy cows. The strains were selected according to high hydrophobicity index, moderate auto-aggregation and organic acid production. Two *Lactobacillus* strains were chosen to conduct further studies.

It is well known that *Lactobacillus* strains are able to inhibit pathogenic microorganisms by organic acids, hydrogen peroxide and bacteriocins (Chaimanee et al. 2009). In the present work *Lb. perolens* CRL 1724 was able to inhibit 85·7% of the MCP assayed, especially those considered major pathogens as *Staph. aureus, Str. agalactiae, Str. dysgalactiae* and *Esch. coli*. In addition, a co-aggregation effect of *Lb. perolens* CRL 1724 with all of them was observed. *Lb. plantarum* CRL 1716 showed a lower percentage of inhibition (50%) but a similar co-aggregation effect compared with *Lb. perolens* CRL 1724. Soleimani et al. (2010) showed that different strains of *Lactobacillus* are capable of co-aggregation with *Staph. aureus* strains causing bovine mastitis. Also Soleimani et al. (2010) suggest that the co-aggregation assay is a reliable method to evaluate the close interaction between lactobacilli and pathogenic bacteria and that many surface proteins are found in lactobacilli which are predicted to promote binding to environmental surfaces like other bacteria surface. Co-aggregation may be beneficial to *Lactobacillus* that produces antimicrobial compounds, as it would force the cells into closer contact (Reid & McGroarty, 1988). Pascual et al. (2008) proposed that co-aggregation could be an important factor in maintaining health, because it produces an area around the pathogen where the concentration of antimicrobial substances produced by lactobacilli is increased.

Adhesion of lactobacilli to the epithelium is the first step in the formation of a barrier to prevent undesirable microbial colonization and has consequently been defined as an essential characteristic when selecting probiotic strains (Havenaar et al. 1992; Reid et al. 2003). In the present work, a percentage of adhesion and adhesion index of 75% and 14·4, respectively, demonstrated the high efficacy of adhesion of *Lb. perolens* CRL 1724 to BTCEC. Lower values were observed for *Lb. plantarum* CRL 1716 (37% and 7·4, respectively). The study of the inhibitory effect of lactobacilli against the mastitis pathogens using teat-canal cells should give relevant information. Future studies of co-inoculation (BAL/MCPs) will be conducted before performing in-vivo protection assays. Interestingly, a great pool of viable BTCEC was isolated with the method set up in our laboratory, and this allowed the development of an easy and rapid method to evaluate adherence in vitro. To our knowledge, this is the first report that demonstrated adhesion of lactobacilli to BTCEC. Similar results were obtained by Otero & Nader-Macías (2007) in epithelial cells from the bovine vagina.

Several studies have suggested that *Lactobacillus* adherence is mediated by proteins associated with the external protein S-layer (Wadström et al. 1987; Henriksson et al. 1991; Frece et al. 2005), while others have suggested a role for lipoteichoic acid and carbohydrate (Fuller, 1975); further studies need to be conducted to determine the chemical nature of the structures involved in adhesion to BTCEC. The adhesion of *Lb. perolens* CRL 1724 to BTCEC was confirmed by scanning electron microscopy. No evidence of morphological or structural modifications of BTCEC due to the adhesion of lactobacilli was observed through any of the scanning electron microscopy observations. The adherence of lactobacilli to epithelial cells, even after treatment employed to scanning electron microscopy preparations, suggests the adhesion efficacy of the strain to the epithelial cells.

Lb. perolens CRL 1724 was selected for udder inoculations because of its elevated percentage of inhibition and co-aggregation of MCPs and their major capability of adhesion to BTCEC. The tolerance of the udders to different concentration of *Lb. perolens* CRL 1724 was determined. The results showed that 10^3 and 10^6 cfu/ml were well tolerated by the udder, but 10^9 cfu/ml was not tolerated because of milk alterations and udder inflammation. A concentration of 10^6 cfu/ml was the dose selected for the intramammary inoculation assay because it was the highest lactobacilli concentration that did not produce long-term udder inflammation or alteration of milk.

The nine quarters inoculated with 10^6 cfu/ml showed that there were no adverse clinical signs in the udders, which remained free of clinical mastitis during the 15-d trial period. On the other hand, with the concentration used, there was a

short-term significant increase in SCC 2 d post inoculation, returning to normal values at the end of the trial. The short-term significant increase observed in SCC is a normal reaction of the udder against inoculation and it cannot be due to any change or internal damage caused in the mammary glands by the lactobacilli inoculated. In this sense Crispie et al. (2008) concluded that the mechanism by which the live culture can provide host protection against mastitis infection may be associated with its ability to elicit a rapid immune response, inducing substantial recruitment of PMN, lymphocytes and localized production of acute phase proteins, which together can subsequently clear the gland of the infecting pathogen. Although no infusion was administered to the control quarter, nonetheless, these quarters exhibited a negligible increase in SCC (Crispie et al. 2008). These increases were most likely due to cross-talk between quarters. Previous and repeated trials by our research team have shown that infusion of sterile water into the control quarter does not cause irritation or inflammation.

Several reports showed that the intramammary application of probiotic bacteria (Greene et al. 1991) or bacteriocin (Ryan et al. 1999) resulted in a short term increase in SCC. The results obtained in the present work are similar to those of Crispie et al. (2008), who observed an increase in the values of PMN leucocytes in the first 2 d after the inoculation of 10^9 cfu/ml of *Lactococcus lactis*, and a decrease on days 5 and 7 post inoculation. Interestingly, *Lb. perolens* CRL 1724 could be recovered during the 15 d of the assay. This indicates that the strain persisted in the udder, even though the inoculation was done in lactating cows, where milking favours the elimination of bacteria. Beecher et al. (2009) recovered *Lc. lactis* for 2 d post inoculation.

Taking in account the high susceptibility of dairy cows to bovine mastitis during the dry period, the intramammary application of lactobacilli in cows during this period will also be the subject of a further study. The effect of the lactobacilli on milk also requires investigation, but it is fairly unlikely that bacteria would still be found after the dry period and calving. The results obtained will serve as the basis for further studies on the generation of non-antibiotic formulations for the prevention of mastitis in dairy cows.

Conclusions

The results obtained from this work demonstrate the in-vitro capacity of two *Lactobacillus* strains to adhere to BTCEC and to inhibit and co-aggregate MCPs. The in-vitro method of obtaining BTCEC, set up in the laboratory constitutes an easy and rapid method to evaluate adherence in vitro. In vivo, *Lb. perolens* CRL 1724 resulted in a short-term increase in SCC and was recovered from all quarters inoculated during the 15 d of the trial without producing clinical signs in the udder.

This work was supported by SECYT-UNRC, MINCYT Córdoba PID280, CONICET PIP 632 and ANPCYT PICT 543 grants. These are the results obtained from the project 'Design of a probiotic product for bovine mastitis prevention' signed between CONICET and UNRC Res. 2907. Ignacio Daniel Frola, María Carolina Espeche and Matías Santiago Pellegrino are recipients of a fellowship from Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). We thank Med. Vet. Laura Zapata for the collaboration in adherence assays. This work was previously presented at the XXVI World Buiatrics Conference in Santiago, Chile, 14–18 November 2010.

References

Acuña CN, Chertcoff RE, Martínez MB & Nimo JM 2001 Udder pathogens prevalence in dairy cows from Argentina. In: Proceedings of the 40th Annual Meeting of the National Mastitis Council, Reno, Nevada, pp. 177–178

Beecher C, Daly M, Berry DP, Klostermann K, Flynn J & Meaney W 2009 Administration of a live culture of *Lactococcus lactis* DPC 3147 into the bovine mammary gland stimulates the local host immune response, particularly IL-1 and IL-8 gene expression. *Journal of Dairy Research* **76** 340–348

Bergey DH & Holt JG 1994 *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Baltimore MD, USA: Lippincott Williams & Wilkins

Brooks BW & Barnum DA 1984 The susceptibility of bovine udder quarters colonized with *Corynebacterium bovis* to experimental infection with *Staphylococcus aureus* or *Streptococcus agalactiae*. *Canadian Journal of Comparative Medicine* **48** 146–150

Burvenich C, Paape MJ, Hill AW, Guidry AJ, Miller RH, Heyneman R, Kremer WDJ & Brand A 1994 Role of the neutrophil leukocyte in the local and systemic reactions during experimentally induced *Escherichia coli* mastitis in cows immediately after calving. *Veterinary Quarterly* **16** 45–49

Calvinho LF, Delgado AR, Vitulich CA, Occhi HL, Canavesio VR, Zurbriggen MA & Tarabla HD 1991 [Susceptibility in vitro to antibiotics of microorganisms isolated from clinical mastitis in dairy farms of the dairy area in Santa Fe]. *Veterinaria Argentina* **8** 677–680

Calvinho LF & Tirante L 2005 [Prevalence of pathogens of bovine mastitis and evolution of the state of health of the mammary gland in Argentina during the last 25 years]. Rev. FAVE, Sección Ciencias Veterinarias. Sitio Argentino de Producción Animal, pp. 1–8. http://www.produccion-animal.com.ar (accessed 20 April 2009)

Chaimanee V, Sakulsingharoj C, Deejing S, Seetakoses P & Niamsup P 2009 Screening and characterisation of bacteriocin-producing bacteria capable of inhibiting the growth of bovine mastitis. *Maejo International Journal of Science and Technology* **3** 43–52

Crispie F, Alonso-Gómez M, O'Loughlin C, Klostermann K, Flynn J, Arkins S, Meaney W, Ross RP & Hill C 2008 Intramammary infusion of a live culture for treatment of bovine mastitis: effect of live lactococci on the mammary immune response. *Journal of Dairy Research* **75** 374–384

Espeche MC, Otero MC, Sesma F & Nader-Macias MEF 2009 Screening of surface properties and antagonistic substances production by lactic acid bacterial isolated from the mammary gland of healthy and mastitis cows. *Veterinary Microbiology* **135** 346–357

FAO, WHO 2008 Health and nutritional properties of probiotics in food, including powder milk with live lactic acid bacteria. http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf. (Accessed 22 November 2009)

Fetrow J 2000 Mastitis: An economic consideration. In: Proceedings of the 29th Annual Meeting of the National Mastitis Council, Atlanta, Georgia. National Mastitis Council, Madison, Wisconsin, pp. 3–47

Frece J, Kos B, Svetec IK, Zgaga Z, Mrsa V & Suskovic J 2005 Importance of S-layer proteins in probiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology* **98** 285–292

Fuller R 1975 Nature of the determinant responsible for the adhesion of lactobacilli to chicken crop epithelial cells. *Journal of General Microbiology* **87** 245–250

Greene WA, Gano AM, Smith KL, Hogan JS & Todhunter DA 1991 Comparison of probiotic and antibiotic intramammary therapy of cattle

with elevated somatic cell counts. *Journal of Dairy Science* **74** 2976–2981

Havenaar R, Brink BT & Huisiń veld JHJ 1992 Selection of strains for probiotics use. In: *Probiotics: The Scientific Basis* (Ed. R Fuller) pp. 209–223. London, UK: Chapman and Hall

Henriksson A, Szewzyk R & Conway PL 1991 Characteristics of the adhesive determinants of *Lactobacillus fermentum* 104. *Applied and Environmental Microbiology* **57** 499–502

Hütt P, Shchepetova J, Lõivukene K & Mikelsaar M 2006 Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero- and uropathogens. *Journal of Applied Microbiology* **100** 1324–1332

INFOSTAT 2004 InfoStat, versión 2004 Manual del Usuario. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. Primera Edición, Editorial Brujas Argentina

International Dairy Federation Laboratory 1995 Milk and milk products: detection of Salmonella. IDF Standard 93B:1005. Brussels, Belgium

International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals 1985 http://www.cioms.ch/publications/guidelines/1985_texts_of_guidelines.htm. (Accessed 2 September 2011)

Kotarsky SF & Savage DC 1979 Models for study of the specificity by which indigenous lactobacilli adhere to murine gastric epithelia. *Infection and Immunity* **26** 966–975

McDougall S, Parker KI, Heuer C & Compton CWR 2009 A review of prevention and control of heifer mastitis via non-antibiotic strategies. *Veterinary Microbiology* **154** 177–185

Meaney WJ, Twomey DP, Flynn J, Hill C & Ross RP 2001 The use of a bismuth-based teat seal and the bacteriocin lacticin 3147 to prevent dry period mastitis in dairy cows. In: Proceedings of the British Mastitis Conference, Garstang, UK, pp. 24–32

Nader-Macias MEF, Otero MC, Espeche MC & Maldonado NC 2008 Advances in the design of probiotic products for the prevention of major diseases in dairy cattle. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **35** 1387–1395

National Mastitis Council 2004 *Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality, Fourth Edition*. Arlington VA, USA, pp. 1–47

Otero MC & Nader-Macías ME 2007 *Lactobacillus* adhesion to epithelial cells from bovine vagina. In: *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. (Ed. A Méndez-Vilas) pp. 749–757. Badajoz, Spain: Formatex

Pascual LM, Daniele MB, Ruiz F, Giordano W, Pájaro C & Barberis L 2008 *Lactobacillus rhamnosus* L60, a potential probiotic isolated from the human vagina. *Journal of General and Applied Microbiology* **54** 141–148

Pellegrino M, Giraudo J, Raspanti C, Odierno L & Bogni C 2010 Efficacy of immunization against bovine mastitis using a *Staphylococcus aureus* avirulent mutant vaccine. *Vaccine* **28** 4523–4528

Reid G & McGroarty JA 1988 *Lactobacillus* inhibitor production against *Escherichia coli* and coaggregation ability with uropathogens. *Canadian Journal of Microbiology* **34** 344–351

Reid G, McGroarty JA, Gil Domingue PA, Chow AW, Bruce AW, Eisen A & Costerton JW 1990 Coaggregation of urogenital bacteria *in vitro* and *in vivo*. *Current Microbiology* **20** 47–52

Reid G, Sander ME, Rex G, Gibson G, Mercenier A, Rastall R, Roberfroid M, Rowland L, Cherbut C & Klaenhammer T 2003 New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. *Journal of Clinical Gastroenterology* **37** 105–118

Ryan MP, Flynn J, Hill C, Ross RP & Meaney WJ 1999 The natural food grade inhibitor lacticin 3147 can prevent mastitis in non-lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* **82** 2625–2631

Soleimani NA, Kermanshahi RK, Yakhchali B & Sattari TN 2010 Antagonistic activity of probiotic lactobacilli against *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *African Journal of Microbiology Research* **4** 2169–2173

Sordillo LM 2005 Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Livestock Production Science* **98** 89–99

Wadström T, Andersson K, Sydow M, Axelsson L, Lindgren S & Gullmar B 1987 Surface properties of lactobacilli isolated from the small intestine of pigs. *Journal of Applied Microbiology* **62** 513–520

Walsh MC, Gardiner GE, Hart OM, Lawlor PG, Daly M & Lynch B 2008 Predominance of a bacteriocin-producing *Lactobacillus salivarius* component of a five-strain probiotic in the porcine ileum and effects on host immune phenotype. *FEMS Microbiology Ecology* **64** 317–327

Anaerobe 18 (2012) 103–109

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Anaerobe

journal homepage: www.elsevier.com/locate/anaerobe

Molecular biology, genetics and biotechnology

Lactic acid bacteria from raw milk as potentially beneficial strains to prevent bovine mastitis

M. Carolina Espeche [a,1], Matías Pellegrino [b,1], Ignacio Frola [b], Alejandro Larriestra [c], Cristina Bogni [b], M.E. Fátima Nader-Macías [a,*]

[a] Departamento de Microbiología Preventiva, CERELA-CONICET (Centro de Referencia para Lactobacilos-Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas), Chacabuco 145, 4000 San Miguel de Tucumán, Argentina

[b] Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, UNRC, Argentina

[c] Departamento de Patología Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria, UNRC, Argentina

ARTICLE INFO

Article history:
Received 24 June 2011
Received in revised form
28 November 2011
Accepted 3 January 2012
Available online 10 January 2012

Keywords:
Mastitis prevention
Beneficial properties
Probiotics
Lactic acid bacteria

ABSTRACT

Bovine mastitis produces a wide variety of problems in the dairy farm. The treatment of this disease is based on the use of antibiotics which are not always effective. These drugs are also responsible for the presence of residues in the milk and the increase of antibiotic-resistant strains. Probiotic products were proposed as a valid alternative to antibiotic therapies and are also useful for the prevention of infectious syndromes. With the aim of designing a probiotic product to prevent bovine mastitis, lactic acid bacteria (LAB) were isolated from foremilk samples from different dairy farms in Córdoba-Argentina. One hundred and seventeen LAB were isolated and their beneficial characteristics such as the production of inhibitory substances, surface properties and production of exopolysaccharides (EPS) were assessed. Most of them displayed low degree of hydrophobicity, autoaggregation, EPS negative phenotype and were identified as *Enterococcus hirae* and *Pediococcus pentosaceus*. Nine LAB strains inhibited three indicator bacteria. Some isolates were pre-selected and genetically identified according to the results obtained. Antibiotic resistance and virulence factors were studied for the assessment of the safety of the strains. The results obtained were compared to those reported previously from samples obtained in the North-western area of the country and some differences were found.

1. Introduction

BM is the most frequent disease in dairy farms and produces a great impact on dairy farming business [1]. Antibiotics are usually applied during lactation and also in dry cow therapies with the risk of antibiotic resistance and the presence of residues in the milk. Besides, treatments are not always successful [2].

An alternative therapy against infections is the administration of probiotics, defined as "*live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health physiological benefit on the host*" [3]. LAB is one of the most representative groups of prokaryotes used with this purpose and are part of the indigenous microbiota of the teat canal. They are optimal candidates to design a species-specific probiotic product to prevent BM [4,5]. In the field of bovine health, probiotics are mainly applied to prevent gastrointestinal infections and for nutritional purposes [6,7]. For these reasons, the objectives of the present work were to isolate and characterize the lactic acid microbiota from raw milk samples from the central region of Argentina, to pre-select some strains by their beneficial characteristics and later to perform their genetic taxonomic identification. These results were compared with those previously obtained in cows from a different ecological place (Northern Argentina).

2. Material and methods

2.1. Sampling

Samples were taken from 51 clinically healthy or mastitic Holstein cows, belonging to eight different dairy farms in Southern Córdoba, Argentina. Teat ends were cleaned with 70% ethanol and dried with individual paper towels. The health status of each

Abbreviations: LAB, lactic acid bacteria; EPS, exopolysaccharides; BM, bovine mastitis; SCC, somatic cell count; MATH, microbial adhesion to hydrocarbons; TMB, tetramethylbenzidine.

* Corresponding author. Tel.: +54 381 4311720x141; fax: +54 381 4005600.
E-mail addresses: fnader@cerela.org.ar, mmacias@cerela.org.ar (M.E.F. Nader-Macías).

[1] These authors contributed equally to this work.

1075-9964/$ – see front matter © 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.anaerobe.2012.01.002

animal was registered. Foremilk was received in sterile plastic tubes, immediately refrigerated and transported to the laboratory.

2.2. Udder health status

Udder health status was defined by clinical examination, SCC in a fluoro-opto-electronic counter (Fossomatic method) [8] and isolation of the pathogen in blood agar [9]. The cut-point for the definition of BM was 200,000 cells/ml [10]. Animals were included into three different groups: healthy cows (uninfected udder, without clinical signs of mastitis, SCC below 200,000 cells/ml), cows with subclinical mastitis (infected udder, without clinical signs of mastitis, SCC over 200,000 cells/ml) and cows with clinical mastitis (infected udder, with clinical signs of mastitis, SCC over 200,000 cells/ml).

2.3. Analysis of the microbiota and isolation of LAB

Mesophilic microorganisms were quantified in plate count agar (Britania, Argentina) by applying the serial dilutions method. Agar plates were incubated for 24 h at 30 °C. LAB enumeration was performed in MRS (Merck, Germany) after 48 h at 37 °C in an atmosphere with 5% CO_2. For the isolation of LAB, samples were streaked out with a sterile loop in MRS and modified BHI agar with azide and crystal violet (Sigma–Aldrich, USA) [5]. Plates were incubated at 37 °C in an atmosphere with 5% CO_2 for 24 h (modified BHI) or 48 h (MRS). Colonies with different morphology were transferred to MRS broth and incubated at 37 °C for 24 h. Phenotypic tests were performed. Gram-positive, catalase-negative, indol-negative, nitrate-negative isolates were stored in milk-yeast extract at −70 °C for further studies.

2.4. Bacterial surface properties

Isolates were subcultured three times in MRS broth at 37 °C. Active cultures were centrifuged 5 min at 9.300 × g and washed with sterile saline solution. Suspensions were prepared with the washed pellets and sterilized PBS buffer for autoaggregation [11] or saline solution for hydrophobicity [12]. OD_{600nm} was adjusted at 0.7 ± 10% or 0.6 ± 10% for autoaggregation or hydrophobicity assays, respectively. The degree of hydrophobicity was evaluated with hexadecane (Sigma–Aldrich, USA) by using the MATH test [12]. Strains were classified as low, medium and high according to their hydrophobicity or autoaggregative capabilities.

2.5. Production of antagonistic substances

The screening of the antimicrobial characteristics of the bacterial supernatants was performed by applying the agar plate diffusion method. Briefly, strains were subcultured three times in LAPTg broth (1% yeast extract, 1.5% peptone, 1% tryptone, 1% glucose, 0.1% Tween 80) [13] for 12 h at 37 °C and then were centrifuged. Aliquots of each supernatant were neutralized with sterile 2 M NaOH, or neutralized, treated with 1000 U/ml of catalase (Sigma–Aldrich, USA) during 30 min at 25 °C and then stored at 4 °C until agar plates were prepared. Supernatants that inhibited some indicator strain were also treated with proteinase K, trypsin, alfa-chymotrypsin and protease (1 mg/ml) (Sigma–Aldrich, USA). Sterile MRS broth and sterile solutions of the enzymes in MRS broth (1 mg/ml) were used as controls. Thirteen strains were applied as indicators. *Staphylococcus aureus* ATCC29740, *Streptococcus agalactiae* ATCC27956, *Streptococcus dysgalactiae* ATCC27957, *Streptococcus bovis* ATCC9809, *Escherichia coli* (two different strains), *S. agalactiae*, *Streptococcus uberis* (isolated by INTA-Rafaela) were provided by Dr. L. Calvinho (INTA-Rafaela). *S. aureus*, *S. dysgalactiae*, coagulase-negative *Staphylococcus* were previously isolated by our laboratories [5]. *Listeria innocua* 7 was provided by the Unité de Recherches Laitiéres et Génetique Appliqueé (INRA, France) and *Listeria monocytogenes* Scott A by Dr. Pasteris (INSIBIO). All the indicator strains were isolated from cow quarters with BM, except for *L. monocytogenes* (a human isolate) and *L. innocua* (isolated from a dairy product). Indicator strains were subcultured twice in LAPTg at 37 °C, except for *L. innocua* and *L. monocytogenes* that were incubated at 30 °C.

2.6. Hydrogen peroxide production

The screening of hydrogen peroxide production was performed in the isolates according to the technique described by Juárez Tomás et al. [14]. Briefly, active cultures of the isolates were streaked out in MRS agar containing 1 mM 3,3′,5,5′-TMB (Sigma–Aldrich, USA) and 2 U/ml of type II horseradish peroxidase (Sigma–Aldrich, USA). Plates were incubated during 48 h at 37 °C and then opened and exposed to air for 10 min. Isolates were classified as non producers, low producers, producers and high producers according to the colour intensity of the colonies.

2.7. Screening of EPS and capsular polysaccharide-producing LAB

The evaluation of EPS production was performed in MRS agar supplemented with 0.25% cysteine and 2% sugar (glucose, lactose, fructose or sucrose) according to the technique described by Ruas-Madiedo et al. [15]. Agar plates were incubated during 48 h at 37 °C with 5% CO_2. LAB were classified as ropy or mucoid according to the macroscopic characteristics of the colonies when extended with a sterile loop.

The screening of capsular polysaccharide-producing LAB was performed by using Indian ink staining and light microscopy observations [16].

2.8. Pre-selection criteria applied

Some LAB were selected by their beneficial properties to be genetically identified. Isolates with at least one of the following characteristics were pre-chosen: high or medium degree of hydrophobicity, high or medium autoaggregative capability, inhibition of some of the indicator pathogens, high hydrogen peroxide production, EPS or capsular polysaccharide production. The health status of the quarters where the microorganisms were isolated was recorded and taken into consideration for the final selection.

2.9. Genetic identification

DNA was isolated according to Pospiech and Neumann [17]. Variable region (V1) of the 16S ribosomal RNA gene was amplified with the primers MLB and PLB [18]. Amplification was performed in a Biorad MyCycler™ thermalcycler. Each 60 μl of reaction contained 0.1 μg DNA, 0.2 mM dNTP (Invitrogen, USA), 1 μM of each primer, 1 × PCR buffer (Invitrogen, Brazil), 2 mM $MgCl_2$, (Invitrogen, Brazil), 2 U Taq polymerase (Invitrogen, Brazil) and miliQ water. PCRs were carried out in the following conditions: 4 min at 94 °C of initial denaturation, 30 cycles consisting of 45 s at 94 °C of denaturation, 45 s at 55 °C of primer annealing, 45 s at 72 °C of extending step and 7 min at 72 °C of final extension.

PCR products were purified by using GFX PCR DNA and Gel Band Purification columns (GE Biosciences) and then were sequenced (Macrogen). Sequences were analyzed by using BLAST algorithms (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

2.10. Virulence factors and antibiotic resistance of the strains

The presence of virulence factors in the selected strains was determined by applying phenotypic and genotypic tests. Hemolysin production was studied in sheep blood agar. Plates were incubated with 5% CO_2 at 37 °C during 48 h. A clear zone around the colonies was considered as positive.

Gelatinase production was evaluated by using plates with gelatine or skim milk as described by Coque et al. [19]. The presence of a turbid or a clear halo around the colonies was considered as positive respectively.

The presence of the genes related to virulence determinants and antibiotic resistance was studied by using PCR. DNA was extracted as mentioned in 2.9. Primers sequences [20,21] and PCR conditions are summarized in Table 1. *Enterococcus faecium* CRL1492, *E. casselif* CRL1488 and *E. faecium* CRL1657 were included as control strains [22].

2.11. Statistical analysis

Statistical analysis was performed by applying the software Minitab (version 14).

3. Results

3.1. Milk characterization

Around forty percent of the milk samples were obtained from healthy quarters (43.1%), while 39.3% from quarters with subclinical BM. A low number of samples came from quarters with clinical BM (data not shown).

3.2. Microbiological evaluation of the samples

The number of mesophilic microorganisms was lower than 100,000 CFU/ml in all the samples. LAB were isolated from thirty three of the fifty one samples examined, with a mean value of $5.62 \times 10^2 \pm 4.1 \times 10^2$ CFU/ml.

3.3. LAB isolation

Out of fifty one foremilk samples, one hundred and seventeen LAB were isolated. Most of them came from healthy quarters (47.9%), while 38.5% were isolated from quarters with subclinical BM. The remaining LAB came from quarters with clinical BM.

3.4. Surface properties

Most of the LAB showed a low degree of hydrophobicity (94.9%) and did not display an aggregative phenotype, independently of the health status of the quarters where the strains were isolated. However, those LAB with medium or high degree of hydrophobicity were isolated from healthy or subclinical quarters, but not from quarters with clinical BM. There was no correlation between hydrophobicity and autoaggregation (Pearson correlation coefficient: 0.136) (Fig. 1).

3.5. Production of antagonistic metabolites

Nine LAB isolates were able to inhibit *L. innocua* 7, *L. monocytogenes* Scott A and *S. dysgalactiae* by producing bacteriocin-like inhibitory substances. Five of them were isolated from healthy quarters and the rest from quarters with subclinical BM. All of them exhibited a low degree of hydrophobicity. LAB were not able to inhibit any indicator strains by production of organic acids or hydrogen peroxide in the diffusion plate assay.

Most of the LAB (55.6%) were able to produce hydrogen peroxide when using MRS plates with TMB. There were high producers in the three groups of samples (from healthy quarters and from quarters with subclinical or clinical BM). The distributions of the strains, according to the levels of production of hydrogen peroxide and the health status of the quarters are showed in Fig. 2.

Table 1
Primers sequences and PCR conditions applied for the genetic identification, study of virulence determinants and antibiotic resistance genes.

Genes	Primer sequences (5′-3′)	PCR conditions						Product size (bp)
		1 X		N X		1 X		
		Initial step	Denaturation	Primer annealing	Extension step	Final extension	N	
16 S	MLB GGCTGCTGGCACGTAGTTAG PLB AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	4min 94 °C	45 s 94 °C	45 s 55 °C	45 s 72 °C	7 min 72 °C	30	500
agg	aggF AAGAAAAAGAAGTAGACCAAC aggR AAACGGCAAGACAAGTAAATA	4 min 94 °C 2 min 51 °C 2 min 72 °C	30 s 94 °C	15 s 51 °C	15 s 72 °C	5 min 72 °C	29	1.553
gelE	gelEF ACCCCGTATCATTGGTTT gelER ACGCATTGCTTTTCCATC	4 min 94 °C 2 min 47 °C 2 min 72 °C	30 s 94 °C	15 s 47 °C	15 s 72 °C	5 min 72 °C	29	419
esp	espF TTGCTAATGCTAGTCCACGACC espR GCGTCAACACTTGCATTGCCGAA	4 min 94 °C 2 min 59 °C 2 min 72 °C	30 s 94 °C	15 s 59 °C	15 s 72 °C	5 min 72 °C	29	933
efa	efaF GCCAATTGGGACAGACCCTC efaR CGCCTTCTGTTCCTTCTTTGGC	4 min 94 °C 2 min 59 °C 2 min 72 °C	30 s 94 °C	15 s 59 °C	15 s 72 °C	5 min 72 °C	29	688
cylA	cylAF TGGATGATAGTGATAGGAAGT cylAR TCTACAGTAAATCTTTCGTCA	2 min 59 °C 2 min 47 °C 2 min 72 °C	30 s 94 °C	15 s 47 °C	15 s 72 °C	5 min 72 °C	29	517
cad	cadF CGTAGCATCTTCAGAAACG cadR TGAGAATGTTGTGTGGTAGC	4 min 94 °C 2 min 51 °C 2 min 72 °C	30 s 94 °C	15 s 51 °C	15 s 72 °C	5 min 72 °C	29	502
vanA	vanAF CATGAATAGAATAAAAGTTGCAATA vanAR CCCCTTTAACGCTAATACGATCAA	5 min 94 °C	1 min 94 °C	1 min 51 °C	1 min 15 s 72 °C	7 min 72 °C	30	1.030
vanB	vanBFGTGACAAACCGGAGGCGAGGA vanBRCCGCCATCCTCCTGCAAAAAA	5 min 94 °C	1 min 94 °C	1 min 49.5 °C	45 s 72 °C	7 min 72 °C	30	536
vanC	vanCF GGTATCAAGGAAACCTC vanCR CTTCCGCCATCATAGCT	5 min 94 °C	1 min 94 °C	1 min 49.5 °C	1 min 72 °C	7 min 72 °C	30	822

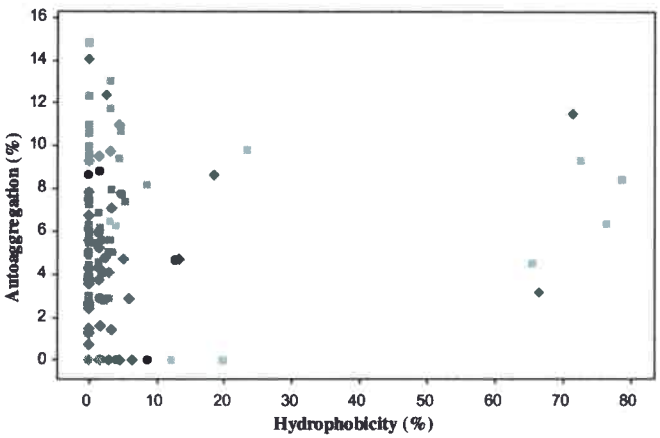


Fig. 1. Relationship between hydrophobicity and autoaggregation of the isolates discriminated by the health status of the bovine quarter. (●) quarter with clinical mastitis. (■) healthy quarter. (◆) quarter with subclinical mastitis.

3.6. EPS and capsular polysaccharide production

None of the isolates were able to produce EPS by the methodology applied in the present work.

3.7. Genetic identification

Forty LAB strains (six hydrophobic, nine bacteriocin-producers and twenty five strains able to produce high levels of hydrogen peroxide) were pre-selected to perform their genetic identification based on the criteria described above. Only four different species were identified: *Enterococcus hirae* (45.0%), *Pediococcus pentosaceus* (35.0%), *Weissella cibaria* (17.5%) and *E. faecium* (2.5%). Only *W. cibaria* and *E. hirae* showed medium or high hydrophobicity.

Most of the high hydrogen peroxide-producers (63.0%) were identified as *P. pentosaceus*. All the bacteriocin-producers were identified as *E. hirae*.

E. hirae and *P. pentosaceus* were the predominant species in samples obtained from healthy quarters. *W. cibaria* was only isolated from healthy quarters or with subclinical BM.

3.8. Virulence factors and antibiotic resistance

None of the strain showed the presence of gelatinase or hemolysin by using phenotypic tests. Nevertheless, in the case of the strain *E. hirae* 7–3, a PCR fragment of the expected size for *VanB* gene was amplified with *vanB* specific primers.

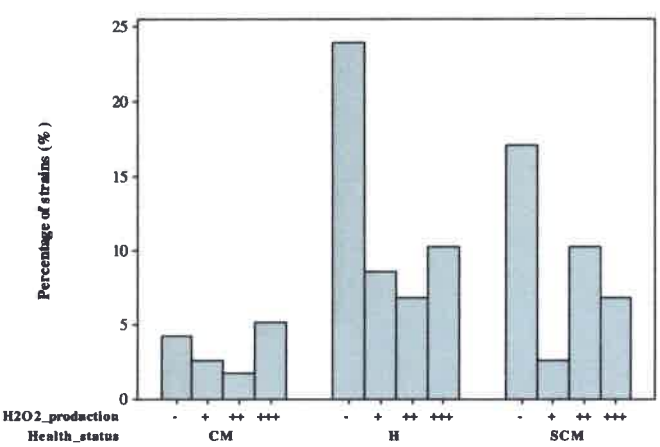


Fig. 2. Distribution of the isolates according to hydrogen peroxide production and health status of the quarters where they were isolated. –: non producers. +: low producers. ++: producers. +++: high producers. CM: quarters with clinical mastitis. H: Healthy quarters. SCM: quarters with subclinical mastitis.

3.9. Selection criteria

The criteria applied to the final selection of LAB as potentially probiotic were: microorganisms without virulence traits not previously reported as a BM pathogen and also isolated from healthy animals. These strains should have a high degree of hydrophobicity and/or a high level of hydrogen peroxide production and/or be able to inhibit some of the indicator strains assessed. The selected bacteria are highlighted in Table 2.

4. Discussion

BM is one of the most common and expensive diseases in dairy farms due to the production losses, discarded milk, applied therapy, veterinary services, culling and risk of other diseases such as decrease of fertility [1,23]. The main etiologic agents are *S. aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* [24–26]. There are some novel applications or alternatives to the antibiotic therapy, as the use of vaccines [27], bacteriocins and probiotics that are being currently studied [5,28–30]. In many cases, studies related to probiotics do not take into account the host specificity of the applied microorganisms [28,30]. According to some authors, the species-specificity is essential to favour the adhesion and expression of the beneficial effects [31–33]. This presumption is based on ecologic issues, because autochthonous strains have higher chances to survive than others due to their previous adaptation to specific environments. Moreover, it was demonstrated by applying comparative genomics of LAB, the existence of a niche-specific gene set which allow them to live in a specific environment but not in others [34]. In the present work, the isolation of LAB from bovine foremilk samples in dairy farms from the Centre of Argentina was performed.

Microorganisms to be applied as probiotics require a reliable identification by using a molecular method [3]. One hundred and seventeen LAB from bovine foremilk samples were isolated, and based on their beneficial properties, forty of them were pre-selected to be genetically identified by 16S RNA gene sequencing (independently of the health status of quarters). Even though the high number of animals sampled (51 lactating cows), the isolates were classified only in four different species. In a previous work, the lactic acid microbiota of the same number of dairy cows was studied and characterized in the North-western of Argentina by applying similar methodologies [5]. When comparing these results to those previously obtained from the North-western area of the country, there were some taxonomic differences between both ecological niches. A wider variety of species (15) was isolated from the same number of animals in the North-western of Argentina. Genera such as *Streptococcus*, *Lactococcus* and *Lactobacillus*, predominant in the North-west and in other regions of the world [5,35–38], were not isolated in samples from the central area. *E. hirae*, the most prevalent in the central area, was previously cited in milk but not as the predominant microorganism [38]. The second main species isolated in Córdoba, *P. pentosaceus* was not reported in the North-west. The genus *Weissella* was described in both areas, although *W. cibaria* was isolated only in cows from the central region, and *Weissella paramesenteroides* only in the North-west [5]. Even though the final purpose of this work was not epidemiological, in some way indicates the biodiversity of the LAB from different geographical areas of our country.

LAB exert their effect as a consequence of one or more mechanisms. Adhesion to epithelial cells, aggregation, and inhibition of pathogens were described among them. The degree of

Table 2
Characteristics and genetic identification of LAB pre-selected by their beneficial properties. Potentially probiotic strains are highlighted in grey.

Strains	Surface properties				Antimicrobial properties		Polysaccharides production		Virulence determinants and vancomycin resistance genes	Helath status
	Hydrophobicity		Autoaggregation		H_2O_2 production	Inhibited pathogens	EPS	Capsular polysaccharide		
	%	Group	%	Group						
Pediococcus pentosaceus 24–10	1.59	l	2.86	l	+++	–	–	–	–	CM
Pediococcus pentosaceus CRL1836	4.54	l	10.67	l	+++	–	–	–	–	H
Pediococcus pentosaceus CRL1838	0.00	l	0.00	l	+++	–	–	–	–	SCM
Enterococcus faecium CRL1839	4.48	l	10.96	l	+++	–	–	–	–	SCM
Enterococcus hirae CRL1841	5.08	l	4.71	l	+++	–	–	–	–	SCM
Enterococcus hirae CRL1842	13.33	l	4.69	l	+++	1,2, 3	–	–	–	SCM
Enterococcus hirae CRL1843	3.22	l	12.99	l	+++	–	–	–	–	H
Pediococcus pentosaceus 24–4	6.45	l	0.00		+++	–	–	–	–	SCM
*Pediococcus pentosaceus*13–4	0.00	l	2.78	l	+++	–	–	–	–	H
Enterococcus hirae CRL1844	0.00	l	1.39	l	+++	–	–	–	–	H
Pediococcus pentosaceus 24–13	1.59	l	8.75	l	+++	–	–	–	–	CM
Pediococcus pentosaceus 24–11	0.00	l	7.46	l	+++	–	–	–	–	CM
Enterococcus hirae 13–2	3.12	l	5.55	l	+++	–	–	–	–	H
Enterococcus hirae 13–6	0.00	l	0.00	l	+++	–	–	–	–	H
Pediococcus pentosaceus 13–12	1.81	l	4.00	l	+++	–	–	–	–	H
Pediococcus pentosaceus 24–2	5.26	l	7.35	l	+++	–	–	–	–	H
Pediococcus pentosaceus CRL1831	0.00	l	10.00	l	+++	–	–	–	–	H
Pediococcus pentosaceus CRL1832	12.90	l	4.62	l	+++	–	–	–	–	CM
Pediococcus pentosaceus 10–5	0.00	l	1.41	l	+++	–	–	–	–	H
Enterococcus hirae 24–12	1.69	l	0.00	l	+++	–	–	–	–	CM
*Enterococcus hirae*7–3	1.66	l	1.56	l	+++	–	–	–	+	SCM
Pediococcus pentosaceus 10–7	0.00	l	7.79	l	+++	–	–	–	–	H
*Enterococcus hirae*13–11	4.41	l	9.41	l	+++	–	–	–	–	H
*Enterococcus hirae*22–26	1.51	l	9.52	l	+++	–	–	–	–	SCM
Pediococcus pentosaceus 24–9	4.29	l	0.00	l	+++	–	–	–	–	CM
Enterococcus hirae B6.1b	5.00	l	11.46	l	–	1, 2, 3	–	–	–	H
Weissella cibaria B5.1a	0.00	l	14.00	l	+++	–	–	–	–	SCM
Enterococcus hirae CRL1845	1.51	l	9.52	l	+++	–	–	–	–	SCM
Enterococcus hirae CRL1846	5.00	h	11.46	l	–	1, 2, 3	–	–	–	H
Weissella cibaria CRL1857	0.00	l	14.00	l	+++	–	–	–	–	SCM
Enterococcus hirae CRL1847	1.51	l	4.54	l	–	1, 2, 3	–	–	–	H
Enterococcus hirae CRL1848	0.00	l	2.56	l	–	1, 2, 3	–	–	–	SCM
Enterococcus hirae CRL1858	3.03	l	0.00	l	–	1, 2, 3	–	–	–	SCM
Weissella cibaria CRL1833	82.91	h	8.41	l	+	–	–	–	–	H
Enterococcus hirae CRL1837	2.38	l	4.76	l	–	1, 2, 3	–	–	–	SCM
Weissella cibaria CRL1840	74.54	h	11.46	l	+	–	–	–	–	SCM
Weissella cibaria CRL1859	68.74	h	4.51	l	+	–	–	–	–	H
Weissella cibaria CRL1860	68.20	h	6.29	l	+	–	–	–	–	H
Weissella cibaria CRL1861	72.54	h	9.26	l	+	–	–	–	–	H
Enterococcus hirae B14.2a	1.61	l	0.00	l	–	–	–	–	–	SCM
Enterococcus hirae CRL1834	3.33	l	7.89	l	–	1, 2, 3	–	–	–	H
Enterococcus hirae CRL1835	0.00	l	4.93	l	++	1, 2, 3	–	–	–	H
Weissella cibaria B5.2b	66.36	m	3.12	l	+	–	–	–	–	SCM

l: low. m: middle. h: high. +++: high producer. ++: producer. +: low producer. –: non producer. 1: *Listeria innocua* 7. 2: *L. monocytogenes* Scott A. 3: *Streptococcus dysgalactiae*. H: healthy quarter. CM: quarter with clinical mastitis. SCM: quarter with subclinical mastitis.

autoaggregation and hydrophobicity predict the ability of a strain to adhere to epithelial cells and it is a specific property of each microorganism [32,33,39,40]. Based on this concept, the degree of hydrophobicity and the autoaggregative capability was assessed. Only a few LAB showed medium or high degree of hydrophobicity, while any of them exhibited an autoaggregative phenotype. The number of hydrophobic LAB was higher in the North-west and some autoaggregative strains were described. Most of them were isolated from stripping milk samples. In the present work, all the strains were isolated from foremilk and probably the hydrophobic microorganisms remained in the teat canal until the fat globules attached them later with the stripping milk [41]. The surface properties detected in all the strains were similar to those reported previously in other bovine niches [31,42–44] and could be a characteristic of the cow-related ecosystems. Selected strains from the North-west adhere to epithelial cells obtained from the teat canal. Moreover, one of them, *Lactobacillus perolens* CRL1724, can be recovered up to the day 15 post-inoculation with normal SCC from day 2 post-inoculation [45]. The strains selected in the present work showed a similar behaviour with high percentages of adhesion and adhesion indexes in experiments performed with epithelial cells obtained from the teat canal which suggest a longer permanence time in the teat canal (data not shown) (http://congresos.biologia.org.ar/img/Resumenes_aprobados_IIRCSB.pdf).

The production of antimicrobial compounds was studied by applying the diffusion plate technique and also MRS-TMB plates. The supernatants were tested against eleven relevant BM pathogens strains and also two *Listeria* sp. Nine strains were able to inhibit *L. innocua*, *L. monocytogenes* and the BM pathogen *S. dysgalactiae*. Four of them were isolated from quarters with subclinical BM and five from healthy quarters. The inhibitions were caused only by bacteriocin-like inhibitory substances. LAB from the North-west were able to inhibit a higher number of indicator strains by production of organic acids and bacteriocins. All the bacteriocinogenic strains isolated from Córdoba were identified as *E. hirae*. A lower number of bacteriocinogenic strains were isolated from the North-west: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CRL1655, *Enterococcus mundtii* CRL1656 and *E. faecium* CRL1657 (all of them from healthy quarters) [5]. It is probable that the low diversity of microorganisms isolated in the central area is due to differences in

the milking and hygiene practices [46], and the ecological pressure exerted by bacteriocins [47,48]. Further studies are being performed to characterize these substances and to optimize their production.

It is well known that LAB can inhibit opportunistic pathogens as *S. aureus* in food matrices and also in the vaginal ecosystem by hydrogen peroxide production. Indeed, most of the lactic acid microbiota isolated from healthy human or bovine vagina are high hydrogen peroxide-producers and exert a beneficial effect by this way [49,50]. Most of the strains isolated in the present work were able to produce this substance. A large number of these microorganisms were high producers and they were identified as *P. pentosaceus*, species mainly applied as starters for food fermentation. These results are different from those of North-western LAB, because most of them showed to be no hydrogen peroxide-producers, and the high producers were strains isolated only from foremilk [5].

The functional role of the EPS produced by LAB was not yet elucidated [15,51]. EPS reduce pathogenic biofilm formation, influence the adhesion of some probiotics and pathogens [52,53] and also exert an immunostimulatory effect [54]. The capability to produce polysaccharides was assessed in culture media enriched with different sugar sources. None of the strains were able to produce EPS or capsular polysaccharides. Similar results were obtained before for LAB isolated from the North-west. It would be interesting to find some EPS-producers from the bovine environment to test later their beneficial effects and also to evaluate their potential application as raw material to encapsulate the selected strains and to improve their viability.

In the development of a probiotic product it is also necessary to assess the safety of the suggested beneficial microorganisms [3]. Some genera as *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Pediococcus* have been recognized historically as GRAS (generally recognized as safe), QPS (Qualified Presumption of Safety) and food grade microorganisms, while some others as *Streptococcus* and *Enterococcus* include some pathogenic or potentially pathogenic strains showing haemolytic activity and/or antibiotic resistance. Some species are intrinsically resistant to some specific antibiotics, as several lactobacilli to vancomycin, although this resistance is intrinsic and it is not transferred to other strains [55]. The presence of virulence and antibiotic resistance genes is more common in enterococi isolated from clinical samples than in those isolated from foods. Vancomycin resistant enterococci have become an important health problem because this resistance could be transferred to other microorganisms by conjugation [21]. These are the reasons why the safety of each potentially probiotic strain needs to be evaluated [40]. In this sense, virulent determinants and resistance to vancomycin were assayed in this work by applying phenotypic and molecular techniques. Only one strain, identified as *E. hirae*, produced a PCR fragment of the expected size for *VanB* gene. This strain was excluded from the selected group. Resistance to different antibiotics (penicillin, ampicillin-sulbactam, erythromycin, gentamicin) was also evaluated by a phenotypic test. The selected strains did not show resistant to the clinically relevant antibiotics (data not shown) (http://congresos.biologia.org.ar/img/Resumenes_aprobados_IIRCSB.pdf).

A mastitis preventive product to be applied in the dried period is being designed. In this sense, an increase of the SCC for a short time will not affect the milk quality because the animal is not milked during this period. Based on the selection criteria described above, a group of four strains was included for further assessments (Table 2), mainly those related to their technological properties and *in vivo* studies. Although there are some scientific papers that deal with the use of microorganisms or bacteriocins for the prevention of mastitis, they do not consider the same criteria that we used in the present work to select the beneficial strains [28–30].

5. Conclusion

Although some differences, mainly in the diversity of the microbiota and the species isolated, were detected, the results obtained in the studies performed in LAB from the central area of Argentina support in some way those obtained previously in the North-western region. A new group of potentially probiotic strains are available after this work, selected by different criteria based on their functional properties and their safety, which will be further assayed in *in vivo* studies.

Acknowledgements

This work was supported by CONICET PIP 632 and ANPCYT PICT 543 grants. The results obtained are included in the project "Design of a probiotic product for bovine mastitis prevention" signed between CONICET and UNRC Res.2907.

References

[1] Halasa T, Huijps K, Osterás O, Hogeveen H. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. Vet Q 2007;29:18–31.
[2] Barkema HW, Schukken YH, Zadoks RN. Invited review: the role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. J Dairy Sci 2006;89:1877–95.
[3] FAO-WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf.
[4] Giannino ML, Aliprandi M, Feligini M, Vanoni L, Brasca M, Fracchetti F. A DNA array based assay for the characterization of microbial community in raw milk. J Microbiol Methods 2009;78:181–8.
[5] Espeche MC, Otero MC, Sesma F, Nader-Macías MEF. Screening of surface properties and antagonistic substances production by lactic acid bacteria isolated from the mammary gland of healthy and mastitic cows. Vet Microbiol 2009;135:346–57.
[6] Rodriguez-Palacios A, Staempfli HR, Duffield T, Weese JS. Isolation of bovine intestinal *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus acidilactici* with inhibitory activity against *Escherichia coli* O157 and F5. J Appl Microbiol 2009;106:393–401.
[7] Sun P, Wang JQ, Zhang HT. Effects of *Bacillus subtilis* natto on performance and immune function of preweaning calves. J Dairy Sci 2010;93:5851–5.
[8] International Dairy Federation (IDF). Milk enumeration of somatic cells, vol. 148; 1995. Brussels, Belgium.
[9] Giraudo JA, Calzolari A, Rampone H, Rampone A, Giraudo AT, Bogni C, et al. Field trials of a vaccine against bovine mastitis. 1. Evaluation in heifers. J Dairy Sci 1997;80:845–53.
[10] Harmon RJ. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. J Dairy Sci 1994;77:2103–12.
[11] Vandevoorde L, Christiaens H, Verstraete W. Prevalence of coaggregation reactions among chicken lactobacilli. J Appl Bacteriol 1992;72:214–9.
[12] Otero MC, Ocaña VS, Elena Nader-Macías M. Bacterial surface characteristics applied to selection of probiotic microorganisms. In: Spencer RJ, Ragout de Spencer A, editors. Methods in molecular biology. Totowa: Humana Press Inc.; 2004. p. 435–40.
[13] Raibaud P, Caulet M, Galpín JV, Mocquot G. Studies on the bacterial flora of the alimentary tract of pigs, II Streptococci: selective enumeration of the dominant groups. J Appl Bacteriol 1961;24:285–91.
[14] Juárez Tomás MS, Otero MC, Ocaña V, Nader-Macías MEF. Production of antimicrobial substances by lactic acid bacteria I: determination of hydrogen peroxide. In: Spencer RJ, Ragout de Spencer A, editors. Methods in molecular biology. Totowa: Humana Press Inc.; 2004. p. 337–46.
[15] Ruas-Madiedo P, De Los Reyes-Gavilán CG. Invited review: methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. J Dairy Sci 2005;88:843–56.
[16] Duguid JP. The demonstration of bacterial capsules and slime. J Pathol Bacteriol 1951;63:673–85.
[17] Pospiech A, Neumann B. A versatile quick-prep of genomic DNA from Gram-positive bacteria. Trends Genet 1995;11:217–8.
[18] Kullen MJ, Sanozky-Dawes RB, Crowell DC, Klaenhammer TR. Use of the DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the *Lactobacillus acidophilus* complex. J Appl Microbiol 2000;89:511–6.
[19] Coque TM, Patterson JE, Steckelberg JM, Murray BE. Incidence of hemolysin, gelatinase, and aggregation substance among enterococci isolated from patients with endocarditis and other infections and from feces of hospitalized and community-based persons. J Infect Dis 1995;171:1223–9.
[20] Kariyama R, Mitsuhata R, Chow JW, Clewell DB, Kumon H. Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. J Clin Microbiol 2000;38:3092–5.

[21] Eaton TJ, Gasson MJ. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. Appl Environ Microbiol 2001;67:1628–35.
[22] Fontana C, Gazzola S, Cocconcelli PS, Vignolo G. Population structure and safety aspects of *Enterococcus* strains isolated from artisanal dry fermented sausages produced in Argentina. Lett Appl Microbiol 2009;49:411–4.
[23] Hansen PJ, Soto P, Natzke RP. Mastitis and fertility in cattle - possible involvement of inflammation or immune activation in embryonic mortality. Am J Reprod Immunol Microbiol 2004;51:294–301.
[24] Tenhagen BA, Köster G, Wallmann J, Heuwieser W. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. J Dairy Sci 2006;89:2542–51.
[25] Piepers S, De Meulemeester L, De Kruif A, Opsomer G, Barkema HW, De Vliegher S. Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically infected dairy cows in Flanders, Belgium. J Dairy Res 2007;74:478–83.
[26] Pyörälä S, Taponen S. Coagulase-negative staphylococci-emerging mastitis pathogens. Vet Microbiol 2009;134:3–8.
[27] Pellegrino M, Giraudo J, Raspanti C, Odierno L, Bogni C. Efficacy of immunization against bovine mastitis using a *Staphylococcus aureus* avirulent mutant vaccine. Vaccine 2010;28:4523–8.
[28] Beecher C, Daly M, Berry DP, Klostermann K, Flynn J, Meaney W, et al. Administration of a live culture of *Lactococcus lactis* DPC 3147 into the bovine mammary gland stimulates the local host immune response, particularly IL-1 and IL-8 gene expression. J Dairy Res 2009;76:340–8.
[29] Klostermann K, Crispie F, Flynn J, Meaney WJ, Paul Ross R, Hill C. Efficacy of a teat dip containing the bacteriocin lacticin 3147 to eliminate Gram-positive pathogens associated with bovine mastitis. J Dairy Res 2010;77:231–8.
[30] Klostermann K, Crispie F, Flynn J, Ross RP, Hill C, Meaney W. Intramammary infusion of a live culture of *Lactococcus lactis* for treatment of bovine mastitis: comparison with antibiotic treatment in field trials. J Dairy Res 2008;75: 365–73.
[31] Nader-Macías MEF, Otero MC, Espeche MC, Maldonado NC. Advances in the design of probiotic products for the prevention of major diseases in dairy cattle. J Ind Microbiol Biotechnol 2008;35:1387–95.
[32] Ouwehand A, Salminen S, Isolauri E. Probiotics: an overview of beneficial effects. Antonie Van Leeuwenhoek 2002;82:279–89.
[33] Saarela M, Mogensen G, Fondén R, Mättö J, Mattila-Sandholm T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. J Biotechnol 2000;84: 197–215.
[34] O'Sullivan O, O'Callaghan J, Sangrador-Vegas A, McAuliffe O, Slattery L, Kaleta P, et al. Comparative genomics of lactic acid bacteria reveals a niche-specific gene set. BMC Microbiol 2009;9:1–9.
[35] Desmasures N, Bazin F, Guéguen M. Microbiological composition of raw milk from selected farms in the Camembert region of Normandy. J Appl Microbiol 1997;83:53–8.
[36] Ercolini D, Russo F, Ferrocino I, Villani F. Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. Food Microbiol 2009;26: 228–31.
[37] Kuang Y, Tani K, Synnott AJ, Ohshima K, Higuchi H, Nagahata H, et al. Characterization of bacterial population of raw milk from bovine mastitis by culture-independent PCR-DGGE method. Biochem Eng J 2009;45:76–81.
[38] Lafarge V, Ogier JC, Girard V, Maladen V, Leveau JY, Gruss A, et al. Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. Appl Environ Microbiol 2004;70:5644–50.
[39] Cesena C, Morelli L, Alander M, Siljander T, Tuomola E, Salminen S, et al. *Lactobacillus crispatus* and its nonaggregating mutant in human colonization trials. J Dairy Sci 2001;84:1001–10.
[40] Gueimonde M, Salminen S. New methods for selecting and evaluating probiotics. Dig Liver Dis 2006;38:S242–7.
[41] Ly MH, Vo NH, Le TM, Belin JM, Waché Y. Diversity of the surface properties of Lactococci and consequences on adhesion to food components. Colloids Surf B Biointerfaces 2006;52:149–53.
[42] Otero MC, Morelli L, Nader-Macías ME. Probiotic properties of vaginal lactic acid bacteria to prevent metritis in cattle. Lett Appl Microbiol 2006;43:91–7.
[43] Maldonado NC, de Ruiz CS, Otero MC, Sesma F, Nader-Macías ME. Lactic acid bacteria isolated from young calves - characterization and potential as probiotics. Res Vet Sci; 2011. doi:10.1016/j.rvsc.2011.03.017.
[44] Rodriguez C, Cofre JV, Sanchez M, Fernandez P, Boggiano G, Castro E. Lactobacilli isolated from vaginal vault of dairy and meat cows during progesteronic stage of estrous cycle. Anaerobe 2011;17:15–8.
[45] Frola ID, Pellegrino MS, Espeche MC, Giraudo JA, Nader-Macías ME, Bogni CI. Effects of intramammary inoculation of *Lactobacillus perolens* CRL1724 in lactating cows' udders. J Dairy Res; 2011:1–9.
[46] Valérie M, Agnès H, Jean-François C. La flore microbienne de laits crus de vache: diversité et influence des conditions de production. Lait 2001;81:575–92.
[47] Salminen S, von Wright A, Ouwehand A. Lactic acid bacteria. microbiological and functional aspects. 3rd ed. New York: Marcel Dekker Inc.; 2004.
[48] Deegan LH, Cotter PD, Hill C, Ross P. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. Int Dairy J 2006;16:1058–71.
[49] Ocaña VS, Pesce De Ruiz Holgado AA, Nader-Macías ME. Growth inhibition of *Staphylococcus aureus* by H_2O_2-producing *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* isolated from the human vagina. FEMS Immunol Med Microbiol 1999; 23:87–92.
[50] Otero MC, Nader-Macías ME. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by H_2O_2-producing *Lactobacillus gasseri* isolated from the vaginal tract of cattle. Anim Reprod Sci 2006;96:35–46.
[51] De Vuyst L, Degeest B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. FEMS Microbiol Rev 1999;23:153–77.
[52] Ruas-Madiedo P, Gueimonde M, De Los Reyes-Gavilán CG, Salminen S. Short communication: effect of exopolysaccharide isolated from "viili" on the adhesion of probiotics and pathogens to intestinal mucus. J Dairy Sci 2006;89: 2355–8.
[53] Kim Y, Oh S, Kim SH. Released exopolysaccharide (r-EPS) produced from probiotic bacteria reduce biofilm formation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Biochem Biophys Res Comm 2009;379:324–9.
[54] Chabot S, Yu HL, De Léséleuc L, Cloutier D, Van Calsteren MR, Lessard M, et al. Exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M stimulate TNF, IL-6 and IL-12 in human and mouse cultured immunocompetent cells, and IFN-γ in mouse splenocytes. Lait 2001;81:683–97.
[55] Salminen S, Von Wright A, Morelli L, Marteau P, Brassart D, De Vos WM, et al. Demonstration of safety of probiotics - a review. Int J Food Microbiol 1998;44: 93–106.

Journal of Dairy Research (2013) **80** 28–35.
doi:10.1017/S0022029912000581

Histological examination of non-lactating bovine udders inoculated with Lactobacillus perolens CRL 1724

Ignacio D Frola[1], Matías S Pellegrino[1], Gabriel Magnano[2], José A Giraudo[2], María C Espeche[3], María EF Nader-Macias[3] and Cristina I Bogni[1]*

[1] Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Cs. Ex. Fco-Qcas y Naturales, University of Río Cuarto, Ruta 8 Km 601, X5804ZAB Río Cuarto, Córdoba, Argentina
[2] Department of Animal Pathology, Faculty of Agronomy and Veterinary, University of Río Cuarto, Ruta 8 Km 601, X5804ZAB Río Cuarto, Córdoba, Argentina
[3] Departament of Preventive Microbiology, CERELA-CONICET (Centro de Referencia para Lactobacilos-Consejo Nacional de Investigaciones Cientifícas y Técnicas de Argentina), Chacabuco 145, 4000 San Miguel de Tucumán, Argentina

Received 16 December 2011; accepted for publication 2 July 2012; first published online 9 November 2012

The effect of intramammary inoculation of Lactobacillus perolens CRL 1724 on bovine udders at drying off was evaluated through histological examination of the canal and cistern tissues. The persistence of the strain in the udder 7 d post inoculation was also determined. Lb. perolens CRL 1724 was recovered from all mammary quarters and no clinical signs or teat damage were observed after inoculation of 10^6 cfu/ml. The udders showed a normal structural aspect and there were no modifications of the milk appearance. Lb. perolens CRL 1724 cells were evidenced on the surface of the epithelial cells of the cistern without causing any morphological modifications or cell alterations. Lb. perolens CRL 1724 produces a mild inflammatory reaction, characterized by recruitment of neutrophils to the epithelial zone and a slight hyperaemia into blood vessels. This preliminary study provides important information for further studies directed towards the inclusion of Lb. perolens CRL 1724 in the design of probiotic products for preventing bovine mastitis in non-lactating dairy cows.

Keywords: Bovine mastitis, *Lactobacillus perolens* CRL 1724, adherence, non-lactating dairy cows.

Bovine mastitis, one of the most persistent, prevalent and expensive diseases of dairy cows (Viguier et al. 2009; Derong & Zhao, 2010) is defined as 'inflammation of the bovine udder' (Fetrow, 2000). This disease causes considerable distress to the animal, decreased milk production and major economic losses on dairy farms worldwide (Crispie et al. 2008). Dairy cows are highly susceptible to mastitis, mainly during the dry period (Ryan et al. 1999) and antibiotics are currently administered at the drying period to help to eliminate subclinical cases and to prevent the establishment of new intramammary infections (Twomey et al. 2000).

The use of antibiotics for prophylactic treatment is being subjected to considerable debate all over the world because of its perceived connection with the emergence of antibiotic resistance in bacteria, particularly with the increased prevalence of organisms such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, which are prevalent in nosocomial infections in humans (David & Daum, 2010). Moreover the use of antibiotics to control mastitis generates the appearance of residues in the milk of treated cows (Dalton, 2006). Such concerns have prompted the World Health Organization (WHO) and United Nations Organization for Food and Agriculture Organization (FAO), in the 34th session of the Codex Alimentarius Commission, to increase measures aimed at reducing antimicrobial resistance generated for antibiotic therapies in bovines (González-Gracia, 2011). Some researchers (Browning et al. 1990; Crispie et al. 2004a; Klostermann et al. 2008) have recommended that dry cow antibiotic therapy should not be used as a routine prophylactic measure but rather restricted only to the treatment of infected cows.

During recent years there has been increased interest in developing alternative approaches to the prevention of intramammary infections, particularly in dry cows (Crispie et al. 2004b, 2005; Dallard et al. 2010). In this sense, there is a wide variety of proposals that include the application of vaccines (Giraudo et al. 1997; Pellegrino et al. 2010; Pereira

*For correspondence; e-mail: cbogni@exa.unrc.edu.ar

et al. 2011) and some immunomodulators (Larsen et al. 2004; Dallard et al. 2010). Other measures include the use of 'organic' products, such as the use of probiotic microorganisms (Klostermann et al. 2008) or some of the metabolic or bioactive compounds they are able to produce (Crispie et al. 2005).

For the identification of the beneficial strains that can be used as probiotics, there are many criteria and laboratory assays, many of them recommended by international organizations (FAO & WHO, 2002; International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP, 2009). One of the characteristics to be applied for the selection of probiotic strains is the capability of adhesion to epithelial cells (Otero & Nader-Macías, 2007; Both et al. 2010). Adhesion is one of the strategies that promote the further colonization of the bacteria. Also the adhesion of the lactobacilli to the epithelium is the first step in the formation of a barrier or a biofilm to prevent undesirable microbial colonization (Lebeer et al. 2007). Adherence of *Lactobacillus* to epithelial surfaces has been studied in vaginal epithelial cells because of their competition with pathogens for the receptor sites for adhesion (Osset et al. 2001; Nader-Macías et al. 2007).

In earlier work, *Lb. perolens* CRL 1724 was isolated from bovine milk and characterized as a potential probiotic strain (Espeche et al. 2009; Frola et al. 2011). Frola et al. (2011) showed that in vitro *Lb. perolens* CRL 1724 was able to inhibit and co-aggregate with microorganisms considered as major bovine mastitis causing pathogens. Moreover *Lb. perolens* CRL 1724 showed a high efficacy in vitro to adhere to bovine teat canal epithelial cells and was recovered from all the mammary quarters in vivo. No clinical signs or teat damage were observed in lactating cows after the inoculation of 10^6 cfu/ml.

The aim of the present study was to evaluate whether intramammary inoculation of *Lactobacillus perolens* CRL 1724 in dry-period cows produced some type of structural modifications in the gland, using histological examination. The persistence of the strain in the udders 7 d post inoculation was also determined.

Materials and methods

Bacterial strain and culture conditions

Lb. perolens CRL 1724 (Centro de Referencia para Lactobacilos Culture Collection) used in this study was isolated and characterized as potentially probiotic from milk of healthy Holstein cows and characterized according to Espeche et al. (2009) and Frola et al. (2011).

Lb. perolens CRL 1724, resistant to streptomycin, was grown in Man, Rogosa and Sharpe broth (MRS, Britania) at 37 °C for 18 h, and stored in milk yeast extract (MYE) (10 g low fat milk, 0·5 g yeast extract and 1 g glucose per 100 ml) with 12% glycerol at −20 °C. Before performing the experimental assays, bacteria were subcultured three times, every 12–14 h at 37 °C in MRS broth. The bacterial inoculum was prepared as follows: a culture of the strain (10^9 cfu/ml) incubated for 18 h at 37 °C in MRS broth was centrifuged and the bacterial pellet was washed twice with saline solution (0·8% NaCl). Cells were suspended in 5 ml of saline solution to obtain a concentration of 10^9 cfu/ml. The concentrated preparation was serially diluted in saline solution to 10^6 cfu/ml. This inoculum was fractionated and stored at 4 °C until inoculation was performed (a period no longer than 2 h) (Frola et al. 2011).

Intramammary inoculation of Lb. perolens *CRL 1724 at drying off*

The study was carried out on an experimental dairy farm in Córdoba, Argentina. The experimental farm operated under conventional management. Five clinically healthy non-lactating Holstein cows were used for the assays. One of the cows from the experimental dairy was used to evaluate the effect of *Lb. perolens* CRL 1724 after intramammary inoculation and the other four cows were used for histological examinations; one of them belonged to the experimental farm and the other three cows were selected from a commercial dairy farm. The animals were of parity 1 and 4 and were in late lactation. Cows were milked twice daily and produced an average of 14 kg milk/d before interruption of lactation. The animals were selected based on previous bacteriological studies and somatic cell counts (SCC). All the quarters used in this work were free of major mastitis-causing pathogens (MCPs) and with SCC in individual quarters < 200 000 cells/ml. The animals were inoculated after evening milking. The cleaning of the udders before inoculation, and inoculation procedure were performed following the methodology described by Frola et al. (2011). The unit of study was the mammary quarter. After intramammary inoculation, four of the animals (of parity 1 and showing reproductive problems) were removed from the herd and sent to slaughter at the end of the trial.

One cow was first used to evaluate whether intramammary inoculation of *Lb. perolens* CRL 1724 produced some type of effect on the udder, by evaluation of the clinical signs, milk appearance, SCC and recovery of viable lactobacilli in the milk. Taking in account previous results (Frola et al. 2011) three quarters were infused once on day 0 (D0) with 1 ml containing 10^6 cfu of *Lb. perolens* CRL 1724. One quarter was used as control. To minimize animal handling and to follow animal welfare best practices, no infusion was inoculated in the control quarter.

Three quarters of each one of the remaining four cows were infused with 1 ml of 10^6 cfu of *Lb. perolens* CRL 1724 for histological examination. One quarter was used as control and samples were taken 2 d after intramammary inoculation.

Sampling and bacterial recovery

Before inoculation, foremilk samples were collected from each quarter according to the National Mastitis Council

procedure (National Mastitis Council, 2004) immediately before milking. Milk or dry secretion samples were transported refrigerated (a period no longer than 2 h) to the laboratory and immediately 10 µl was plated onto blood-agar (TSA with 5% of sheep blood) and incubated at 37 °C for 24 h. Bacteria were characterized by standard biochemical tests (Bergey & Holt, 1994). SCC was performed with a Somacount 300 (Bentley) according to the revised protocol of the 148A method C, fluoro-opto-electronic (International Dairy Federation Laboratory, 1995). In all cows, milk or dry secretion samples were obtained 2 d before infusion (D – 2), immediately prior to infusion (D0) and until 2 d (D2) post infusion. One cow, used to evaluate whether the intramammary inoculation of *Lb. perolens* CRL 1724 produces some type of effect on the udder, was sampled daily until day 7 (D7).

Serial dilutions of samples in saline solution were streaked on MRS agar plates in duplicate and incubated at 37 °C for 24–48 h under microaerophilic conditions (5% CO_2, 95% air) for *Lactobacillus* isolation. Isolated colonies were identified as *Lb. perolens* CRL 1724 by phenotypic tests (Gram stain, morphology, catalase activity, nitrate reduction, indole production) and by determination of streptomycin resistance.

Clinical observations and animal care

Clinical signs were monitored throughout the experiment by a veterinarian, every 8 h during the first 24 h and daily until the end of the assay. General attitude and appetite of the cows were observed. The udders were palpated for soreness, swelling, hardness and heat, and the appearance of milk and dry secretion was assessed visually for clots and changes in colour or composition. Animals were cared for in accordance with The International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals (1985).

Histological examination of the dry udder

Four inoculated cows were sacrificed and examined histologically before sending them to the slaughterhouse. Two representative samples of canal and cistern of bovine mammary gland were removed and fixed in 10% buffered formalin and 2·5% glutaraldehyde (in 0·1 mol/l phosphate buffer, pH 7·4) during 24 h at room temperature for histological examination and transmission electronic microscopy (TEM).

For histological examination, fragments fixed were embedded in paraffin and cut in 5-µm sections. Sections were stained with haematoxylin and eosin (H-E) according to Grignaschi et al. (1983), toluidine blue and Gram, placed on a glass slide and covered with cover-slip according to a method standardized in our laboratory. Samples were examined under high resolution optical microscopy (HROM) and pictures were taken with a Powershot G6, 7·1 megapixels (Canon INC, Japón) digital camera and the software AxioVision Release 4.6.3 (Carl Zeiss, Alemania). For TEM examination, fixed tissue fragments were fixed overnight in 1% osmium tetroxide and afterwards treated with an aqueous solution of 2% uranyl acetate for 40 min. After fixation, tissues were gradually dehydrated in a series of alcohol solutions of increasing strength, passed through acetone and embedded in Spurr resin. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined with Siemens Elmiskop 101 transmission electron microscope.

Results

Effect of intramammary inoculation of Lb. perolens *CRL 1724*

To evaluate the in-vivo performance of *Lb. perolens* CRL 1724, the tolerance of udder to the inoculation of 10^6 cfu/ml of lactobacilli was first determined in one non-lactating cow. The concentration used was tested previously in lactating cows (Frola et al. 2011). The inoculum was well tolerated by the animal: no clinical signs or teat damage were observed and the udders presented a normal aspect. There were no changes in the appearance of milk secretions. SCC in milk samples was $4{\cdot}5 \times 10^6$ cells/ml after 24 h of intramammary inoculation and decreased to a normal value (1×10^5 cells/ml) until the end of the assay (7 d post inoculation). *Lb. perolens* CRL 1724 was recovered until the end of the assay and from all the inoculated quarters. The highest bacterial recovery value (25 cfu/ml) was obtained 48 h after intramammary inoculations. All the quarters inoculated were negative for mastitis causing pathogen isolation during the whole trial period.

Histological examination

Intrammamary inoculation of *Lb. perolens* CRL 1724 evaluated by epithelial tissue sections from the teat canal of the udders (analysed by histological preparations) showed, in all cows, the presence of a stratified squamous epithelium (flat cells) with an important keratin layer (Fig. 1a, c). No difference was found between inoculated and non-inoculated quarters and both quarters presented scarce numbers of blood cells in blood vessels (Fig. 1b, d) in connective tissue. No bacteria were observed after H-E and Gram stains (data not shown).

On the other hand, the epithelial tissue sections obtained from mammary gland cistern, in all samples analysed, were characterized by the presence of an epithelial lining composed of one or two layers of cuboidal or columnar cells without keratin layer. In all cows, mammary gland cistern showed differences between the inoculated and no-inoculated quarter (Fig. 2). The presence of some neutrophils was observed in the connective and epithelial tissue. In this sense, a higher number of neutrophils were observed near the epithelial zone (Fig. 2b, c). Another characteristic detected was a blood vessels hyperaemia which, together with neutrophils, denoted a mild inflammatory reaction

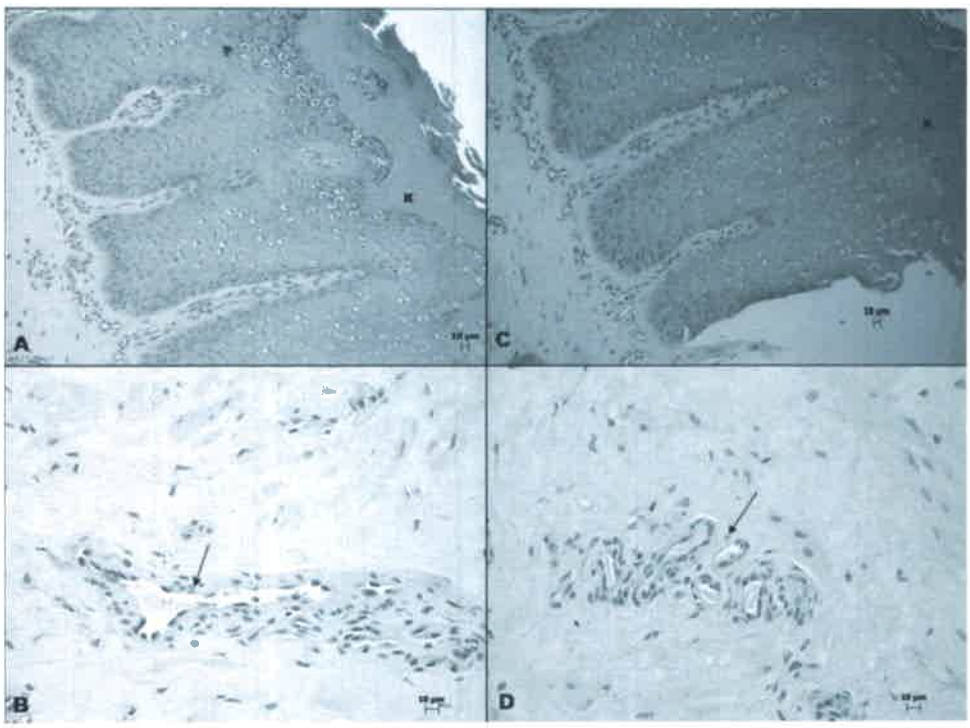


Fig. 1. High resolution optical microscopy showing haematoxylin and eosin stained from representative epithelial tissue sample of bovine mammary gland canal after intrammamary inoculation with *Lactobacillus perolens* CRL 1724. (a) and (b) non-inoculated with *Lb. perolens* CRL 1724. Presence of keratin superficial layer (K) and connective tissue with presence of empty blood vessel (black arrow) (20× and 40, respectively). (c) and (d) epithelial tissue samples and connective tissue from inoculated quarter without change compared with controls (20× and 40, respectively). The bar in each panel is equivalent to 10 μm.

(data not shown). Bacteria adhered to the surface of the cistern epithelial tissue were observed in some quarters inoculated with *Lb. perolens* CRL 1724 (Fig. 2d). This result was confirmed for Gram stain (data not shown).

There were no ultrastructural modifications in the epithelial tissue cells of the canal and cistern of all mammary gland analysed after *Lb. perolens* CRL 1724 inoculation (Figs. 3 & 4, respectively). TEM and RHOM examinations did not show ultrastructural changes, necrosis or apoptosis of epithelial cells, which might be evidenced by the shrinkage of the nucleus and chromatin condensation (pyknosis), outbreak of the nucleus (cariorexis) or the appearance of small cytoplasm vacuoles due to water accumulation. No changes were observed in the nucleus, nucleolus, nuclear membrane and cytoplasmic membrane of the all samples assayed.

Discussion

Bovine mastitis currently produces a serious health and economic problem in dairy farms around the world and antibiotics and disinfectants are routinely used to fight this disease. The generation of non-antibiotic formulations for the treatment and prevention of mastitis in cows has the potential to reduce the veterinary dependence on antibiotics in the control of this persistent and costly disease (Ryan et al. 1999). In this sense, the use of probiotic bacteria has been widely studied as a novel approach to prevent infections in animals, especially in the gastrointestinal and vaginal tract (Otero & Nader-Macías, 2007; Walsh et al. 2008).

Previous reports showed the isolation and characterization of *Lb. perolens* CRL 1724 to be a potential probiotic strain (Espeche et al. 2009; Frola et al. 2011). *Lb. perolens* CRL 1724 was able to inhibit and co-aggregate in vitro with microorganisms considered as major bovine mastitis causing pathogens. Moreover *Lb. perolens* CRL 1724 showed a high efficacy to adhere to bovine teat canal epithelial cells in vitro. Intramammary inoculation of 10^6 cfu/ml of the strain in lactating cows showed no udder clinical signs or teat damage and bacteria could be recovered from milk until 15 d after challenge.

In this work the inoculation of 10^6 cfu/ml of *Lb. perolens* CRL 1724 was also well tolerated by the udders at the beginning of the dry period. No clinical signs or teat damage were observed in the inoculated quarters and the udders presented a normal aspect. There were no changes in the appearance of milk secretions. These results differ from those obtained by Beecher et al. (2009) who reported that all the lactating cows inoculated with *Lactococcus lactis* at 10^8 cfu/ml experienced swollen udder quarters. Similar results were observed in lactating cows by Frola et al.

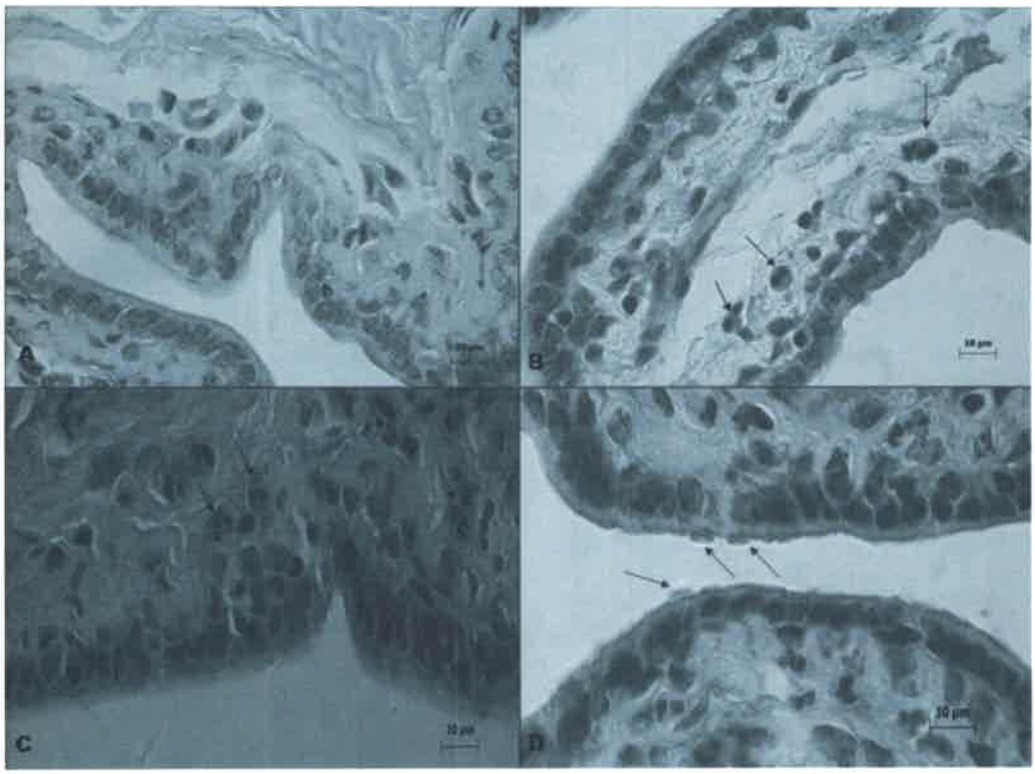


Fig. 2. High resolution optical microscope photographs showing haematoxylin and eosin stained from representative epithelial tissue sample of bovine mammary gland cistern after intrammamary inoculation with *Lactobacillus perolens* CRL 1724. (a) non-inoculated (100×). (b), (c) and (d) epithelial tissue of inoculated quarter. (b) and (c) presence of neutrophils near to the epithelial zone (black arrows) (100×). (d) bacterial adhered to the surface of epithelial tissue (greys arrows) (100×). The bar in each panel is equivalent to 10 μM.

(2011), where a short-term significant increase in SCC was observed 1 d post inoculation as a normal reaction of the udder, returning to normal values at the end of the trial. In this sense, Crispie et al. (2008) and Klostermann et al. (2008) reported increased values of SCC in the first 2 d after the inoculation of 10^9 cfu/ml of *Lc. lactis* which decreased on days 5 and 7 post inoculation, respectively.

In the present study, *Lb. perolens* CRL 1724 was recovered from the udders until the end of the assay. This could indicate that the strain persisted in the udders. Beecher et al. (2009) observed the recovery of *Lc. lactis* for a period of 72 h post inoculation.

Different authors studied the effect of lactic acid bacteria in the control of mastitis utilizing, for example, a commercial probiotic for oral use in calves (Greene et al. 1991) or substances such as bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from different niches (Crispie et al. 2005; Cao et al. 2007). In contrast, the host specificity and ecological niche specificity has been shown by different research groups (Ocaña et al. 1999; Otero et al. 2006; Zoetendal et al. 2006). In this work, the effect of intramammary inoculation of a lactobacilli strain isolated from bovine milk on the epithelial tissue of the udders was determined. The preliminary results obtained in this work show that *Lb. perolens* CRL 1724 did not cause damage in the epithelium cells.

Differences between epithelial tissue sections of the cistern of the udder from inoculated and non-inoculated quarters were observed. Neutrophils were observed close to the epithelium and together with hyperaemia of blood vessels denoted a mild inflammatory reaction. In this connection Crispie et al. (2008) showed that administration of the lactococcal culture into the mammary glands of uninfected animals elicited an immunomodulatory effect, with substantial recruitment of polymorphonuclear lymphocytes to the infused quarters and concluded that the mechanism by which the live culture can provide host protection against mastitis infection may be associated with its ability to elicit a rapid immune response. In addition, Beecher et al. (2009) obtained a massive immune response, with an increase in pro-inflammatory genes as IL-1b, IL-8 and CXCR1, after inoculation of a strain of *Lc. lactis* in lactating cows and argued that this result may be one of the immunomodulatory mechanisms by which the bacterium confers its therapeutic effect. On the other hand, according to Sordillo & Streicher (2002) the mammary gland is protected by a variety of defence mechanisms and one of them is innate immunity. This mechanism is mediated by the physical barrier of the teat end, macrophages, neutrophils, natural killer (NK) cells, and certain soluble factors, and if these function adequately, most pathogens are readily eliminated within a short

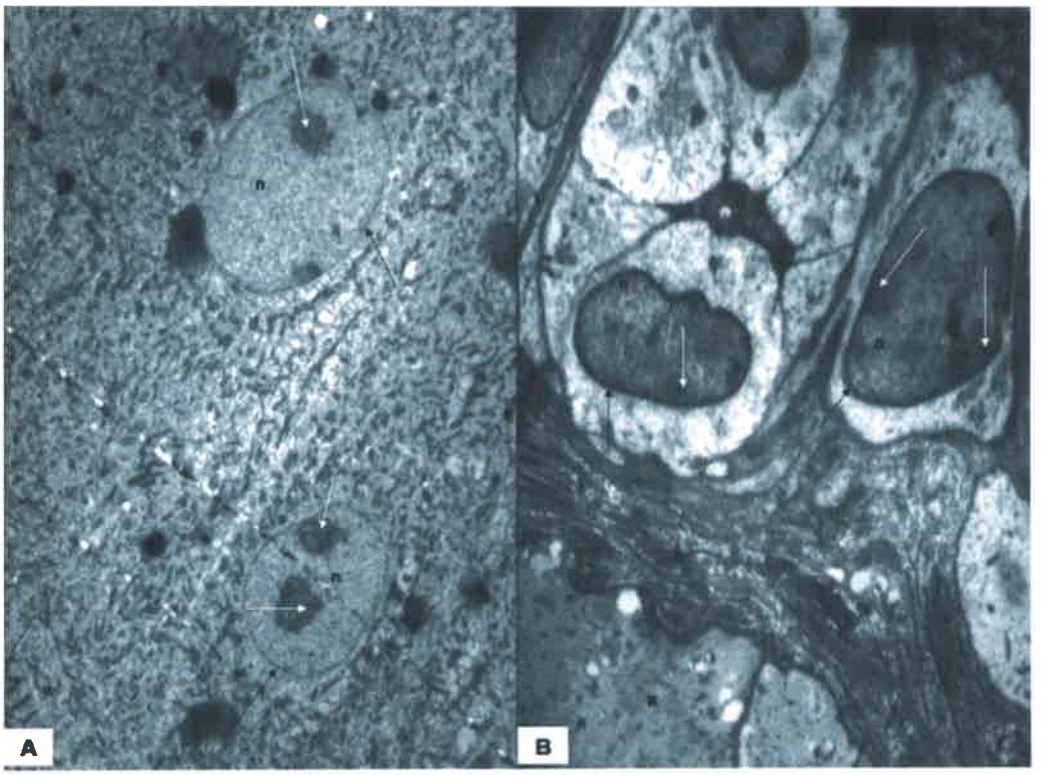


Fig. 3. Transmission electron micrographs showing representative sample of teat canal epithelial cells after intrammamary inoculation with *Lactobacillus perolens* CRL 1724 (a) non-inoculated, nucleus (n), nucleolus (white arrows) and nuclear membrane (black arrows) of epithelial cells (4000×). (b) epithelial cells of inoculated quarter with nucleus (n), nucleolus (white arrows) and membrane nuclear (black arrows) without modifications (6000×). (K): Keratin.

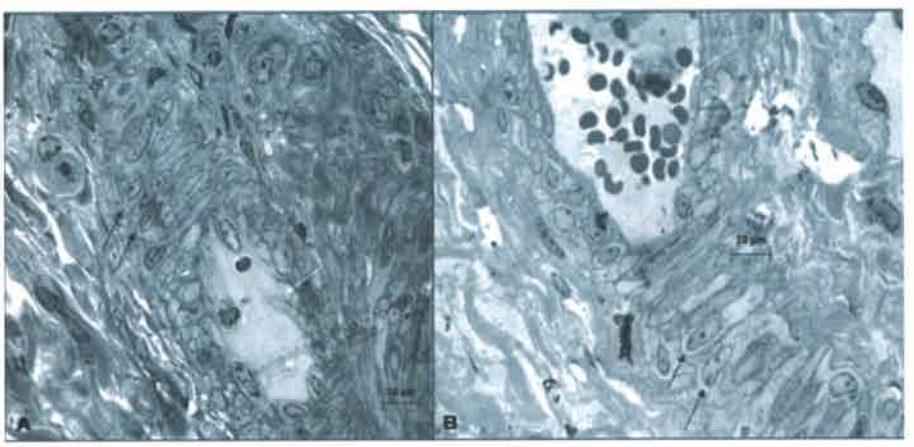


Fig. 4. High resolution optical microscope photographs showing toluidine blue stained of representative sample of tissue cells of bovine mammary gland cistern after intrammamary inoculation with *Lactobacillus perolens* CRL 1724. (a) non-inoculated, mammary cells (black arrows) and blood vessel with scarce presence of blood cells (white arrow) (100×). (b) mammary tissue cells of inoculated quarter without morphological modifications in nucleus, nucleolus or membrane nuclear (black arrows); full blood vessel (white arrow) (100×). The bar in each panel is equivalent to 10 μm.

period of time and before the specific immune system is activated.

Adhesion to epithelial cells is an important step in both pathogenic infection and probiotic colonization of different mucosal surfaces such as gastrointestinal, urogenital and respiratory tracts. Adhesion of probiotic microorganisms to the mucosa and the antagonism against pathogens by interference mechanisms have been related to many of the

health benefits attributed to probiotics. In consequence, the ability to adhere to epithelial cells is considered an important criterion for in-vitro selection of probiotics (Morelli, 2000).

Several studies have suggested that *Lactobacillus* adherence is mediated by proteins associated to the external protein S-layer (Henriksson et al. 1991; Frece et al. 2005) while others have suggested a role for lipoteichoic acid and carbohydrate (Chan et al. 1985). Zárate & Nader-Macias (2006) argue that the adhesion to epithelial cells by pathogens is considered an important prerequisite for the onset of infections in the different tracts and that it is the first step in the colonization of the vaginal surface by probiotic microorganisms. Chan et al. (1985) and Reid et al. (1987) affirm that this 'anti-infective' mechanism may involve the blockage of pathogen adherence by both steric hindrance and competition for receptors in the urogenital tract. Bernet et al. (1994) reported that adherent lactic acid bacterial strains may hinder the cell association and invasion by bacterial pathogens and explained such inhibitory effects of lactobacilli by a mechanism of non-specific steric hindrance on the receptors for pathogens. Other reports also showed that lactic acid bacterial strains with adhesion ability may hinder the contact between the epithelial cells and the pathogenic bacteria (Hudault et al. 1997; Coconnier et al. 2000). In consequence, when selecting lactobacilli for probiotic purposes, the adherent strains are preferred in order to form a film on the epithelial tract as a biological barrier against colonization of pathogenic bacteria.

In this work, bacteria on the epithelial tissue surface of inoculated cistern were observed, but no bacteria were observed in the epithelial tissue sections obtained from teat canal. This absence may be due to the keratin layer that coats the canal tissue and would prevent bacterial adherence to the epithelial surfaces as reported by Sandholm & Korhonen (1995). No inoculated samples of both cistern and canal were free of bacteria.

Lb. perolens CRL 1724 (10^6 cfu/ml) did not cause structural or morphological modifications, lesions or necrosis in the epithelial tissue cells of canal and cistern of bovine mammary gland. These observations suggest that intramammary inoculation of *Lb. perolens* CRL 1724 does not produce any damage to the epithelial cells covering the bovine mammary gland tissue studied. This condition, together with the mild inflammation observed at cistern tissue is a promissory result for inclusion of *Lb. perolens* CRL 1724 in a probiotic formulation.

Conclusions

In conclusion, our preliminary results show that *Lb. perolens* CRL 1724 could adhere in vivo to mammary gland cistern of non-lactating cows and generate a mild inflammatory reaction, characterized by the presence of neutrophils in the area close to the epithelia, without causing structural or ultrastructural modifications, lesions or necrosis in tissue cells of bovine mammary gland teat canal and cistern. This study provides important information for further studies directed towards including *Lb. perolens* CRL 1724 in the design of a probiotic product for preventing bovine mastitis in non-lactating dairy cows.

This work was supported by SECYT-UNRC, MINCYT Córdoba PID280. These are the results obtained from the project 'Design of a probiotic product for bovine mastitis prevention' signed between CONICET and UNRC Res. 2907. Ignacio Daniel Frola is recipients of a fellowship from Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

References

Beecher C, Daly M, Berry DP, Klostermann K, Flynn J & Meaney W 2009 Administration of a live culture of *Lactococcus lactis* DPC 3147 into the bovine mammary gland stimulates the local host immune response, particularly IL-1 and IL-8 gene expression. *Journal of Dairy Research* **76** 340–348

Bergey DH, Holt JG 1994 *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Baltimore, MD, USA: Lippincott Williams & Wilkins

Bernet MF, Brassart D, Neeser JR & Servin AL 1994 *Lactobacillus acidophilus* LA1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut* **35** 483–489

Both E, Gyorgy E, Kibédi-Szabó CZ, Tamás E, Ábrahám B, Miklóssy I & Lányi S 2010 Acid and bile tolerance, adhesion to epithelial cells of probiotic microorganisms. *U.P.B. Science Bulletin Series B* **72** 37–44

Browning JW, Mein GA, Barton M, Nicholls TJ & Brightling P 1990 Effects of antibiotic therapy at drying off on mastitis in the dry period and in early lactation. *Australian Veterinary Journal* **67** 440–442

Cao LT, Wu JQ, Xie F, Hu SH & Mo Y 2007 Efficacy of nisin in treatment of clinical mastitis in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* **90** 3980–3985

Chan RCY, Reid G, Irvin RT, Bruce AW & Costerton JW 1985 Competitive exclusion of uropathogens from human uroepithelial cells by *Lactobacillus* whole cells and cell wall fragments. *Infection and Immunity* **47** 84–89

Coconnier MH, Lievin V, Lorrot M & Servin AL 2000 Antagonistic activity of *Lactobacillus acidophilus* LB against intracellular *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* infecting human enterocyte-like Caco-2/TC-7 cells. *Applied and Environmental Microbiology* **66** 1152–1157

Crispie F, Flynn J, Ross RP, Hill C & Meaney WJ 2004a Update on the development of a novel dry cow therapy using a bismuth-based intramammary teat seal in combination with the bacteriocin lacticin 3147. *Irish Veterinary Journal* **57** 652–656

Crispie F, Flynn J, Ross PR, Hill C & Meaney WJ 2004b Dry cow therapy with a non-antibiotic intramammary teat seal – a review. *Irish Veterinary Journal* **57** 412–418

Crispie F, Twomey D, Flynn J, Hill C, Ross P & Meaney W 2005 The lantibiotic lacticin 3147 produced in a milk-based medium improves the efficacy of a bismuth-based teat seal in cattle deliberately infected with *Staphylococcus aureus*. *Journal of Dairy Research* **72** 159–167

Crispie F, Alonso-Gómez M, Collette O'Loughlin, Klostermann K, Flynn J, Arkins S, Meaney W, Ross RP & Hill C 2008 Intramammary infusion of a live culture for treatment of bovine mastitis: effect of live lactococci on the mammary immune response. *Journal of Dairy Research* **75** 374–384

Dallard BE, Ortega HH, Iguzquiza IA, Salvetti NR, Quaino OA & Calvinho LF 2010 The effect of a single intramammary infusion of a biological response modifier in cows at drying off. *Veterinary Research Communications* **34** 519–532

Dalton JC 2006 Antibiotic residue prevention in milk and dairy beef. *Western Dairy News* **6** 79

David MZ & Daum RS 2010 Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clinical Microbiology Reviews* **23** 616–687

Derong SYZ & Zhao HY 2010 Prevalence of bacterial infection responsible for bovine mastitis. *African Journal of Microbiology Research* **4** 1110–1116

Espeche MC, Otero MC, Sesma F & Nader-Macias MEF 2009 Screening of surface properties and antagonistic substances production by lactic acid bacterial isolated from the mammary gland of healthy and mastitis cows. *Veterinary Microbiology* **135** 346–357

FAO, WHO 2002 *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. Geneva, Switzerland: Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group

Fetrow J 2000 Mastitis: an economic consideration. In *Proceedings of the 29th Annual Meeting of the National Mastitis Council*, Atlanta: Ga. National Mastitis Council. pp. 3–47. Madison, Wisconsin

Frece J, Kos B, Svetec IK, Zgaga Z, Mrsa V & Suskovic J 2005 Importance of S-layer proteins in probiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiolgy* **98** 285–292

Frola ID, Pellegrino MS, Espeche MC, Giraudo JA, Nader-Macias MEF & Bogni CI 2011 Effects of intramammary inoculation of *Lactobacillus perolens* CRL1724 in lactating cows udders. *Journal of Dairy Research* **78** 1–9

Giraudo JA, Calzolari A, Rampone H, Rampone A, Giraudo AT & Bogni C 1997 Field trials of a vaccine against bovine mastitis. 1. Evaluation in heifers. *Journal of Dairy Science* **80** 845–853

González-Gracia R 2011 La OMS y la FAO quieren mayor vigilancia de los antibióticos para el ganado. Un problema de seguridad alimentaria mundial. http://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/10289/ACTUALIDAD/oms-fao-quieren-mayor-vigilancia-antibi%C3%B3ticos-ganado.html (Accessed 9 December 2011)

Greene WA, Gano AM, Smith KL, Hogan JS & Todhunter A 1991 Comparison of probiotic and antibiotic intramammary therapy of cattle with elevated somatic cell counts. *Journal of Dairy Science* **74** 2976–2981

Grignaschi V, Diaz N, Alonso M, Lardo M & Licero G 1983 Citomorfología y Citoquímica Hemáticas. Edit. Britania. Argentina

Henriksson A, Szewzyk R & Conway PL 1991 Characteristics of the adhesive determinants of *Lactobacillus fermentum* 104. *Applied and Environmental Microbiology* **57** 499–502

Hudault S, Lievin V, Bernet-Camard MF & Servin AL 1997 Antagonistic activity exerted *in vitro* and *in vivo* by *Lactobacillus casei* (strain GG) against *Salmonella typhimurium* C5 infection. *Applied and Environmental Microbiology* **63** 513–518

International Dairy Federation Laboratory 1995 *Milk and Milk Products: Detection of Salmonella*. IDF Standard 93B:1005. Brussels, Belgium

International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals 1985 http://www.cioms.ch/publications/guidelines/1985_text-s_of_guidelines.htm. (Accessed 2 September 2011)

International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) 2009 Probiotics: a consumer guide for making smart choices. http://www.isapp.net/docs/Consumer_Guidelines-probiotic.pdf. (Accessed 8 June 2009)

Klostermann K, Crispie F, Flynn J, Ross RP, Hill C & Meaney W 2008 Intramammary infusion of a live culture of *Lactococcus lactis* for treatment of bovine mastitis: comparison with antibiotic treatment in field trials. *Journal of Dairy Research* **75** 365–373

Larsen MW, Moser C, Hoiby N, Song Z & Kharazmi A 2004 Ginseng modulates the immune response by induction of interleukin-12 production. *Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica* **112** 369–373

Lebeer S, Verhoeven TLA, Perea-Vélez M, Vanderleyden J & De Keersmaecker SCJ 2007 Impact of environmental and genetic factors on biofilm formation by the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Applied and Environmental Microbiology* **73** 6768–6775

Morelli L 2000 In vitro selection of probiotic lactobacilli: a critical appraisal. *Current Issues in Intestinal Microbiology* **1** 59–67

National Mastitis Council 2004 *Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality*. Fourth Edition. Inc., Arlington, VA, USA, pp. 1–47.

Nader-Macías MEF, Ocaña VS, Juárez Tomás MS & Silva de Ruiz C 2007 In *Fundamentos Biológicos, Procesos y Biotecnología de Bacterias Lácticas* (Ed. G Pérez Martinez). España: CSIC

Ocaña VS, Bru E, Ruiz Holgado A & Nader-Macías ME 1999 Surface characteristics of lactobacilli isolated from human vagina. *Journal of General and Applied Microbiology* **45** 203–212

Osset J, García E, Bartolomé RM & Andreu A 2001 Role of *Lactobacillus* as protector against vaginal candidiasis. *Medicina Clínica* **117** 285–288

Otero MC, Morelli L & Nader-Macías ME 2006 Probiotic properties of bovine vaginal lactic acid bacteria to prevent metritis. *Letters in Applied Microbiology* **43** 91–97

Otero MC & Nader-Macías ME 2007 *Lactobacillus* adhesion to epithelial cells from bovine vagina. In *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. pp. 749–757. (Ed. A Méndez-Vilas). Badajoz, Spain: Formatex

Pellegrino M, Giraudo J, Raspanti C, Odierno L & Bogni C 2010 Efficacy of immunization against bovine mastitis using a *Staphylococcus aureus* avirulent mutant vaccine. *Vaccine* **28** 4523–4528

Pereira U, Oliveira D, Mesquita L, Costa G & Pereira L 2011 Efficacy of *Staphylococcus aureus* vaccines for bovine mastitis: A systematic review. *Veterinary Microbiology* **148** 117–124

Reid G, Cook R & Bruce A 1987 Examination of strains of *lactobacilli* for properties that may influence bacterial interference in the urinary tract. *Journal of Urology* **138** 330–335

Ryan MP, Flynn J, Hill C, Ross RP & Meaney WJ 1999 The natural food grade inhibitor lacticin 3147 can prevent mastitis in non-lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* **82** 2625–2631

Sandholm M & Korhonen H 1995 Infection of the udder-Udder inflammation. In *The Bovine Udder and Mastitis*. pp. 37–48. (Ed. M Sandholm). Helsinki: University of Helsinki Press

Sordillo LM & Streicher KL 2002 Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* **7** 135–146

Twomey DP, Wheelock AI, Flynn J, Meaney WJ, Hill C & Ross RP 2000 Protection against *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cows using a bismuth-based teat seal containing the bacteriocin, Lacticin 3147. *Journal of Dairy Science* **83** 1981–1988

Viguier C, Arora S & Gilmartin N 2009 Mastitis detection: current trenes and future perspectives. *Trends Biotechnology* **27** 486–493

Walsh MC, Gardiner GE, Hart OM, Lawlor PG, Daly M & Lynch B 2008 Predominance of a bacteriocin-producing *Lactobacillus salivarius* component of a five-strain probiotic in the porcine ileum and effects on host immune phenotype. *FEMS Microbiology Ecology* **64** 317–327

Zárate G & Nader-Macias ME 2006 Influence of probiotic vaginal lactobacilli on in vitro adhesion of urogenital pathogens to vaginal epithelial cells. *Letters in Applied Microbiology* **43**(2) 174–180

Zoetendal EG, Vaughan EE & de Vos WM 2006 A microbial world within us. *Molecular Microbiology* **59** 1639–1650

In: Bioactive Compounds
Editor: A. Bitterlich and S. Fischl, pp.

ISBN 978-1-61324-865-2

Chapter VII

Alternative Approaches for the Prevention of Bovine Mastitis. Probiotics, Bioactive Compounds and Vaccines

María Elena Fátima Nader-Macías[1,*], Cristina Bogni[2], Fernando Juan Manuel Sesma[1], María Carolina Espeche[1], Matías Pellegrino[2], Lucila Saavedra[1], Ignacio Frola[2]

[1]CERELA-CONICET. Chacabuco 145. 4000. Tucumán. Argentina
[2]Department of Microbiology and Immunology, Universidad Nacional de Rio Cuarto. Ruta 36 Km 601, 5800 Río Cuarto, Córdoba. Argentina

Abstract

Bovine mastitis (BM), both clinical and subclinical, is the most important infectious disease in the dairy farm, and basically affects the quality and the quantity of milk production. They are responsible for the major economic losses in the dairy farm due to treatment, veterinary service, animal replacement, discarded milk and mainly reduced milk production. The main causative microorganisms are *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* and *Escherichia coli*. Even though, current practices as proper milking hygiene and reduced exposure to pathogens contributes to decrease the occurrence of the disease, the treatment for BM relies heavily on the use of antibiotics, both for prophylaxis and therapy. These treatments have proved to be frequently ineffective to control cronic mastitis, causing a persistent bacterial reservoir within a herd with recurrent infections and the culling of infected animal from the productive circuit. During the last decades, world tendency to limit the use of antibiotics in dairy cattle, has lead researchers toward the study of cows

* Corresponding author: CERELA-CONICET, Chacabuco 145. 4000. San Miguel de Tucumán. Argentina. E-mail: fnader@cerela.org.ar.

natural defence mechanisms in order to ensure their absence in dairy products with the aim of satisfy consumers demand for "organic products". At the same time, the increase of functional products or "health-preventing foods" consumption supports the need to increase some other aspects of the animal welfare and breeding. Alternatives approaches are being applied for the prevention of this disease and highly promoted, that includes the application of vaccines, the use of probiotics or beneficial microorganisms, their metabolic products as organic acids and hydrogen peroxide, antimicrobial peptides, and/or other more physiological treatments.This chapter reviews the last advances in this area, the rational to support each one of the preventive applications, together with the products available in the international market. Also, the clinical trials supporting the use of the different approaches are included, to encourage the advances and studies in this area. In this way, is possible to help to the control of mastitis, the improvement of the health status of the animals, and in this way in the milk production.

Introduction

Bovine milk and dairy products have very long traditions in human nutrition. There is no doubt that all the components of milk provide a fundamental source of energy and nutrients to rapidly growing infants or adults. Milk components take part on human metabolism in several ways, providing essential aminoacids, vitamins, minerals and fatty acids, or by affecting absorption of nutrients. Consumption of 0.5 liter milk daily supplies a significant amount of many of the nutrients that are required daily (Haug et al., 2007).

The consumption of milk and milk products vary considerably among regions, and depend basically of the main animal species available in the specific geographical areas. But in the case of bovine milk, the drinking milk range from about 180 Kg yearly per capita in Island and Finland to less than 50 Kg in Japan and China. There are broad differences between the developing regions and developed countries, and also between urbanized areas. In south and south west Asia the milk consumptions has increases substantially to ten times higher in the last years (FAO, 2009). Brazil also has experiences a rapid expansion in the consumption of milk that has increased around 40%. According to the opinion of international and national market experts, the milk consumption will continue growing, and this will be higher than the offer. This higher demand is supported by the economic growth of western countries, as China and India, which even thought they have a higher production, they cannot self-sufficient, and by the higher urbanization of many Asiatic towns. The decrease of grants for the milk production in some countries as United States, Canada and UE, and the lower number of countries that produce milk in ecological conditions becomes Argentina in one of the countries with higher growth potential in the area (FAO, 2009).

Bovine milk is a complex food with a long list of components (lipids, proteins, aminoacids, vitamins, minerals, immunoglobulins, hormones, growth factors, cytokines, nucleotides, peptides, polyamines, enzymes and other bioactive peptides) which may have negative or positive health effect, and can be altered by many factors, including the animal-feeding regime (Lönnerdal, 2003). It is also important to consider that the association between food and health is well established, and recent studies have shown that modifiable risk factors seem to be of greater significance for health than previously anticipated (Haug et

al., 2007). Many consumers are highly aware of the health-properties of food, and the market for healthy food and food with special health benefits is increasing.

The higher level of consumption of milk and milk based products with health properties, has been also supported by their lower cost originated by different sources of global changes, as the increase of production, the lower cost of the inputs, the technological changes and the higher scale efficiency. These technological changes are related with the advances and innovations in all the aspects of the animal production (breeding, food, health-related aspects) and also to the products release into the market (elaboration, transport and marketing). The application of modern technologies for growth and feed has originated an increase in productivity, supported mainly by the intensive animal breeding in feedlots where the farmers face a number of challenges to improve the sustainability of the system (FAO, 2009). In highly competitive times, farmers need to remain profitable whilst producing high quality, safe, nutritious and enjoyable foods at the same time as reducing the negative impacts of livestock farming on the environment (greenhouse gases, ammonia, nitrate pollution of water, odor nuisance) and also respond to societal concerns about the welfare of farmed animals. Improvements achieved through animal breeding are arguably the single best way to improve the sustainability of animal agriculture with the added benefit that the improvements made are cumulative and permanent. In the same way, the market is being more competitive and highly strict in terms of warranty of safety, environmental sanitation, and animal welfare, with a higher worth of some specific attributes of the products (natural, functional foods, with identity etc.).

Animal breeders have made considerable progress in recent decades in improving the economic efficiency of milk production, and probably this is one of the reasons of the fall of the real price of milk, but in recent years, animal breeding has become more complex with breeders needing to broaden their breeding objectives. Nowadays breeders want to improve a wide range of traits, such as product quality, welfare related fitness traits and disease resistance. Many of these traits are difficult or expensive to measure. And also the maintenance of animals in intensive-production feedlots and the current milking machines, together with a long list of factors, shows the importance of the emergency of many syndromes, as for example, cow mastitis.

Bovine Mastitis

Mastitis is an infectious bacterial disease which causes inflammation of the mammary gland, and is the most frequent disease of dairy cows, far ahead of feet and leg or metabolic disorders. This causes discomfort to the animal, makes milking difficult and reduces the yield and quality of milk and increases the rate of culling and veterinary costs (Miles et al., 1992; Calvinho, 1999; Bradley, 2002; Seegers et al., 2003; Halasa et al., 2007). Also reduces the profitability of farm milk production, but the calculation of the extent of this economic loss is complex because of the many factors involved and deficiencies in the evidence on the relationship between the disease and various production factors. The quantitative effects of mastitis on dairy cow performance are not easy to assess. These effects, however, have great economic consequences mainly because direct production losses must be considered along

with milk withheld from the market following medicinal treatments, the cost of treatments, and various other costs, including additional labor and increased milling time (Miles et al., 1992; Seegers et al., 2003; Halasa et al., 2007)

Economic calculation of the mastitis costs or economic implications vary between countries and even between regions within the country. The results of these calculations change with time, based on the modifications of the milk quality regulations and market circumstances (Lescourret et al., 1994). There are not recent data available, but some reports have estimated that mastitis infections affected 30% of dairy cattle and cost the EU dairy industry about €1.55 billion in 2005. In 2005 there were nearly 23 million dairy cattle in the EU, producing over 500 million tones of milk. Over 600,000 people were involved in the dairy industry which has a turnover of €117 billion (SABRE, 2006). According to older data, the average cost of mastitis in the New York State is found to be $125 per cow from reduced milk production, treatment, and increased culling. At the 1988 cow inventory, this translates to approximately $100 million annually for the entire dairy farm sector. When quality and production losses for the processing sector are added, the cost to the New York industry alone is nearly $150 million annually (Miles et al., 1992; Halasa et al., 2007).

In Argentina, there are not recent data available on the economical implications of mastitis. According to the 1970´stimations, the annual losses produced only by the decrease in milk production were around U$S 115 millions, while in the 80´s were higher than U$S220 million (Calvinho and Tirante, 2005). Taking into account that the milk production has increases in the last decade, being Argentine the 16th producer country with 10325462 million tons, according to the FAOSTAT report the economical implications of mastitis is really surprising.

The cited data represent only some of the evaluations published. A revision performed by Halasa et al. (2009) explain the long list of economic factors associated with mastitis, and perform a comparative study of the papers published from 1990 on the economics of mastitis and management, showing a very large variation between them. It is clear from these data that the dairy sector is very important to the agricultural output of many countries and that any problem which harms milk production can negatively affect a lot of people and animals. In some way mastitis affects also the animal fertility, which is important for sustainable livestock production. Infertile dairy cattle, for example, are not cost-efficient as they need to regularly deliver a calf in order to maintain high milk yield. There has been a decline in fertility in recent years, probably in part due to side effects of selective breeding for increased milk production (Hansen et al., 2004; Vangroenweghe et al., 2005; Nava-Trujillo et al., 2010).

The data cited before evidence the importance of mastitis in the field of milk production worldwide. Mastitis remains a major challenge to the worldwide dairy industry despite the widespread implementation of mastitis control strategies. It is estimated that since 1970 the farms that have followed the recommended control procedures have reduced the average annual number of cases of clinical mastitis from 135 to 40 cases/100 cows each year, while the quarters remaining uninfected for a whole year has increased from 65 to 80% of the total quarters. The costs of the main control procedures are broadly covered by the reduction in clinical mastitis, leaving the benefits of reduced subclinical infection. Also is interesting to consider that even though in the last forty years have seen a dramatic decrease in clinical

mastitis incidence, this has been also accompanied by a change in the relative and absolute importance of different pathogens.

Mastitis Related Pathogens

The microorganisms that cause mastitis in dairy cows live in the udder and its surroundings. They are usually bacteria, but it is also possible to isolate mycoplasma, yeasts, algae and fungi, either. Over 140 infectious agents have been associated with clinically apparent episodes of mastitis, but the vast majority of cases are due to infection with a few types of bacteria (staphylococci, streptococci and several Gram-negative species (O'Grady and Doherty, 2009). These infectious agents fall into three categories (Table 1), and can be isolated by conventional cultivable techniques, or either by genetic identification of the microorganisms (Reinoso et al., 2004, 2008, Taponen et al., 2007).

a) *Contagious bacteria:* classified according to the pathogens inflammatory reaction in *major* and *minor* pathogens. The common contagious bacteria are *Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae*, known as major pathogens *and Corynebacterium bovis* considered as minor pathogen. These pathogens are adapted to survive in the udder and are able to developed clinical, subclinical and long last period (chronic) infections. The reservoirs of these pathogens are the infected quarters and the transmission occurs mainly during milking, by their presence in the milking machines, washing water or hands of the operators.
b) *Environmental bacteria:* are commonly present in the cow's environment and may reach the teat end from that source. They cannot be removed from the environment, and although they can move from one quart to another, this route of transmission does not contribute to the development of new infections. The largest number of new infections with these organisms occurs in the dry period and around delivery. The main environmental bacteria associated with mastitis are streptococcus spp and coliform (Table 1). Approximately 40-50% of streptococcal infections and 80% of coliform infections can result in clinical mastitis. *S. uberis* is found in the udder, in the intestine, and on the cow's skin and teats. The particularity of the *S. uberis* is its extraordinary ability to develop in an external environment, i.e. in the bedding or anywhere on the animals. The contamination can take place during milking or in the environment (Odierno et al., 2006).
c) *Other pathogens:* Several types of bacteria commonly found in the udder are considered opportunist pathogens. These include a group of staphylococcal species, named coagulase negative *Staphylococcus* (CNS). These species have gained importance in recent years and are currently prevalent in infected glands and may cause an increase of two or three times the SCC. Mastitis caused by CNS usually remains sub clinical or mildly clinical, but may slightly decrease milk production.

Table 1. Bovine mastitis infectious microorganisms

Contagious bacteria	Environmental bacteria	Others pathogens
Staphylococcus aureus	*Escherichia coli*	*Coagulase-negative*
Streptococcus agalactiae	*Klebsiella spp.*	*staphylococci (CNS)*
Corynebacterium bovis[*]	*Citrobacter spp.*	
	Enterobacter spp.	
	Streptococcus uberis	
	Streptococcus dysgalactiae	
	Streptoccocus spp.	
	Enterococcus faecalis	
	Enterococcus faecium	

[*] *Corynebacterium bovis,* classified as minor pathogen, can disseminate cow to cow.

The impact of pathogens on milk quality and productivity and cow health vary considerable among the different countries and through out a period of time. The incidence of the different microorganisms is constantly modifying. This variation is mainly related to the implementation of mastitis prevention programmes. As prevalence of major pathogens decrease, the relative importance of other organism increase. In some European countries (Belgium, Norway and U.K), control programs for contagious mastitis have been developed for decades, resulting in a decrease in occurrence of *S. agalactiae* (sporadic occurrence) and *S. aureus* mastitis and an increase of *S. uberis* and *Escherichia coli* mastitis. On the other hand, in America, i.e. in Brazil the prevalence of S. *agalactiae* is 60% of herds positive during 2004 and *S. aureus* remains being the main pathogen associated with clinical mastitis in several countries as The Netherlands, and Southern countries as Argentina, where the prevalence of IMI associated with *S. aureus* was 20%.

During the last decade's, the genomic information on pathogens have improved the knowledge and strain adaptation to human and bovine hosts has been recognised. Molecular epidemiological studies of bovine mastitis pathogens allowed a better knowledge of infective strains distributions in dairy herds. These developments contribute to novel approaches in formulating strategies to bovine mastitis control.

The global dairy industry, the predominant pathogens causing mastitis, our understanding of mastitis pathogens and the host response to intramammary infection are changing rapidly. Globalization, energy demands, human population growth and climate change all affect the dairy industry. And in this way, mastitis can be considered a complex syndrome, where there are long lists of factors that have positive or negative incidence in the production or in the prevention, as summarized in Figure 1.

Preventive Control Strategies

Control methods to reduce mastitis in dairy herds must be directed to decrease the exposure of the teat ends to contagious pathogens (Smith and Hogan, 1997). This can be achieved by reducing the spread from cow to cow during the milking operation, eliminating

the reservoir of the pathogens in the dairy herd and/or working on the genetic selection of dairy cattle resistant to mastitis (Gonzalez et al. 1993).

The conventional methods of controlling mastitis are based upon adoption of preventive control strategies including diagnosis, segregation of the animals and the use of improved hygiene and therapeutic protocols. These strategies are summarised in the "Five Point Plan" proposed for the National Mastitis Council (2004). The main objective of this plan is to reduce the degree and the durability of the infection. The "Five Point Plan" encloses:

1) *The use of measures to improve the milking routine*
   - Correct use of milking equipment and its periodic evaluation
   - Clean and dry the teats before milking
   - Teat disinfection pre and post milking (pre-dipping and teat-dipping)
   - Washing and disinfection of the milking machine and the production line before and after milking
2) *Quarters antibiotic treatment at the dry period:* Dry cow therapy continues to be effective in reducing the number of both contagious infections during the dry period and in preventing environmental streptococcal infections that can also occur in the early dry period.

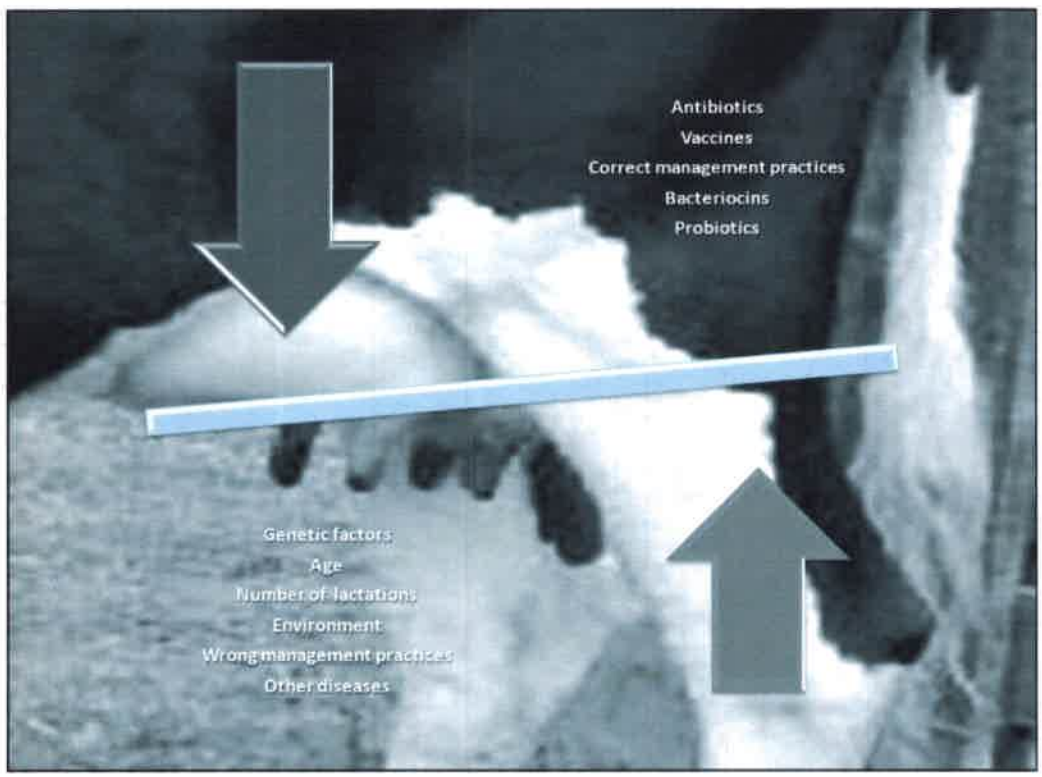


Figure 1. Different factors that affect the health status of the mammary gland, and to mastitis.

3) *Clinical bovine mastitis treatment:* Before clinical bovine mastitis treatment, the selection of an initial treatment regimen should be based upon historical microbiological cultures and antibiotic-sensitivity results, severity of infection and documented success of previous treatments. Antibiotic treatment of subclinical mastitis during lactation is not cost effective and this practice increases the opportunities for drug residues in milk. According to the Food and Drug Administration/ Center for Veterinary Medicine (http://www.fda.gov/ AnimalVeterinary) the approved antibiotics for the treatment of bovine mastitis are: Pirlimycin, Hetacillin, Cloxacillin, Amoxicillin, Novobiovin, Penicillin G, Dihydrostreptomycin, Cephapirin and Erythromycin. The choice of the antimicrobial agents and the route of administration will be directed by the characteristics of the drug and regulatory issues.
4) *Replacement of cows with chronic mastitis*
5) *Vaccination plan*: These control strategies have proved to decrease *St. agalactiae* and *St. dysgalactiae* bovine mastitis. Even though these control strategies contribute to a decrease in the occurrence of the disease, the treatment for bovine mastitis still relies heavily on the use of antibiotics, both for prophylaxis and therapy (Mc Dougall et al., 2009). The prevention of bovine mastitis by using antibiotics at the dry period have demonstrated that this practice eliminates up to 80% of new infections caused by different pathogens during the dry period, but is not completely effective in animals infected with *S. aureus*. Less than 15% of the dairy cows infected with *S. aureus* respond to the antibiotic therapy. This is due to the poor penetration of the drug in the mammary gland that originated that a significant survival percentage of bacteria in the host cells that increase the recurrent infections after the treatment (Yancey et al., 1991). For this reasons, the use of antibiotics is ineffective for the control of *S. aureus's* chronic and recurrent infections within a herd. While antibiotics have had a major impact on health of dairy cows and consequently in the production of milk, its use is very questioned because of the possibility of producing anaphylactic reactions in consumers due to the presence of traces of antibiotics in milk for human consumption (Errecalde et al., 2004). In addition, during the last few decades, the global pressure to limit the use of antibiotics in dairy cattle has lead researchers to focus on cows' natural defence mechanisms in order to reduce potential for antibiotic residues and in this way to support their absence in dairy products with the aim to satisfy consumers demand for "organic products".

E.1. Vaccines

Several studies aimed at preventing bovine mastitis are primarily focused at the first step of the innate immune response, and to obtain its high stimulation. One of the component of this immune response is the migration of large numbers of white blood cells (in the udder called somatic cells) to the infected gland, but the presence of somatic cells in the milk is not considered a positive outcome, as somatic cells are evidence of mastitis and reduce milk quality. Effective immunization is difficult because of the nature of milk. For this reason, the

immunization schedule employed for the prevention of this disease should promote the migration of neutrophils to the site of the infection through the production of inflammatory mediators and should stimulate in this step the production of specifics antibodies for the opsonization of bacteria. This preventive method must also promote neutrophils phagocytosis, the neutralization of toxins and at the same time induce bacterial cell lysis (Tenhagen et al., 2001). Both, the level of antibodies and the number of neutrophils are low in healthy mammary glands. Because a large number of these cell types are required ($9x10^5$/ml) to prevent the intrammamary infections, and having in mind that this value exceeds the number present in a healthy gland, the emphasis of prevention methods is mainly directed to increase the opsonics antibodies in milk, and to reduce the number of neutrophils needed to protect the gland (Sear et al., 2004). Vaccination is one of the main strategy to control mastitis, as its principal objective is to increase the concentration of opsonics antibodies in blood and milk against a particular microorganism to inhibit their growth and toxin production.-

Since the disease was first diagnosed, veterinarians and dairy herd's producers claim for the development of an efficient vaccine against bovine mastitis. The main obstacles to achieve this objective are the large number of microorganisms (bacteria, viruses, fungi) involved in the production of the disease, to an incomplete knowledge of the mammary gland's immunity and the virulence factors of the main pathogens, the failure to maintain a high level of immunoglobulins in milk and the lack of proper vaccination schedule.

In recent years, significant progress has been performed in the development of vaccines against some microorganisms that cause mastitis. Perhaps the greatest progress has been achieved by the use of vaccines against *E. coli* from which the best known and widely used are the mutant bacterin (J5 strain) against *E. coli* infection currently available in several countries including U.S., France and Denmark, among others (Table 2). This vaccine showed to reduce the duration and severity of the symptoms of clinical mastitis after challenge with a virulent strain of *E. coli*.

Mastitis caused by coliforms (*E. coli, Klebsiella spp.* and others) is usually of short duration and <15% of affected animals usually develop chronic infections. Coliform mastitis is generally clinical and many affected animals exhibit systemic signs of disease. The clinical symptoms associated with coliform infections are the result of endotoxin released from the cell wall of dying gram-negative bacteria. There is rarely a long-term impact of coliform infections on SCC. Losses attributable to coliform mastitis are associated with the clinical episode and are the result of reduced milk yield, discarded milk, treatment costs, death and culling. The highest risk period for coliform mastitis is during the immediate periparturient period. Therefore, a vaccine may be judged effective if it successfully reduces symptoms of coliform mastitis during this limited "at-risk" period.

For many years, the main cause for mastitis in dairy cows was identified as *S. aureus, St. agalactiae* and *St. dysgalactiae*. The presence of these species is generally due to deficiencies in the progress of hygiene in milking and dry cow routines. Although control recommendations have effectively reduced the incidence of mastitis due to these contagious pathogens, they have had little impact on the incidence of mastitis caused by environmental pathogens such as *St. uberis*. The first indication that supports vaccination against *St. uberis* was the demonstration that previous exposure could provide some resistance to infection. Sense that many research have been conducted to developed a *St. uberis* vaccine (Table 2)

One of the most frustrating mastitis pathogens is *S. aureus*. This organism is a highly successful mastitis pathogen that it has evolved to produce infections of long duration with limited clinical signs. Most infections with this pathogen are subclinical and are detected by the production of poor quality milk. While clinical mastitis may occur sporadically, affected animals rarely become seriously ill and the major economic effect of this disease is reduced milk yield and quality premiums received by the producer. Animals are at risk for this organism throughout lactation and often becoming infected after prolonged periods of exposure.

S. aureus vaccines currently available or under study, point not only to reduce the frequency and severity of clinical mastitis, but also to eliminate chronic mastitis and prevent the establishment of new IMI. Several research works are conducted to avoid *S. aureus* bovine mastitis by using vaccines made on the base of wall cellular component, capsular exopolisacarides, bacterins and DNA technology. Many of them, mainly those that are the result of studies of the last two decades are summarized in table 2, where also is included some data of the specific clinical or experimental trials. Even though these vaccines increased the level of specific antibodies in blood, the levels reached in milk are very low and it is very difficult to prevent new infections and to induce both humoral and cellular immune response. The use of attenuated vaccines could enhance both cellular and humoral protective responses, simulating natural infection without causing the disease. Also, attenuated vaccines may contain native antigens (proteins, polysaccharides, lipids, nucleic acids, etc.) that are expressed for extended periods of time and simulates natural infection, as resumed in Table 2.

E.2. Novel Preventive Approaches for the Treatment of Mastitis

Probiotics, Bioactive Peptides and Bacteriocins

During the last years, there is an increasing tendency and recommendation of all the governmental and regulation organisms on the need to apply preventive strategies in all the human and animal areas. In this way, the use of different and novel preventive approaches are being suggested and assayed, which includes the use of probiotic microorganisms or some of the metabolic or bioactive compounds they are able to produce.

Probiotics are "*live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host*" (FAO-WHO, 2002). These products have been aimed at both the health of man and animals. Most studies published to date have focused mainly on studying probiotics for the prevention of infections in the gastrointestinal tract. However, any part of the body with a normal microbiota could be a potential target for specific probiotics (Ouwehand et al., 2002).

The progressive decrease in the use of antibiotics as growth promoters increased the interest in the use of beneficial microorganisms in animal feed. These veterinary probiotics improve the health status, increase the weight gain and inhibit pathogens (Guillot, 2003; Ewaschuk et al., 2004; Draksler et al., 2004, Isolauri et al., 2004, Weese and Rousseau, 2005; Anadón et al., 2006, Nader-Macías et al., 2008, Azad and Al-Marzouk, 2008, Simpson et al., 2009; Herstad et al., 2010). Recently, the target of these products was extended to the bovine reproductive tract in order to prevent metritis and also to the mammary gland to prevent

mastitis. Both of them are diseases that affect reproduction and productivity in the dairy herd and are responsible for important economic losses (Otero et al., 1999, 2006, Nader-Macías et al., 2008; Espeche et al., 2009). Lactic acid bacteria, bifidobacteria, spore-forming bacilli and yeast have been described as probiotic to date. However, lactic acid bacteria are the main group because they have been included in the GRAS (Generally Regarded as Safe) or Food-Grade Microorganisms (FGM) cathegories. Some specific species are being also included in the list of QPS microorganisms (qualified presumption of safety).

Mechanisms of Action of Probiotic Microorganisms

Probiotics may exert their beneficial effects on the host health by different and several mechanisms: adhesion to epithelial cell, colonization, biofilm formation, production of biosurfactants, aggregation and coaggregation, production of antagonistic metabolites (organic acids, hydrogen peroxide, bacteriocins), competition for nutrients, production of enzymes and/or immune system modulation. It is likely that microorganisms may exert their effects as the result of one or more of these mechanisms, as explained later.

a) *Adhesion and colonization:* adhesion to epithelial cells is a prerequisite for colonization and therefore to the probiotic action. Adherent bacteria may persist longer and thus are more likely to exert its effect compared with those non-adherent microorganisms. This property can also block the adhesion of pathogens to the epithelium, as a result of competition for the same receptor, or by steric blockage. Also, adhesion to the intestinal mucosa could modulate the immune system. In an initial step, the process is reversible and is based on non-specific interactions. Later it includes specific interactions between adhesins and surface receptors and the formation of a biofilm that protects against the entry of pathogens (van Loosdrecht et al., 1990, Saarela et al. 2000; Ouwehand et al., 2002; Kubota et al., 2008; Vesterlung et al., 2005 and 2006, Oelschlaeger, 2010, Eberl et al., 2010).
b) *Production of biosurfactants:* surfactants are amphiphilic substances capable of reducing surface tension. Their physiological function is to increase the solubility of hydrophobic compounds or metal binding that affect the bacterial aggregation and adhesion, and in this way the degree of pathogenesis. They also act as signaling molecules in quorum sensing and biofilm formation. In addition, these products have antimicrobial properties and inhibit the adhesion of some specific species such as *Enterococcus faecalis, Str mutans, E. coli, S. epidermidis* and *Candida albicans* (Ron and Rosenberg, 2001, Salminen et al., 2004; Golek et al., 2009; Gudiña et al., 2010).
c) *Aggregation and coaggregation*: both properties are required for the persistence of the microorganism in the epithelium. Aggregation involves the interaction between two organisms of the same species, whereas the coaggregation represents the interaction between microorganisms of different species. The aggregation of the beneficial bacteria can promote adhesion and biofilm formation and therefore protective colonization of mucosal surfaces. On the other hand, bacteria capable of

coagreggate can produce a barrier that prevents colonization by pathogenic microorganisms (Boris et al., 1997, Cesena et al., 2001; Schachtsiek et al., 2004, Collado et al., 2007).

d) *Production of antagonistic metabolites:* over time, the ability of lactic acid bacteria to produce antimicrobial substances was used to preserve dairy products, meat and vegetables. Lactic acid bacteria produce a wide range of compounds active against other microorganisms. The production of these substances provides a competitive advantage. Lactic acid bacteria can produce organic acids, hydrogen peroxide, carbon dioxide, diacetyl, bacteriocins, and substances of low molecular weight of protective nature.

e) *Competition for nutrients:* microorganisms need certain essential nutrients for growth. Lactic acid bacteria can compete with pathogens for vitamins, amino acids or other essential nutrients and in this way limit the growth of other organisms (Salminen and Von Wright, 1998, Salminen et al., 2004; Gueimonde and Salminen, 2006; Oelschlaeger, 2010).

f) *Production of enzymes:* β-galactosidase and bile salt hydrolase are two examples of the enzymes that produce beneficial microorganisms. The first hydrolyzes lactose. Thus, consumption of fermented dairy products does not produce the characteristic symptoms of lactose intolerance in people who lack the intestinal enzyme. The second enzyme would be responsible for the cholesterol-lowering effects of some strains of probiotic lactic acid bacteria (Salminen and Von Wright, 1998; Taranto et al., 1998 and 2000, Salminen et al., 2004; Parvez et al., 2006).

g) *Modulation of the immune system*: the results of many animals and in human studies are being a very strong evidence of the importance of the indigenous microbiota, mainly composed by bacteria, in the maturation and modulation of the immune system. To produce some type of immunomodulation, the probiotic bacteria needs to interact with the epithelia, either by adhering or to remain for long periods of time to contact different cell types of the host. Thus, the interaction with the host triggers a cascade of events leading to the modulation of the immune response. The probiotic lactic acid bacteria modulate host response to innate and specific immunity, local and systemic level, and exert their effect on the humoral and cellular immune system. The mechanisms by which they act have not yet been fully elucidated (Schiffrin et al., 1997; Salminen et al., 2004; Gueimonde and Salminen, 2006; Oelschlaeger, 2010). The study of the immunological mechanisms involved in the protective effect of lactic bacteria in the bovine mammary gland is more recent. Crispie et al. (2008) showed that the intramammary administration of *L. lactis* DPC3147 isolated from kefir triggers an immunomodulatory effect in the healthy gland, with recruitment of neutrophils and lymphocytes to the mammary quarter. Beecher et al. (2009) found that the administration of *L. lactis* DPC3147 in healthy quarter stimulates the local immune response and particularly the expression of the *IL1β*, *IL-8* and *CXCR1* genes. The inflammatory response produced in this case was intense, with visible signs of inflammation in the gland, increase of rectal temperature and blood clots in the milk produced. The somatic cells count reached values up to $1x10^{12}$ cells per milliliter of milk. The strain was recovered in milk up to 48 hours after the challenge.

The inflammation was completely self-limited seven days after inoculation. The type of response that occurred with the inoculation of lactic bacteria was different to that produced by *S. aureus*, *St. dysgalactiae* and *St. uberis*.

Probiotics for the Mammary Gland

In 1987, Woodward et al. observed that the indigenous microbiota of the teat skin is able of inhibiting mastitis pathogens. In a more recent work, Al-Qumber and Tagg (2006) found that some *Bacillus* strains isolated from the teat skin of healthy animals can inhibit a wide range of pathogenic strains of mastitis by the action of broad spectrum antimicrobials. Is worth to suppose that certain strains of the indigenous microbiota can maintain or restore the ecological balance in the niche and this is one of the traits of probiotic microorganisms. The autochthonous microbiota of each ecological niche is in equilibrium and this state can be altered by intrinsic or extrinsic factors. In these circumstances, there is an overgrowth of some potentially pathogenic or pathogenic microorganisms, which produce some kind of disease. Probiotic bacteria have the ability to maintain or restore the balance through various mechanisms that have been explained previously (Salminen et al., 2004, Oelschlaeger, 2010). In 1991, Greene et al. performed a comparative study between probiotic and antibiotic intramammary treatment in dairy cows. Lactating cows with subclinical mastitis were divided in two groups. One of them was inoculated with a commercial antibiotic and the other with a combination of two strains: *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*. Both strains belonged to a probiotic product approved for oral use in calves, but with no-specification of their origin or citation of previous studies to support or justify their employment. The cure rate of the probiotic treatment was significantly lower than the antibiotic therapy and produced a significant increase in somatic cell counts. In 2008, Klotermann et al. compared an antibiotic therapy and a potentially probiotic containing *L. lactis* DPC3147 in the treatment of chronic subclinical mastitis and clinical mastitis. After the intramammmary infusion, the application of the organism was as effective as the antibiotic in the treatment of clinical mastitis. The mechanism of the probiotic effect is the stimulation of the host intramammary immune system (Crispie et al., 2008; Beecher et al., 2009). *L. lactis* DPC3147 was isolated previously from a kefir grain and produces a bacteriocin active against many mastitis pathogens (Ryan et al., 1996 and 1998).

Our research group is focused on the prevention of diseases that affect the dairy cattle by restoring the balance in the indigenous microbiota in a certain niche (Nader et al., 2008). The study of the lactic acid microbiota of the mammary gland was performed with the aim of restoring the ecological homeostasis with a probiotic product. Based on the host specificity, one hundred and two lactic acid bacteria from foremilk, stripping milk and teat canal scrapped were isolated. The production of antagonistic substances and bacterial-surface properties, such as hydrophobicity and autoaggregation were evaluated. Safety aspects as virulence traits and antibiotic resistance were also taken into account. Finally, four strains: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CRL1655, *Lactobacillus perolens* CRL1724, *L. plantarum* CRL1716 and *Enteroccus mundtii* CRL1656 were selected. Both lactobacilli showed some surface properties and inhibited mastitis pathogens by organic acid production. The adhesion of *L. perolens* to teat canal cells was also studied. *L. perolens* showed an interesting pattern of adhesion to bovine teat canal epithelial cells. Both *L. lactis* and *E. mundtii* are

bacteriocinogenic strains and produce nisin Z and mundticin CRL1656 respectively (Espeche et al., 2009; Frola et al., submitted).

The hypothesis of our research group is that by promoting the colonization of the vaginal mucosa of pregnant cows and the mammary gland of lactating cows with indigenous probiotic strains for the prevention of post-partum metritis and mastitis, the neonate will be protected. The vaginal probiotics would increase the first contact of these microorganisms with the sterile, unprotected neonate intestinal tract, during the passage through the vaginal tract at birth. Probiotics administered to the cow for mastitis prevention would be also in contact with the calf during the first days of its life and would stimulate the immature immune system and prevent calf diarrhea, as shown in Figure 2.

Bacteriocins in Mastitis

Traditionally, in veterinary areas, medicine treatment therapies and prophylaxis have been based primarily on the use of antibiotics. It is known that the indiscriminate use of Antibiotics (ATB) for the treatment of bovine mastitis is a main public concern, as cited before. Some sensitive organisms might become resistant and they can often spread the resistance genes to other related microorganism through different processes. In addition, the presence of residues of ATB in milk and other dairy products may not be detected in time and get to the market chain to the consumer producing various disorders. It is also important to note that the presence of residues of ATB in milk is also a serious problem for the dairy industry because it can lead to the failure of the fermentation processes.

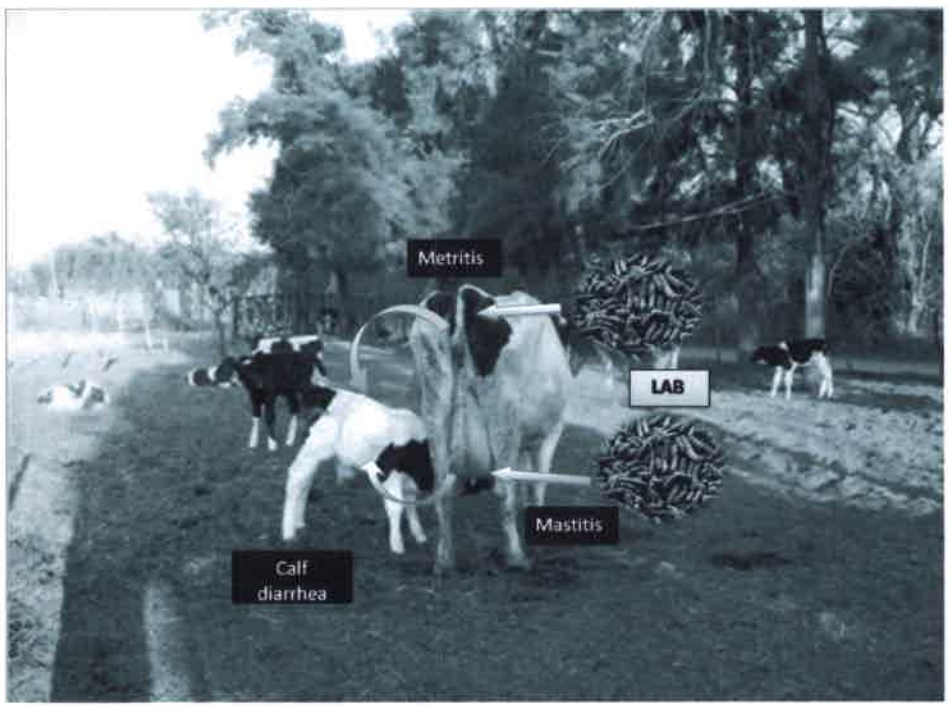


Figure 2. Proposed colonization of lactic acid bacteria as probiotic in bovines.

Table 2. Characteristics of the major vaccines released to the market or under study for the last 2 decades for the prevention of bovine mastitis

Vaccine type/ comercial name	Composition	Animal assays	Doses/ administration route	Vaccine Efficacy	Reference
Capsular exopolysaccharides/exoproteins					
Capsule-Inactivated cells/ REDUMAST	Crude exopolysaccharides extract and inactivated cells of *S. aureus*. Inactivated cells of *S. agalactiae* and *S. uberis*. Sodium azide preservative, thimerosal and formaldehyde. Aluminum Hydroxide	Field trial in hiefers N=30	Two doses: 30 and 10 days before calving. Subcutaneous	Reduces the incidence of clinical and subclinical mastitis against *S. aureus*. Does not decrease the frequency of mastitis caused by *Streptococcus sp*. Improves the quality of milk by lowering the bacterial count and somatic cell count and increases oil production.	Giraudo et al., 1997 Calzolari et al., 1997
Exoproteins	*S. uberis* PauA (total antigen) or PauA selectively removed with either Freund's incomplete adjuvant (FIA) or a commercially used adjuvant (SB62)	Experimental challenge trial in cows N=16	Five doses of the total antigen in FIA or five doses of the depleted antigen in FIA at 3, 5, 8, 11 and 13 weeks into lactation. Or two doses of total antigen combined with SB62 at 3-week intervals during early lactation.	PauA alone is not able to induce a protective immune response. However, some observations suggest that an inhibitory response to this protein was important to prevent colonisation of the bovine mammary gland and thus to protect against bovine mastitis due to *S. uberis*.	Leigh et al., 1999

Table 2. Continued

Vaccine type/ comercial name	Composition	Animal assays	Doses/ administration route	Vaccine Efficacy	Reference
Conjugate	*S. aureus* exopolysaccharide 5, 8 and 336 serotypes conjugated to a protein and incorporated in poly (DL-lactide-co-glycolide) microspheres.	Experimental trial in cows N=10	Two doses before calving. Supramammary lymph node and intramuscularly	Long-lasting antibodies titter to capsule that promoted neutrophil phagocytosis and prevented adherence to bovine epithelial cells. n=	O'Brien et al., 2000
Conjugate	Different combinations of *S. aureus* Reynolds and CP5-HSA conjugate	Experimental trial in heifers N=20	Three doses: one at 3-11 month and two doses at 23 days and 11 months after dose 1. Supramammary lymph node	CP5 vaccination gives a strong and long lasting immune response in cattle. Conjugation technology could not be necessary to achieve an immune response against *S. aureus* CP5 in cattle.	Tollersrud et al., 2001
Exoproteins	(6 X His)GapC of *S. uberis* or *S. dysgalactiae*, or chimeric CAMP-factor antigen, CAMP-3.	Experimental challenge trial in cows N=32	Two doses at 36 (day 0) and 15 days prior to challenge. Subcutaneous	Vaccination with *S. uberis* (6 X His)GapC or CAMP-3 results in a significant reduction in inflammation on several days post-challenge, most significantly for the former antigen. Inflammation was not reduced in *S. dysgalactiae* (6×His)GapC vaccinates, suggesting that it does not	Fontaine et al., 2002

				confer cross-species protection.	
Enterotoxin type C mutant/ MastaVac	Soybean oil, staphylococcal enterotoxin type C mutant (SEC-SER) and lecithin	Experimental challenge trail in cows N=11	Three doses: one at day 0 and later 2 and 6 weeks after initial vaccination. Intramuscularly	The vaccine was effective in preventing new infections with a virulent *S. aureus* strain that secreted A, B, C and D enterotoxin.	Chang et al., 2008
Whole cells based					
Bacterin/Lysigin Somato-Staph	Lysed culture of highly antigenic polyvalent somatic antigen containing types I, II, III, IV phages and miscellaneous groups of *S. aureus*.	Experimental trial in heifers N=12	Six months age followed by a booster dose two weeks later and subsequent vaccinations every 6 months until calving	Reduces 45% of both new intramammary *S. aureus* infections (IMI) during pregnancy and new IMI at calving. Reduces 30% of new CNS IMI which becames chronic and 31% reduction in new CNS IMI at calving	Nickerson et al., 1993
Bacterin	Inactivated *S. aureus* bacteria with pseudocapsule and α and β toxoids with a mixture of mineral oil and detergent as adjuvant.	Experimental trail in heifers N=108	Two doses: 78 and 18 days before calving. Supramammary lymph node	When all the parameters on udder health were considered together, the results indicate a potential protective effect during the entire lactation.	Nordhaug et al., 1994
Live strain	Live *S. uberis* 01405 strain and bacterial surface extract with Freund's incomplete adjuvant and Tween 20	Experimental challenge trial in cows N=12	Two doses: one 14 days before drying off and other within 48 h of calving. Subcutaneous	Vaccination protects against challenge with the homologous strain, but was less effective against an heterologous strain.	Finch et al., 1997

Table 2. Continued

Vaccine type/ comercial name	Composition	Animal assays	Doses/ administration route	Vaccine Efficacy	Reference
Bacterin	*E. coli* mutant (01 11:B4) J5 formalin killed in oil adjuvant	Experimental challenge trial in cows N=225	Three doses: one at drying off, one 30 days after drying off and other within 48 h after calving. Subcutaneous	Vaccination with the *E. coli* J5 bacterin does not prevent IMI, but reduces severity of clinical signs following intramammary experimental challenge with an heterologous *E. coli* strain.	Hogan et al., 1999
Bacterin	*S. aureus* Df lysate incorporated into microsphere	Experimental trial in cows N=8	Drying off immunization with two doses: one intramuscular and one in the area of the supramammary lymph node	Produces long-term opsonic antibodies for neutrophils and blocks adherence to mammary epithelium	O´Brien et al., 2001
Bacterin/MASTIVACS I	Exosecretion of *S. aureus* VLVL8407 strain and bacterial fragments of other two *S. aureus* strains (ZO3984 and BS449) (1:1:1 by protein concentration) and mixed 1:1 with incomplete Freund´s adjuvant.	Experimental challenge trial N=19	Non-pregnant cows in the first to second mild-lactation period inoculated with 3 doses: one with the adjuvant vaccine under the tail root and without adjuvant in the area of the supra-mammary lymph node. Similar doses were administered 36 and 56 days after the first dose. Intramuscular	The vaccine provides about 70% protection from *S. aureus* infection and complete protection from inflammatory reactions as expressed by the somatic cells count	Leitner et. al., 2003
Bacterin	Type 5, 8 and 336 *S.*	Experimental	Three doses: the first 1	Increases the amount of antigen-	Lee et al.,

	aureus capsular polysaccharide	trials in heifers N=20	month before the expected calving, followed by 2 boots in a 2-week interval (days 14 and 28). Intramuscular and Supramammary lymph node	specific antibodies in serum. The effect on lymphocyte subsets and neutrophil phagocytosis were minimal.	2005
Live mutant strain	*S. aureus* aroA mutant	Experimental challenge trials in mice N=10	Two doses: 7 days before parturition and 7 days after the first dose. Intramammary	Mice immunized with the vaccine are protected from intramammary heterologous challenge.	Buzzola et al., 2006
Bacterin/STARVAC	Inactivated *E. coli* J5 strain, inactivated *S. aureus* (CP8) SP 140 strain, expressing Slime Antigenic Associated Complex (SAAC)	Experimental trial in multiparous cows N=386	Three doses: 45 and 10 days before calving and 52 days after calving.	Reduces the incidence of clinical or sub-clinical mastitis and the severity of the clinical signs of mastitis caused by *S. aureus*, coliforms or coagulase negative staphylococci. Vaccination also increases the spontaneous cure rate of the infected cows.	Prenafeta et al., 2010
Live mutant strain	*S. aureus* RC122 avirulent mutant strain	Experimental challenge trial in heifers N= 9	Three subcutaneous doses: one at 14-16 months age and two doses 30 days after pregnancy and 10 days before calving. One intramammary dose 20 days after calving.	Induces specific and significant opsonic antibody response in blood and milk and provides protection through a significant reduction of post challenge milk bacterial shedding.	Pellegrino et al., 2010

Table 2. Continued

Vaccine type/ comercial name	Composition	Animal assays	Doses/ administration route	Vaccine Efficacy	Reference
DNA based					
DNA	Fc binding region of Protein A in pcDNA3 vector	Experimental trial in cows N=15	Three doses: 6, 4 and 2 week's pre-partum. Intramuscular, Intradermal or intravulvarmucosal	Low antibody titters in response to the vaccine	Carter and Kerr, 2003
DNA	FnBP and ClfA (aa 221-550) of *S. aureus* in pCI-D_1D_3-RES-ClfA	Experimental trial in heifers N=8	Three doses: 30 and 10 days before calving and one dose of the recombinant protein within 6 days of calving	Causes lymphoproliferative and humoral immune responses and provides partial protection of mammary gland	Shkreta et al., 2004.
DNA	Clf A of *S. aureus* cloned into mammalian expression vector (pCI) and recombinant ClfA protein.	Experimental trial in cows N=35	Three doses of the pCI-ClfA 21 days apart. One boost with the recombinat ClfA protein three months after the third pCI-ClfA dose/ Intramusculary	The DNA-prime/protein boost strategy induces antibodies that improved phagocytosis and decreased adhesion of the bacteria.	Nour El-Din et al., 2006

Table 3. Microorganisms and bacteriocins evaluated for prevention or treatment of bovine mastitis

Micro organism	Origin	Effects	*In vivo* study	Results	Reference
Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei,	Lacto-bac, a commercial probiotic approved for oral use in calves as a microbial supplement	Intramammary infusion of quarters with *Lactobacillus* increases quarter SCC with no effect on infection rate	Twenty-six cows with subclinical mastitis	Treatment of cows with *Lactobacillus* cured 21.7% of infected quarters, whereas 73.7% of infections treated with antibiotic were eliminated. Treatment of quarters with antibiotic did not reduce quarter SCC unless infected quarters were cured. Intramammary infusion of quarters with *Lactobacillus* increased quarter SCC.	Greene et al., 1991
***Lactococcus lactis* DPC3147**	Irish kefir grain	Probiotic effective in the treatment of subclinical and clinical bovine mastitis	Twenty-two quarters with subclinical mastitis and fifty quarters from Holstein-Friesian cows, New Zealand Friesians, Norwegian Reds, Normandes and Montbelliards.	Intramammary infusion of a live culture of *L. lactis* DPC3147 is as efficient as common antibiotic treatments	Klostermann et al., 2008
***Lactococcus lactis* DPC3147**	Irish kefir grain	Modulation of the immune response	Six healthy dairy cows. Holstein Friesian in her sixth lactation and a Norwegian Red in her second lactation	Administration of a live culture *of L. lactis* DPC 3147 leads to a rapid and considerable increase of *IL-1*□ and *IL-8* gene expression	Beecher et al., 2009

Table 3. Continued

Micro organism	Origin	Effects	*In vivo* study	Results	Reference
Nisin A	Ambicin N®	Germicidal activity against mastitis pathogens (*S. aureus, Strep. agalactiae, Strept uberis , Klebsiella pneumoniae and E. coli)*	Eighty three quarters	Reduction of *S. aureus* 3.90 log and *E. coli* 4.22 log after exposure for 1 min to the germicide. Activity was significantly greater than that exhibited by the 0.1 and 0.5% iodophors and by the 0.5% chlorhexidine digluconate teat dips.	Sears et al., 1992
Nisin Z	Nisin Z Silver-Elephant®	Germicidal activity against mastitis pathogens in clinical and subclinical mastitis	Ninety Holstein cows with subclinical mastitis. Ninety two cows and one hundred and seven quarters with clinically mastitis	Nisin therapy had bacteriological cure rates of 90.1% for *Strept agalactiae*, 50% for *S. aureus*, 58.8% for CNS in the subclinical mastitis trial. Nisin presented similar results to those with antibiotic treatments.	Wu et al., 2007; Cao et al., 2007
Lacticin 3147	Lacticin 3147 produced by *L. lactis* DPC3147 isolated from a Irish kefir grain	Germicidal activity of bismuth and Lacticin 3147-based teat seal in dry cows challenged with*S aureus.*	Ninty-nine quarters	Teat seal plus lacticin 3147 reduced the number of *S.aureus*	Twomey et al., 2000
Lacticin 3147	Lacticin 3147 and *L. lactis* DPC3251 isolated from a Irish kefir grain	Natural teat dip using a fermentate containing the live bacterium *L. lactis* DPC 3251	Eighteen teats of eight lactating Holstein-Friesian cows	After 10 min exposure with teat dip, staphylococci were reduced by 80% when compared with the un-dipped control teat. Streptococci were reduced between 90-97%.	Klostermann et al., 2010
Lacticin NK34	Partially purified form of lacticin	*In vivo* preventive and therapeutic effects on	A hundred ICR mice were used to evaluate the	Mice infected with *S.aureus* and CNS isolated from bovine mastitis and treated	Kim et al., 2010

	NK34	mouse infection model using mastitis pathogens	antimicrobial effects of lacticin NK34	with lacticin NK34 demonstrate an 80% survival rate compared with a 7.5% in control mice.	
Lysostaphin	Recombinant lysostaphin	Therapeutic effect against *S. aureus* by intramammary application	Thirty Holstein-Freisian dairy cattle in their first lactation were infected with *S. aureus*.	The cure rate of quarters receiving recombinant lysostaphin was 20% compared with 29% for sodium cephapirin and 57% for a commercial antibiotic formulation.	Oldham and Daley, 1991

Table 4. Examples of commercially available products containing nisin for bovine mastitis

Product	Bacte-riocin	Application	Clinical study	Results	Reference
Consept®	Nisin A	Germicidal activity against mastitis pathogens (*S. aureus, Strep. agalactiae, Strept uberis , Klebsiella pneumoniae and E. coli)*	Eighty three quarters	Reduction of *S. aureus* 3.90 log and *E. coli* 4.22 log after exposure for 1 min to the germicide. Activity was significantly greater than that exhibited by the 0.1 and 0.5% iodophors and by the 0.5% chlorhexidine digluconate teat dips.	Sears et al., 1992
Mast out (Immucell, EEUU)	Nisin A	Intramammary infusion product containing Nisin for the treatment of subclinical mastitis in lactating dairy cows	Three hundred cows with subclinical mastitis	Mast Out® treatment group showed a statistically highly significant ($p < 0.0001$) overall cure rate in comparison to the placebo group	http://www.immucell.com/pdf/mastout.pdf
Wipe Out (Immucell, EEUU)	Nisin A	Dairy Wipes made from a non-woven material that has been soaked through with a quick-acting and effective antimicrobial solution containing Nisin	Eighty three quarters	Kills 99% of the most common mastitis-causing organisms	Sears et al., 1992 http://www.immucell.com/pdf/WIPEOUTResults.E%20Chartv6.pdf

In recent years, new antimicrobial compounds such as those called bacteriocins are being considered for the use in bovine mastitis. Bacteriocins are peptides with antimicrobial activity, gene-encoded, which are produced by a number of bacterial genera, and have a wide spectrum of inhibitory activity. In particular, bacteriocins of lactic acid bacteria have received much of attention due to the great potential for their use in food to control food-borne pathogens or saprophytic organisms and to increase the shelf life of food products, as well as for the development of products for human and veterinary medicine by pharmaceutical industries (Jack et al.1995, Cotter et al 2005)

As the interest in these antimicrobial peptides was increasing in recent decades, the discovery of new bacteriocins emerged in the literature, and then the need of new and improved classification of them was also evident. Since bacteriocins are an heterogeneous group of peptides, many classification systems have been proposed. Originally, Klaenhammer (1993) proposed four major classes for bacteriocins. Later, the advance in the knowledge of this kind of compounds made necessary a revision of this classification, and more recently Cotter *et al* (Cotter *et al.*, 2005) and Heng *et a.l* (2007) suggested some modifications.

Class I the post-translationally modified bacteriocins, i.e., the lantibiotics. Members of this group is divided according to their structure in *type A* (elongated, amphipathic structures), *type B* (globular and more compact structure) and *type C* (comprising more than one component). *Type A* is further subdivided into subtypes AI and AII according to their size, charge and leader peptide sequence. The archetype of AI subtype is nisin. This bacteriocin has been used as an additive in the food industry for over 40 years. The *type B* lantibiotics are more globular and compact than type A and its prototype is the mersacidin which is active against Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (Heng et al., 2007). The *type C* or multicomponents consist of two peptides. Each of them has little or no activity, but when combined together they have synergistic action. Lacticin 3147 is the most well studied example, produced by *Lactococcus lactis* DPC3147, active against mastitis pathogens (Ryan et al., 1999).

Class II are small (<10 kDa) heat-stable membrane-active bacteriocins. This group is further divided in subgroups. Subclass *IIa* are "pediocin like peptides" since pediocin PA-1 is the best characterized member. They encompass strong anti-listerial activity and this group is further distinguished by having a conserved amino-terminal hydrophilic region (YGNGV) and two cysteine residues forming a disulfide bridge. The C-terminal region is hydrophobic and more variable (DRID et al., 2006, Heng et al., 2007). Subtype *IIb* (two-component peptides) and *IIc* (thiol-activated peptides requiring reduced cysteine residues for activity) need two or more peptides to exert its inhibitory effect. These individual peptides lack antimicrobial activity by themselves. Examples are lactacin F produced by *Lb. johnsoni* F and lactocin 705 synthesized by *Lb. curvatus* (Cuozzo et al., 2000, Heng et al., 2007). In the case of salivaricin ABP-118 produced by *Lb. salivarius* UCC118 and and salivaricin CRL 1328 synthesized by *Lb. salivarius* CRL1328 (Flynn et al., 2002, Heng et al., 2007, Vera Pingitore et al., 2009) each component exhibit his own antimicrobial activity and when combined, present synergistic effect.

Class III, are larger (>30 kDa) heat-labile bacteriocins, and *Class IV*, complex bacteriocins (lipid or carbohydrate moieties besides the protein).

In the classification proposed by Cotter et al. (2005), they suggest a division in two main classes: *Class I*, peptides with post-translational modifications, such as unusual amino acids lanthionine, beta-metil lanthionine, dehydroalanine. *Class II:* includes all peptides that do not undergo posttranslational modifications.

On the other hand, Heng et al (2007) retained *Class III* and divided it into *IIIa* (bacteriolysins) and *IIIb* (non-lytic proteins) and added *Class IV* (cyclic bacteriocins known before as Class IIc). Nissen-Meyer *et al.* (2009) suggested a division of class II bacteriocins into four subgroups according to similarities of their C-terminal regions. More recently, Zouhir *et al* (2010) define new structure-based sequence fingerprints that support a subdivision of the bacteriocins from Gram positive bacteria into 11 groups.

Application of LAB Bacteriocins

An interesting aspect of nisin is its spectrum of action, being able to inhibit the major pathogens responsible for bovine mastitis (Broadbent et al 1989). The use of bacteriocins for the treatment of bovine mastitis data from the 40's, with a report published by Taylor et al. (1949) who evaluated the use of the lantibiotic nisin in an intramammary infection replacing the ATBs. Sears et al. (1992) reported the development of a preparation of a sanitizer germicidal agent suitable for use in the cow teats. The nisin-based formulation produced a significant reduction in the number of *S. aureus*, compared with the agents commonly used for cleaning the teat after milking. This peptide is the only GRAS (Generally Recognized as Safe) bacteriocin that is in the market and is present in products such as Concept (Applied Microbiology, Inc., New York, NY), Mast Out ®, Wipe-Out ® (ImmuCell, Portland, OR) (Sears et al, 1992; Sears and McCarthy, 2003).

A variant of the lantibiotics nisin, named nisin Z has been used for the treatment of subclinical mastitis in lactating cows (Wu J et al., 2007). In this study 46 lactating cows with subclinical mastitis were treated with nisin Z by intramammary infusion and compared with untreated control groups. The results showed that treatment with nisin Z significantly decreased the number of several associated pathogens as well as a the levels of the enzyme N-acetyl-beta-D-glucosaminidase and somatic cell count, indicative of inflammatory state of the mammary gland (Cao et al. 2007, Wu et al., 2007). Some products are currently known such as "pre-and post-milking dip and cleaning wipes commercial nisin incorporated in its formulation as an active ingredient.

In some cases it is possible to combine the action of two antimicrobial substances. For example the use of lysostaphin considered also as bacteriocin (Heng et al., 2007) can complement the action of nisin and the inhibitory action of the mixture of these antibiotics is synergistic (Oldham and Daley, 1991).Studies using genetically engineered mice and transgenic cows secreting lysostaphin in their mammary glands demonstrated both animals were resistant to infections caused by staphylocci (Kerr et al 2001; Wall et al, 2005).

Other lantibiotic that has received much of attention is Lacticin 3147. This bacteriocin is a two-component lantibiotic with a wide spectrum of antimicrobial activity, particularly for some of mastitis pathogens such as *S aureus, Strep agalactiae, Strep uberis*. Twomey et al (2000) evaluated the effectiveness of a treatment of *S.aureus* infection (teat, teat duct and teat sinus) by using a teat-seal based on bismuth salts and lacticin 3147. The results of this study showed the significant potential of this bacteriocin to prevent infection by staphylococci,

especially when the bacteriocin concentration used was relatively high. An interesting fact is that pure cultures of lantibiotics producer strains were as effective as antibiotics for intramammary treatment of diseases (Crispie et al. 2008; Klostermann et al. 2008).

Recently, Klostermann et al. (2010) developed "a natural teat dip" from a fermented product with lacticin 3147-producing strain (*L. lactis* DPC 3251). *In vitro* experiments showed an inhibition of mastitis-producing bacteria, being more important in *S. aureus, Strept dysgalactiae* strains and to a lesser extent on *Strept. uberis. In vivo* studies used teats of lactating dairy cow inoculated with the "challenge organisms" and later treated and washed with fermented products containing bacteriocins-producer strains and isogenic non-bacteriocinogenic strains. The results showed that after 10 min exposure there was a reduction of 80-97% pathogens (*S. aureus, S. dysgalactiae and S. uberis).*

The clinical trials published to assay some of these bacteriocins or bioactive compounds, are showed in Table 3, where some complementary information is included, as the characteristics of the peptide, the description of the animal trials, the results obtained and the reference of the publication.

As some of these bioactive peptides are in the market, they were included in Table 4, where the additional information is shown.

Conclusion

Global milk production is increasing based in the higher level of consumption of milk and milk-derived products in many countries that supports more complex milk-production systems. At the same time there is a high requirement for functional and healthy foods, which must be obtained mainly from healthy animals. Bovine mastitis continues to be a cause of significant economic loss to the dairy industry internationally, and also, fundamental for the health related items. And is treated generally with antibiotics.

Prevention strategies have decrease the incidence of some pathogens, modifying the pattern and appearance of some others, which encourage looking for different practices to decrease this syndrome. Some modified microorganisms and biological substances are being studied to help in the eradication of mastitis that will be difficult to get by the cultural, economic and geographical differences of the producer's countries. More governmental requirements should be applied to increase the safety of the food-products and animal welfare.

Further studies should be performed to understand the mechanisms of action of each one of the preventive strategies, trying to get the synergistic or combined effect of them, to advance in the eradication, or at least in the decreasement of this syndrome

Acknowledgements

The results included in this work were supported by grants from CONICET (PIP 632), ANPCyT (PICT 543).

References

Al-Qumber, M., & Tagg, J. R. (2006). Commensal bacilli inhibitory to mastitis pathogens isolated from the udder microbiota of healthy cows. *Journal of Applied Microbiology, 101*(5), 1152-1160.

Anadón, A., Rosa Martínez-Larrañaga, M., & Aranzazu Martínez, M. (2006). Probiotics for animal nutrition in the European Union. Regulation and safety assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology, 45*(1), 91-95.

Azad, I. S., & Al-Marzouk, A. (2008). Autochthonous aquaculture probiotics - A critical analysis. *Research Journal of Biotechnology, 3*(SPEC. ISS.), 171-177.

Beecher, C., Daly, M., Berry, D. P., Klostermann, K., Flynn, J., Meaney, W., et al. (2009). Administration of a live culture of *Lactococcus lactis* DPC 3147 into the bovine mammary gland stimulates the local host immune response, particularly *IL-1* and *IL-8* gene expression. *Journal of Dairy Research, 76*(3), 340-348.

Boris, S., Suarez, J. E., & Barbes, C. (1997). Characterization of the aggregation promoting factor from *Lactobacillus gasseri*, a vaginal isolate. *Journal of Applied Microbiology, 83*(4), 413-420.

Bradley, A. J. (2002). Bovine Mastitis: an evolving disease. *The Veterinary Journal, 164*, 116-128.

Broadbent, J. R., Chou, Y. C., Gillies, K., & Kondo, J. K. (1989). Nisin inhibits several gram-positive, mastitis-causing pathogens. *J Dairy Sci, 72*(12), 3342-3345.

Buzzola, F. R., Barbagelata, M. S., Caccuri, R. L., & Sordelli, D. O. (2006). Attenuation and persistence of and ability to induce protective immunity to a *Staphylococcus aureus* aroA mutant in mice. *Infection and Immunity, 74*(6), 3498-3506.

Calvinho, L. F. (1999). El control de mastitis causado por *Staphylococcus aureus* a través de segregación. *Chacra & Campo Moderno, 828*, 10-11.

Calvinho, L. F., & Tirante, L. (2005). Prevalencia de microorganismos patógenos de mastitis bovina y evolución del estado de salud de la glándula mamaria en Argentina en los últimos 25 años. *FAVE - Ciencias Veterinarias, 4*(1-2), 29-40.

Calzolari, A., Giraudo, J. A., Rampone, H., Odierno, L., Giraudo, A. T., Frigerio, C., et al. (1997). Field trials of a vaccine against bovine mastitis. 2. Evaluation in two commercial dairy herds. *Journal of Dairy Science, 80*(5), 854-858.

Cao, L. T., Wu, J. Q., Xie, F., Hu, S. H., & Mo, Y. (2007). Efficacy of nisin in treatment of clinical mastitis in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science, 90*(8), 3980-3985.

Carter, E. W., & Kerr, D. E. (2003). Optimization of DNA-based vaccination in cows using green fluorescent protein and protein A as a prelude to immunization against staphylococcal mastitis. *Journal of Dairy Science, 86*(4), 1177-1186.

Cesena, C., Morelli, L., Alander, M., Siljander, T., Tuomola, E., Salminen, S., et al. (2001). *Lactobacillus crispatus* and its nonaggregating mutant in human colonization trials. *Journal of Dairy Science, 84*(5), 1001-1010.

Chang, B. S., Moon, J. S., Kang, H. M., Kim, Y. I., Lee, H. K., Kim, J. D., et al. (2008). Protective effects of recombinant staphylococcal enterotoxin type C mutant vaccine against experimental bovine infection by a strain of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical mastitis in dairy cattle. *Vaccine, 26*(17), 2081-2091.

Collado, M. C., Meriluoto, J., & Salminen, S. (2007). Development of new probiotics by strain combinations: is it possible to improve the adhesion to Intestinal mucus? *Journal of Dairy Science, 90*(6), 2710-2716.

Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol, 3*(10), 777-788.

Craven, N., & Anderson, J. C. (1984). Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by bovine mammary gland macrophages and intracellular protection from antibiotic action in vitro and in vivo. *Journal of Dairy Research, 51*(4), 513-523.

Crispie, F., Alonso-Gómez, M., O'Loughlin, C., Klostermann, K., Flynn, J., Arkins, S., et al. (2008). Intramammary infusion of a live culture for treatment of bovine mastitis: Effect of live lactococci on the mammary immune response. *Journal of Dairy Research, 75*(3), 374-384.

Draksler, D., Gonzáles, S., & Oliver, G. (2004). Preliminary assays for the development of a probiotic for goats. *Reproduction Nutrition Development, 44*(5), 397-405.

Eberl, H. J., Khassehkhan, H., & Demaret, L. (2010). A mixed-culture model of a probiotic biofilm control system. *Computational and Mathematical Methods in Medicine, 11*(2), 99-118.

Errecalde, J. O. (2004). *Uso de antimicrobianos en animales de consumo. Incidencia del desarrollo de resistencias en la salud pública.* (Vol. 162). Roma.

Espeche, M. C., Otero, M. C., Sesma, F., & Nader-Macías, M. E. F. (2009). Screening of surface properties and antagonistic substances production by lactic acid bacteria isolated from the mammary gland of healthy and mastitic cows. *Veterinary Microbiology, 135*(3-4), 346-357.

Ewaschuk, J. B., Naylor, J. M., Chirino-Trejo, M., & Zello, G. A. (2004). *Lactobacillus rhamnosus* strain GG is a potential probiotic for calves. *Canadian Journal of Veterinary Research, 68*(4), 249-253.

FAO. (2009). *The state of food and agriculture*. Roma, Italia: Communication Division FAO.

FAOSTAT. (2008, 1/12/2010). Top Production - Cow milk, whole, fresh - 2008. from http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=339&lang=en

FAO-WHO. (2002). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. . *Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food.*, from http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf

Finch, J. M., Winter, A., Walton, A. W., & Leigh, J. A. (1997). Further studies on the efficacy of a live vaccine against mastitis caused by *Streptococcus uberis*. *Vaccine, 15*(10), 1138-1143.

Fontaine, M. C., Perez-Casal, J., Song, X. M., Shelford, J., Willson, P. J., & Potter, A. A. (2002). Immunisation of dairy cattle with recombinant *Streptococcus uberis* GapC or a chimeric CAMP antigen confers protection against heterologous bacterial challenge. *Vaccine, 20*(17-18), 2278-2286.

Giraudo, J. A., Calzolari, A., Rampone, H., Rampone, A., Giraudo, A. T., Bogni, C., et al. (1997). Field trials of a vaccine against bovine mastitis. 1. Evaluation in heifers. *Journal of Dairy Science, 80*(5), 845-853.

Golek, P., Bednarski, W., Brzozowski, B., & Dziuba, B. (2009). The obtaining and properties of biosurfactants synthesized by bacteria of the genus *Lactobacillus*. *Annals of Microbiology, 59*(1), 119-126.

González, R. (1993). Evaluación de técnicas y procedimientos utilizados en el diagnóstico, prevención y control de la mastitis bovina. In E. G. Pergamino (Ed.), *II Congreso Nacional de Lechería* (pp. 66). Venado Tuerto, Argentina: Estudio Ganadero Pergamino.

Greene, W. A., Gano, A. M., Smith, K. L., Hogan, J. S., & Todhunter, D. A. (1991). Comparison of probiotic and antibiotic intramammary therapy of cattle with elevated somatic cell counts. *Journal of Dairy Science, 74*(9), 2976-2981.

Gudiña, E. J., Rocha, V., Teixeira, J. A., & Rodrigues, L. R. (2010). Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* A20. *Letters in Applied Microbiology, 50*(4), 419-424.

Gueimonde, M., & Salminen, S. (2006). New methods for selecting and evaluating probiotics. *Digestive and Liver Disease, 38*(SUPPL. 2).

Guillot, J. F. (2003). Probiotic feed additives. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 26*(1), 52-55.

Halasa, T., Huijps, K., Osterás, O., & Hogeveen, H. (2007). Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. *Veterinary Quarterly, 29*(1), 18-31.

Halasa, T., Nielen, M., Huirne, R. B. M., & Hogeveen, H. (2009). Stochastic bio-economic model of bovine intramammary infection. *Livestock Science, 124*(1-3), 295-305.

Hansen, P. J., Soto, P., & Natzke, R. P. (2004). Mastitis and fertility in cattle - Possible involvement of inflammation or immune activation in embryonic mortality. *American Journal of Reproductive Immunology, 51*(4), 294-301.

Haug, A., Høstmark, A. T., & Harstad, O. M. (2007). Bovine milk in human nutrition - A review. *Lipids in Health and Disease, 6*.

Heng, N. C., Wescombe, P. A., Burton, J. P., Jack, R. W., & Tagg, J. R. (2007). The Diversity of Bacteriocins in Gram-Positive Bacteria. In C. Eckey (Ed.), *Bacteriocins. Ecology and Evolution*. Berlin: Springer.

Herstad, H. K., Nesheim, B. B., L'Abée-Lund, T., Larsen, S., & Skancke, E. (2010). Effects of a probiotic intervention in acute canine gastroenteritis - A controlled clinical trial. *Journal of Small Animal Practice, 51*(1), 34-38.

Hogan, J. S., Bogacz, V. L., Aslam, M., & Smith, K. L. (1999). Efficacy of an *Escherichia coli* J5 bacterin administered to primigravid heifers. *Journal of Dairy Science, 82*(5), 939-943.

Isolauri, E., Salminen, S., & Ouwehand, A. (2004). Probiotics. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, 18*(2), 299-313.

Jack, R. W., Tagg, J. R., & Ray, B. (1995). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiological Reviews, 59*(2), 171-200.

Kerr, D. E., Plaut, K., Bramley, A. J., Williamson, C. M., Lax, A. J., Moore, K., et al. (2001). Lysostaphin expression in mammary glands confers protection against staphylococcal infection in transgenic mice. *Nat Biotechnol, 19*(1), 66-70.

Kim, S. Y., Shin, S., Koo, H. C., Youn, J. H., Paik, H. D., & Park, Y. H. (2010). In vitro antimicrobial effect and in vivo preventive and therapeutic effects of partially purified

lantibiotic lacticin NK34 against infection by Staphylococcus species isolated from bovine mastitis. *J Dairy Sci, 93*(8), 3610-3615.

Klaenhammer, T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev, 12*(1-3), 39-85.

Klostermann, K., Crispie, F., Flynn, J., Meaney, W. J., Paul Ross, R., & Hill, C. (2010). Efficacy of a teat dip containing the bacteriocin lacticin 3147 to eliminate Gram-positive pathogens associated with bovine mastitis. *Journal of Dairy Research, 77*(2), 231-238.

Klostermann, K., Crispie, F., Flynn, J., Ross, R. P., Hill, C., & Meaney, W. (2008). Intramammary infusion of a live culture of *Lactococcus lactis* for treatment of bovine mastitis: Comparison with antibiotic treatment in field trials. *Journal of Dairy Research, 75*(3), 365-373.

Kubota, H., Senda, S., Nomura, N., Tokuda, H., & Uchiyama, H. (2008). Biofilm formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental stress. *Journal of Bioscience and Bioengineering, 106*(4), 381-386.

Lee, J. W., O'Brien, C. N., Guidry, A. J., Paape, M. J., Shafer-Weaver, K. A., & Zhao, X. (2005). Effect of a trivalent vaccine against Staphylococcus aureus mastitis lymphocyte subpopulations, antibody production, and neutrophil phagocytosis. *Canadian Journal of Veterinary Research, 69*(1), 11-18.

Leigh, J. A., Finch, J. M., Field, T. R., Real, N. C., Winter, A., Walton, A. W., et al. (1999). Vaccination with the plasminogen activator from *Streptococcus uberis* induces an inhibitory response and protects against experimental infection in the dairy cow. *Vaccine, 17*(7-8), 851-857.

Leitner, G., Lubashevsky, E., Glickman, A., Winkler, M., Saran, A., & Trainin, Z. (2003). Development of a Staphylococcus aureus vaccine against mastitis in dairy cows: I. Challenge trials. *Veterinary Immunology and Immunopathology, 93*(1-2), 31-38.

Lescourret, F., & Coulon, J. B. (1994). Modeling the impact of mastitis on milk production by dairy cows. *Journal of Dairy Science, 77*(8), 2289-2301.

Lönnerdal, B. (2003). Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *The American journal of clinical nutrition, 77*(6), 1537S-1543S.

McDougall, S., Parker, K. I., Heuer, C., & Compton, C. W. R. (2009). A review of prevention and control of heifer mastitis via non-antibiotic strategies. *Veterinary Microbiology, 134*(1-2), 177-185.

Miles, H., Lesser, W., & Sears, P. (1992). The economic implications of bioengineered mastitis control. *Journal of Dairy Science, 75*(2), 596-605.

Nader-Macías, M. E. F., Otero, M. C., Espeche, M. C., & Maldonado, N. C. (2008). Advances in the design of probiotic products for the prevention of major diseases in dairy cattle. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 35*(11), 1387-1395.

Nava-Trujillo, H., Soto-Belloso, E., & Hoet, A. E. (2010). Effects of clinical mastitis from calving to first service on reproductive performance in dual-purpose cows. *Animal Reproduction Science, 121*(1-2), 12-16.

Nickerson, S. C. (1993). *Vaccination programs for preventing and controlling mastitis.* Paper presented at the National Mastitis Council Regional Meeting Proceeding Syracuse, New York.

Nissen-Meyer, J., Rogne, P., Oppegard, C., Haugen, H. S., & Kristiansen, P. E. (2009). Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Curr Pharm Biotechnol, 10*(1), 19-37.

NMC. (2004). *Current Concepts of Bovine Mastitis* (4th ed.). Arlington, VA: National Mastitis Council.

Nordhaug, M. L., Nesse, L. L., Norcross, N. L., & Gudding, R. (1994). A field trial with an experimental vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis in cattle. 2. Antibody response. *Journal of Dairy Science, 77*(5), 1276-1284.

Nour El-Din, A. N. M., Shkreta, L., Talbot, B. G., Diarra, M. S., & Lacasse, P. (2006). DNA immunization of dairy cows with the clumping factor a of *Staphylococcus aureus. Vaccine, 24*(12), 1997-2006.

O'Brien, C. N., Guidry, A. J., Douglass, L. W., & Westhoff, D. C. (2001). Immunization with *Staphylococcus aureus* lysate incorporated into microspheres. *Journal of Dairy Science, 84*(8), 1791-1799.

O'Brien, C. N., Guidry, A. J., Fattom, A., Shepherd, S., Douglass, L. W., & Westhoff, D. C. (2000). Production of antibodies to *Staphylococcus aureus* serotypes 5, 8, and 336 using poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres. *Journal of Dairy Science, 83*(8), 1758-1766.

Odierno, L., Calvinho, L., Traverssa, P., Lasagno, M., Bogni, C., & Reinoso, E. (2006). Conventional identification of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis in Argentinean dairy herds. *Journal of Dairy Science, 89*(10), 3886-3890.

Oelschlaeger, T. A. (2010). Mechanisms of probiotic actions - A review. *International Journal of Medical Microbiology, 300*(1), 57-62.

O'Grady, L., & Doherty, M. (2009). Focus on bovine mastitis: knowledge into practice. *Irish Veterinary Journal, 62*, 4-5.

Oldham, E. R., & Daley, M. J. (1991). Lysostaphin: Use of a recombinant bactericidal enzyme as a mastitis therapeutic. *Journal of Dairy Science, 74*(12), 4175-4182.

Otero, C., Silva De Ruiz, C., Ibañez, R., Wilde, O. R., De Ruiz Holgado, A. A. P., & Nader-Macías, M. E. (1999). Lactobacilli and enterococci isolated from the bovine vagina during the estrous cycle. *Anaerobe, 5*(3-4), 305-307.

Otero, M. C., Morelli, L., & Nader-Macías, M. E. (2006). Probiotic properties of vaginal lactic acid bacteria to prevent metritis in cattle. *Letters in Applied Microbiology, 43*(1), 91-97.

Ouwehand, A., Salminen, S., & Isolauri, E. (2002). Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek, 82*, 279-289.

Parvez, S., Malik, K. A., Ah Kang, S., & Kim, H. Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology, 100*(6), 1171-1185.

Pellegrino, M., Giraudo, J., Raspanti, C., Odierno, L., & Bogni, C. (2010). Efficacy of immunization against bovine mastitis using a *Staphylococcus aureus* avirulent mutant vaccine. *Vaccine, 28*(28), 4523-4528.

Prenafeta, A., March, R., Foix, A., Casals, I., & Costa, L. (2010). Study of the humoral immunological response after vaccination with a *Staphylococcus aureus* biofilm-embedded bacterin in dairy cows: possible role of the exopolysaccharide specific

antibody production in the protection from *Staphylococcus aureus* induced mastitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology, 134*(3-4), 208-217.

Pyörälä, S. (2009). Treatment of mastitis during lactation. *Irish Veterinary Journal, 62*(40), 40-44.

Reinoso, E., Bettera, S., Frigerio, C., DiRenzo, M., Calzolari, A., & Bogni, C. (2004). RAPD-PCR analysis of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine and human hosts. *Microbiological Research, 159*(3), 245-255.

Reinoso, E. B., El-Sayed, A., Lämmler, C., Bogni, C., & Zschöck, M. (2008). Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from humans, bovine subclinical mastitis and food samples in Argentina. *Microbiological Research, 163*(3), 314-322.

Ron, E. Z., & Rosenberg, E. (2001). Natural roles of biosurfactants. *Environmental Microbiology, 3*(4), 229-236.

Ryan, M. P., Meaney, W. J., Ross, R. P., & Hill, C. (1998). Evaluation of lacticin 3147 and a teat seal containing this bacteriocin for inhibition of mastitis pathogens. *Applied and Environmental Microbiology, 64*(6), 2287-2290.

Ryan, M. P., Rea, M. C., Hill, C., & Ross, R. P. (1996). An application in cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147. *Applied and Environmental Microbiology, 62*(2), 612-619.

Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., & Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: Safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology, 84*(3), 197-215.

SABRE. (2006). A European Integrated Research Project on Cutting Edge Genomics for Sustainable Animal Breeding. http://www.sabre-eu.eu/Portals/0/SABRE%20 Publications/SABRE_Brochure_11p.pdf.

Salminen, S., & Von Wright, A. (1998). *Lactic acid bacteria. Microbiology and functional aspects, second edition. Revised and expanded.* New York: Marcel Dekker.

Salminen, S., von Wright, A., & Ouwehand, A. (2004). *Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects. Third edition, revised and expanded.* New York: Marcel Dekker, Inc.

Schachtsiek, M., Hammes, W. P., & Hertel, C. (2004). Characterization of *Lactobacillus coryniformis* DSM 20001T surface protein Cpf mediating coaggregation with and aggregation among pathogens. *Applied and Environmental Microbiology, 70*(12), 7078-7085.

Schiffrin, E. J., Brassart, D., Servin, A. L., Rochat, F., & Donnet-Hughes, A. (1997). Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: Criteria for strain selection. *American Journal of Clinical Nutrition, 66*(2).

Sears, P. M., & McCarthy, K. K. (2003). Management and treatment of staphylococcal mastitis. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice, 19*(1), 171-185.

Sears, P. M., Norcross, N. L., Kenny, K., Smith, B., González, R. N., & Romano, M. N. (1990). *Resistance to Staphylococcus aureus infections in staphylococcal vaccinated heifers.* Paper presented at the Proceedings of the International Symposium on Bovine Mastitis, Indianapolis, IN.

Sears, P. M., Smith, B. S., Stewart, W. K., Gonzalez, R. N., Rubino, S. D., Gusik, S. A., et al. (1992). Evaluation of a nisin-based germicidal formulation on teat skin of live cows. *Journal of Dairy Science, 75*(11), 3185-3190.

Seegers, H., Fourichon, C., & Beaudeau, F. (2003). Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Veterinary Research, 34*(5), 475-491.

Shkreta, L., Talbot, B. G., Diarra, M. S., & Lacasse, P. (2004). Immune responses to a DNA/protein vaccination strategy against *Staphylococcus aureus* induced mastitis in dairy cows. *Vaccine, 23*(1), 114-126.

Simpson, K. W., Rishniw, M., Bellosa, M., Liotta, J., Lucio, A., Baumgart, M., et al. (2009). Influence of *Enterococcus faecium* SF68 probiotic on giardiasis in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine, 23*(3), 476-481.

Smith, K. L., & Hogan, J. S. (1995). *Epidemiology of mastitis.* Paper presented at the Proceeding of the 3rd International Mastitis Seminar Tel Aviv, Israel.

Taponen, S., Koort, J., Björkroth, J., Saloniemi, H., & Pyörälä, S. (2007). Bovine intramammary infections caused by coagulase-negative staphylococci may persist throughout lactation according to amplified fragment length polymorphism-based analysis. *Journal of Dairy Science, 90*(7), 3301-3307.

Taranto, M. P., Medici, M., Perdigon, G., Ruiz Holgado, A. P., & Font de Valdez, G. (2000). Effect of *Lactobacillus reuteri* on the prevention of hypercholesterolemia in mice. *Journal of Dairy Science, 83*(3), 401-403.

Taranto, M. P., Medici, M., Perdigon, G., Ruiz Holgado, A. P., & Valdez, G. F. (1998). Evidence for hypocholesterolemic effect of *Lactobacillus reuteri* in hypercholesterolemic mice. *Journal of Dairy Science, 81*(9), 2336-2340.

Taylor, J. I., Hirsch, A., & Mattick, T. R. (1949). The treatment of bovine streptococcal and staphylococcal mastitis with nisin. *The Veterinary Records, 61*, 197-198.

Tenhagen, B. A., Edinger, D., Baumgärtner, B., Kalbe, P., Klünder, G., & Heuwieser, W. (2001). Efficacy of a herd-specific vaccine against *Staphylococcus aureus* to prevent post-partum mastitis in dairy heifers. *Journal of Veterinary Medicine Series A: Physiology Pathology Clinical Medicine, 48*(10), 601-607.

Tollersrud, T., Zernichow, L., Andersen, S. R., Kenny, K., & Lund, A. (2001). Staphylococcus aureus capsular polysaccharide type 5 conjugate and whole cell vaccines stimulate antibody responses in cattle. *Vaccine, 19*(28-29), 3896-3903.

Twomey, D. P., Wheelock, A. I., Flynn, J., Meaney, W. J., Hill, C., & Ross, R. P. (2000). Protection against *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cows using a bismuth-based teat seal containing the bacteriocin, Lacticin 3147. *Journal of Dairy Science, 83*(9), 1981-1988.

Van Loosdrecht, M. C. M., Lyklema, J., Norde, W., & Zehnder, A. J. B. (1990). Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiological Reviews, 54*(1), 75-87.

Vangroenweghe, F., Lamote, I., & Burvenich, C. (2005). Physiology of the periparturient period and its relation to severity of clinical mastitis. *Domestic Animal Endocrinology, 29*(2), 283-293.

Vesterlund, S., Karp, M., Salminen, S., & Ouwehand, A. C. (2006). *Staphylococcus aureus* adheres to human intestinal mucus but can be displaced by certain lactic acid bacteria. *Microbiology, 152*(6), 1819-1826.

Vesterlund, S., Paltta, J., Karp, M., & Ouwehand, A. C. (2005). Measurement of bacterial adhesion-in vitro evaluation of different methods. *Journal of Microbiological Methods, 60*(2), 225-233.

Wall, R. J., Powell, A. M., Paape, M. J., Kerr, D. E., Bannerman, D. D., Pursel, V. G., et al. (2005). Genetically enhanced cows resist intramammary Staphylococcus aureus infection. *Nature Biotechnology, 23*(4), 445-451.

Weese, J. S., & Rousseau, J. (2005). Evaluation of *Lactobacillus pentosus* WE7 for prevention of diarrhea in neonatal foals. *Journal of the American Veterinary Medical Association, 226*(12), 2031-2034.

Woodward, W. D., Besser, T. E., Ward, A. C., & Corbeil, L. B. (1987). In vitro growth inhibition of mastitis pathogens by bovine teat skin normal flora. *Canadian journal of veterinary research, 51*(1), 27-31.

Wu, J., Hu, S., & Cao, L. (2007). Therapeutic effect of nisin Z on subclinical mastitis in lactating cows. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 51*(9), 3131-3135.

Yancey, R. J., Sanchez, M. S., & Ford, C. W. (1991). Activity of antibiotics against *Staphylococcus aureus* within polymorphonuclear neutrophils. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 10*(2), 107-113.

Zouhir, A., Hammami, R., Fliss, I., & Hamida, J. B. (2010). A new structure-based classification of gram-positive bacteriocins. *Protein J, 29*(6), 432-439.

War against mastitis: Current concepts on controlling bovine mastitis pathogens

Cristina Bogni[1*], Liliana Odierno[1], Claudia Raspanti[1], José Giraudo[2], Alejandro Larriestra[2], Elina Reinoso[1], Mirta Lasagno[1], Mirian Ferrari[3], Edith Ducrós[3], Cecilia Frigerio[1], Susana Bettera[1], Matías Pellegrino[1], Ignacio Frola[1], Silvana Dieser[1] and Claudina Vissio[2].

[1]Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Physical-Chemical and Natural Sciences
[2]Department of Animal Pathology, Faculty of Agronomy and Veterinary Medicine. 3. Department of Chemical Technology, Faculty of Engineering .University of Río Cuarto. Ruta 36 Km 601, X5804ZAB Río Cuarto, Córdoba. Argentina.
*Corresponding author: E-mail: cbogni@exa.unrc.edu.ar

Mastitis, inflammation of the mammary gland, is one of the most costly and complex diseases of the dairy industry. The economic consequences of bovine mastitis are related to treatment, production losses, culling and changes in milk quality. These factors have a substantial impact on the farm business. The complexity is reflected in the numerous causative pathogens, the variety and magnitude of the physiological responses to these pathogens and the variation in efficacy of control measures for different causative organisms. Whether accompanied by clinical signs or not, an IMI (IMI) is associated with an increase in the somatic cell counts (SCC) in milk. The magnitude of this increase varies according to the bacteria involved in the IMI. The major pathogens (*Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., coliforms *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. and *Mycoplasma* spp.) are responsible, most of the time, for clinical mastitis. The minor pathogens, staphylococci other than *Staphylococcus aureus* (mostly *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus epidermidis*, and *Staphylococcus xylosus*) or *Corynebacterium* spp. are associated with a moderate infection and rarely with clinical signs. Based upon their primary reservoir and mode of transmission, mastitis agents are classified as contagious (*Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae)*, commonly transmitted among cows and environmental pathogens, streptococci other than *Streptococcus agalactiae (*mostly *Streptococcus uberis)* and coliform (e.g., *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp.) witch arise from the cows environment, entering into the udder between milkings, when teats are exposed to mud, manure, and dirty bedding materials. Mastitis is an evolving disease that must be discussed ecologically. As result of that, the causative agents, the milk production environment and the mammary gland as a reservoir, should be understood as a whole. These are the driving forces of the persistence and spread of the disease in the herd. The control of bovine mastitis is mainly based on prevention and the focus has to be on the reduction of new infection risk, the control of mammary gland state and the management of the clinical cases. All control tools are developed to deal with the disease and finally to manipulate the immunity and to reduce the carrier state. Even though some current management practices, such as proper milking hygiene and reduced exposure to environmental pathogens contribute to the decrease in the occurrence of the disease, the treatment for bovine mastitis relies heavily on the use of antibiotics. Antibiotics have been used routinely for the treatment of existing infections and also for preventing new ones mainly at the drying off. But, while dry cow antibiotic therapy has helped to reduce the incidence of mastitis, the emergency of antibiotic-resistant pathogens has provoked considerably damages. The development of preventives measures, like application of vaccines, inmunomodulators, beneficial microorganisms (probiotics) or their metabolic products (bacteriocins, lactic acid, and hydrogen peroxide), are beginning to be highly considered and applied in many herds.

This chapter provides the opportunity to expand our knowledge of bovine mastitis and undoubtedly contributes to the development of novel approaches to mastitis diagnostics and control.

1. Global milk production

Since mid- 1990th the world milk consumption has been growing in average 10-15 million tonnes per year, based on the population growth and the increasing income in many countries. The production of milk cow increased from 460 to 550 million tonnes in 2009. The consumption of milk is heterogeneous over the world and varies among the different countries. Even though, European Union and North America continue to be the largest milk consumers, since 1980 the demand for the dairy products has grown considerably, especially in China, India and several Asian countries. The governmental support of milk consumption like school milk programs and new dairy products favors this expansion. An increase of 25% on world milk demand between 2007 and 2020 is expected [1]. In this context, the production and quality of milk could be altered by mastitis, the inflammation of mammary gland. Milk somatic cell count (SCC) constitutes a useful tool to measure milk quality, health status of the mammary gland and the risk of milk changes composition. Increased SCC is associated with reductions in milk yield and it adversely affects cheese production, as a result of reduced of both, curd firmness and fat, and casein loss in whey. Several studies on the United States show that costs related to mastitis on dairy farms are approximately U$ 200 per cow/year, and this gives an annual lost of 2 billion dollar for dairy industry. Almost all authors agree that at least 70% of economic losses come from reduction on milk

production and discard of milk from sick animals. Other causes are the elimination of milk containing antibiotics used in treating sick animals, loss of genetic value by removing cows early and therefore more expensive replacement, veterinary fees, drug expenditures, payments of extra hours and the commercial value reduction of cows removed [2]. Thus, milk producers face the challenge of improving milk quality to reduce human health negative impact. There is no evidence that high SCC is directly associated with adverse effects on human health. However, high SCCs are associated with increased indirect risks, including poor farm hygiene, antibiotic residues and the presence of pathogenic organisms and toxins in milk [3].

2. Development of mastitis

The teat itself is the first line of defence against the penetration of bacteria into the udder. Normally, the sphincter muscle closes the teat canal tightly when the cow is not being milked. Infections begin when microorganisms penetrate the teat canal and multiply in milk-producing tissues. During mechanic milking, organisms present in the milk or at the teat end may be propelled into or through the teat duct into the cistern. After milking, the teat canal remains dilated for one to two hours. Organisms from the environment (manure, bedding, etc.) or those found on injured skin at the tip of the teat may easily invade an open canal. Bacteria may proceed into the udder by attaching and colonizing new tissue. Once bacteria are inside the udder, infection and inflammation of the damaged area begin. Bacteria initially affect tissues lining the large milk-collecting ducts and cisterns by the production of several virulence factors that cause swelling and death of milk producing cells. Milk-secreting cells damaged release substances that lead to increased permeability of vessels and attract leukocytes which can engulf and destroy bacteria. During this process, the leukocytes release substances that cause the recruitment of additional leukocytes from the blood into the milk. If bacteria are not entirely destroyed, they continue to multiply and begin to invade smaller ducts and alveolar areas. Sometimes the microorganisms are eliminated rapidly and the infection is cleared. In this case, the clogged ducts are opened and milk composition and production return to normal in several days. However, as the infection persists and ducts remain clogged, the entrapped milk makes the secretory cells revert to a resting (non-producing) state and the alveoli begin to shrink. Substances released by leukocytes lead to the complete destruction of alveolar structures, which are replaced by connective and scar tissues. The destruction of milk secretory tissue is, in effect, the cow's third line of defence to bring the infection under control. Thus, as the disease progresses, the number of somatic cells in the milk becomes elevated and associated with a permanent reduction in milk yield [4].

3. Different ways of mastitis presentations

Whether accompanied by clinical signs or not, an intramammary infection (IMI) is associated with an increase in the SCC in milk which varies according to the bacteria involved in the IMI. Mastitis usually occurs primarily in response to intramammary bacterial infection, but also to mycoplasmal, fungal, or algal infections. Mechanical trauma, thermal trauma, and chemical injury, predispose the gland to IMI. Occurrence of mastitis depends on the interaction of host, microbial agent, and environmental factors. The severity of the inflammation can be classified into sub-clinical, clinical and chronic forms, and its degree depends on the nature of the causative pathogen and on the age, breed, immunological health and lactation state of the animal. Sub-clinical mastitis is difficult to detect due to the absence of any visible indications, and it has major cost implications. Clinical mastitis is a condition in which abnormalities of the udder and secretion are readily observable. Changes in the milk, such as flakes, clots, and a watery appearance are the most obvious abnormalities; heat, swelling and sensitivity of the udder are either slight or absent. Systemic symptoms may also be present and include fever, loss of appetite, reduced rumen function, weakness, and depression. Chronic mastitis is a form of udder infection that lasts long and results in persistent inflammation of the mammary gland [4].

4. Mastitis diagnostics

Monitoring udder health performance is impossible without reliable and affordable diagnostic methods. Therefore, there is a constant need to improve these methods, for accuracy, cost, or convenience. The most frequently used diagnostic methods are SCC and bacteriological culturing of milk. Currently, methods such as measurement of N-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAGase), lactate dehydrogenase activity (LDH), electric conductivity (EC) on milk, are used less frequently. Mastitis diagnosis starts with visual observation of the udder and of the milk through the forestripping, which is also an important part of udder preparation [5]. If there is any detectable change in quarter and/or any observable abnormality in the milk, the quarter is defined as having clinical mastitis. It is important not to ignore clinical symptoms. An easy, cheap, and rapid "cow-side" mastitis test to estimate SCC on farm is the California Mastitis Test (CMT). This test could be used by farmers and veterinarians to diagnose and treat the inflammation in its early stages, thus having the potential to stop the propagation of the disease in the herd. An increase in temperature is one of the symptoms associated with mastitis. A thermal camera was used to diagnose experimentally-induced mastitis and could detect temperature changes of 1 to 1.58 °C. Infrared thermograph was also used to measure skin surface

temperatures in infected cows, and a strong correlation (R2=0.92) between skin surface temperature and SCCs was observed. However, the ambient temperature can affect this assay, and a rise in temperature might only occur in some cases of mastitis; therefore, temperature might only act as an indicator of infection. Estimation of the levels of inflammation-related enzymes might also be used for the detection of mastitis as these show good correlation with SCCs. Other enzymatic tests include the detection of an esterase secreted by somatic cells using an enzymatic assay on a dipstick*. Bioluminescence- determination assays, based on estimation of the ATP concentrations in somatic cells or the recognition of somatic cell DNA by fluorescent staining, can also be used 'on-site' for the reliable determination of elevated SCC levels and thus the probable presence of mastitis [6].

The identification of pathogens causing mastitis is important for disease control and epidemiological studies. Bacteriological culturing can be carry out at herd, as well as cow and quarter level, each with its own specific goal. Conventional identification of the species is performed according to cultural, biochemical and serological properties. Commercial biochemical kits are available for identification but they have proved unreliable for the identification of veterinary pathogens. The use of molecular methods in pathogen detection has increased over the last years. For a number of mastitis pathogens, PCR-based techniques have been described [7]. Recently, multiplex PCR tests in which several pathogens can be tested at the same time have been developed [8]. Additionally, real-time PCR assays are being developed for detection and quantifying mastitis pathogens in milk. Advances in relevant proteomics techniques, such as two-dimensional gel electrophoresis and mass spectroscopy, have led to the identification of several new proteins involved in mastitis. The proteomics studies mentioned above resulted in information on the different protein expression pattern obtained from mastitis-infected milk and on the proteins expressed by invading pathogens. This information can be applied not only to the discovery of new therapeutic targets but also to the search for new diagnostic biomarkers. The successful application of these new biomarkers in a detection device still remains a challenge. Recent advances in microfluidics and so-called 'biochips' have the capacity to revolutionize diagnostics [9].

5. Mastitis associated pathogens

Over 135 different microorganisms (bacterial, algal or fungal) have been isolated from bovine IMI, but the majority of infections are caused by staphylococci, streptococci, and gram-negative bacteria [10]. Microorganisms that cause mastitis are generally classified as either contagious or environmental based upon their primary reservoir and mode of transmission. *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* are contagious pathogens and are commonly transmitted among cows by contact with infected milk. These pathogens are of particular importance because they cause mainly subclinical forms of IMI that are often difficult to detect. Primary environmental pathogens include different types of bacteria: species of streptococci other than *Strep. agalactiae* (*Streptococcus* spp.), coliform species (*Escherichia coli, Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp.) and *Pseudomonas* spp. (Table 1). In regard to *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis* classification, in some laboratories, the two species are grouped together as "environmental streptococci". However, these species differ in many bacteriological and epidemiological characteristics. *Strep. uberis* has many characteristics of an environmental pathogen. For instance, the large variety of strains occurring in the environment makes it unlikely that a large proportion of cows in a herd would get infected with the same strain. On the other hand, *Strep. dysgalactiae*, largely conforms to the description of contagious pathogens. *Strep. dysgalactiae* is more contagious in nature than *Strep. uberis*, but is also found in the environment. The major pathogens (*Staph. aureus*, *Strep. agalactiae*, *Strep. dysgalactiae, Strep. uberis*) are responsible for clinical and subclinical mastitis, whereas coliforms and *Mycoplasma* spp. usually cause clinical mastitis. The minor pathogens are most often associated with a moderate infection rather than associated with clinical signs. These infections are mainly due to staphylococci other than *Staph. aureus* or *Corynebacterium bovis.*

5.1 *Staphylococcus aureus*

Recent studies of genetic homology (DNA sequences, DNA-rRNA hybridization, comparative sequencing of 16 rRNA) have shown that the genus *Staphylococcus*, together with the genera *Gemella, Macrococcus* and *Salinicoccus* is found within the family *Staphylococcaceae*. The *Staphylococcus* genus includes 42 species, divided by the coagulase test into coagulase-positive (CPS) and coagulase-negative (CNS) species. Some of them are part of the normal microbial flora of skin and mucous membranes of animals. *Staph. aureus* is the most prevalent mastitis causing agent in many parts of the world. However other CPS, including *Staphylococcus hyicus* and *Staphylococcus intermedius*, are also recognized as etiologic agents of bovine mastitis. In many studies and in routine diagnostics, Gram-positive cocci, catalase and coagulase-positive are merely confirmed as *Staph. aureus* [11]. Considering the similar morphological and biochemical characteristics (haemolysis, clumping factor, acetoin production, pyrrolidonyl arylamidase, acid production from maltose, sensitivity to acriflavine and polymyxin) among different CPS species isolated from bovine mastitis, phenotypic identification may be unreliable, and misidentification may happen [12]. The use of nucleic acid targets, with their high sensitivity and specificity, provides an alternative technique for the accurate identification and classification of *Staphylococcus* species. Apart from the 16S rRNA gene, the 16S-23S rRNA intergenic spacer region, and the heat shock protein 60 (*hsp60*) gene [13], other gene sequences have been used in genetic studies: the *femA* gene,

the *sodA* gene [14], the *tuf* gene, the *rpoB* gene [15], and the *gap* gene[16]. *Staph. aureus* produces a large number of potential virulence factors. Among them, several extracellular toxins (α, β, γ and δ hemolysins, enterotoxins), enzymes (staphylokinase, lipases, esterases, protease, nuclease), cell-wall associated proteins (protein A, collagen-binding protein, fibronectin-binding protein, elastin-binding protein), capsular polysaccharides and slime. *In vitro* studies have shown that *Staph. aureus* adheres to mammary epithelial cells and extracellular matrix components and invades into mammary epithelial. Adhesion is a prerequisite and crucial early step for mammary gland infection. Bacteria are found enclosed in membrane bound vacuoles in the cytoplasm of mammary epithelial cells. *Staph. aureus* escapes from the phagosome into the cytoplasm and induces apoptosis. The invasion into mammary epithelial cells may occur through an endocytic process. Thus, the recurrent subclinical infection may result from this intracellular existence of bacteria that are protected from host defenses and effects of antibiotics. In the last decade, several virulence genes (*spa* IgG-binding, *spa* X-region, *nuc, clf*A, *coa, hla, hlb, fnb*A, *fnb*B, *cap, agrI, agrII, agr III, ica*A, *ica*D) in *Staph. aureus* isolated from bovine have been described [17,18] . Virulence genes or gene elements may also have an association with resistance determinants (*mec*A, *blaZ*) and hypervirulence. In spite of the introduction of large-scale mastitis control programmes, *Staph. aureus* remains a major mastitis pathogen. It causes mastitis epidemics even in well-managed dairy herds and can persist for long periods in the mammary glands. The current control practices may fail to prevent the spread of particularly virulent strains. The control of *Staph. aureus* mastitis should be focused on specific strains causing infections in the herds.

Table 1. Bovine mastitis associated microorganisms

Contagious microorganism	Environmental microorganism	Others pathogens
Staphylococcus aureus *	*Escherichia coli**	Coagulase-negative
Streptococcus agalactiae *	*Klebsiella* spp.*	staphylococci (CNS) **
Streptococcus dysgalactiae *	*Citrobacter* spp.*	
Mycoplasma spp.*	*Serratia* spp. *	
Corynebacterium spp.**	*Enterobacter* spp.*	
	Proteus spp. *	
	Streptococcus uberis *	
	Streptococcus dysgalactiae *	
	Streptoccocus spp.*	
	Enterococcus faecalis *	
	Enterococcus faecium *	
	Aerococcus spp.*	
	Pseudomonas spp.*	
	Bacillus spp.*	
	Arcanobacterium pyogenes *	
	Nocardia spp.**	
	Yeast spp.*	
	Prototheca spp.*	

* Classified as major pathogen, **Classified as minor pathogen

5.2 *Streptococcus spp.*

Streptococci are a heterogeneous group of bacteria, consisting of as many as 48 species [19]. Identification of streptococcal species is currently based on observation of the cultural and morphological characteristics, determination of the biochemical pattern (production of enzymes and production of acid from various carbohydrate sources) and observation of the antigenic structure according to the classification of Rebecca Lancefield. PCR amplification of species-specific parts of the gene encoding the 16S rRNA, the 23S rRNA gene, the 16S-23S rDNA intergenic spacer region, *tuf* gene, *cfb* gene, as well as tRNA intergenic spacer length polymorphism analysis had been successfully used for the rapid and reliable identification of these species [20,21] .

5.2.1 *Streptococcus agalactiae*

Strep. agalactiae is a beta-hemolytic Gram-positive bacteria corresponding to group B streptococci. In animals it is well known worldwide as a major contagious pathogen causing bovine subclinical mastitis. This bacterium can survive a very short time in the environment, but it can persist indefinitely within the mammary gland as an obligate pathogen of the udder [22]. *Strep. agalactiae* forms small 3 to 4 mm, grey-white colonies, which have a narrow zone of beta hemolysis on blood agar. *Strep. agalactiae* is identified in the veterinary laboratory by CAMP factor, hydrolysis of hippurate and lack of hydrolysis of esculin agar. This specie is characterized as inulin-variable. Commercial antisera that recognize the group B antigen are used to identify isolates. One of the most important virulence factors is the capsular polysaccharide of which nine antigenic variants have been identified [23]. Few studies have explored the presence of genetic determinants that encode potential virulence factors. The *bca* and *scpB* virulence-related genes were the most frequent among bovine isolates [24]. More recently, virulence genes *hylB* (hyaluronidase) and *lmb* (laminin-binding protein) were detected in bovine strains.

5.2.2 *Streptococcus dysgalactiae*

Strep. dysgalactiae is described as α-hemolytic or nonhemolytic (Lancefield group C) and associated only with IMI. Among the environmental streptococci, *Strep. dysgalactiae* is one of the most prevalent, which may infect mammary glands as favorable conditions arise [25] . This specie is identified as inulin and esculin-variable and by lack of CAMP factor production and hydrolysis of hippurate. Little is known about factors that contribute to the virulence of *Strep. dysgalactiae*. Several cell-associated and extracellular factors of this specie have been identified. This pathogen can interact with several plasma and extracellular host-derived proteins (among others immunoglobulin G, albumin, fibronectin, fibrinogen). These interactions are mediated by bacterial surface proteins. The virulence genes encoding hyaluronidase, fibrinolysin, streptolysin-S, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, plasminogen-binding M-Like protein and the collagen-like protein were detected in the majority of bovine isolates. Additionally, group A streptococci bacteriophage-associated virulence genes encoding superantigens, DNase and/or streptodornase were detected in bovine isolates [26]. Furthermore, *Strep. dysgalactiae* adheres to and is internalized by bovine mammary epithelial cells *in vitro*. Involvement of host cell kinases is required for its internalization into bovine mammary epithelial cells; a process that apparently occurs by a receptor-mediated endocytosis mechanism. Finally, *Strep. dysgalactiae* survive within mammary epithelial cells for extended periods of time without losing viability or damaging the eukaryotic cell. Among the virulence factors, bovine S protein enhances streptococcal adherence to bovine epithelial cells. The binding of bovine complement S protein (vitronectin) to *Strep. dysgalactiae* isolates from mastitis cows and its role in adherence to bovine epithelial cells were observed. Vitronectin is a multifunctional protein that plays an important role in complement-dependent cell lysis, in the coagulation system, and in cellular adhesion.

5.2.3 *Streptococcus uberis*

Strep. uberis is an important environmental pathogen particularly because it is ubiquitous in the dairy environment. Identification of *Strep. uberis* is currently based on observation of the cultural and morphological characteristics, biochemical tests determination, and enzyme activity [27]. *Strep. uberis* is identified by hydrolysis of hippurate, esculin and inulin and characterized as CAMP factor-variable. On the other hand, several commercial microbial identification systems have also been used to differentiate *Strep. uberis* from other species of streptococci and enterococci isolated from bovine mastitis, and more recently, molecular tools such as PCR-based protocols have been proposed to provide an accurate identification of *Strep. uberis* isolates [28]. Among these, RFLP analysis of 16S rDNA described by [20,27] were proposed as a general method for bacterial identification. Virulence factors associated with pathogenesis are not well understood and constitute a major obstacle for the development of strategies to control this important mastitis pathogen. Several putative virulence associated genes have been described. Among them, virulence genes encoding hyaluronic acid capsule, plasminogen activator proteins such as PauA, PauB and streptokinase, lactoferrin binding proteins, SUAM, CAMP factor, a surface dehydrogenase protein GapC and Opp proteins. A recent study carried out by Reinoso et al., 2011 [28] reported the distribution of 10 virulence associated genes over various herds. The results showed that not all virulence genes were present in the strains but all detected genes were present in combination. Within this context, it will be of great interest to investigate new genes related to virulence in *Strep. uberis*.

5.3 Coagulase-negative *Staphylococcus*

Coagulase-negative *Staphylococcus* (CNS) has traditionally been considered to be a minor pathogen. However, during the last decade, they are being considered as emerging pathogens of bovine mastitis [29, 30]. CNS seems to be a particular problem especially in well managed and high producing farms, where udder infections caused by major mastitis pathogens have been successfully controlled. The highest prevalence of CNS infections is in heifers rather than in cows, and particularly around calving period.

CNS infections have been shown that can cause more severe and persistent processes due to mammary gland tissues damage. A wide variety of reservoirs of CNS have been identified. Species such as *Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus saprophyticus, Staphylococcus simulans* and *Staphylococcus warneri* belong to the normal bacterial flora of the teat skin, while *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus sciuri* seem to come from the environment. *Staphylococcus chromogenes* may colonize the skin of the teat and other parts of animal's body such as hair, vagina and teat canal. Since different species have different pathogenic effects, it is important to know which broad groups are present in a herd or area. Potential virulence factors of CNS have been investigated both by phenotypic and genotypic methods. CNS has shown to adhere to bovine mammary cells almost equally to *Staph. aureus,* although the invasive capacity of *Staph. aureus* is greater than that of CNS strains. In cell cultures, CNS isolates from mastitis showed cytotoxic activity, possibly caused by a metalloprotease. Biofilm associated proteins were found among bovine mastitis isolates, including *Staph. epidermidis, Staph. chromogenes, Staphylococcus hyicus,* and *Staph. xylosus* [31] . Among other virulence factors, exoproteins such as DNasa, elastase, lecitinase, proteases, enterotoxins and shock toxic syndrome toxin (TSST) have been described.

5.4 *Escherichia coli*

Among coliforms bacteria, *E. coli* is the most frequently isolated from bovine milk in cows belonging to dairy farms with intensive systems of milk production. *E. coli* is a member of *Enterobacteriaceae* family. Its primary importance is its ability for lactose fermentation. Over 700 antigenic types or serotypes of *E. coli* have been recognised based on O, H, and K antigens. Two classes of coliforms have to be distinguished: strains that are harmless (non-pathogenic strains) and strains that cause a wide variety of typical clinical infections (pathogenic strains). Millions of non-pathogenic *E. coli* bacteria are living in the humans and animals normal intestinal microflora. *E. coli* is ubiquitous in the cow's environment because is massively excreted with the faeces. *E. coli* causes infection and inflammation of the mammary gland in dairy cows mainly around parturition and during early lactation striking local and sometimes severe systemic clinical symptoms. Clinical signs vary from very severe, even fatal forms, or mild mastitis, where cows have only local signs in the udder. During mastitis, the host defense status is a factor determining the outcome of the disease. Particularly, during *E. coli* mastitis, the neutrophil is a key factor in the cows' defense against IMI. However, virulence of the involved bacterial strain may also play a role. Most of the pathogenic *E. coli* strains posses several kinds of pathogenic mechanisms and virulence factors. A non-specific but potent factor that is important during the pathogenesis of *E. coli* is the endotoxin or lipopolysaccharide, which is responsible for most pathophysiological effects [31]. Major groups of *E. coli* virulence factors among bovine mastitis strains include, serum resistance associated factor, cytotoxic necrotizing factors (CNF1 and CNF2), aerobactin, capsule antigen K1, F17 fimbriae, TraT lipoprotein. A variety of virulence genes are present in *E. coli* mastitis strains. Recently, Wenz et al 2006 [32] reported that the *eaeA* gene (intimin protein), *CNF1* and *CNF2* genes and *cs31a* gene (fimbrial antigen) were occassionally identified and were not associated with systemic disease severity. A high degree of genotypic variability is characteristic of *E. coli* strains causing clinical mastitis within and between different farms. Studies with pulse-field gel electrophoresis suggest that clinical bovine mastitis *E. coli* isolates may form a subset of the general environmental *E. coli* population. They are better able to multiply in the udder and to evade the host cellular innate immune response, and are genetically distinct from most environmental strains.

6. Preventive and control strategies against mastitis pathogens

The herd-level SCC is a result of many factors such as cow factors, management practices, and seasonal fluctuations. The pathogen distribution among the herd also influences the level of herd SCC. For instance, *Staph. aureus*-positive herds have higher bulk milk SCC than *Staph. aureus*-negative herds. To continuously monitor and interpret SCC on the herd level and to detect an increase or decrease in the trend over time would be ideal. Bonuses programs are applied in many countries based on a SCC threshold value varying from 150,000 to 250,000 cells/mL. The "Five Point Plan" proposed for the National Mastitis Council (2003) [4] summarizes several strategies for controlling herd mastitis, based upon adoption of preventive and control strategies including diagnosis, segregation of the animals and the use of improved hygiene and therapeutic protocols. Some of these practices to control mastitis in dairy herds are summarized in Table 2. Main objective of this plan is to reduce the degree and the durability of the infection and avoid new IMI. The "Five Point Plan" encloses:

6.1. Improvement of milking routine

One of the essential steps is the correct use of milking equipment and its periodic evaluation. This includes washing and disinfection of the milking machine and the production line before and after milking. Treatment of teat ends is based on cleaning and drying of teats before milking and disinfection pre and post milking (pre-dipping and teat-dipping).

6.2. Antibiotic treatment at the dry period

Intramammary dry cow therapy reduces the number of contagious infections during the dry period and environmental streptococcal infections during the early dry period. The dry cow preparations are formulated (vehicles, solvents, pH) to cause minimal tissue irritation, to avoid damaging the secretory tissue and to prevent fibrosis. An antibiotic which is active against Gram-positive organisms in low concentrations is chosen, and if combinations are used, antibiotics with bactericidal effects are preferable. Antibiotic combinations of cloxacillin, ampicillin, cephapirin, streptomycin, cephalexin, penethamate, erythromycin, amoxicillin, penicillin, nafcillin are frequently used.

6.3. Treatment of clinical mastitis

Antibiotic treatment of subclinical mastitis during lactation is cost effective and increases the opportunities for drug residues in milk. According to the Food and Drug Administration/ Center for Veterinary Medicine [34] the approved antibiotics for the treatment of bovine mastitis are: pirlimycin, methicillin, cloxacillin, amoxicillin, novobiocin, penicillin G, dihydrostreptomycin, cephapirin and erythromycin. The choice of the antimicrobial agents and the route of administration will be directed by the characteristics of the drug and regulatory issues. *Staph. aureus* is susceptible to a variety of antibiotics *in vitro*. However, farmers often complain that *in vivo* cure rates are disappointing. Several factors including the ability of bacterium to survive inside neutrophils, to form small-colony variants, to induce fibrosis and formation of micro abscesses, and to invade mammary epithelial cells are potential contributors to the poor response of chronic *Staph. aureus* infections to antimicrobial treatment. Many antimicrobial drugs used for mastitis treatment, including compounds that penetrate the mammary gland; are sulfonamides, penicillins with the exception of penethamate iodide, aminoglycosides, and early-generation cephalosporins.

6.4. Replacement of cows with chronic mastitis

Culling is used in mastitis control for the following reasons: 1) infected udders are sources of new infections in the herds and 2) susceptibility increases in those cows which have suffered mastitis. A cow which has had mastitis is usually more susceptible during subsequent lactations. A cow which has incurable mastitis at earlier lactations should be culled.

6.5. Vaccination plan

The prevention of bovine mastitis by using dry cow therapy has demonstrated that 80% of new infections caused by different pathogens during the dry period can be eliminated, but is not completely effective in *Staph. aureus* infected animals where less than 15% of infected cows respond to the antibiotic therapy. Traditional measures are able to reduce the incidence of *Staph. aureus* IMI. However, the control of the disease in many cases becomes difficult despite the application of these practices. Since the disease was first diagnosed, veterinarians and dairy herd's producers claim for the development of an efficient vaccine against bovine mastitis. The main obstacles to achieve this objective are the large number of microorganisms (bacteria, viruses, fungi) involved in the production of the disease, an incomplete knowledge of the mammary gland's immunity and the virulence factors of the main pathogens, the failure to maintain a high level of immunoglobulins in milk and the lack of proper vaccination schedule. Perhaps the greatest vaccine development progress has been achieved by the use of a vaccine based on mutant bacterin (*E. coli* J5 strain) currently available in several countries including U.S., France and Denmark, among others. This vaccine showed how to reduce the duration and severity of the symptoms of clinical mastitis after challenge with a virulent strain of *E. coli* [35].
Recently, many *Strep. uberis* virulence factor shave been identified. Among them, vaccines made on the base of GapC, CAMP-factor, pauA, lives *Strep. uberis* 0140J strain and bacterial surface extract of *Strep. uberis* were developed [36,37].

Several research works are conducted to avoid *Staph. aureus* bovine mastitis by using vaccines made on the base of wall cellular component, capsular exopolisacarides, bacterins, live attenuated bacteria and those DNA technology based [38]. Even though these vaccines increased the level of specific antibodies in blood, the levels reached in milk are very low and it is very difficult to prevent new infections and to induce both humoral and cellular immune response.

Table 2. Current practices to control mastitis in dairy herds and their effect on dairy cow health

ATTRIBUTES	Use of germicidal teat dip	Antibiotic dry treatment	Clinical cows treatment	Proper hygienic practice in dairy herd	Chronic mastitis cows segregation
% reduction of new infections	50-80	60-70	40-60	40	20-30
Frequency of use	50%	75 %	70%	80%	No frequent
Practical difficulty	Easy	Easy	Easy	Easy	Easy
Acceptance by consumers	No	No	No	Yes	Yes
Cost	Medium	High	High	Low	High
Incidence in the production	Medium	Medium	High	Medium	Low
Risk to operator	No	No	No	No	No
Environment's risk	Pollutes water	No	No	No	No
Risk to animal health	Eliminates normal flora Teat irritation	Selection of antibiotic resistance strains	Selection of antibiotic resistance strains	No	No
Risk to milk products	Chemical residues	No	Antibiotic residues	No	Improves bulk tank milk quality
Risk to human health	No	No	Allergic reactions	No	No
Prevention of new infections	For a short period	Until half-life of the antibiotic	No	Only at milking	Yes

7. Alternative approaches to control pathogen infection

Even though the above strategies contribute to decrease the occurrence of the disease, the treatment for bovine mastitis still relies heavily on the use of antibiotics, both for prophylaxis and therapy. But, while antibiotics have had a major impact on dairy cow health and consequently on milk production, their use is questioned because of traces of antibiotics in milk for human consumption. In order to reduce antibiotic residues in dairy products and in agreement with global pressure to limit their use in dairy cattle, research has been focussed on enhancing cows' natural defence mechanisms through the development of innovative methods for the treatment and the prevention of bovine mastitis

7.1. Probiotics: A Healthy Alternative

Probiotics are "live microorganisms, which administered in adequate amounts confer a health benefit on the host" according to World Health Organization and the Food and Agriculture Organization of the United Nations. Among lactic acid bacteria (LAB) the genera most often used as probiotics are *Lactobacillus*, *Bifidobacterium, Lactococcus, Enterococcus*, *Streptococcus*, *Saccharomyces*. They are all Gram-positive and the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* are the mainly selected because of their long history of safe use in dairy industry and their natural presence in the human intestine. Different criteria to define a strain as "potentially probiotic" include the following conditions: GRAS organism (Generally Recognized As Safe), viability during processing and storage, antagonistic effect against pathogens, tolerance to bile acid challenge and adherence to the intestinal epithelium of the host among others.

Recently the application of live bacteria as potential therapeutic against mastitis has gained interest. Probiotic bacteria can be used to control several inflammatory processes through antagonism and immunomodulation. Commensal bacteria, with a broad spectrum of antimicrobial activity, have previously been isolated from healthy bovine udders and suggested as potential anti-mastitis agents. Greene et al, 1991 [39] investigated the effects of treating bovine subclinical mastitis infections with intramammary infusions of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* (Lacto-bac, a commercial probiotic) and although an increase in SCC was observed, no increase in intramammary cure rate was detected. On the other hand lacticin 3147, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* DPC 3147 exhibits a broad-antimicrobial spectrum against mastitis-causing pathogens *in vitro*. In combination with a bismuth-based teat seal, it

provides protection against infection with *Strep. dysgalactiae* and *Staph. aureus* in dry period cows [40]. Recently, Klostermann et al, 2008 [41] demonstrated that a resuspended freeze-dried application of *Lc. lactis* is as effective as an antibiotic in curing clinical mastitis cases and Crispie et al, 2008 [42] showed that administration of the lactococcal culture into the mammary glands of uninfected animals elicits an immunomodulatory effect that substantially produces a recruitment of polymorphonuclear and lymphocytes to the infused quarters.

Other alternative strategies against mastitis pathogens are bacteriocins (polypeptide antibiotics) which usually only target closely related species. The advantage of bacteriocins over antibiotics in the treatments is that they could be targeted against specific pathogenic organisms. Bacteriocins identified for potential use as antimicrobials include lantibiotics, produced by LAB strains and, colicins and microcins, produced by Gram-negative bacteria. Commercial products are currently available for the treatment of mastitis in dairy cattle and will be discussed in more detail. Table 3 summarises potential applications of some bacteriocins in veterinary fields.

Table 3. Potential veterinary applications of bacteriocins

Bacteriocins	Producer/Commercial Product	Potencial use
Nisin	*Lactococcus lactis*	Effective against a wide range of Gram positive bacteria, including mastitis pathogens. Used to treat mastitis in cattle
Nisin A	Origin Ambicin N®	Anti-bacterial activity against mastitis pathogens
Nisin A	Consept®	Germicidal activity against mastitis pathogens (*Staph. aureus*, *Strep. agalactiae*, *Strept. uberis*, *E. coli* and *Klebsiella pneumoniae)*
Nisin A	Mast out (Immucell, EEUU)	Intramammary infusion product containing *Nisin* for the treatment of subclinical mastitis in lactating dairy cows
Nisin A	Wipe Out (Immucell, EEUU)	Dairy Wipes made from a non-woven material that has been soaked through with a quick-acting and effective antimicrobial solution containing *Nisin*
Nisin Z	Nisin Z Silver-Elephant®	Germicidal activity against mastitis pathogens in clinical and subclinical mastitis
Lacticin 3147	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DPC3147 isolated from a Irish kefir grain	Treat mastitis in cattle. Germicidal activity of bismuth and *Lacticin 3147*-based teat seal in dry cows challenged with *Staph. aureus*
Lacticin 3147	*Lacticin 3147* and *Lactococcus lactis* DPC3251 isolated from a Irish kefir grain	Natural teat dip using a fermentate containing the live bacterium *Lc. lactis* DPC 3251
Lacticin NK34	Partially purified form of *lacticin NK34*	*In vivo* preventive and therapeutic effects on mouse infection model using mastitis pathogens
Mutacin B-Ny266	*Streptococcus mutans*	Bacterial infection caused by methicillin-resistant staphylococci
Lysostaphin	Recombinant lysostaphin	Therapeutic effect against *Staph. aureus* by intramammary application

Nisin was first identified attempted to find a practical application for the treatment of bovine mastitis. The interest for the use of nisin as a therapeutic agent was renewed in 1989, when Broadbent et al. showed its inhibitory effect to several Gram-positive pathogens causing mastitis. The practical use of nisin was investigated by Sears et al, 1992 [43] in combination with lysostaphin by administration of intramammary infusions. In addition, promising results (cure rates of 66% for *Staph. aureus*, 95% for *Strep. agalactiae* and 100% for *Strep. uberis*) were obtained. Two nisins have been evaluated for prevention or treatment of bovine mastitis: the *nisin* A, origin Ambicin N® with germicidal activity against mastitis pathogens (*Staph. aureus, Strep. agalactiae, Strept. uberis, Klebsiella pneumoniae* and *E. coli)* and the nisin Z, origin nisin Z Silver-Elephant® with Germicidal activity against mastitis pathogens. Some of commercially available products containing *nisin* for bovine mastitis are *Consept®*, *Mast out* (Immucell, EEUU) and *Wipe Out* (Immucell, EEUU) all of them elaborated with *nisin* A. Recently, it has been demonstrated that lacticin 3147, a new bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* DPC3147 is also effective against a wide range of Gram-positive bacteria, including many mastitis causing pathogens. Lacticin NK34 (partially purified form of *lacticin* NK34) has *in vivo* preventive and therapeutic effects on mouse infection model using mastitis pathogens.

Our research group focused on the prevention of bovine mastitis by promoting the colonization of mammary gland during dry cow period with indigenous probiotic strains. Based on the host specificity, one hundred and two LAB

strains from foremilk, stripping milk and teat canal scrapped were isolated. The production of antagonistic substances and bacterial-surface properties, such as hydrophobicity and auto-aggregation were evaluated. Safety aspects as virulence traits and antibiotic resistance were also taken into account [44]. Finally, three strains: Lc. lactis subsp. lactis CRL1655, *Lactobacillus perolens* CRL1724 and *Enterococcus hiriae* CRL1835 were selected. Among lactobacilli probiotic properties, inhibition of mastitis pathogens by organic acid production and adhesion to teat canal cells were the most relevant. *E. hiriae* CRL1835 is a bacteriocinogenic strain and. *Lc lactis* subsp. *lactis* CRL1655 is a producer of nisin Z [44]. Furthers studies will be conducted to develop non antibiotic formulations for the treatment and prevention of bovine mastitis.

7.2. Quorum sensing

Quorum sensing (QS) is the regulation of gene expression in response to fluctuations in cell-population density. Bacteria produce and release chemical signal molecules called autoinducers that increase in concentration as a function of cell density. The detection of a minimal threshold stimulatory concentration of an autoinducer leads to an alteration in gene expression. In the natural environment, there are many different bacteria living together which use different signalling molecules. Today, several quorum sensing systems are intensively studied in different pathogenic bacteria [45]. *Staph. aureus*, an important mastitis pathogen, regulates its virulence factors in a coordinated manner, by the aid of well-characterized global regulatory elements, such as *sar* locus and two-component regulatory systems *agr* and *sae* locus. *Staph. aureus* initially infects by binding to epithelial cells using a series of extra-cellular binding proteins [46] During the late initial stage of growth, self-generated signal molecules secreted by the bacteria serve as quorum sensing agents. When they reach certain concentration their interaction with specific receptors activates the transcriptional control system consisting of the genetic elements *agr* and *sar* (Heinrichs et al., 1996). Interaction between *agr* and *sar* reduces the expression of the adhesion surface proteins and increases secretion of exoproteins and toxins (Wolz et al., 2000), which are believed to be required for bacteria survival and infection dissemination.

Recent studies in *Strep. uberis* have shown the presence of QS genes such as *luxS* and *comEA, EC, X (*competence) responsible of group behaviour. Quorum sensing regulates diverse physiological processes including formation of surface-associated communities called biofilms, where bacteria are embedded in an extracellular polymeric matrix, and are protected against environmental stresses, antimicrobial treatment, and the host immune system. As *Staphylococcus* spp and *Streptococcus* spp. have ability to grow in infected tissues on biofilms developing an innate resistance to almost all therapeutic agents, the difficulties of treating recurrent infections might be related to this pathogen ability [47]. Understanding the virulence factors that influence the ability of major mastitis pathogens to colonize and maintain infections will allow finding effective and appropriate treatment protocols that could greatly decrease the impact of mastitis to the dairy industry. As *QS* is an important process involved in bacterial survival and infections, recent research has focused on the development of therapeutic agents which prevent or manage bacterial pathogenesis by inhibiting bacterial QS. Inhibition of quorum sensing offers an alternative to antibiotic mediated bactericidal or bacteriostatic approach and reduces the risk for resistance development.

7.3. Transgenic dairy cows

The ability to produce transgenic dairy cows opens the door to countless new strategies which aim at enhancing the efficiency of dairy production. The goals of these projects include increasing milk production efficiency, increasing milk protein content, and animal health through enhanced disease resistance. Current therapies for mastitis rely heavily on the use of β-lactam antibiotics such as penicillins and cephalosporins. A transgenic approach to enhance mastitis resistance would enable mammary epithelial cells to produce antibacterial enzymes that, in contrast to β-lactam antibiotics, would be degraded along with other milk proteins during the digestion process and would not represent a health risk to the consumer. Antibacterial proteins, such as lysostaphin, are not typically used as injection or oral therapeutics because of immune-mediated or digestive destruction of their activity. In contrast, the immune system of transgenic animals will not consider the transgenic protein as being foreign. The use of transgenesis to direct expression of a foreign protein into milk to prevent mastitis was first reported in a mouse model in 1987 by Gordon et al. Shortly thereafter, it was proposed that mammary production of lysozyme II or bacterial lysostaphin would be an effective means to enhance mastitis resistance. Both of these proteins have considerable antistaphylococcal activity. However, the initial applications of the technology were the generation of transgenic mice producing human lysozyme or human lactoferrin in milk. Clearly, there are potential risks in the production of foreign proteins in milk of dairy cows that could positively or negatively affect its antibacterial or functional characteristics.

Transgenic technology has resulted in the production of mice and cows that secrete human lactoferrin into their milk. The transfer of a gene encoding human lactoferrin to the bovine mammary gland would, in theory, represent a good candidate approach. Results showed that lactoferrin transgenesis model did not provide protection against *E. coli* mastitis in dairy cows, but reduced the severity of the inflammatory reaction, which could be seen in the systemic signs and in the serum cortisol and haptoglobin concentrations. Thus, over expression of bovine lactoferrin does not seem to

be a candidate for enhancing mastitis resistance, although its gene regulatory region may be suitable to direct expression of new antibacterial proteins [48].

Another foreign protein, lysozyme, also altered the physical and functional properties of the milk. Unfortunately, human lysozyme has very limited potency against *Staph. aureus* and is ineffective against *E. coli* and *Strep. uberis* isolates obtained from mastitis milk. However, it seems unlikely that lysostaphin would be among the best candidate proteins for genetic engineering to enhance mastitis resistance in dairy cows if this approach were taken by the dairy industry in the future. Both, natural and bovine derived lysostaphin were equally effective in three different mouse infection models. Cows carrying a lysostaphin gene showed to be more resistant to *Staph. aureus* induced IMI and to CNS mastitis than normal cows. They eliminated *Staph. chromogenes* from the mammary gland faster and had a milder clinical and local inflammatory response[49].

Another transgenic approach to enhance cow disease resistance involves the production of pathogen-specific antibodies into milk. However, the increasing resistance of dairy cattle to infections by genetic engineering is a delicate issue with many ethical considerations. For animal welfare, one of the most important goals should be to prevent the most common diseases among production animals. Genetic engineering could be one means to control mastitis, but further studies are needed.

References

[1] FAOSTAT-Agriculture (Food and Agriculture Organization Statistics). Annual Agricultural data.2007. Available at.http://www.apps.fao.org/ Accessed may 20, 2011.

[2] Morin D, Petersen G, Whitmore H, Hungerfold L, Hinton R. Economic analysis of a mastitis monitoring and control program in four dairy herds. J Am Vet Med Assoc. 1993; 202: 540-548.

[3] National Mastitis Council, board of director's report. Human health risks associated with high somatic cell count milk: symposium summary. National Mastitis Council, Verona, Wisconsin. Available at: http://www.nmconline.org/docs/scchealthrisks.pdf.;2005. Accessed may 5, 2011.

[4] Bramley A, Cullor J, Erskine R, Fox L, Harmon R, Hogan J, Nickerson S, Oliver S, Larry Smith K, Sordillo L. Current Concepts of Bovine Mastitis. 4th ed. 421 S. Nine Mound Rd. Verona, WI: National Mastitis Council Publications; 2003.

[5] Reneau JK. Somatic cell counts: measures of farm management and milk quality. In: Proc., National Mastitis Council Ann. Mtg. p. 29-37. Feb. 8-10, Reno, NV; 2001.

[6] Frundzhyan V, Parkhomenko I, Brovko L, Ugarova N. Improved bioluminescent assay of somatic cell counts in raw milk. J Dairy Res. 2008;75(3):279-83.

[7] Zadoks R, Schukken Y. Use of molecular epidemiology in veterinary practice. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice. 2006;22(1):229-261.

[8] Phuektes P, Browning G, Anderson G, Mansell P. Multiplex polymerase chain reaction as a mastitis screening test for *Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae, Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis* in bulk milk samples. J Dairy Res. 2003;70(2):149-55.

[9] Viguier C, Arora S, Gilmartin N, Welbeck K, O'Kennedy R. Mastitis detection:current trends and future perspectives. Trends in Biotech.2009; 27: 8-10.

[10] Watts J. Etiological agents of bovine mastitis. Vet Microbiol.1988; 16, 41-66.

[11] Capurro A, Concha C, Nilsson L, Ostensson K. Identification of coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. Acta Vet Scand.1999;40:315-321.

[12] Devriese L, Vancanneyt M, Baele M, Vaneechoutte M, De Graef E, Snauwaert C, Cleenwerck I, Dawyndt P, Swings J, Decostere A, Haesebrouck F. *Staphylococcus pseudointermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. Int J Syst Evol Micr. 2005;55:1569-1573.

[13] Goh S, Santucci Z, Kloos W, Faltyn M, George C, Driedger D, Hemmingsen S. Identification of *Staphylococcus* species and subspecies by the chaperonin 60 gene identification method and reverse checkerboard hybridization. J Clin Microbiol. 1997;35:3116-3121.

[14] Poyart, C., G. Quesne, C. Boumaila, and P. Trieu-Cuot. Rapid and accurate species-level identification of coagulase-negative staphylococci by using the *sodA* gene as a target. J Clin Microbiol.2001;39:4296–4301.

[15] Drancourt M, Raoult D. *rpoB* gene sequence-based identification of *Staphylococcus* species. J Clin Microbiol. 2002;40:1333-1338.

[16] 16 Yugueros J, Temprano A, Sanchez M, Luengo J, Naharro G. Identification of *Staphylococcus* spp. by PCR-restriction fragment length polymorphism of *gap* gene. J. Clin. Microbiol. 2001;39:3693–3695.

[17] El-Sayed A, Alber J, Lämmler C, Jäger S, Wolter W, Castañeda-Vázquez H. Comparative study on genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical and subclinical mastitis in Mexico. Vet Méx. 2006;37 (2):165-179

[18] Haveri M, Roslöf A, Rantala L, Pyörälä S. Virulence genes of bovine Staphylococcus aureus from persistent and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics. J Appl Microbiol. 2007;103:993-100.

[19] Facklam R. What Happened to the Streptococci: Overview of Taxonomic and Nomenclature Changes Clin Microbiol Rev. 2002;15(4):613–630.

[20] Jayarao B, Dore J, Oliver S. Restriction Fragment Length polymorphism Analysis of 16S Ribosomal DNA of *Streptococcus* and *Enterococcus* Species of Bovine Origin. J Clin Microbiol. 1992;30: 2235-2240.

[21] Picard F, Ke D, Boudreau D,Boissinot M, Huletsky A, Richard D, Ouellette M, Roy P, Bergeron M. Use of *tuf* Sequences for Genus-Specific PCR Detection and Phylogenetic Analysis of 28 Streptococcal Species. J Clin Microbiol.2004;42(8):3686–3695.

[22] Kefee G. *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. Can Vet J. 1997;38:429-437.
[23] Slotved, H, Kong, F., Lambertsen, L., Sauer, S., Gilbert, G. Serotype IX, a proposed new *Streptococcus agalactiae* serotype. J. Clin Microbiol.2007;45, 2929–2936.
[24] Duarte R, Bellei B, Miranda O, Brito M, Teixeira L. Distribution of Antimicrobial Resistance and Virulence-Related Genes among Brazilian Group B Streptococci Recovered from Bovine and Human Sources. Antimicrobial Agents and Chemotherapy.2005; 49(1): 97–103.
[25] Todhunter, D, Smith K, Hogan J.Environmental streptococcal intramammary infections of the bovine mammary gland. J. Dairy Sci. 1995;78:2366-2374.
[26] Rato M, Bexiga G, Nunes F., Vilela C, Santos-Sanches I. Human Group A Streptococci Virulence Genes in Bovine Group C Streptococci. Emerging Infectious Diseases http://www.cdc.gov/eid . 2010;16(1):116-119.
[27] Khan I, Hassan A, Abdulmawjood A, Lämmler C,Wolter W, Zschöck M. Identification and epidemiological characterization of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis using conventional and molecular methods. J Vet Sci. 2003;4: 213–223.
[28] Reinoso E, Lasagno M, Dieser S, Odierno L.Distribution of virulence associated genes in *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis. FEMS Microbiol. Letters.2011;318(2):183-188
[29] Thorberg, B., Danielsson-Tham, M., Emanuelson, U., Persson Waller, K. Bovine subclinical mastitis caused by different types of coagulase-negative staphylococci. J. Dairy Sci. 2009;92:4962-4970.
[30] Sampimon O, Barkema H, Berends I, Sol J, Lam T. Prevalence and herd-level risk factors for intramammary infection with coagulase-negative staphylococci in Dutch dairy herds. Vet Microbiol. 2009;134(1-2):37-44.
[31] Tormo M, Knecht E, Götz F, Lasa I, Penadés J. Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of Staphylococcus: evidence of horizontal gene transfer. Microbiology.2005;151:2465-75
[32] Kaipainen T, Pohjanvirta T, Shpigel N, Shwimmer A, Pyörälä S , Pelkonen S. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from bovine clinical mastitis. Vet. Microbiol. 2002;85:37–46.
[33] Wenz J, Barrington G, Garry F, Ellis R, Magnuson R. *Escherichia coli* Isolates Serotypes, Genotypes, and Virulence Genes and Clinical Coliform Mastitis Severity. J. Dairy Sci.2006; 89:3408–3412.
[34] Food and Drug Administration (FDA). Available at (http://www.fda.gov/AnimalVeterinary). Accessed June 10, 2011.
[35] Hogan J, Smith K, Todhunter D, Schoenberger P. Field trial to determine efficacy of an *Escherichia coli* J5 mastitis vaccine. J. Dairy Sci.1992;75:78-84
[36] Finch J, Winter A, Walton A, Leigh J. Further studies on the efficacy of a live vaccine against mastitis caused by *Streptococcus uberis*. Vaccine. 1997;15:1138-1143.
[37] Fontaine M, Perez-Casal J, Song X, Shelford J, Willson P, Potter A. Immunization of Dairy Cattle With Recombinant Streptococcus uberis GapC or a Chimeric Camp Antigen Confers Protection Against Heterologous Bacterial Challenge. Vaccine. 2002;20(17-18):2278-2286.
[38] Pereira U, Oliveira D, Mesquita L, Costa G, Pereira L. Efficacy of *Staphylococcus aureus* vaccines for bovine mastitis: A systematic review Vet. Microbiol. 2011;148:117–124.
[39] Greene W, Gano A, Smith K, Hogan J, Todhunter D. Comparison of probiotic and antibiotic intramammary therapy of cattle with elevated somatic cell counts. J. Dairy Sci.1991;74:2976-2981.
[40] Ryan M, Flynn J, Hill C, Ross R, Meaney W. The natural food grade inhibitor lacticin 3147 can prevent mastitis in non-lactating dairy cows. J. Dairy Sci.1999; 82:2625-2631.
[41] Klostermann K Crispie F, Flynn F, Ross R, Hill C, Meaney W. Intramammary infusion of a live culture of Lactococcus lactis for treatment of bovine mastitis: comparison with antibiotic treatment in field trials. J. Dairy Res. 2008; 75:365–373.
[42] Crispie F, Alonso-Gómez M, O'Loughlin C, Klostermann K, Flynn J, Arkins S, Meaney W, Ross R, Hill C. Intramammary infusion of a live culture for treatment of bovine mastitis: effect of live lactococci on the mammary immune response. J. Dairy Sci.2008;75, 374-384.
[43] Sears P , Smith, B, Stewart W, Gonzalez R, Rubino S, Gusik S, Rubino S, Gusik S, Kulizek E, Projan S, Blackburn P. Evaluation of a nisin-based germicidal formulation on teat skin of live cows. J Dairy Sci. 1992;75:3185–3190.
[44] Espeche C, Otero M, Sesma F, Nader-Macias M. Screening of surface properties and antagonistic substances production by lactic acid bacterial isolated from the mammary gland of healthy and mastitis cows. Vet Microbiol.2009;135:346-357.
[45] Waters C, Bassler B. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 2005;21:319-346.
[46] Novick RP, Geisinger, E. Quorum sensing in staphylococci. Annu Rev Genet.2008;42:541–564.
[47] Moore, G E, "Biofilm Production by *Streptococcus uberis* Associated with Intramammary Infections." University of Tennessee Honors Thesis Projects. Available at http://www.trace.tennessee.edu/utk_chanhonoproj/129. 2009. Accessed may 12, 2011.
[48] Hyvönen P, Suojala L, Orro T, Haaranen J, Simola O, Rontved C, Pyörälä S. Transgenic Cows That Produce Recombinant Human Lactoferrin in Milk Are Not Protected from Experimental *Escherichia coli* Intramammary Infection. Infect. and Immun. 2006;75(11): 6206–6212.
[49] Kerr D, Wellnitz E. Mammary expression of new genes to combat mastitis. J Anim Sci.2003;81:38-47.

