

75681

**GOBELLI, DINO JOAQUIN**

*Desarrollo de los elementos probatorios de aplicación informática para la protección de redes.*

2016      **75681**



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS FISICO-QUIMICAS Y NATURALES

Tesis para acceder al título de  
Magister en Biotecnología

**DISEÑO DE FORMULACIÓN PROBIÓTICA DE APLICACIÓN  
INTRAMAMARIA PARA LA PREVENCIÓN DE MASTITIS BOVINA**

Lic. Dino Joaquín Gobelli

DIRECTORA: Dra. Cristina Inés Bogni

CODIRECTOR: Dr. Matías Santiago Pellegrino

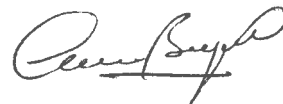
Río Cuarto, 2016

71681

MF)
Class:
T - 1087

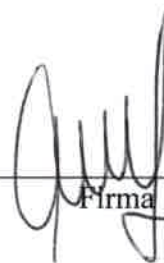
El siguiente trabajo final fue realizado en el Departamento de Microbiología escrito y presentado como requisito para optar al título de Magister en Biotecnología, en la Facultad de Ciencias Exactas, Físico – Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

Director: Dra. Cristina Inés Bogni



Firma

CoDirector: Dr. Matías Santiago Pellegrino



Firma

#### MIEMBROS DEL JURADO

Dra. Carolina Morgante



Firma

Dra. Cecilia Dogi



Firma

Dr. Germán Barros



Firma

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

UNRC, 20 de diciembre de 2016.

## Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Rio Cuarto por permitirme la formación profesional.

A mi directora, Dr. Cristina Bogni, por todos los consejos y conocimientos brindados, su predisposición y paciencia.

A mi codirector, Dr. Matias Pellegrino, por su apoyo, supervisión y dedicación.

Al Med. Vet. Jose Giraudo por su colaboración en este trabajo.

A los miembros del jurado, Dra. Carolina Morgante, Dra. Cecilia Dogi y Dr. Germán Barros por haber aceptado ser parte de esta tesis y sus aportes realizados para enriquecerla.

A mi familia, especialmente a mis padres, por su apoyo constante y confianza.

A mis compañeros de laboratorio por su compañía y ayuda desinteresada.

A mis amigos “químicos” por seguir siempre presentes, dispuestos a ayudarme.

Y a todas las personas que colaboraron en este camino, Gracias!

## RESUMEN

La mastitis bovina es la enfermedad infecciosa que genera mayores pérdidas en la industria lechera. Se define como la inflamación de la glándula mamaria, principalmente como consecuencia de infecciones de microorganismos. Actualmente, la aplicación intramamaria de antibióticos es la medida más efectiva para prevenir nuevas infecciones. Esta práctica ha facilitado la aparición de bacterias resistentes a antibióticos, por lo que se recomienda restringir su uso solo al tratamiento de casos clínicos. Los microorganismos presentes naturalmente en la ubre, como las bacterias del ácido láctico, poseen propiedades probióticas y tienen la capacidad de inhibir bacterias patógenas. Para su aplicación es de vital importancia la conservación de las bacterias con propiedades probióticas, teniendo en cuenta que puedan ser almacenadas y disponer de ellos en forma viable en el momento de su administración. La técnica mayormente utilizada en la preservación de bacterias es la liofilización. Si bien es considerada idónea, los parámetros que permiten un resultado aceptable son variables de una cepa a otra. El objetivo principal de este trabajo fue diseñar una formulación probiótica de aplicación intramamaria para la prevención de la mastitis bovina utilizando dos cepas de bacterias lácticas, *Lactobacillus perolens* CRL 1724 y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CRL1655 aisladas y caracterizadas en estudios previos, en los que presentaron potencialidad para ser utilizadas como una alternativa natural para la prevención de esta enfermedad. Para determinar las condiciones óptimas de liofilización y almacenamiento se estudiaron diferentes medios crioprotectores formulados sobre la base de leche descremada y azúcares. De esta etapa se seleccionó un único medio y se probó el efecto del agregado de inulina, un compuesto prebiótico con potencial crioprotector, y ácido ascórbico como antioxidante. Los ensayos mostraron que la leche descremada incrementa la tasa de supervivencia en ambas cepas. Además, la adición de hidratos de carbono mejora la resistencia al estrés causado por la liofilización. Seleccionando como base el medio protector compuesto por leche descremada y lactosa se comprobó que la adición de ácido ascórbico afecta negativamente al producto, mientras que el agregado de inulina no afecta de manera la estabilidad de la formulación probiótica. De este modo, se garantizó la estabilidad por el lapso de 6 meses sin pérdida de viabilidad considerable. Las cepas deshidratadas en leche descremada combinada con lactosa e inulina demostraron poseer un buen potencial para su uso en una formulación probiótica. Además, se realizó la caracterización genética de las bacterias lácticas mediante electroforesis de campos pulsantes, lo que permitió diferenciar las cepas claramente. Por último, se estudió el vehículo para administrar la formulación, como así también el efecto de la inoculación en glándula mamaria de bovinos al secado. Si bien el alginato de sodio adicionado a la formulación mostró ser un espesante adecuado e inocuo para las bacterias probióticas, la administración del mismo en la glándula mamaria produjo inflamación. Los resultados obtenidos en el presente trabajo sustentan el concepto de que cada cepa debe ser estudiada individualmente en cada condición y demuestran que la liofilización es una técnica adecuada para la conservación de las bacterias probióticas. Conjuntamente, sienta las bases para estudios futuros de inoculación con una formulación probiótica que permita analizar el carácter preventivo del producto y evaluar su efectividad en comparación con el uso de antimicrobianos.



## SUMMARY

Bovine mastitis is an infectious disease which generates greatest losses in the dairy industry around the world. It is defined as inflammation of the mammary gland caused mainly due to infections of pathogenic microorganisms such as staphylococci, streptococci and coliforms. Control of bovine mastitis is primarily based on prevention. Today, intramammary application of antibiotics is the most effective measure to prevent new infections and treat those existing, which has led to a widespread use of antibiotics, even for prophylactic purposes. This practice promotes the emergence of antibiotic-resistant bacteria, so it is advisable to restrict its use only to the treatment of clinical cases. In order to reduce antibiotic residues in dairy products and in accordance with global pressure to limit its use in dairy cattle, researchers have focused on improving the natural defense mechanisms of the animals through the development of alternative control methods such as vaccines, immunomodulators or the use of probiotic microorganisms. It is well known that microorganisms naturally found in the mammary gland, as lactic acid bacteria, have the ability to inhibit pathogenic bacteria. This makes it possible to use this type of bacteria as probiotics, which if administered in adequate doses can act preventively and thus avoid the indiscriminate use of antibiotics. For its application the preservation of bacteria is crucial, considering that can be stored for marketing and then be viable and active at the time of administration. The most common technique for the preservation and storage of bacteria is the freeze drier. Although it is considered suitable for the preservation of bacteria, the parameters that allow an acceptable result are highly variable from a strain to another. The main objective of this work was to design a probiotic formulation of intramammary application for the prevention of bovine mastitis using two strains of lactic acid bacteria, *Lactobacillus perolens* CRL 1724 and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CRL1655, isolated and characterized in previous studies. This showed potential to be used as a natural alternative for the prevention of this contagious disease. To determine the optimal conditions of freeze drying and storage different cryoprotectants media were studied. From the results obtained in this stage one medium was selected and the effect of added inulin, a prebiotic compound, and ascorbic acid as antioxidant was tested. In addition, progress was made in the genetic characterization of lactic acid bacteria by pulsed field gel electrophoresis. Finally, we have studied how to rehydrate and administer the formulation, as well as the effect of inoculating bovine mammary gland at drying off period. The results showed that the skim milk increases the survival rate significantly in both strains. Furthermore, addition of carbohydrates improves resistance to stress caused by lyophilization. Using the protector media composed of skim milk and lactose it was found that the addition of ascorbic acid negatively affects the product, while the aggregate of inulin did not affect significantly the stability of the formulation probiotics. In this way, the stability was ensured over a period of 6 months without any significant loss of viability even at room temperature. The results obtained in this work support the idea that each strain should be studied under each condition and demonstrate that lyophilization is a suitable technique for the conservation of probiotic bacteria in dairy media. Strains dehydrated by freeze drying in skim milk combined with lactose and inulin demonstrated good potential for its use in a probiotic formulation that could, in the near future, become a valuable tool to prevent bovine mastitis and help reduce the indiscriminate use of Antibiotics used for preventive purposes during the dry period.

## ÍNDICE

	Página
<b>Índice de tablas y figuras</b>	V
<b>Abreviaturas</b>	VI
<b>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1. Lechería argentina	1
2. Leche	5
3. La ubre	5
3.1. Anatomía	5
3.2. Mecanismos de defensa	7
4. Mastitis	10
4.1. Tipos de mastitis	11
4.2. Patógenos de mastitis	12
4.3. Impacto económico	15
5. Periodo de secado	16
5.1. Terapia al secado	17
6. Terapias y medidas de prevención alternativas	18
7. Probióticos en mastitis	19
8. Conservación	20
9. Antecedentes	21
<b>CAPÍTULO 2: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>23</b>
1. Hipótesis	23
2. Objetivos	24
<b>CAPÍTULO 3: MATERIALES</b>	<b>25</b>
1. Cepas bacterianas	25
2. Animales de experimentación	25
3. Medios de cultivo	25
4. Medios de conservación	26
5. Reactivos	26
6. Soluciones Stock y de trabajo	27
<b>CAPÍTULO 4: MÉTODOS</b>	<b>30</b>
1. Conservación y Activación de las BAL	30
1.1. Conservación de las BAL	30
1.2. Activación de las BAL	30
2. Diseño de la formulación probiótica (FP)	30
2.1 Desarrollo de medio crioprotector (MCP) y almacenamiento	30
2.2. Determinación de la viabilidad de BAL por el agregado de compuestos bioactivos:	32
2.3. Rehidratación y vehículos.	34



3. Caracterización genética de las BAL	34
3.1. Electroforesis de campos pulsantes (PFGE)	34
4. Ensayo experimental de inoculación en glándula mamaria bovina al secado.	36
4.1. Selección del establecimiento lechero para la inoculación	36
4.2. Relevamiento del establecimiento lechero	37
4.3. Grupo experimental	37
4.4. Inoculación en glándula mamaria y dosis administradas	37
4.5. Toma de muestras de leche	38
4.6. Análisis clínico	38
4.7. Recuento de células somáticas	38
4.8. Aislamiento y caracterización bacteriológica	39
5. Análisis estadístico	39
<b>CAPÍTULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>40</b>
1. Diseño de la formulación probiótica	40
1.1. Supervivencia de BAL en medios crioprotectores.	40
1.2. Efectos de compuestos bioactivos sobre la supervivencia de las BAL	45
1.3. Rehidratación y vehículos.	47
2. Caracterización genética.	47
2.1. Electroforesis de campos pulsantes	48
3. Ensayo experimental de inoculación en glándula mamaria bovina al secado.	50
3.1. Selección del establecimiento lechero	50
3.2. Relevamiento del establecimiento lechero	50
3.3. Grupo experimental	51
3.4. Análisis bacteriológico	52
3.5. Inoculación en glándula mamaria	52
<b>CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES</b>	<b>55</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>56</b>

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla		Página
1	Frecuencia de aislamientos de organismos patógenos mayores obtenidos de mastitis subclínicas en diferentes cuencas lecheras de la Argentina.	14
2	Concentraciones de alginato de sodio y CaCl <sub>2</sub> .	34

Figura		Página
1	Producción nacional de leche durante 1975-2015	2
2	Cuencas Lecheras Pampeanas y Extra-Pampeana.	3
3	Distribución por provincia de la producción y de las unidades productivas nacionales en Sistema de Pago por Calidad	4
4	Ubre bovina	6
5	Anatomía de la glándula mamaria bovina.	7
6	Interacciones entre los biosistemas que participan en el establecimiento de la mastitis bovina.	10
7	Medios Crioprotectores utilizados para el almacenamiento de BAL por liofilización.	31
8	Medios utilizados para liofilizar BAL.	33
9	Supervivencia de bacterias lácticas en distintos medios protectores 24 h post-liofilizado.	41
10	Supervivencia de <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> CRL1655 en distintos medios protectores	43
11	Supervivencia de <i>Lactobacillus perolens</i> CRL 1724 en distintos medios protectores	44
12	Supervivencia de bacterias lácticas liofilizadas en distintos medios protectores almacenadas a 4° C y a 25° C.	46
13	Perfiles de restricción con SmaI de ADN genómico de <i>L. lactis</i> y <i>L. perolens</i> por PFGE. Esquema de perfiles de restricción.	49
14	Distribución porcentual de muestras de leche de vacas al secado agrupadas en estratos según recuento de células somáticas.	50
15	Distribución porcentual de muestras de leche de vacas al secado agrupadas según el aislamiento de microorganismos.	51
16	Evolución del Recuento Celular Somático durante el ensayo de inoculación.	53

## ABREVIATURAS

- %sup: Porcentaje de supervivencia.  
ADN: Ácido Desoxirribonucleico.  
AcNa: Acetato de sodio.  
BAL: Bacterias ácido lácticas.  
BHI: Caldo Infusión Cerebro Corazón.  
BLC: Buffer de lavado.  
BLE: Buffer de lavado.  
BR: Buffer de Restricción.  
BSA: Albúmina de suero bovino.  
c.s.p.: Cantidad suficiente para.  
C: Control.  
cél: Células.  
CERELA: Centro de referencia de *Lactobacillus* de Tucumán.  
CMT: Test mastitis California.  
CS: Células Somáticas.  
DD: Cuarto delantero derecho.  
DI: Cuarto delantero izquierdo.  
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.  
FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.  
FP: Formulación probiótica.  
G+C: Guanina y Citosina.  
h: Horas.  
Ig: Inmunoglobulinas.  
Kb: kilobase.  
L: Linfocitos.  
LEL: Medio leche extracto de levadura.  
LMP: Low Melting Point.  
MAGyP: Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca.  
MCP: Medio crioprotector.  
Mf: Macrófagos.  
min: Minutos.  
MRS: Caldo Man Rogosa y Sharpe.  
NaCl: Cloruro de sodio.  
N<sub>AL</sub>: ufc/ml antes de liofilizar.  
N<sub>DL</sub>: ufc/ml luego de la liofilización.  
NMC: National Mastitis Council.  
OMS: Organización Mundial de la Salud.  
OSCN: Hipotiocianato.

PFGE: Electroforesis de campos pulsantes.  
PMN: Polimorfonucleares.  
PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.  
RCS: Recuento de Células Somáticas.  
rpm: Revoluciones por minuto.  
SCN: *Staphylococcus coagulasa* negativos.  
SCN<sup>-</sup>: Tiocianato.  
SDS: Dodecilsulfato sódico.  
SENASA: Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria.  
SF: Solución fisiológica.  
SL: Solución de lavado.  
SLis: Solución de lisis.  
TBE: Tris-borato-EDTA.  
TD: Cuarto trasero derecho.  
TE: Tris-EDTA.  
TI: Cuarto trasero izquierdo.  
TSB: Caldo Tripticasa Soya.  
ufc: Unidades formadoras de colonias.  
vol: Voltios

## CAPÍTULO 1

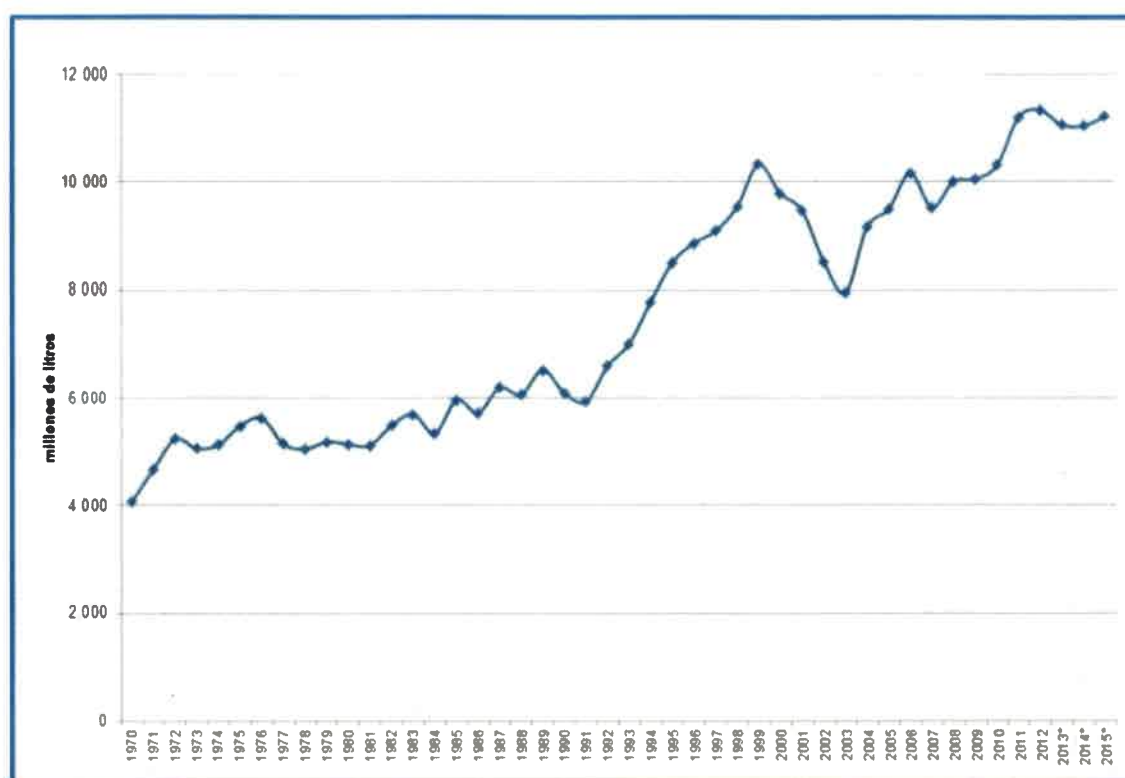
## INTRODUCCIÓN

## 1. Lechería argentina

Ubicados principalmente en las provincias de Córdoba, Santa Fe, Buenos Aires, Entre Ríos, La Pampa, Santiago del Estero y algunas zonas menores en el resto de Argentina, existen 11.531 tambos con unas 1.770.056 vacas y 749.778 vaquillonas (Coordinación de Campo de la Dirección Nacional de Sanidad Animal del SENASA) que totalizaron una producción de 11.161 millones de litros de leche (11,49 toneladas) en el año 2015 según los datos del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (Subsecretaría de lechería, MAGyP, 2016).

Dentro del sistema agroalimentario argentino, la cadena láctea está caracterizada por la diversidad productiva, tecnológica y de mercado. En la producción primaria, se observa una fuerte heterogeneidad intrasectorial y entre regiones productoras, conviven un acotado número de megatambos, tambos medianos altamente eficientes, tambos integrados a través de cooperativas de producción y comercialización y/o numerosas explotaciones pequeñas, muchas de las cuales operan al margen de las reglamentaciones sanitarias sociales e impositivas. Por otro lado, la industria procesadora está estratificada, con escasas grandes empresas y varios centenares de pequeñas y medianas empresas (Gutman y col., 2003).

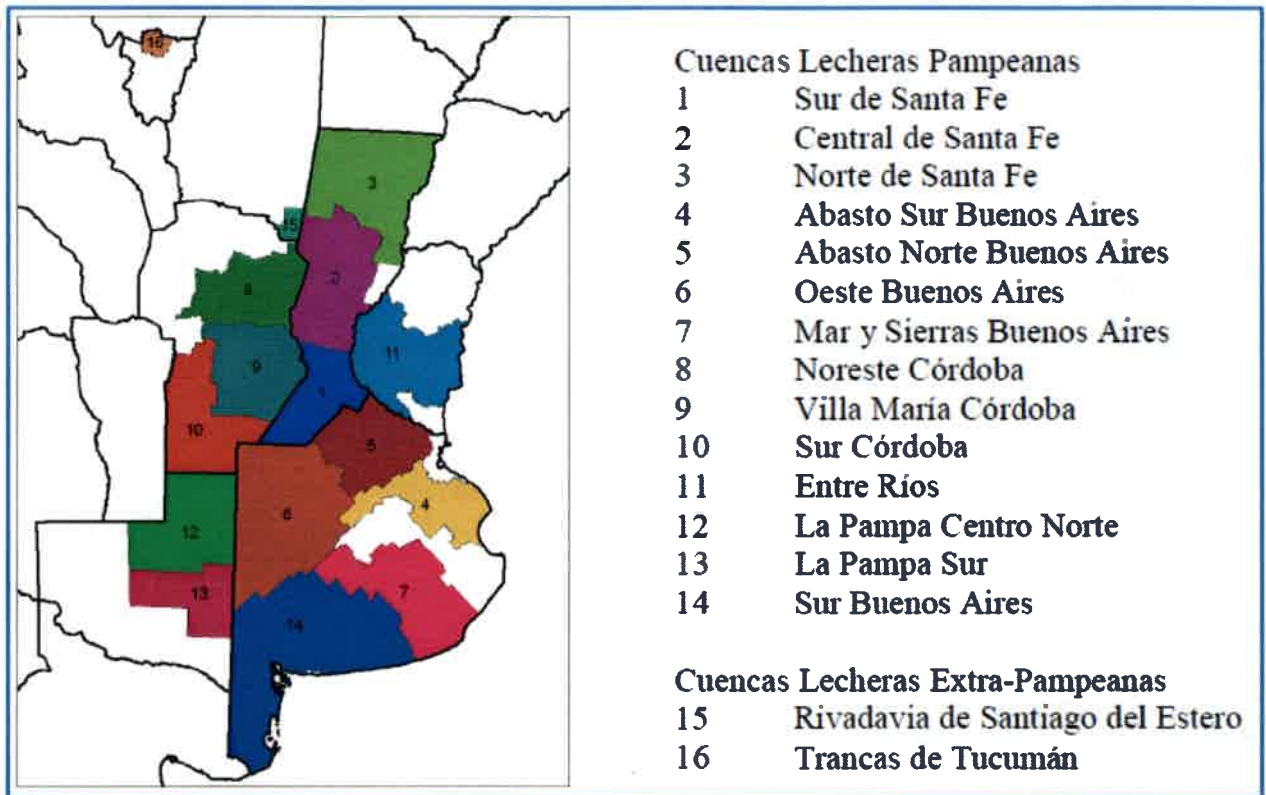
Históricamente, la producción primaria se caracterizó por tener un comportamiento cíclico que ha redundado en continuas crisis ligadas a la evolución del mercado interno. En términos generales, como se observa en la Figura 1, durante las décadas '70 y '80, el crecimiento de la producción ha sido paulatino a un ritmo promedio del 2,6% anual. Ya en la década de los '90, la tasa de crecimiento varió significativamente pasando a un promedio del 5% anual (Castellano y col., 2009). Así se destaca que la producción creció en forma sostenida entre 1991 y 1999, a una tasa anual promedio de 6,1%, llegando en 1999 al techo de 10,3 millones de litros (Gutman y col., 2003). A finales de los '90 se inicia un estancamiento económico en el país que incidió tanto en la producción primaria como industrial. El sector siguió los vaivenes de la economía nacional y la producción se reactivó luego de la devaluación del 2002, superando los valores del año 1999 recién a partir del año 2011 (MAGyP).



**Figura 1.** Producción nacional de leche durante 1975-2015 (en millones de litros por año). (Subsecretaría de lechería – MAGyP, 2016).

La producción láctea de Argentina se concentra en la región pampeana, localizándose en ella las principales “cuencas lecheras” que son regiones dentro de las provincias en las cuales existe una mayor densidad de tambos. Las cuencas se encuentran ubicadas en las provincias de Buenos Aires (Mar y Sierras, Oeste, Sur, Abasto Sur, Abasto Norte), Santa Fe (Norte, Sur, Central), Córdoba (Sur, Villa María, Noreste), La Pampa (Centro- Norte, Sur) y Entre Ríos (Figura 2).

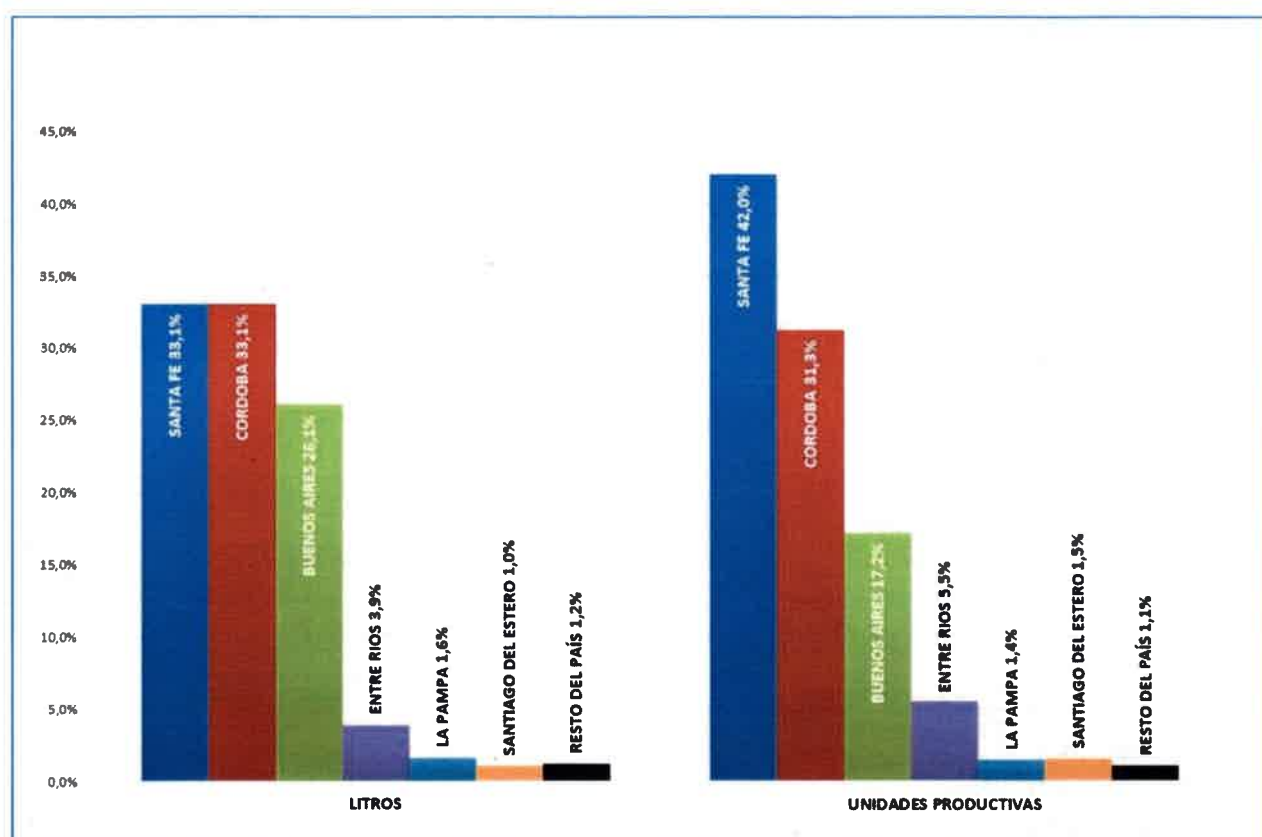
Existen además otras zonas productoras de importancia económica a nivel regional. Estas cuencas lecheras extra pampeanas son la Cuenca de Trancas (Tucumán) y la de Rivadavia (Santiago del Estero).



**Figura 2.** Cuencas Lecheras Pampeanas y Extra-Pampeanas (Marino, Castignani y Arzubi, 2011).

Como se observa en la Figura 3 de distribución de la producción lechera por provincia y de unidades productivas nacionales, más del 90% de la producción se concentra en las provincias de Santa Fe, Córdoba y Buenos Aires. La provincia de Córdoba comparte con Santa Fe el primer lugar en producción de litros de leche del país, contribuyendo con el 33,1% del total de la producción nacional (Subsecretaría de lechería, MAGyP, 2016). Las ventajas comparativas de las cuencas de Villa María y Noreste en relación al resto del país, son el buen comportamiento de las pasturas, como la alfalfa, y los mejores resultados económicos que presenta la producción de leche en relación a actividades alternativas.





**Figura 3.** Distribución por provincia de la producción y de las unidades productivas nacionales (porcentual 2016) en Sistema de Pago por Calidad (Subsecretaría de lechería- MAGyP, 2016).

La producción mundial de leche de vaca se encuentra cercana a los 638 millones de toneladas (FAO, 2013). En Argentina la producción total de leche cruda alcanza aproximadamente un 1,8% del total de leche bovina y ubica al país como el 14° productor en el orden mundial.

Por otro lado Argentina es uno de los principales países exportadores del mundo, con una capacidad de producción actual que supera ampliamente los volúmenes requeridos para satisfacer la demanda interna y asumir el desafío de la exportación. En el período 2005/14 las exportaciones argentinas representaron en promedio el 23% de la producción nacional, con un máximo de 28% en 2006 y un mínimo de 17% en el año 2007, cuando las condiciones climáticas extraordinarias provocaron que la producción cayera un 6% (Anuario de lechería argentina, 2014).

## 2. Leche

La leche es un líquido secretado por la glándula mamaria de las hembras de los mamíferos tras el parto, cuya función natural es la de ser alimento para la cría. Es un líquido de composición compleja, blanco y opaco, de sabor dulce y pH próximo a la neutralidad (Alais y col., 1985).

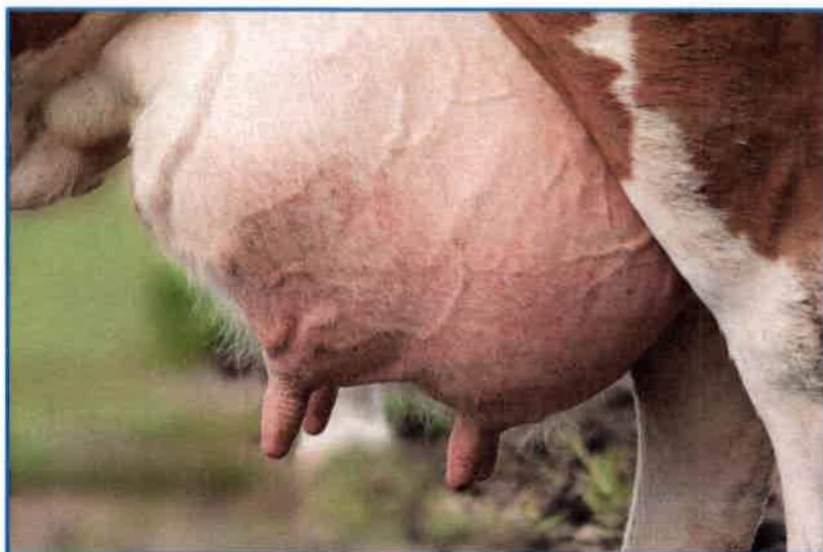
Es una mezcla compleja y heterogénea compuesta por un sistema coloidal de tres fases: una emulsión de materia grasa en forma globular, una suspensión coloidal de micelas de caseína, proteínas globulares y lipoproteínas y una solución de lactosa, proteínas solubles, minerales, vitaminas y otros componentes. Por lo tanto, los componentes principales de la leche son: lípidos, proteínas (caseínas, albuminas y globulinas), glúcidos (lactosa principalmente) y sales. A estos se añaden otros componentes en cantidades mínimas como lecitinas, vitaminas, enzimas, nucleótidos, gases disueltos, etc., alguno de los cuales tienen gran importancia debido a su actividad biológica (Alais y col., 1985).

Por otro lado, el código alimentario argentino define a la leche como el producto obtenido por el ordeño total e ininterrumpido, en condiciones de higiene, de la vaca lechera en buen estado de salud y alimentación, proveniente de tambos inscriptos y habilitados por la Autoridad Sanitaria Bromatológica Jurisdiccional y sin aditivos de ninguna especie.

## 3. La ubre

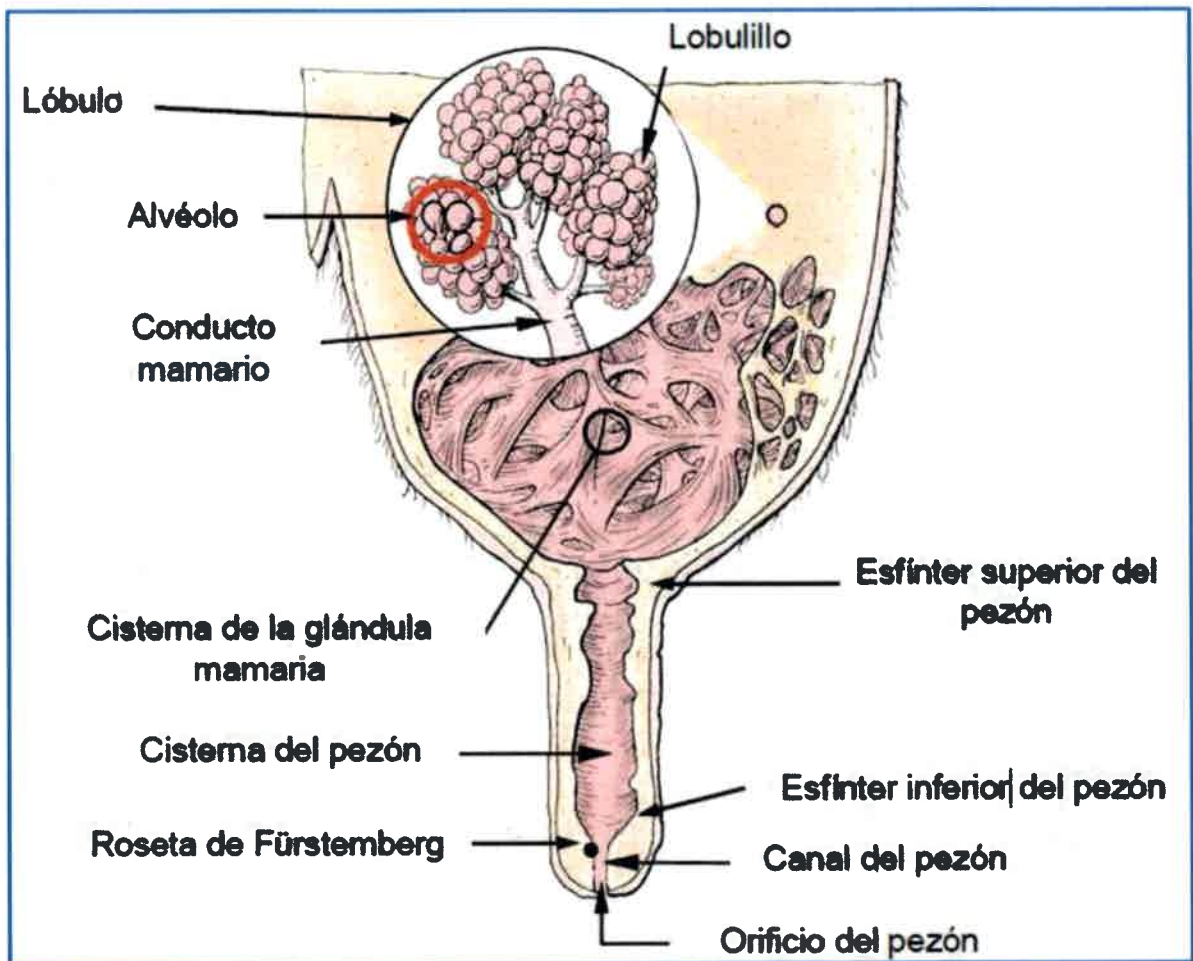
### 3.1. Anatomía

La ubre bovina se encuentra suspendida por fuera de la pared del abdomen posterior de la vaca y está constituida por cuatro glándulas mamarias, denominadas cuartos (Figura 4). Cada cuarto es una unidad funcional en sí misma que opera de manera independiente y drena la leche por medio de su propio canal. Por lo general, los cuartos posteriores son ligeramente más grandes y producen, en promedio, el 60% de la leche secretada (Agrobit, 2004; Avila Téllez y col., 2006a y 2006b).



**Figura 4:** Ubre bovina

Los principales componentes estructurales de la ubre son el sistema de ligamentos suspensorios y el sistema secretor y conductos receptáculos. El sistema de ligamentos está formado por un grupo de ligamentos y tejido conectivo que mantienen a la ubre prácticamente adosada a la pared abdominal, lo que minimiza el riesgo de lesiones cuando la vaca se mueve y permite adaptarse a los cambios de tamaño y peso de la ubre con la producción de leche. El sistema secretor y conductos está conformado por cuatro glándulas exocrinas, donde la leche se sintetiza en células especializadas agrupadas en alveolos, y luego es secretada fuera del cuerpo por medio de un sistema de conductos compuesto por la cisterna del pezón, la cisterna de la glándula y los canales lácteos (Figura 5). La ubre está compuesta de millones de alveolos que se agrupan en lobulillos, y varios lobulillos se agrupan en lóbulos. El alveolo, que es la unidad funcional de producción, es una esfera hueca cuya pared está formada por una sola capa de células denominadas lactocitos que secretan la leche al lumen del alveolo. La leche deja el lumen por medio de un tubo colector que la descarga a un conducto colector de mayor tamaño que conduce a la cisterna de la glándula, directamente encima del pezón. El pezón tiene de 6 a 8 cm de largo y un diámetro de 2,5 a 3 cm. La musculatura del pezón representa un sistema que enlaza las fibras musculares que corren en diversas direcciones. En la punta del pezón las fibras musculares se ordenan en forma circular para formar un anillo de músculo liso o esfínter llamado canal del pezón. El canal del pezón representa la unión de la cisterna del pezón con el ambiente externo y este mide de 6 a 10 mm de largo (Gasqué Gómez y col., 2008)



**Figura 5.** Anatomía de la glándula mamaria bovina (Modificado de Ramos, 2009).

### 3.2. Mecanismos de defensa

Los mecanismos de defensa de la glándula mamaria suelen clasificarse como:

a) No inmunológicos: barreras anatómicas como el esfínter del pezón y el tapón de queratina que producen una obstrucción física al ingreso de microorganismos. También se consideran diversos elementos solubles, de naturaleza humoral, como la lactoferrina, lactoperoxidasa, lisozima, complemento y otros compuestos químicos.

b) Inmunológicos: conocidos como sistema inmune innato y adquirido en los que participan componentes celulares y humorales (Sordillo y col., 1997).



### 3.2.1. Mecanismos de defensa no inmunológicos

#### 3.2.1.1. Mecanismos físicos: Barrera del pezón

La primera línea de defensa contra las infecciones la constituyen las estructuras del canal del pezón, el esfínter del canal del pezón impide la entrada de bacterias. La roseta de Füssenberg forma una corona en el paso del canal del pezón a la cisterna de este (Figura 5). Los pliegues de la roseta de Füssenberg no sólo tienen una función mecánica como mecanismo de cierre, sino también sirve como mecanismo de defensa en ese lugar. La queratinización intensiva del epitelio del canal del pezón forma una capa lactosada bactericida que representa una barrera muy efectiva contra agentes extraños. Si bien este tapón de queratina es lavado casi completamente durante el ordeño, después de 2-3 h del mismo se restablece completamente la función de defensa del canal del pezón. Por lo tanto, es de fundamental importancia la integridad del esfínter y el epitelio formador de la queratina, cuya estructura de entramado dificulta el avance de los microorganismos hacia el interior de la glándula mamaria (Sordillo y col., 1997).

#### 3.2.1.2. Elementos solubles

Entre las moléculas no-inmunológicas solubles que forman parte de la defensa de la glándula mamaria la lactoferrina y la lactoperoxidasa son las más relevantes de este tipo. La lactoferrina es una proteína con capacidad para fijar el hierro. En leche normal, su concentración es baja, pero se incrementa durante la involución de la glándula o durante algún proceso inflamatorio (Smith y col., 1981). Debido a su capacidad quelante en presencia de bicarbonato, la lactoferrina inhibe el crecimiento de bacterias dependientes de hierro (Craven y col., 1985), limitando significativamente el crecimiento de bacterias productoras de mastitis tales como, estafilococos y coliformes. La lactoferrina también ejerce cierta actividad inmunomoduladora, con capacidad opsonizante, incrementando la capacidad fagocítica y destructora de los neutrófilos (Tizard, 1996).

El sistema de la lactoperoxidasa se basa en la formación de hipotiocianato ( $\text{OSCN}^-$ ) el cual ejerce un efecto oxidativo sobre las enzimas bacterianas (Sandholm y col., 1995). No obstante, el accionar de dicho sistema depende de la concentración de  $\text{SCN}^-$  y de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en la leche.

### 3.2.2. Mecanismos de defensa inmunológicos

#### 3.2.2.1. Componentes inmunológicos solubles

Como parte de esta clasificación, entre los mecanismos inmunológicos solubles cabe mencionar al complemento y a las inmunoglobulinas (Igs). La concentración de ambos en glándula varía de acuerdo al momento de la lactancia y al grado de salud de la misma.

El complemento consiste en una serie de proteínas que, una vez activadas, ejercen funciones inmunológicas diversas, tales como opsonización de microorganismos (C3b), quimiotaxis de neutrófilos (C5a) y lisis bacteriana (C5b-9). El complemento llega desde la sangre en respuesta a un proceso inflamatorio. En cuanto a las Igs, cuatro clases han sido descritas en la glándula mamaria, IgA, IgE, IgG (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>) e IgM (Butler y col., 1986). Las principales funciones de las Igs son las de prevenir la adherencia a las superficies mucosas o actividad antiadhesiva (IgA), activar el complemento (IgM) y actividades opsonizantes, favoreciendo la fagocitosis (IgG) (Meglia y col., 2001).

#### 3.2.2.2. Componentes inmunológicos celulares

La secreción láctea posee un componente celular constituido básicamente por macrófagos (Mf), polimorfonucleares neutrófilos (PMN), linfocitos (L) y, en menor medida, células epiteliales, conocido en su conjunto como células somáticas (CS). Las CS son un componente normal de la secreción láctea, cuyo número y proporción variará dependiendo del estado fisiológico en que se halle la glándula, como así también de su grado de inflamación (Meglia y col., 2001).

El paso rápido de los leucocitos sanguíneos a la luz alveolar es uno de los mecanismos de defensa naturales más importantes contra la mastitis. En el caso de una glándula mamaria sana, se puede observar un contenido menor de 100.000 leucocitos/ml en la leche. El contenido de leucocitos aumenta a causa de una infección, principalmente como una respuesta a microorganismos invasores. En el caso de la mastitis, el Recuento de Células Somáticas (RCS) puede llegar a millones de células/ml. El número más importante de los leucocitos durante el curso de una mastitis son los PMN. Los PMN reconocen a las bacterias opsonizadas con

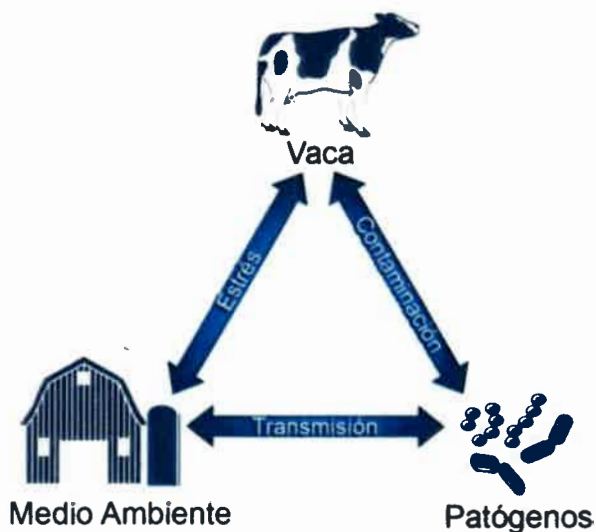
anticuerpos y las fagocitan. Pueden pasar unas 12 a 24 horas después de la infección para que el contenido de PMN aumente claramente (Hernández Reyes y col., 2008).

#### 4. Mastitis

La mastitis es la inflamación de la glándula mamaria, en la mayoría de los casos como consecuencia de infecciones causadas por distintos microorganismos, especialmente bacterias, y con menos frecuencia debido a traumatismos, lesiones e irritaciones de origen químico (Bramley y col., 2003).

La 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. La mastitis es la enfermedad infecciosa más costosa en los rodeos lecheros. La eliminación completa de la mastitis de un rodeo es imposible, sin embargo se puede reducir el número de nuevas infecciones y disminuir la duración y severidad de las mismas (Bogni y col., 2011).

Es importante considerar que se trata de una enfermedad multifactorial y que desde el punto de vista epidemiológico se consideran tres elementos que conforman el llamado triángulo epidemiológico de la mastitis: el huésped, los agentes infecciosos y el medio ambiente (Figura 6) (National Mastitis Council (NMC), 2003;).



**Figura 6.** Interacciones entre los biosistemas que participan en el establecimiento de la mastitis bovina.



La vía de entrada principal de los agentes patógenos es el orificio del pezón. Después de la invasión bacteriana se produce: congestión capilar, edema del tejido secretor y obstrucción de los conductos intralobulares. También existe alteración de la permeabilidad capilar lo cual produce cambios en la composición de la leche como disminución de la cantidad y la calidad de la caseína sintetizada, de grasa butirosa, lactosa y aumento de la concentración de sodio y cloruros, de proteínas del suero sanguíneo, de enzimas y del pH (Wolter y col., 2002).

#### 4.1. Tipos de mastitis

El grado de inflamación puede variar mucho, desde subclínico hasta clínico, en sus diversas formas, dependiendo esto de la severidad con que la ubre reaccione a los patógenos y/o toxinas. Según el NMC (2003; 2004), dependiendo del grado de inflamación y daño causado, la mastitis se puede clasificar en:

##### 4.1.1. Mastitis Subclínica

Esta forma de mastitis es el tipo más frecuente de infección intramamaria y tanto la ubre como la leche tienen aspecto normal. La mastitis subclínica no es advertida a simple vista ni por el tambero ni por el productor, pero puede ser detectada por distintos tipos de análisis que manifiestan la presencia de los microorganismos o un aumento en el RCS.

Es la forma más importante de mastitis porque causa las mayores pérdidas económicas debido a que:

- Disminuye la producción de leche
- Disminuye la calidad de la leche
- Provoca pérdidas de bonificaciones por calidad

La característica de enfermedad oculta hace que cueste tomar conciencia tanto al productor como al ordeñador, de la cantidad de leche que están dejando de producir sus vacas, y además, que las infecciones pueden transmitirse desde las vacas enfermas a las sanas.

Más del 80% de este tipo de mastitis son producidas por microorganismos. Los más frecuentemente asociados con las infecciones intramamarias subclínicas son: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulasa negativos* (SCN), *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus uberis* (Watts, 2003).

#### 4.1.2. Mastitis Clínica

Esta forma de infección intramamaria se caracteriza por anomalías visibles en la ubre y/o en la leche, cuya severidad varía mucho en el transcurso de la enfermedad. Pueden observarse cuartos enrojecidos e hinchados o bien palpase endurecimientos.

En los rodeos donde se ha controlado la mastitis contagiosa, la mayoría de los casos clínicos son causados por estreptococos ambientales y coliformes. Las prácticas de manejo como el sellado post-ordeño y la terapia de vaca seca, pueden llevar a erradicar el *Streptococcus agalactiae* y reducir la prevalencia del *Staphylococcus aureus*, pero no controlan la enfermedad clínica causada por patógenos ambientales. En aproximadamente el 30% de los casos clínicos no se detectan patógenos en las muestras cultivadas.

El sellado post-ordeño y el tratamiento de la vaca seca son poco efectivos contra los estreptococos ambientales, y no son efectivos en la prevención de las mastitis a coliformes.

#### 4.1.3. Mastitis Crónica

La mastitis crónica es la infección de la ubre que se presenta por un tiempo prolongado. La misma, puede presentarse como una fase subclínica indefinida, o la infección puede alternar entre fases clínicas y subclínicas. En algunos casos los signos clínicos pueden permanecer por largos períodos.

#### 4.2. Patógenos de mastitis

No todos los microorganismos causan reacciones perjudiciales en el animal. Se denominan microorganismos patógenos a los que causan una reacción adversa en el animal. Los microorganismos causantes de mastitis viven en la vaca, en su ubre y en sus alrededores. Más de 140 microorganismos diferentes pueden causar una infección intramamaria. Los microorganismos causantes de infección intramamaria generalmente son bacterias, aunque también es posible encontrar micoplasmas, levaduras, algas y hongos (Cruz Alamilla, 2007). Se han clasificado a los patógenos bacterianos según su reacción inflamatoria, en patógenos mayores y patógenos menores. Los patógenos mayores producen una elevación marcada del RCS, mientras que los menores lo aumentan levemente (Bogni y col., 2011). Otro criterio útil es el que los clasifica como contagiosos, ambientales, oportunistas y otros (Wolter y col., 2002). Los

patógenos contagiosos se transmiten de cuartos infectados a cuartos sanos, siendo los cuartos infectados son el principal reservorio de éstos patógenos. El contagio ocurre principalmente durante el ordeño (a través de las pezoneras, de las manos del ordeñador, trapos para limpiar ubres, gotas de leche en el colector, etc.). Generalmente causan infecciones subclínicas con brotes periódicos de casos clínicos. Los patógenos ambientales viven en el ambiente que rodea a la vaca y la infectan entre ordeños, cuando los pezones entran en contacto con barro, materia fecal, etc. (García y col., 2007; Pol y col., 2009). Generalmente originan muchos más casos clínicos que subclínicos.

#### 4.2.1. Prevalencia de Infecciones Subclínicas en Argentina

Un estudio realizado, a principios de la década del '90 sobre 39 rodeos lecheros de la provincia de Santa Fe reveló una prevalencia para *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* del 21,71% y 2,71%, respectivamente (Calvinho y col., 1991).

Otro estudio basado en el cultivo de leche de 16.065 vacas de 74 tambos de Argentina fue realizado con el objetivo de conocer la prevalencia de los patógenos de mastitis en una de las principales zonas lecheras del país (63 situados en la provincia de Buenos Aires, 7 en Entre Ríos y 2 en Santa Fe) durante un período de 40 meses (1996-2000). De 16.065 muestras cultivadas, 9118 fueron positivas y 6485 negativas. La prevalencia de infecciones intramamarias fue del 58.44%. Los patógenos de mastitis más prevalentes fueron: *Staphylococcus aureus* (21,91%), *Streptococcus agalactiae* (5,85 %), *Staphylococcus spp* (13,60 %), *Corynebacterium spp.* (14,33%), *Streptococcus spp* (4,34 %) y coliformes (2,03 %) (Chaves y col., 2001).

En la Tabla 1 se resume la frecuencia de aislamiento de algunos patógenos mayores seleccionados por ser los más prevalentes en muestras obtenidas a partir de mastitis subclínicas en estudios realizados desde principios de la década del 90 hasta los inicios de la década del 2000. Los porcentajes fueron calculados sobre el total de muestras con aislamiento.

**Tabla 1.** Frecuencia de microorganismos patógenos mayores aislados a partir de leche de animales con mastitis subclínicas en diferentes cuencas lecheras de Argentina.

ORGANISMOS	ESTUDIOS					
	A	B	C	D	E	F
<i>S. aureus</i>	17	25,3	31,5	16,6	21,9	13,9
<i>S. agalactiae</i>	-	8,8	11,6	5,4	5,8	1,6
<i>S. uberis</i>	-	-	-	9,2	-	-
<i>S. dysgalactiae</i>	-	3,6	-	-	-	-
<i>Streptococcus spp.</i>	23,4	19,3	5,82	13,3	4,34	6,5
<i>Coliformes</i>	-	2,7	3,1	5,9	2	-

Referencias: los datos se expresan en porcentajes, que fueron calculados sobre las muestras con aislamientos positivos. A: Giraudo y col. (1995), B: Chertcoff y col. (1996); C: Tirante y col. (1998); D: Acuña y col. (2001); E: Chaves y col. (2001); F: Amand de Mendieta y col. (2001).

Finalmente, en un estudio que incluyó muestras de 20.117 vacas en lactancia pertenecientes a 112 tambos ubicados en las provincias de Santa Fe, Córdoba y Buenos Aires relevados entre 1999 y 2007, los patógenos aislados con mayor frecuencia fueron *S. aureus* (57%) y *S. agalactiae* (29%), mientras que los miembros del grupo de *Streptococcus noagalactiae* fueron hallados en el 12% de los animales. *Staphylococcus aureus* fue aislado casi en la totalidad de los rodeos analizados (>97%) (Signorini y col., 2008).

En la mayoría de los estudios mencionados, el patógeno predominante fue *S. aureus*, seguido por distintas especies de estreptococos. En algunas investigaciones se reportó que la distribución de *S. aureus* en los rodeos incluidos oscila entre el 69 y el 100%. Respecto al resto de los microorganismos patógenos, la frecuencia de aislamiento ha sido variable en diferentes cuencas y décadas. Los porcentajes de microorganismos coliformes han sido bajos en todos los estudios; sin embargo se debe considerar que el tipo de estudios de prevalencia y la inclusión de

muestras en su mayoría de mastitis subclínicas puede subestimar la presencia real de estos organismos.

### 4.3. Impacto económico

La mastitis bovina es la enfermedad que mayores pérdidas económicas causa al productor y a la industria láctea, ya que provoca disminución de la secreción láctea y deterioro de la calidad de la leche.

Las pérdidas productivas debidas a casos clínicos son apreciadas con facilidad por el productor, al contrario de lo que sucede con aquellas derivadas de la manifestación subclínica de la enfermedad (Van Asseldonk y col., 2010).

En los casos de mastitis clínica los costos se evidencian por la pérdida por baja producción del animal enfermo, pérdida de producción por la duración de la eliminación del medicamento, por perjuicios duraderos en el rendimiento de la vaca, costos de medicamentos y de médico veterinario y aumento en los costos de la mano de obra.

Los daños económicos causados por la mastitis subclínica son mayores respecto de la mastitis clínica, ya que la primera es unas 20 a 50 veces más frecuente que la mastitis clínica. Además de los altos costos financieros para el ganadero la mastitis tiene una gran importancia en el valor higiénico de la leche y de sus subproductos, debido a lo siguiente:

- Algunos agentes causales de mastitis son patógenos en humanos y éstos pueden ser transmitidos a través de la cadena alimentaria.
- La presencia de residuos de antibióticos o químicos en la leche por el tratamiento de la ubre puede favorecer la aparición de cepas bacterianas resistentes a los mismos y despertar procesos alérgicos en humanos. Además, pueden inhibir el crecimiento de cepas *starters* en la elaboración de quesos.
- El consumidor exige que la leche provenga de animales sanos.

Para la industria láctea son muy significativas las transformaciones causadas a la leche por la mastitis. El tiempo de cuajado aumenta en el caso de producción de queso y la cantidad de queso disminuye considerablemente (Wolter y col., 2002).

Un estudio sobre las pérdidas productivas y económicas diarias ocasionadas por la mastitis y erogaciones derivadas de su control en establecimientos lecheros de Córdoba demostró las magnitudes económicas de esta enfermedad. Se informó una mediana de pérdidas en la



producción de leche por mastitis subclínicas de 2,8 litros/vaca/día, lo que representa un costo de US\$ 0,99/vaca/día. La mediana de pérdidas atribuidas a mastitis clínicas fue de 0,12 litros/vaca/día, representando un costo de US\$ 0,04/vaca/día y la mediana de pérdidas indirectas de US\$ 0,06/vaca/día. Así, las pérdidas en producción de leche más los gastos del control y prevención son iguales o superiores a US\$ 1,09/vaca/día, representando en promedio 16% de los ingresos brutos diarios en el 50% de los establecimientos (Vissio y col., 2015).

## 5. Período de Secado

La ubre de la vaca lechera necesita un período de descanso antes de la próxima parición para que la producción de leche en la siguiente lactancia sea óptima. Las células secretoras de leche necesitan involucionar hasta un estado de reposo para prepararse para la próxima lactancia. A medida que se acerca la fecha de parición, las células secretoras retornan a la actividad y también se forman nuevas células secretoras (Bachman y Schairer, 2003).

Las vacas deben de tener un periodo seco de entre 6 a 8 semanas antes del parto. La curación y regeneración del tejido de la glándula mamaria necesita de cuando menos 6 semanas, por lo que un periodo menor de 6 semanas resulta perjudicial para la salud de la ubre y para la producción de la leche en la siguiente lactación mientras que un periodo mayor de 8 semanas no tiene ningún beneficio para el rendimiento lechero de la vaca y tampoco para la salud de la ubre.

Se describen tres estados por los que atraviesa el tejido mamario durante el período seco:

- Involución activa: reducción de la síntesis de componentes lácteos y regresión de células alveolares.
- Involución establecida: se completa la involución y no hay síntesis ni secreción alguna.
- Calostrogénesis: se regenera el tejido alveolar, se diferencia y comienza formación de calostro.

El comienzo y el final del periodo de vaca seca son momentos de alto riesgo para el desarrollo de mastitis subclínica y clínica. Durante las primeras semanas del periodo de vaca seca la ubre es mucho más susceptible a la infección que durante la lactancia previa. El aumento del riesgo de nuevas infecciones en la primer y última etapa del periodo seco responde a factores como dejar de efectuar ciertas prácticas de ordeño (despunte y el sellado post-ordeño), lo que favorece el incremento de bacterias causantes de mastitis en la punta y canal de los pezones.

Además, el canal del pezón se acorta facilitando la entrada de bacterias hacia el interior de la ubre y el sistema inmune de la vaca, a medida que se aproxima el parto, disminuye su respuesta (Ruegg y col., 2001).

### 5.1. Terapia de secado

El tratamiento de los cuartos de todas las vacas al momento del secado, utilizando antibióticos intramamarios de liberación lenta, es una de las medidas más importantes del Plan Preventivo de Mastitis propuesto por el NMC (Bramley y col., 2003). Este plan debe también incluir: procedimientos de ordeño apropiados usando un equipo adecuado de ordeño; sumergir los pezones inmediatamente después del ordeño en un producto antiséptico; buena higiene de la ubre entre los ordeños; tener reportes precisos de mastitis clínica y de conteos de células somáticas en forma individual para cada vaca con el objeto de ayudar a tomar decisiones de manejo; tratar todos los casos clínicos de mastitis sin demora y apropiadamente; y descartar las vacas con mastitis crónica.

Si bien pocos productos tienen actividad extendida para el período seco entero, la terapia de secado proporciona suficiente protección, de modo que trata las infecciones preexistentes de los cuartos con mastitis y reduce la frecuencia de nuevas infecciones durante el período seco.

La mayoría de los productos para la terapia de la vaca seca están diseñados para eliminar infecciones existentes y para prevenir nuevas infecciones causadas por las bacterias Gram-positivas al inicio del período seco, particularmente *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*, pero carecen de actividad contra bacterias ambientales Gram-negativas, especialmente coliformes (NMC; 2006).

La terapia al secado se aplica en forma sistemática para el tratamiento de todos los cuartos de todas las vacas. A pesar que la aplicación de esta terapia ha sido relativamente efectiva, la aparición de residuos en la leche de vacas tratadas, sumado a la resistencia de patógenos y microbiota indígena por el uso intensivo de antibióticos, le confieren grandes desventajas (Calvinho y col., 2002; Gentilini y col., 2002; Makovec y col., 2003; Turutoglu y col., 2009; Movassagh, 2011).

Otro método menos utilizado es la terapia al secado selectiva, que consiste en tratar solamente los cuartos o vacas infectadas sobre la base de la historia de mastitis clínica, test mastitis



California (CMT) y, menos frecuente, resultado de cultivos de vacas individuales próximas al secado. La terapia selectiva puede indicarse en rodeos con muy baja prevalencia e incidencia de mastitis en los que se comprueba excelentes condiciones higiénico-sanitarias y de manejo, ya que no contempla la prevención de nuevas infecciones en cuartos mamarios sanos (NMC; 2006).

## 6. Terapias y medidas de prevención alternativas.

En la actualidad existe una tendencia mundial basada en la producción de leche en tambos orgánicos, dado que se pretende reducir el uso de antibióticos para la producción de lácteos. De acuerdo con la presión global para limitar su uso en el ganado lechero, los investigadores se han enfocado en el desarrollo de medidas tendientes a mejorar los mecanismos de defensa naturales de los animales a través del desarrollo de métodos de control alternativos (Crispie y col., 2005; Ruegg y col., 2007; Dallard y col., 2011). El empleo de vacunas, como así también de proteínas o péptidos antimicrobianos e inmunomoduladores, es considerado dentro de las nuevas estrategias de control de la mastitis (Dallard, 2007; Bogni y col., 2011).

La aplicación de vacunas constituye una alternativa interesante, ya que su aplicación está orientada no solamente a disminuir la frecuencia y severidad de las mastitis clínicas, sino también a eliminar las mastitis crónicas (Giraudó y col., 1997; Pellegrino y col., 2008, 2010). Algunas desarrolladas son: “REDUMAST” elaborada con antígenos capsulares extraídos de cepas patógenas de *S. aureus* (Giraudó 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 *S. aureus* (Leitner y col., 2011), la “Bacterina/STARVAC” elaborada con la cepa de *E. coli* J5 inactivada más la cepa inactivada de *S. aureus* (CP8) SP140 que expresa un complejo asociado antigénico slime (Prenafeta y col., 2010) y la “cepa mutante avirulenta *S. aureus* RC122” (Bogni y col., 1997; Giraudó y col., 1997; Reinoso y col., 2002; Pellegrino y col., 2008, 2010 y 2016), entre otras.

Por otro lado, se pueden mencionar también microorganismos probióticos y sus metabolitos (Twomey y col., 2000; Crispie y col., 2005 y 2008; Beecher y col., 2009; Klostermann y col., 2008 y 2010; Nader-Macias y col., 2011; Espeche y col., 2009, Espeche-Pellegrino y col., 2012; Frola y col., 2011, Frola y col., 2012).

## 6.1. Probióticos en mastitis

La definición del término probiótico proviene del griego (pro: a favor de; biótico: vida), y ha ido variando con el tiempo desde su primer aparición en 1965 donde se lo refirió como “sustancia que estimula el crecimiento de otros organismos” (Lilly y Stillwell, 1965) hasta 2001 donde la OMS lo define como “microorganismo vivo que cuando se administra en cantidades adecuadas confiere efectos beneficiosos al huésped” (FAO/OMS, 2001).

Entre los mecanismos de acción benéficos de los probióticos se encuentran la producción de sustancias antimicrobianas como el ácido láctico, peróxido de hidrogeno y bacteriocinas, disminución del pH, resistencia a la colonización por competir con patógenos para unirse a sitios de adhesión en la superficie del epitelio, competición por nutrientes y estimulación de la respuesta inmune (Cross, 2002; Corthésy y col., 2007; Charalampopoulos y Rastall, 2012).

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

En el campo de la salud bovina, los probióticos se aplican principalmente para prevenir infecciones gastrointestinales y con fines nutricionales (Rodríguez-Palacios y col., 2009; Espeche y col., 2012). Sin embargo, en los últimos años, ha surgido el concepto de control biológico como una alternativa sustentable, interesante para luchar contra los patógenos en general. Por lo tanto, la gama de aplicaciones de bacterias probióticas se ha ampliado, y ahora se consideran una alternativa para tratamientos contra la mastitis bovina (Reid y col., 2004; Espeche y col., 2012). Estudios previos han demostrado que las bacterias ácido lácticas (BAL) presentes naturalmente en la glándula mamaria, entre las que se encuentran los géneros *Lactobacillus* y *Lactococcus*, tienen la capacidad de inhibir bacterias patógenas. Esto posibilita utilizar este tipo de bacterias como probióticos, que administrados en dosis adecuadas pueden

actuar de forma preventiva y así evitar el uso indiscriminado de antibióticos (Crispie y col., 2005; Klosterman y col., 2013; Diepers y col., 2016).

## 7. Conservación

Para la aplicación de una formulación probiótica (FP) en la glándula mamaria, es de vital importancia la conservación de las bacterias que lo componen, teniendo en cuenta que puedan ser almacenados durante su comercialización y que se debe disponer de ellos en forma viable y activa en el momento de su administración. La metodología mayormente utilizada en la preservación y almacenamiento de bacterias es la liofilización. Esta consiste en someter al microorganismo a bajas temperaturas para congelarlo y extraer el agua por sublimación mediante la aplicación de vacío (Makinen y col., 2012). Si bien es considerada idónea para la preservación de bacterias, los parámetros que permiten un resultado aceptable difieren de una cepa a otra, por ello es necesario tener en cuenta variables como medio de crecimiento, fase de crecimiento celular, pH del medio, temperatura de incubación, medio de secado, condiciones de almacenamiento y posterior rehidratación de las células liofilizadas (Otero y col., 2007).

El proceso de congelado y secado tiene como objetivo disminuir la actividad celular e inhibir reacciones de degradación para aumentar el tiempo de conservación, pero supone un daño a la célula que resulta en una de las principales causas de pérdida de viabilidad en el producto liofilizado, debido a que el agua es un componente crítico en la estructura y funciones celulares (Santivarangkna y col., 2008). Se pueden distinguir dos tipos de agua en una célula, el agua libre que puede intercambiarse osmóticamente a través de la membrana y el agua unida que se encuentra interaccionando con los grupos polares de proteínas, ADN, lípidos de membrana, entre otros (Potts, 1994). Durante la congelación el medio externo de la célula es el primero en congelarse, mientras que el agua en el interior permanece en un estado de sobreenfriamiento hasta  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ . En este estado, el agua sobre-enfriada tiende a salir de la célula por ósmosis, por lo que si el enfriamiento es lento se produce la pérdida de agua intracelular encogiéndose las células. Por el contrario, si el enfriamiento es rápido puede ocurrir la cristalización del agua intracelular provocando daños en la membrana y estructura celular. Por otro lado la deshidratación causa alteraciones en la estructura debido a la pérdida de agua unida que se encuentra estabilizando los grupos polares de proteínas, membrana y macromoléculas superficiales principalmente. En

muchos casos, cuando la célula es rehidratada no es capaz de revertir estas alteraciones, lo que provoca la desnaturalización de proteínas, cambios en la fluidez de la membrana, colapso de macromoléculas de la superficie celular y la subsecuente pérdida de viabilidad (Teixeira y col., 1997). Para evitar estos daños en el proceso de preservación de microorganismos es necesario recurrir al agregado de sustancias protectoras. Estas pueden ser aminoácidos como el glutamato, prolina, betaina y glicina, azúcares entre los que se destacan la sacarosa y la trehalosa o sustancias complejas como la leche. Los azúcares pueden reemplazar el agua que rodea a los grupos polares formando puentes hidrógeno y manteniendo la integridad de proteínas o fosfolípidos en ausencia de agua. La leche descremada también estabiliza las biomoléculas ya que además contiene proteínas que proporcionan una cubierta protectora a la vez que crea una estructura porosa en el producto liofilizado (Zayed y col., 2004; Otero y col., 2007). Por otro lado, los prebióticos, que son sustancias que favorecen al desarrollo de los probióticos una vez inoculados, son de naturaleza polihidroxilada por lo que, al igual que los azúcares, son capaces de actuar como crioprotectores en la liofilización. Entre ellos se destacan los compuestos oligosacáridos como la inulina, lactulosa y fructo, gluco o galacto-oligosacáridos (Playne y col., 2004; Crittenden y col., 2009).

Durante el almacenamiento en estado deshidratado puede haber fenómenos de auto-oxidación, lo cual genera especies reactivas del oxígeno dañinas, que pueden producir la oxidación de los dobles enlaces en las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos provocando cambios en la fluidez de la bicapa lipídica que llevan a la muerte celular (Tymczyszyn y col., 2010). Los antioxidantes, como el ácido L-ascórbico, interfieren con estos procesos protegiendo las membranas celulares contra la peroxidación de lípidos. Las especies oxidantes son directamente interceptadas por el ácido L-ascórbico y las desactiva (Bachowski y col., 1988; Anderson, 1987). El efecto protector del ácido ascórbico en BAL liofilizadas ha sido reportado en estudios previos (Kurtmann y col., 2009; Jalali y col., 2012).

## 9. Antecedentes del grupo de investigación en mastitis de la UNRC

En el año 2007 el Laboratorio de Genética Microbiana del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Universidad Nacional de Río Cuarto, comenzó a desarrollar una línea de investigación en conjunto con investigadores del CERELA-CONICET, con el



objetivo de diseñar un producto probiótico para la prevención de la mastitis bovina. En una primera etapa, se aislaron y caracterizaron BAL de muestras de leche de glándula mamaria de animales sanos y con mastitis clínica y subclínica de las provincias de Tucumán y Córdoba. Las BAL aisladas fueron caracterizadas con respecto a sus propiedades benéficas (inhibición a patógenos, auto-agregación, adherencia, producción de sustancias antagónicas) y se seleccionaron cepas que presentaron propiedades adecuadas para ser incluidas en un producto veterinario para la prevención de la mastitis bovina (Espeche y col., 2009; Frola y col., 2011; Espeche y col., 2012). Se aislaron y caracterizaron un total de 117 cepas de BAL, de las cuales 40 fueron preseleccionadas e identificadas genéticamente. Además, se estudiaron los factores de virulencia y genes de resistencia a antibióticos para evaluar la seguridad de las cepas (Espeche y col., 2012). A partir de los resultados obtenidos se seleccionaron 3 cepas BAL (*Lactobacillus perolens* CRL1724; *Enterococcus hiriae* CRL1835; *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CRL1655) por presentar características interesantes para ser incluidas en un producto para la prevención de la mastitis bovina, como ser capaces de inhibir y co-agregar patógenos considerados agentes causales de mastitis bovina y adherirse a células epiteliales.

En una segunda etapa, se realizaron ensayos de inoculación para evaluar la inocuidad de una de las cepas (*L. perolens* CRL1724) al ser aplicada en la glándula mamaria bovina, evaluando su efecto a través de la observación de parámetros clínicos en la ubre (RCS, enrojecimiento, inflamación) y de modificaciones estructurales en la glándula por estudios histológicos del tejido epitelial del canal y la cisterna del pezón. Los resultados mostraron que la cepa no produjo ningún efecto adverso al ser inoculada en una concentración adecuada ( $1 \times 10^6$  cél/ml) en ubres de bovinos en el período seco (Frola y col., 2012). Además, se avanzó en el estudio de la respuesta inmunológica desencadenada al inocular estas cepas en ubres bovinas.

A partir de estos antecedentes en este trabajo se plantea continuar los ensayos con dos de las cepas seleccionadas, *Lactobacillus perolens* CRL1724 y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CRL1655, descartando a *E. hiriae* por presentar resistencia a vancomicina y por no estar demostrada la inocuidad de esta bacteria.

En este contexto en el presente plan de Tesis para optar al título de Magister en Biotecnología, se aborda la etapa final del desarrollo de un producto probiótico de uso veterinario en glándula mamaria al secado, para la prevención de la mastitis bovina. Para tal fin se formularon las siguientes hipótesis y objetivos específicos.



## CAPÍTULO 2

## HIPÓTESIS

Este trabajo de tesis reviste originalidad debido a que no existe en el mercado argentino un producto de uso veterinario con las características del que se plantea para la prevención y control de la mastitis bovina. Los experimentos se dirigirán a evaluar y optimizar las condiciones de conservación de la viabilidad de los microorganismos benéficos y el mantenimiento de esas características con el fin de avanzar en el diseño de una formulación de aplicación intramamaria para la prevención de la mastitis bovina.

**Hipótesis 1:** Una de las siguientes formulaciones, constituye un medio crioprotector (MCP) adecuado que permite preservar la viabilidad de *Lactobacillus perolens* CRL 1724 y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CRL1655 durante el proceso de liofilización.

Sacarosa, Trehalosa y Lactosa

Leche descremada

Leche descremada y Lactosa

Leche descremada, Lactosa y Sacarosa

Leche descremada, Lactosa y Trehalosa

Leche descremada, Lactosa, Trehalosa y Sacarosa

**Hipótesis 2:** El agregado de Inulina como prebiótico y de ácido ascórbico como antioxidante, mejora la viabilidad y conservación de las BAL liofilizadas.

**Hipótesis 3:** La formulación probiótica desarrollada no genera efectos adversos (inflamación de la glándula mamaria, aumento del RCS, alteración de la secreción láctea) por inoculación intramamaria en bovinos al secado.



## OBJETIVO GENERAL

Diseñar una formulación probiótica de aplicación intramamaria para la prevención de la mastitis bovina.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar las condiciones óptimas de liofilización de las cepas de BAL autóctonas benéficas seleccionadas previamente para su inclusión en la formulación probiótica.
- Estudiar el efecto sobre la viabilidad y conservación de las BAL liofilizadas por el agregado de compuestos bioactivos (prebióticos y vitaminas).
- Avanzar en el diseño y formulación del producto y determinar el tiempo de vida útil del mismo a diferentes temperaturas de conservación.
- Realizar la caracterización genética de las BAL que integran la formulación probiótica.
- Estudiar el efecto de la administración intramamaria del producto desarrollado en bovinos en período de secado, a través de la observación de parámetros clínicos en la ubre.

## CAPÍTULO 3

# MATERIALES

### 1. Cepas bacterianas:

- 1.1. *Lactobacillus perolens* CRL 1724 y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CRL1655, pertenecientes al cepario del Centro de Referencia de *Lactobacillus* de Tucumán (CERELA, Instituto dependiente de CONICET), aisladas de glándula mamaria bovina sana y caracterizadas como potencialmente probióticas (Espeche y col., 2009, Espeche – Pellegrino y col., 2012).
- 1.2. *Staphylococcus aureus* RC108, 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. (Bogni y col., 1997).

### 2. Animales de experimentación.

- 2.1. Vacas Holstein (n= 12) en período de secado pertenecientes a un tambo ubicado en la localidad de Malena, Córdoba, asentado y aprobado por el ente fiscalizador pertinente (SENASA).

### 3. Medios de cultivo

Se utilizaron los siguientes medios de cultivos comerciales, los cuales fueron preparados y esterilizados según las especificaciones del fabricante. Para la obtención de medios de cultivo solidos se adicionó agar bacteriológico (Britania) a una concentración de 1,5%.

- 3.1. Caldo Man Rogosa y Sharpe (MRS) (Britania).
- 3.2. Caldo Man Rogosa y Sharpe (MRS) (Biokar Diagnostics).
- 3.3. Caldo Trypticasa Soya (TSB) (Britania).
- 3.4. Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) (Vetec).

## 4. Medios de conservación

### 4.1. Medio leche extracto de levadura (LEL):

- Leche descremada 10 g
- Extracto de levadura 0,5 g
- Glucosa 1 g
- Agua destilada c.s.p. 1000 ml

Para su elaboración los componentes mencionados se autoclavaron a vapor fluente durante 20 min y se adicionaron 0,5 ml de glicerol estéril por cada 4,5 ml de LEL.

## 5. Reactivos:

- 5.1. Ácido Algínico (Parafarm)
- 5.2. Ácido ascórbico
- 5.3. Ácido Clorhídrico (Cicarelli)
- 5.4. Ácido Bórico (Sigma)
- 5.5. Acetato de sodio
- 5.6. Agar LMP (Low Melting Point) (Promega)
- 5.7. Agarosa (Biodynamics)
- 5.8. Agarosa low EEO (Sigma)
- 5.9. Ampicilina
- 5.10. Bromuro de etidio
- 5.11.  $\text{CaCl}_2$
- 5.12. EDTA 0,5 M (pH 9) (Invitrogen)
- 5.13. Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0,1 mM
- 5.14. Glicerol (Cicarelli)
- 5.15. Inulina (Sigma)
- 5.16. Isopropanol
- 5.17. Lactosa (Lowens)
- 5.18. Leche descremada (Oxoid)
- 5.19. Lisostafina (Sigma)
- 5.20. Lisozima (Sigma)
- 5.21. NaCl (Cicarelli)

- 5.22. NaOH (Merk)
- 5.23. Proteínasa K
- 5.24. Reactivos para la tinción de Gram:
  - Cristal violeta
  - Safranina
  - Lugol
  - Alcohol-acetona
- 5.25. Sacarosa (Gibco)
- 5.26. Sarkosil 20% (Sigma)
- 5.27. SDS (Bio-Rad)
- 5.28. Trehalosa (MP Biomedicals)
- 5.29. Tris base (Promega)

## 6. Soluciones Stock y de trabajo

- 6.1. Alcohol 70%:
  - Alcohol etílico (Porta) 70 ml
  - Agua destilada 30 ml
- 6.2. Buffer K (BK):
  - EDTA 400 mM
  - Proteínasa K 2 mg/ml
  - Sarkosyl 2%
- 6.3. Buffer de lavado (BLE):
  - 20mM Tris-ClH
  - 50 mM EDTA
  - pH=8
- 6.4. Buffer de lavado (BLC):
  - 10mM Tris-ClH
  - 1 M NaCl
  - pH=7,6
- 6.5. Buffer multicore (Promega)
- 6.6. Buffer de Restricción BR:

- Buffer J 15  $\mu$ l (Promega)  
 BSA 2  $\mu$ l (Promega)  
 SmaI 3  $\mu$ l (Promega)  
 Agua dest. 130  $\mu$ l
- 6.7. Buffer TBE 0,5 X:  
 0,045 M Tris-borato  
 0,001 M EDTA  
 pH 8.3
- 6.8. Buffer TE:  
 10 mM Tris clorhídrico pH 8  
 1 mM EDTA
- 6.9. Solución de NaAc 3 M:  
 NaAc 26,61 g  
 Agua destilada c.s.p. 100 ml
- 6.10. Solución de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M:  
 CaCl<sub>2</sub> 1,12 g  
 Agua destilada c.s.p. 100 ml
- 6.11. Solución fisiológica (SF):  
 NaCl 0,9 g  
 Agua destilada c.s.p. 100 ml
- 6.12. Solución de lavado (SL):  
 30 mM NaCl  
 2mM EDTA  
 pH=8
- 6.13. Solución de lisis (SLis):  
 Lisozima 5 mg/ml en NaCl-EDTA
- 6.14. Solución de lisozima:  
 Lisozima 50 mg  
 Agua destilada c.s.p. 5 ml
- 6.15. Solución de NaOH 5M:  
 NaOH 20 g

Agua destilada c.s.p. 100 ml

6.16. Solución de Proteinasa K 20 mg/ml:

Proteinasa K 40 mg

Agua destilada c.s.p. 2 ml

6.17. Solución de SDS 7,5%:

SDS 7,5 g

Agua destilada c.s.p. 100 ml



## CAPÍTULO 4

# MÉTODOS

## 1. Conservación y Activación de las BAL

### 1.1. Conservación de las BAL

Las BAL fueron inoculadas en 5 ml de caldo MRS e incubadas a 37 °C durante 24-48 h. Los caldos con crecimiento bacteriano fueron centrifugados a 3000 rpm durante 20 min 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.

### 1.2. Activación de las BAL

Previo a su utilización, las BAL fueron activadas de la siguiente forma: las cepas conservadas dentro de crioviales con medio LEL-glicerol, fueron activadas mediante tres repiques sucesivos (de 200 µl cada uno) en 5 ml de caldo MRS e incubadas a 37 °C durante 18 h.

## 2. Diseño de la formulación probiótica (FP)

Para el desarrollo de la FP se decidió encarar el estudio de la viabilidad de las BAL en diferentes medios de cultivo a diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento. Los procedimientos realizados se detallan a continuación:

### 2.1 Desarrollo de medio crioprotector (MCP) y almacenamiento

Las bacterias se liofilizaron en diferentes MCP, según se detalla en la Figura 7.



**Figura 7.** Medios crioprotectores (MCP) utilizados para el almacenamiento de BAL por liofilización.

Para el proceso de liofilización se utilizaron cultivos de BAL de 18 h activados previamente por subcultivos en MRS, según se detalla en el punto 1,2 de esta sección. Cada BAL fue inoculada en caldo MRS y cultivada a 37 °C por 18 h hasta una concentración aproximada de  $10^9$  ufc/ml. El cultivo fue centrifugado en frío (4 °C) a 5000 rpm por 10 min, lavado dos veces con solución fisiológica y suspendido finalmente en igual volumen del MCP a ensayar.

Se tomaron muestras de cada suspensión y diluciones de las mismas se sembraron por duplicado, en placas de agar MRS. Las placas se cultivaron 48 h a 37 °C y se determinó el número de unidades formadoras de colonia por ml (ufc/ml) previo al tratamiento por liofilización.

Las suspensiones se fraccionaron en alícuotas de 1 ml en ampollas de liofilización previamente esterilizadas, fueron congeladas durante 24 h a -20 °C, posteriormente 1 h a -80 °C y

finalmente colocadas en el liofilizador durante 24 h. Las ampollas se sellaron y las muestras liofilizadas se almacenaron en oscuridad en heladera a 4° C.

### 2.1.1 Determinación del número de BAL viables

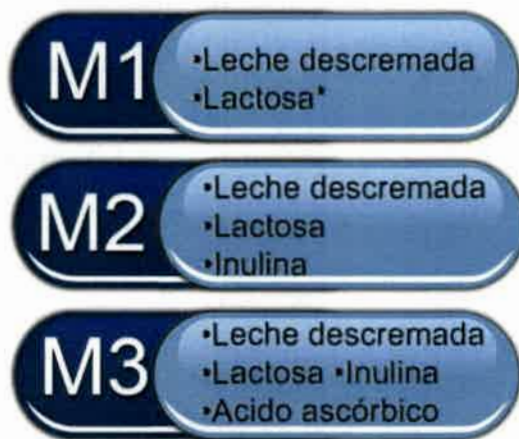
Se determinó el número de BAL viables (ufc/ml) luego del proceso de liofilización a diferentes tiempos de almacenamiento a 4 °C (1, 30, 90 y 180 días) en cada uno de los MCP. Para ello, las muestras se rehidrataron 1 ml de SF y se sembraron las diluciones en placas de agar MRS e incubaron a 37° C por 48 h.

Se estableció el porcentaje de supervivencia (%sup) mediante la relación entre ufc/ml antes de liofilizar ( $N_{AL}$ ) y ufc/ml luego de la liofilización ( $N_{DL}$ ), a distintos tiempos de almacenaje, según la siguiente ecuación (1):

$$(1) \quad \%sup = \frac{\log N_{AL}}{\log N_{DL}} \cdot 100$$

### 2.2. Determinación de la viabilidad de BAL por el agregado de compuestos bioactivos

Se colectaron 20 ml de cultivos de 18 h de cada BAL activada (*Lactobacillus perolens* CRL 1724 y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CRL1655), se centrifugaron a 5000 rpm a 4 °C por 10 min y se resuspendieron en solución fisiológica y se mezclaron en un mismo tubo. La mezcla de las dos bacterias lácticas se centrifugó a 5000 rpm a 4 °C por 10 min, se descartó el sobrenadante y se lavó con solución fisiológica nuevamente. El pellet obtenido se resuspendió en los medios que se detallan en la Figura 8.



**Figura 8.** Medios utilizados para liofilizar BAL. \*MCP3 descrito en el punto 2.1

Se tomaron muestras de cada suspensión y se sembraron las diluciones correspondientes en placas de agar-MRS. Las placas se cultivaron 48 h a 37 °C y se determinó las ufc/ml. Los valores obtenidos fueron considerados como número de bacterias viables previo al tratamiento de liofilizado.

Las suspensiones se fraccionaron en alícuotas de 1 ml en ampollas de liofilización previamente esterilizadas, se dejaron a -20 °C por 24 h, luego se llevó a -80 °C por 1h y finalmente se conectó a un equipo de liofilización durante 24 h. Las muestras liofilizadas se almacenaron a dos temperaturas diferentes, 4 °C y 25±3 °C (temperatura ambiente). A todas las muestras se les determinó el número de bacterias viables a las 24 h y a 30, 75, 135 y 180 días posteriores al proceso de liofilizado. Para ello se rehidrataron las muestras con 1 ml de solución fisiológica hasta la disolución de las mismas. Se sembraron, por duplicado, las diluciones correspondientes en placas de agar MRS y se incubaron a 37 °C por 48 h para determinar ufc/ml. El ensayo se realizó por triplicado.

### 2.3. Rehidratación y vehículos

Se preparó una solución de alginato de sodio a partir de una solución de ácido algínico al 10% neutralizada con NaOH 5 M en agitación constante. Se centrifugó a 5000 rpm por 5 min para descartar restos del ácido algínico no disueltos y se esterilizó a vapor fluente.

A fin de determinar la proporción adecuada de iones  $\text{Ca}^{2+}$  y alginato de sodio para obtener la consistencia deseada se polimerizó el alginato con distintas concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  (Tabla 2).

**Tabla 2.** Concentraciones de alginato de sodio y  $\text{CaCl}_2$ .

	A	B	C	D	E	F	G
<b>Sol. Alginato</b>	7,5 %	5 %	2,5 %	2,5 %	5 %	2,5 %	1,25 %
<b><math>\text{CaCl}_2</math></b>	0,25 M	0,5 M	0,75 M	0,5 M	0,25 M	0,25 M	0,125 M

Para determinar si el polímero presenta efecto inhibitorio sobre las BAL utilizadas, se rehidrató con solución fisiológica una ampolla conteniendo las BAL liofilizadas en M1, y se sembró con ansa en estrías y por extensión con espátula de Driglasky, en placas de agar MRS y en placas de MRS cubiertas con gel de alginato. Las placas fueron incubadas 48 h a 37 °C.

## 3. Caracterización genética de las BAL

Las cepas *Lactobacillus perolens* CRL 1724 y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CRL1655, fueron analizadas genéticamente por restricción del cromosoma bacteriano con SmaI por PFGE.

### 3.1. Electroforesis de campos pulsantes (PFGE)

#### 3.1.1. Obtención de ADN genómico de las BAL en bloques de agarosa.

Las BAL fueron sembradas con ansa en 5 ml de caldo MRS y cultivadas 18h a 37 °C. Las muestras fueron procesadas de acuerdo a los siguientes protocolos:



**Protocolo I:** se incubaron a 37 °C por 1 h, 2 ml del cultivo de cada cepa adicionadas con 0,5 ml de caldo MRS fresco y 4 µl de ampicilina (50 mg/ml) y se dejó en incubación a 37 °C por 1 h. Luego se tomó 1 ml del cultivo y se centrifugó a 1000 rpm durante 5 min. Se lavó el precipitado con 1 ml de SL, se agregaron 100 µl de solución de lisozima 10 mg/ml y se mezcló con 100 µl de agar LMP al 2%, ambas soluciones equilibradas a 50 °C en baño termostático. Finalmente se homogenizó la preparación anterior y se rellenaron los moldes para realizar los bloques con aproximadamente 80 µl de la misma, los cuales se llevaron a 4 °C hasta solidificación.

**Protocolo II:** se inocularon 2 ml de caldo MRS con 80 µl del cultivo de toda la noche y se incubó 3 h a 37 °C. Una alícuota de 0,4 ml del cultivo, al igual que en el **protocolo I**, se centrifugó a 1000 rpm durante 5 min y se lavó con 1 ml de SL. Se agregaron 100 µl de solución de lisozima (10 mg/ml) y se mezcló con 100 µl de agar LMP al 2% a 50 °C. Se formaron los bloques y se enfriaron a 4 °C hasta solidificación.

A cada bloque se lo incubó en 0,6 ml de SLis durante 17 h a 37 °C con agitación constante. Luego se agregaron 500 µl de SDS al 7,5% y se dejó en estufa a 37 °C por 5 h. Cada bloque se lavó con 10 ml de BLC durante 20 min por duplicado, se le agregó 1 ml de BK y se dejó en baño con agitación moderada 18 h a 50 °C. A continuación se lavó dos veces con 10 ml de BLE, luego dos veces más con BLE más con PMSF 0,1 mM durante 1 h y por último se 4 veces con TE por 30 min. Finalmente los bloques se guardaron a 4 °C en EDTA más Sarkosyl 0,5% hasta su uso.

### 3.1.2. Obtención de ADN genómico de *S. aureus* en bloques de agarosa

Una alícuota de 100 µl de un cultivo de toda la noche de *S. aureus* crecido el caldo BHI, se diseminaron con espátula de Drigalsky y las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h. Las colonias obtenidas se resuspendieron en 1 ml de buffer TE hasta alcanzar un valor de 3 en la escala de Mc Farland. A 225 µl de esa suspensión se agregaron 20 µl de lisostafina (5 mg/ml) y se incubó 30 min a 37 °C y se agregaron 5 µl de Proteínasa K (20 mg/ml) y 250 µl de agarosa LMP al 2% equilibrada a 50 °C. Se homogenizó suavemente, se formaron los cubos en moldes apropiados y se dejó solidificar a 4 °C.



Los moldes se incubaron con 1 ml de EDTA 0,5 M (pH 9), 60  $\mu$ l de Sarkosyl 20% y 60  $\mu$ l de Proteinasa K (20 mg/ml) durante 90 min en baño a 55 °C. Finalmente los bloques se lavaron 3 veces con buffer TE a 50 °C durante 15 min cada vez.

### 3.1.3. Digestión de las muestras con enzima de restricción SmaI

Se lavaron los bloques 3 veces con buffer TE durante 30 min y se dejó en buffer TE durante 2,5 h. Se descartó el buffer TE y se incubó medio bloque en 500  $\mu$ l buffer multicores durante 1 h. Se descartó el buffer y se agregaron 150  $\mu$ l de BR y se incubó a temperatura ambiente por 18 h. Posteriormente se lavó, por triplicado, con buffer TE durante 25 min y se incubó 15 min en buffer TBE 0,5 X.

### 3.1.4. Corrida electroforética en gel de agarosa

Se preparó un gel de agarosa al 1% en buffer TBE, se cortaron los bloques digeridos con la enzima y se colocaron en las calles del gel, las cuales se terminaron de llenar con agar LMP al 2 %. El gel se colocó en la cuba electroforética y se agregó buffer TBE 0,5 X hasta cubrir el gel, el cual se equilibró a la temperatura de corrida mediante un módulo de enfriamiento. La corrida electroforética se llevó a cabo por 22 h a 6 vol/cm con pulsos de 1- 20 segundos, un ángulo de 120° y una temperatura de 14 °C. El gel fue teñido por inmersión en buffer TBE conteniendo bromuro de etidio (5  $\mu$ l/100 ml) durante 20 min. Luego se lavó en agua destilada y se expuso en transiluminador a la luz UV.

## 4. Ensayo experimental de inoculación en glándula mamaria bovina al secado

### 4.1. Selección del establecimiento lechero para la inoculación

Con el objetivo de seleccionar el establecimiento para la realización del ensayo de inoculación de FP en glándula mamaria bovina al momento del secado, se tuvieron en cuenta diferentes características del tambo como: proximidad a la UNRC, número de vacas en periodo de secado, y predisposición de los propietarios para realizar el ensayo.

#### 4.2. Relevamiento del establecimiento lechero

Cinco días previos a la realización del ensayo, se realizó un muestreo de todas las vacas en lactación próximas al momento de secado ( $n=12$ ), con el propósito de conocer el estado sanitario de las ubres de dichos animales. Para tal fin, se les extrajo una muestra de leche de cada cuarto para la determinación de RCS y bacteriología. Las muestras fueron refrigeradas a 4 °C, transportadas al laboratorio y procesadas dentro de las 3 h posteriores a la toma de muestras.

#### 4.3. Grupo experimental

Sobre la base de los resultados obtenidos del relevamiento realizado del establecimiento lechero, se seleccionaron 22 cuartos sanos. Los mismos fueron negativos al examen bacteriológico y presentaron un RCS promedio de 426.000 cél/ml. Cada cuarto se consideró como unidad de estudio independiente.

#### 4.4. Inoculación en glándula mamaria y dosis administradas

El producto inoculado en glándula mamaria consistió en la FP obtenida en los diferentes estadios del desarrollo del trabajo. La FP estuvo compuesta por la mezcla de *L. perolens* CRL 1724 y *L. lactis* CRL1655L liofilizada en medio de leche descremada, lactosa e inulina (M2) vehiculizado en gel de alginato de calcio. Además, se evaluó el efecto de los excipientes en glándula mamaria mediante la inoculación de formulación anterior libre de probióticos. Como control se consideró el cuarto sin inocular.

De acuerdo a resultados obtenidos en Estudios de Tolerancia previos (Frola y col., 2011), se utilizó una dosis única de 5 ml conteniendo una concentración de  $1 \times 10^6$  ufc/ml de cada una de las BAL. La misma fue inoculada individualmente en cada uno de los cuartos seleccionados para el ensayo.

Todas las inoculaciones fueron realizadas el día del secado, considerado en este estudio como día cero. El producto liofilizado de las cepas probióticas en M2 ( $1 \times 10^9$  ufc), se resuspendió en 10 ml de SF y se diluyó 1 ml de la suspensión en 100 ml de solución  $\text{CaCl}_2$  0,5 M. Luego con una jeringa previamente cargada con 8 ml de solución de alginato de sodio se tomaron 12 ml de la suspensión de BAL en  $\text{CaCl}_2$  y se agitó para favorecer la homogenización y el gelificado. Previo a la inoculación los cuartos fueron higienizados adecuadamente con alcohol al 70% y

algodón. Se administraron 5 ml de la FP por única vez en cada cuarto mamario, a una profundidad de 15 mm aproximadamente dentro del canal del pezón mediante jeringa sin aguja (Frola y col., 2012). La inoculación del excipiente se llevó a cabo siguiendo el mismo procedimiento partiendo de un tubo de leche descremada, lactosa e inulina liofilizado sin BAL. En total se inocularon 12 cuartos con la FP, 4 cuartos con el excipiente y 6 cuartos no fueron inoculados para ser utilizados como grupo control.

#### 4.5. Toma de muestras de leche

Se tomaron muestras de leche 5 días antes del comienzo del ensayo para control sanitario, el día de la inoculación (Día 0) y los días 1, 2, 8 y 14 posteriores a la inoculación. Se realizó, además, una toma de muestra de todos los cuartos a los 150 días de la inoculación, tras el parto de las vacas. Las muestras de leche se utilizaron para realizar las determinaciones de RCS y bacteriología según se describe en el punto 4.7 y 4.8.

Para la toma de muestra se desinfectaron los pezones con alcohol al 70%, y se secaron con toallas de papel, luego se recogieron muestras de leche de los cuatro cuartos (5-7 ml/cuarto) y se depositaron en tubos estériles para bacteriología. Los tubos fueron identificados con el número del animal, rotulados como DD: cuarto delantero derecho, DI: cuarto delantero izquierdo, TD: cuarto trasero derecho y TI: cuarto trasero izquierdo, refrigerados y transportados al laboratorio para su procesamiento dentro de un lapso no superior a 3 h, a fin de realizarles los estudios pertinentes.

#### 4.6. Análisis clínico

Los signos clínicos de la ubre, tales como dolor, hinchazón, enrojecimiento, entre otros y las características físicas de la leche se registraron todos los días que se visitó el tambo. Y al igual que las inoculaciones y tomas de muestras fueron realizados por el Med. Vet. José Giraudo.

#### 4.7. Recuento de Células Somáticas

Las muestras fueron enviadas, refrigeradas, al laboratorio de diagnóstico veterinario LASA (propiedad del Médico Veterinario José Giraudo, Río Cuarto, Córdoba) para la determinación del RCS mediante la técnica de microscopía óptica, que implica la tinción de

células somáticas con azul de metileno y recuento de las mismas. Los resultados se expresan como cél/ml.

#### 4.8. Aislamiento y caracterización bacteriológica

Para la determinación de microorganismos patógenos se sembró en superficie una alícuota de 10 µl de cada muestra de leche o secreción de cuarto, en agar sangre y se incubó en aerobiosis 24-48 h a 37 °C y se registró la morfología de la colonia, el patrón hemolítico ( $\alpha$  y/o  $\beta$ ) y la producción de pigmento.

### 5. Análisis estadístico

El análisis de los datos se llevó a cabo mediante el uso del software estadístico InfoStat (versión 2016). Los datos de %supervivencia fueron calculados individualmente a partir de los recuentos bacterianos, se realizaron comparaciones a través de análisis de varianzas (ANOVA) para medidas repetidas y posterior análisis con test de Bonferroni. Un p-valor < 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

## CAPÍTULO 5

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 1. Diseño de la formulación probiótica (FP)

Con la finalidad de elaborar una FP de aplicación intramamaria para la prevención de la mastitis bovina se trabajó en diferentes aspectos. En primera instancia se evaluó la supervivencia de las BAL frente al proceso de liofilización en diferentes medios crioprotectores y el efecto del almacenamiento a 4 °C por diferentes períodos de tiempo. A partir de los resultados obtenidos en esta etapa se seleccionó un único medio y se probó el efecto del agregado de inulina, un compuesto prebiótico con potencial crioprotector, y ácido ascórbico como antioxidante. Además, se estudió el vehículo para rehidratar y administrar la formulación, como así también el efecto de su inoculación en glándula mamaria de bovinos al secado.

## 1.1. Supervivencia de BAL en medios crioprotectores

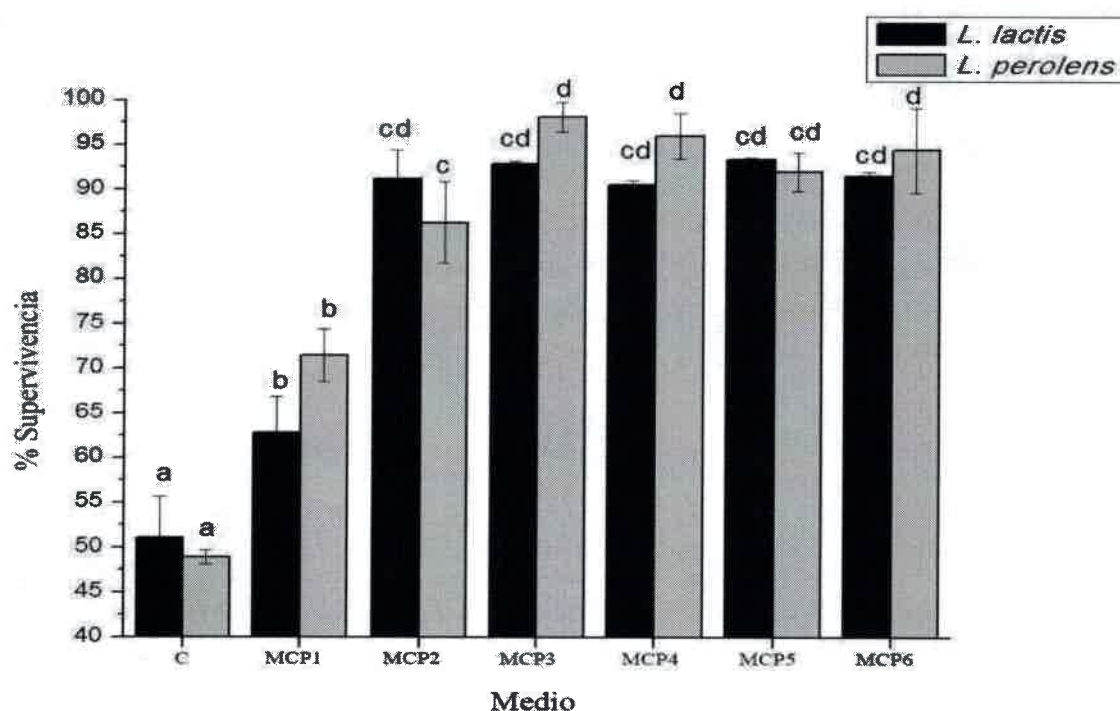
Para la mayoría de los cultivos de las BAL de interés comercial para la industria láctea, se selecciona como medio de secado leche descremada en polvo, ya que evita el daño celular mediante la estabilización de los constituyentes de la membrana celular (Selmer-Olsen y col., 1999). Por otro lado, genera una estructura porosa en el producto liofilizado que hace más fácil la rehidratación y contiene proteínas que proporcionan una capa protectora para las células (Abadias y col., 2001a).

Es conocido que la complementación de la leche descremada con agentes protectores puede mejorar su efecto protector intrínseco durante el almacenamiento. Diversos azúcares, por ejemplo glucosa, fructosa, lactosa, manosa y sacarosa, polialcoholes y azúcares no reductores, como la trehalosa, se han probado en BAL por su efecto protector durante el secado y posterior almacenamiento (Leslie y col., 1995; Linders y col., 1997; Carvalho y col., 2002, 2003ce; Otero y col., 2007; Li y col., 2011).

De acuerdo con los resultados observados en estos estudios en esta primera etapa se decidió utilizar como principales medios protectores leche descremada y lactosa, además de

trehalosa y sacarosa como complemento. Se liofilizaron ambas cepas por separado utilizando los medios crioprotectores descritos en el punto 2.1 de la sección Métodos.

Como se detalló en la sección Métodos, la supervivencia de las BAL en cada medio fue evaluada por los recuentos de ufc en placas de MRS. Los resultados (ufc/ml) a las 24 horas post-liofilizado se muestran en la Figura 9. Ambas BAL presentaron un crecimiento similar en todos los medios crioprotectores y el mismo comportamiento frente al proceso de liofilización. Este resultado fue confirmado estadísticamente, ya que no se observaron diferencias significativas ( $p=0.1747$ ) entre las cepas en la resistencia al proceso.



**Figura 9.** Supervivencia de bacterias lácticas en distintos medios protectores 24 h post-liofilizado. Medios protectores: MCP1: Lactosa + Trehalosa + Sacarosa. MCP2: Leche descremada MCP3: Leche descremada + Lactosa. MCP4: Leche descremada + Lactosa + Sacarosa. MCP5: Leche descremada + Lactosa + Trehalosa. MCP6: Leche descremada + Lactosa + Trehalosa + Sacarosa C: Solución fisiológica. Las experiencias fueron realizadas por triplicado. Letras diferentes corresponden a diferencias estadísticamente significativas (ANOVA,  $p<0,05$ )



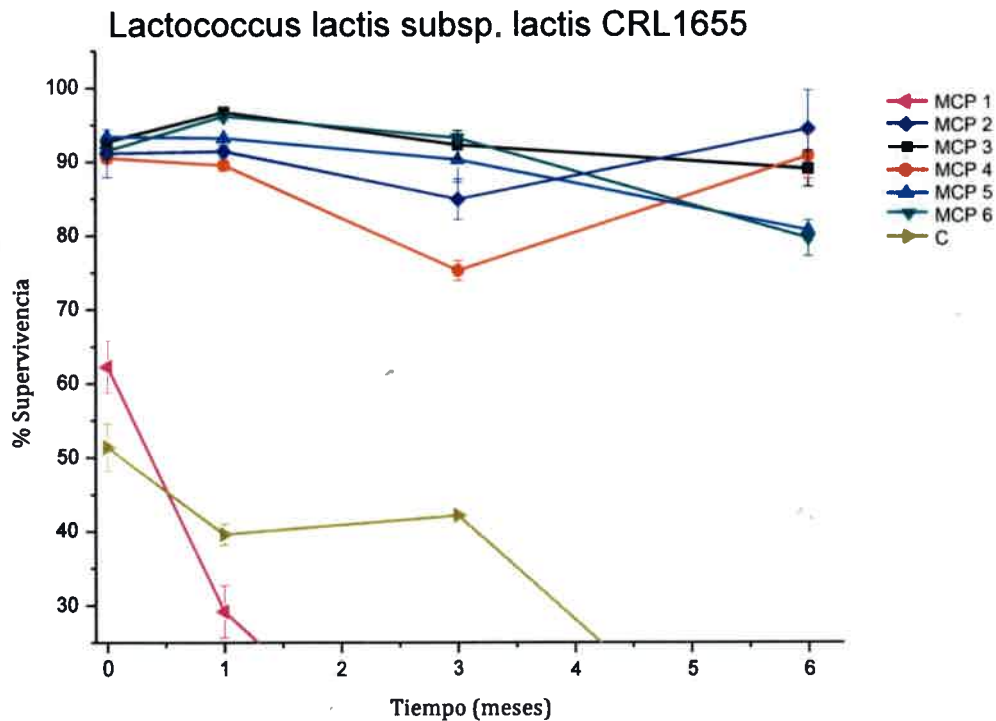
En cuanto a los medios utilizados para llevar a cabo la liofilización, se observó una importante pérdida de la viabilidad de las bacterias liofilizadas en los medios con solución fisiológica (C) o mezcla de azúcares (MCP1) únicamente, registrándose un porcentaje de supervivencia de apenas el 51,37% para *L. lactis* y 49,21% para *L. perolens* en C.

Las BAL liofilizadas en medio crioprotector formulado sobre la base de leche descremada como único protector (MCP2) presentaron un porcentaje de supervivencia elevado, siendo mayor para *L. lactis* (93 %) que para *L. perolens* (86%). La leche descremada es un agente crucial ya que aumenta la tasa de supervivencia notablemente para ambas cepas. No es así para los azúcares, que por sí solos no tienen potencial para ser utilizados como medio protector eficaz, como lo demuestra el bajo porcentaje (20%) observado en el aumento de la supervivencia de las BAL respecto al control sin medio protector.

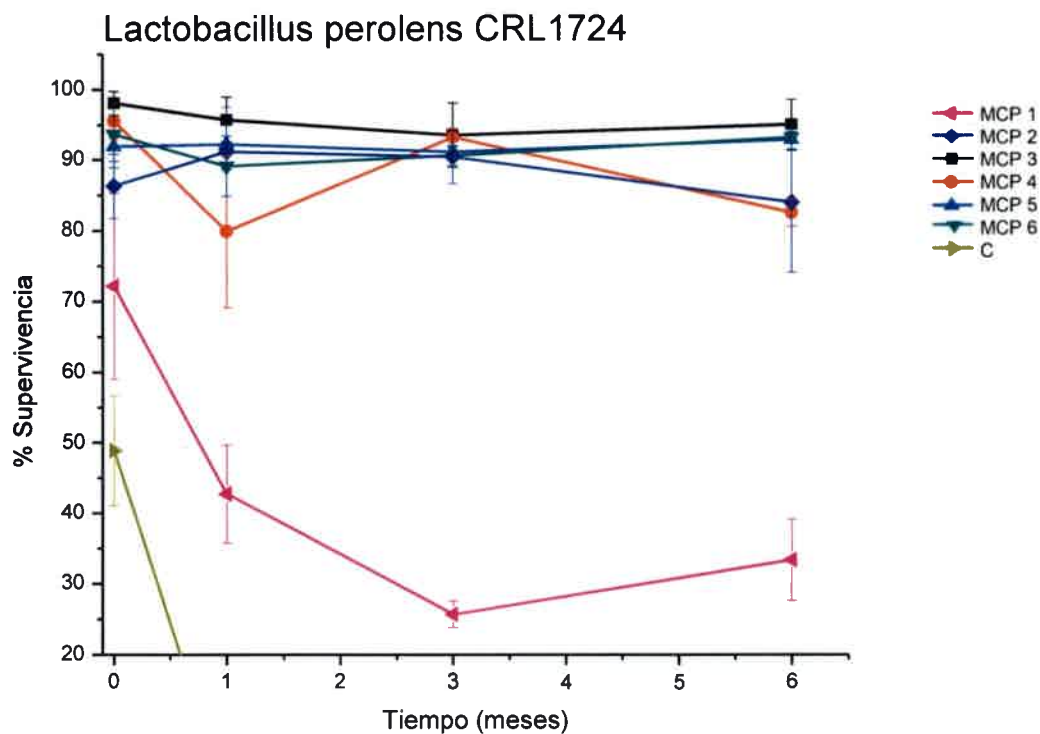
El agregado de azúcares en distintas combinaciones y en conjunto con la leche descremada (MCP3-6) mejora considerablemente la supervivencia de ambas. Si bien esta observación es más clara para *L. perolens*, la combinación de azúcares y leche descremada permite porcentajes de supervivencia mayores para ambas BAL que la leche descremada sola. No se observaron diferencias significativas entre las distintas combinaciones de azúcar probadas para ambas cepas ( $p=0.1345$ ). Si bien, los porcentajes de supervivencia en los diferentes medios protectores dependen de cada cepa en particular y no hay estudios de viabilidad con estas cepas específicamente, trabajos de otros autores que utilizan diferentes especies de BAL reportan resultados similares en cuanto a la capacidad de los medios protectores compuestos por leche descremada para mejorar la viabilidad. Un estudio realizado por Otero y col. (2007) con dos BAL reportó que para *L. delbrueckii*, los medios más eficientes fueron los formulados sobre la base de leche descremada y lactosa o sacarosa, mientras que para dos cepas de *L. gasseri* no había diferencia significativa entre estos medios y leche descremada sola. Por otro lado, en este estudio se observó que la susceptibilidad de los microorganismos a las condiciones de liofilización depende específicamente de cada cepa. En este caso, las tres cepas mostraron un comportamiento muy diferente cuando fueron liofilizadas sin medio protector, incluso las dos cepas de *L. gasseri* mostraron una diferencia de aproximadamente un 30% en la supervivencia.

El efecto del tiempo de almacenamiento de las BAL liofilizadas en los diferentes medios sobre la viabilidad de las cepas, se determinó por un período de 6 meses (Figura 10 y Figura 11).

En el medio control y el MCP1, medio crioprotector sin leche descremada y que contenía solamente azúcares, ninguna de las cepas evidenció una supervivencia mayor al 50% luego de un mes de iniciado el ensayo. La adición de leche descremada favorece la conservación de la tasa de supervivencia a lo largo del tiempo, la cual no decae de manera significativa con el paso del tiempo.



**Figura 10.** Supervivencia de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CRL1655 en distintos medios protectores: MCP1: Lactosa + Trehalosa + Sacarosa. MCP2: Leche descremada. MCP3: Leche descremada + Lactosa. MCP4: Leche descremada + Lactosa + Sacarosa. MCP5: Leche descremada + Lactosa + Trehalosa. MCP6: Leche descremada + Lactosa + Trehalosa + Sacarosa. C: Solución fisiológica.



**Figura 11.** Supervivencia de *Lactobacillus perolens* CRL 1724 en distintos medios protectores: MCP1: Lactosa + Trehalosa + Sacarosa. MCP2: Leche descremada. MCP3: Leche descremada + Lactosa. MCP4: Leche descremada + Lactosa + Sacarosa. MCP5: Leche descremada + Lactosa + Trehalosa. MCP6: Leche descremada + Lactosa + Trehalosa + Sacarosa. C: Solución fisiológica.

En función de los resultados obtenidos y teniendo en cuenta la elevada tasa de supervivencia obtenida luego del proceso de liofilización, etapa donde se produce la mayor pérdida de viabilidad, se decidió seleccionar el medio protector MCP3, compuesto por leche descremada y lactosa, como el más apropiado para realizar la formulación del producto probiótico. Si bien, este medio mostró resultados similares a otros medios protectores compuestos por leche descremada y azúcares (MCP4-MCP6), éstos no fueron seleccionados debido a que el agregado de sacarosa o trehalosa no mejoró sustancialmente los procesos de liofilización o almacenamiento como para justificar un aumento del costo del producto. La incorporación de lactosa, a pesar de no mostrar diferencias significativas para *Lactococcus lactis*, si resultó en un aumento en la tasa de supervivencia cuando *Lactobacillus perolens* fue liofilizado respecto al medio compuesto por leche descremada únicamente.

## 1.2. Efectos de compuestos bioactivos sobre la supervivencia de las BAL liofilizadas

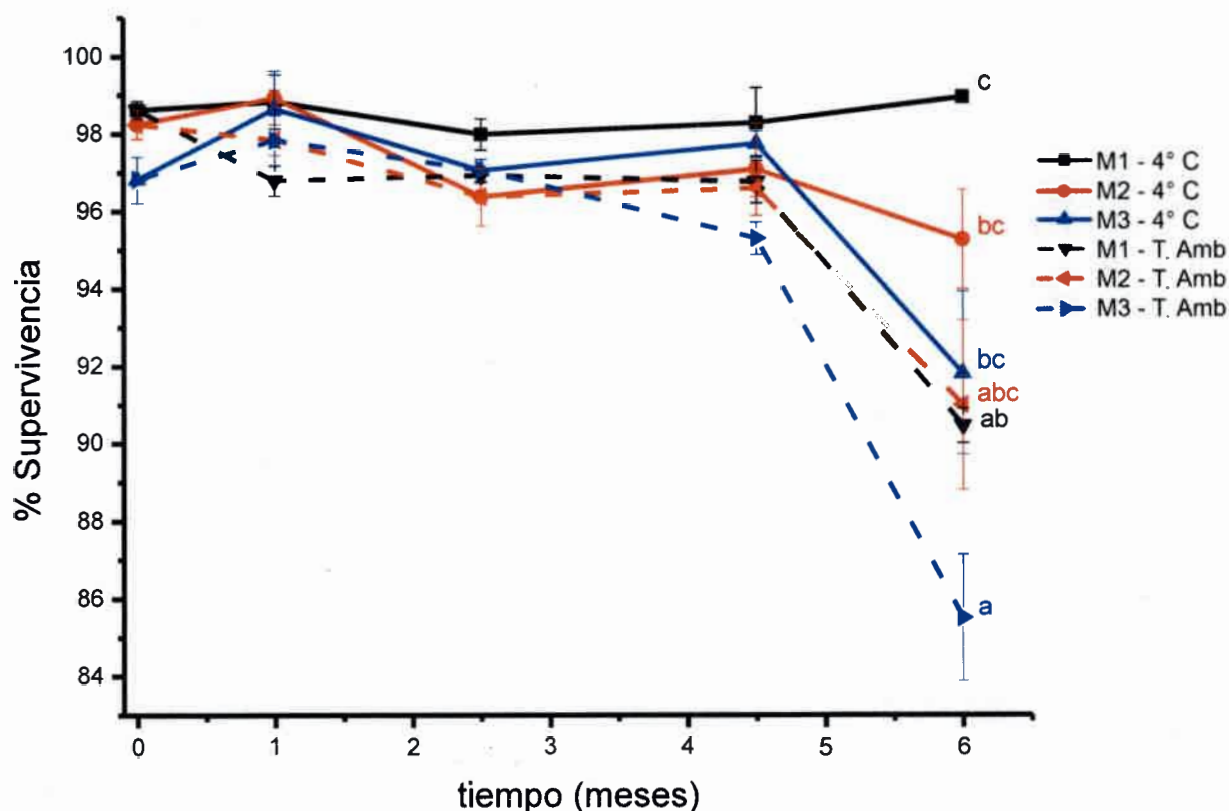
Los prebióticos son compuestos que favorecen el crecimiento y/o actividad de un número de especies bacterianas específicas que tienen un efecto benéfico en la salud. La combinación de prebióticos con probióticos mejora la supervivencia y actividad en el organismo sirviendo como un sustrato específico disponible para la fermentación (Dhewa y col., 2014; Nagpal y col., 2007).

Prebióticos como la inulina en combinación con probióticos tienen un doble rol: aumentar el potencial de las cepas probióticas una vez reconstituidas y actuar como crioprotector en la congelación y liofilización debido a su naturaleza polihidroxilada (Savini y col., 2010; Tymczyszyn y col., 2010).

Conjuntamente con el objetivo de mejorar la supervivencia durante el periodo de almacenamiento se comprobó la viabilidad de las BAL en presencia de ácido ascórbico, un antioxidante utilizado para evitar el deterioro de lípidos en la bicapa lipídica (Kurtmann y col., 2009; Jalali y col., 2012).

En esta etapa, se liofilizó la mezcla de ambas cepas de BAL en el medio crioprotector seleccionado en el Punto 1, al cual se le añadieron los compuestos a estudiar, inulina y ácido ascórbico. Se obtuvieron en total tres medios en los cuales se estudió la supervivencia de las cepas luego del liofilizado y almacenamiento: M1: leche descremada y lactosa. M2: leche descremada, lactosa e inulina. M3: leche descremada, lactosa, inulina y ácido ascórbico.

Luego del proceso de liofilización se obtuvo un producto poroso y homogéneo en todos los medios utilizados, evidenciando un buen proceso. La tasa de supervivencia de las cepas al proceso de liofilizado (Figura 12) fue elevada, siendo mayor al 96%, cuando las cepas se rehidrataron a las 24 h para los tres medios probados.



**Figura 12.** Supervivencia de bacterias lácticas liofilizadas en distintos medios protectores almacenadas a 4° C (línea continua) y a 25° C (línea intermitente). Medios protectores: M1: Leche descremada + Lactosa. M2: Leche descremada + Lactosa + Inulina. M3: Leche descremada + Lactosa + Inulina + Ácido ascórbico. Las experiencias fueron realizadas por triplicado. Letras diferentes corresponden a diferencias estadísticamente significativas (ANOVA,  $p < 0,05$ )

Cuando se analiza el efecto del almacenamiento de las bacterias liofilizadas, la viabilidad se mantiene constante y no se observan diferencias significativas hasta los 4.5 meses de almacenamiento ( $p < 0.0001$ ). Se observaron diferencias significativas de la tasa de supervivencia entre las cepas almacenadas a 4° C y a 25° C evidenciando el efecto adverso de la temperatura ( $p = 0.0110$ ).

Las bacterias guardadas a 4° C que contenían únicamente leche descremada y lactosa (M1) o leche descremada, lactosa más inulina (M2) continuaron mostrando una tasa de



supervivencia elevada. Lo que sugiere que la inulina, descrita como prebiótico, puede ser incorporada al medio protector sin afectar la viabilidad del producto probiótico. Por otra parte, la adición de ácido ascórbico afectó de manera negativa la viabilidad de las cepas durante el almacenamiento, contrariamente a lo que se esperaba, lo cual podría relacionarse a que el pardeamiento no enzimático de la muestra y la consecuente pérdida de viabilidad (Kurtmann y col., 2009).

### 1.3. Rehidratación y vehículos

Con el objetivo de cubrir una mayor superficie del epitelio de la glándula mamaria y facilitar la aplicación del producto, se decidió aumentar el volumen y la consistencia de la FP a inocular.

Considerando que las BAL liofilizadas necesitan ser hidratadas y se deben resuspender de manera homogénea en la formulación, se descartó utilizar una solución ya gelificada. Se decidió utilizar alginato, un polímero extraído de algas marinas que posee la propiedad de gelificar instantáneamente en presencia de iones calcio a temperatura ambiente.

Debido a que la polimerización del gel de alginato de calcio depende de las proporciones de alginato de sodio y de iones calcio utilizadas en la reacción se probaron distintas combinaciones de estos reactivos para lograr una consistencia que permita que el producto quede retenido en la glándula mamaria y las bacterias puedan adherirse correctamente al epitelio mamario. Las concentraciones finales de iones  $\text{Ca}^{2+}$  y alginato de sodio más adecuadas para obtener la consistencia deseada fueron 5% de alginato de sodio y 0,05 M de  $\text{CaCl}_2$ . El agregado de alginato de calcio a placas de MRS, a dichas concentraciones, no evidenció efectos inhibitorios en el crecimiento de las BAL, previamente sembradas en estrías o por diseminación con espátula de Drigalsky.

## 2. Caracterización genética

Con el objetivo de asegurar la inalterabilidad y fidelidad genética de las BAL que integran la FP, resultó de suma importancia realizar la caracterización genética de las cepas. Por este motivo se decidió determinar el perfil de restricción con *SmaI* de ADN genómico por PFGE.

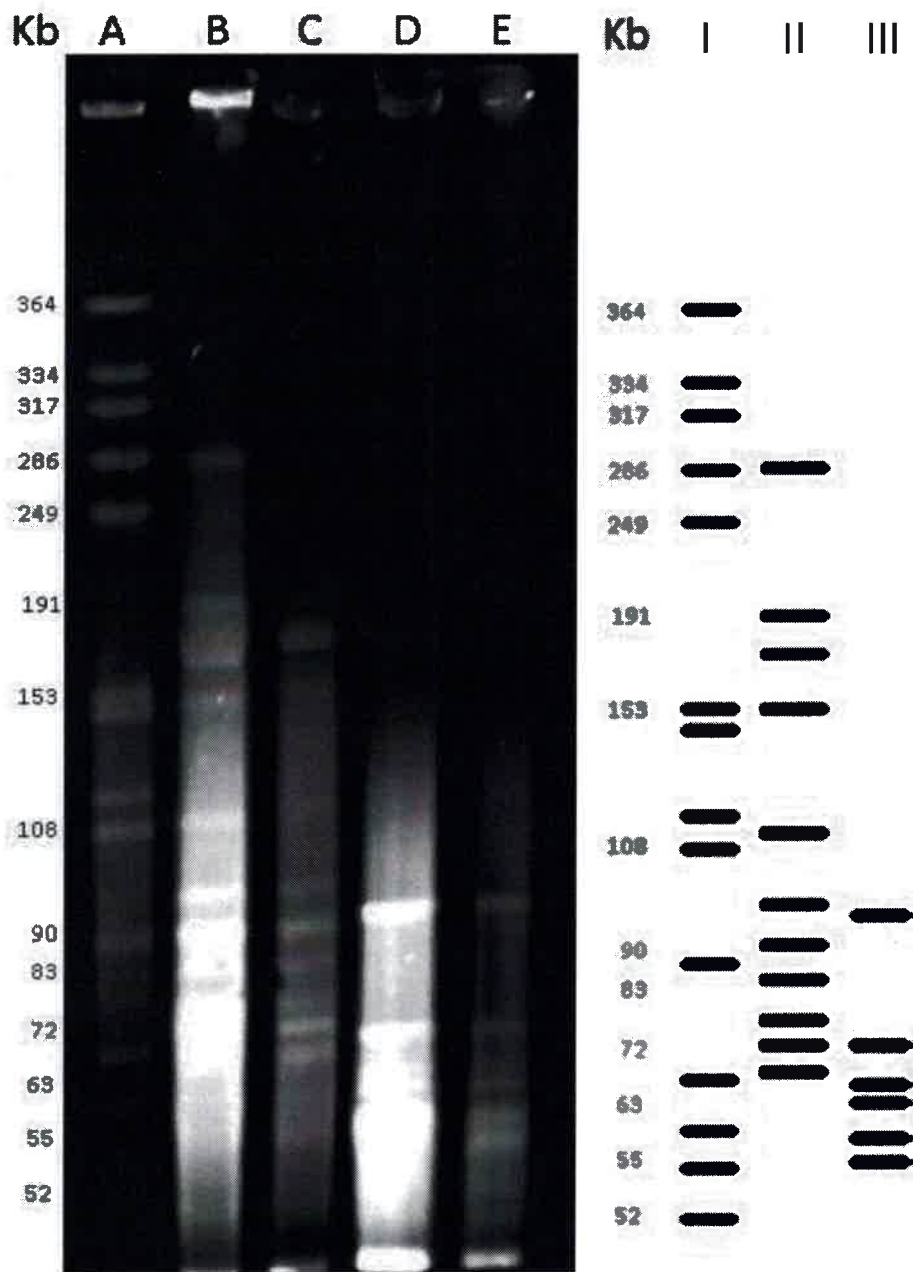


## 2.1. Electroforesis de campos pulsantes

El análisis de los perfiles genéticos por PFGE fue realizado empleando dos protocolos. Se observó que mediante el empleo del protocolo I se obtuvieron bandas de mayor intensidad, esto fue esperable debido al uso de ampicilina en este protocolo para mejorar la lisis celular sumado a que se utilizó una mayor concentración de bacterias lácticas para extraer ADN (Figura 13). Debido a esto, las bandas que presentan mayor concentración de ADN se saturan impidiendo diferenciar el patrón completo. Por el contrario, las muestras tratadas de acuerdo al protocolo II presentan una menor intensidad en las bandas, que permite observar todo el patrón, salvo en el caso de *L. lactis* donde la banda de 286 kb no se distingue.

A través de los perfiles de bandas obtenidos de la restricción de ADN cromosomal producida con *SmaI*, *L. perolens* y *L. lactis* fueron fácilmente diferenciadas. El resultado obtenido del análisis de PFGE de las dos cepas mostró la presencia de un patrón de 6 bandas, para *L. perolens*, comprendidas entre 55 a 96 kb y en el caso de *L. lactis* se obtuvo un patrón de 11 bandas comprendidas entre 76 y 286 kb. Las bacterias lácticas estudiadas presentaron patrones diferentes como era esperado teniendo en cuenta la diferencia de género entre las cepas.

*SmaI* es una enzima de restricción que reconoce y corta en la secuencia específica de nucleótidos 5' CCCGGG 3'. Es de esperar que genomas con bajo contenido de G+C, como el caso de *L. lactis* que contiene aproximadamente 35% de G+C posean pocos sitios de reconocimiento, lo que resulta en pocos fragmentos de ADN de gran tamaño. Por el contrario, en el caso de *L. perolens* que posee un porcentaje de G+C cercano al 50% los sitios de corte son más frecuentes. Debido a esto se obtienen mayor número de fragmentos que son, en consecuencia, de menor cantidad de pares de bases, lo que explica las bandas de menor peso molecular observadas en el perfil de *L. perolens*.



**Figura 13.** Perfiles de restricción con *Sma*I de ADN genómico de *L. lactis* y *L. perolens* por PFGE. A) Marcador de peso molecular: ADN genómico de *S. aureus* RC108 digerido con *Sma*I. B) *L. lactis* protocolo I C) *L. lactis* protocolo II D) *L. perolens* protocolo I E) *L. perolens* protocolo II. Esquema de perfiles de restricción: I: *S. aureus* RC108. II) *L. lactis*. III) *L. perolens*.

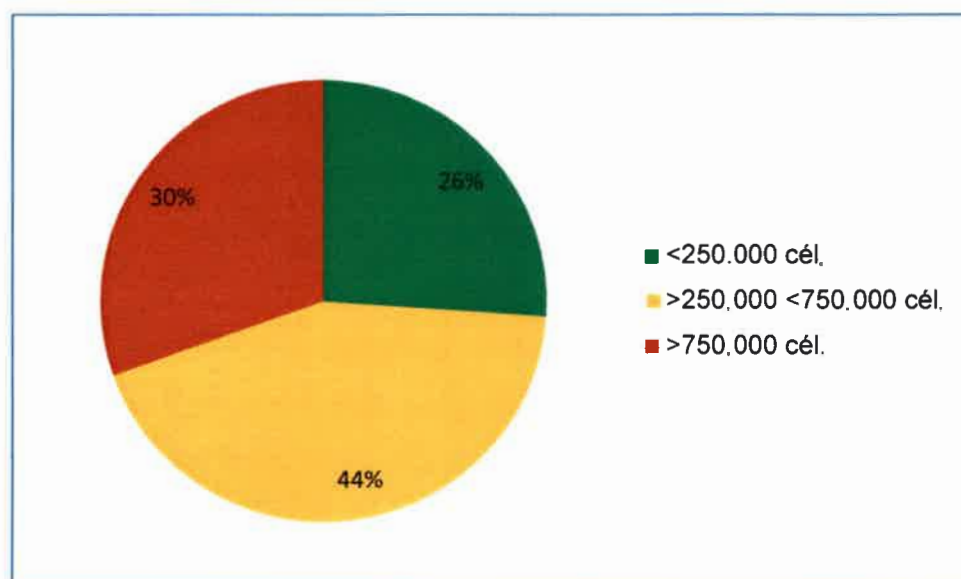
### 3. Ensayo experimental de inoculación en glándula mamaria bovina al secado

#### 3.1. Selección del establecimiento lechero

El tambo seleccionado se ubica a 47 km de la ciudad de Río Cuarto, cercano a la localidad de Malena, Córdoba. (33°30'36.07"S, 64°26'55.26"O) El mismo cuenta con aproximadamente 150 vacas ordeñadas en forma automática e ininterrumpidamente dos veces al día. La leche obtenida del ordeño se deposita en un tanque de frío con una capacidad aproximada de 10.000 litros. El RCS en tanque al comienzo del ensayo fue de 480.000 cél/ml. La higiene general del establecimiento es la estándar de los establecimientos lecheros la región

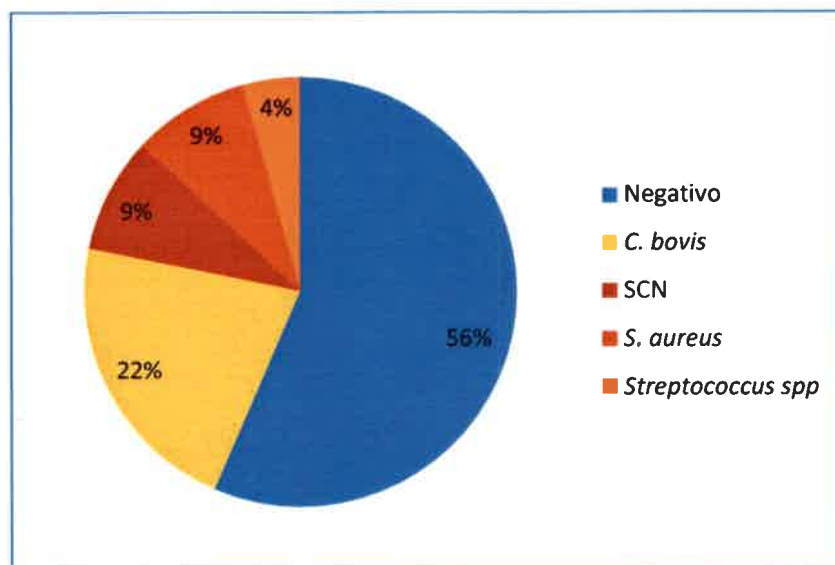
#### 3.2. Relevamiento del establecimiento lechero

Se tomaron muestras de 46 cuartos correspondientes a 12 vacas Holando-Argentina próximas al secado. De los 46 cuartos un 26,08% (12 muestras) presentaron un RCS <250.000 cél/ml, un 43,47% (20 muestras) se ubicaron con un recuento >250.000 cél/ml y <750.000 cél/ml y un 30,43% (14 cuartos) presentaron valores >750.000 cél/ml (Figura 14).



**Figura 14.** Distribución porcentual de muestras de leche de vacas al secado agrupadas en estratos según el RCS.

De la totalidad de muestras analizadas, un 56,5% (26 cuartos) resultaron negativas al análisis bacteriológico, mientras que un 43,5% (20 muestras) fueron positivas. En la mitad de los cuartos infectados (10 cuartos) se aisló *Corynebacterium bovis*, un patógeno menor de aislamiento frecuente en los tambos que genera inflamación leve, con escaso aumento del RCS. En un 20% de los cuartos presentó *S. aureus* y en otro 20% de los cuartos SCN, mientras que el 10% restante fue positivo a *Streptococcus spp* (Figura 15)



**Figura 15.** Distribución porcentual de muestras de leche de vacas al secado agrupadas según aislamiento microbiano obtenido.

### 3.3. Grupo experimental

Considerando estos resultados, se procedió seleccionar los animales para realizar el ensayo de inoculación. Se seleccionaron solo aquellos cuartos con resultados negativos para los análisis bacteriológicos y en lo posible, un RCS bajo o aceptable, considerando como límite para este ensayo 750.000 cél/ml. Se debe tener en cuenta que estos animales se encontraban en un estadio muy cercano al periodo seco y está reportado que en este período los valores de RCS se elevan por procesos fisiológicos naturales (Ting-Chieh Yu y col., 2011; Alnakip y col., 2014). Así, de los cuartos analizados se escogieron finalmente 22 cuartos para el ensayo de inoculación.

### 3.4. Análisis bacteriológico

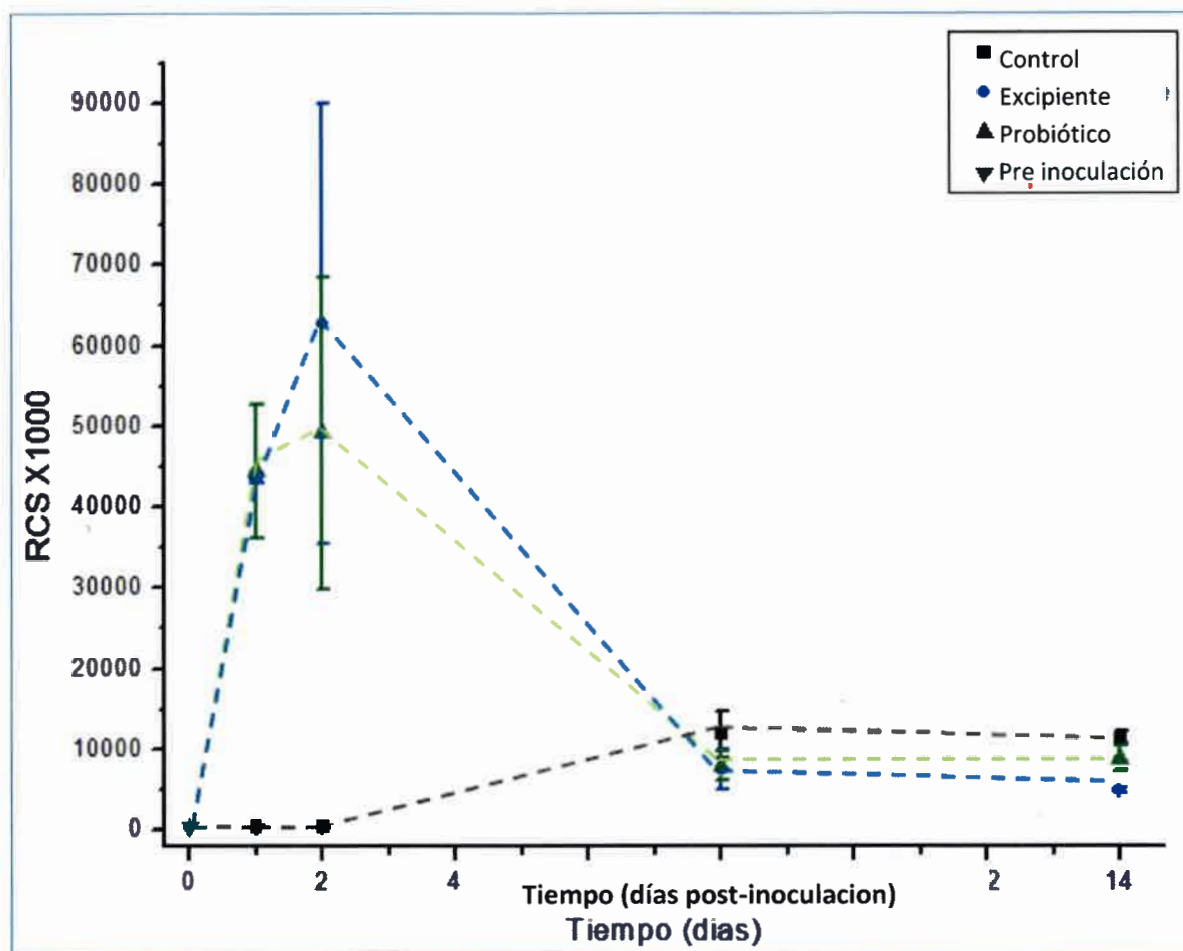
Si bien el objetivo principal del ensayo fue determinar el efecto de la administración intramamaria de la FP, a través de los signos clínicos en la ubre y la medición del RCS en la leche, también se realizaron cultivos bacteriológicos de las muestras a fin de descartar la presencia de patógenos mayores durante el ensayo. Este análisis reveló aislamientos en 10 de los 22 cuartos analizados durante los días del ensayo. El grupo control que no fue inoculado presentó el mayor porcentaje (66%) de cuartos con aislados positivos, mientras que en las muestras correspondientes a cuartos inoculados con el excipiente se obtuvo un 50% de resultados positivos y un 42% en las inoculadas con la FP. El patógeno más prevalente que se aisló fue *C. bovis* que si bien es considerado como un patógeno menor, y las inflamaciones causadas por este microorganismo son leves, llama la atención el elevado porcentaje de aislamiento del mismo en las muestras analizadas. Esta bacteria suele aparecer cuando no se realizan adecuadamente las medidas preventivas y puede ser considerado como bacteria centinela, indicando fallas en los procedimientos de control, antes de la aparición de los patógenos mayores (Chaves, 2009). Solo en uno de los cuartos analizados, perteneciente al grupo control que presentó aislamiento de *C. bovis* a las 24 h, también se aislaron SCN a las 48 h y 8 días. Este patógeno es también muy común y considerado un patógeno menor que genera infecciones leves.

### 3.5. Inoculación en glándula mamaria

Previo a comenzar el ensayo se comprobó un RCS promedio, en los cuartos a utilizar, de 426.000 cél/ml. Después de la inoculación de la glándula mamaria con la FP o excipientes, se tomaron muestras de leche para RCS y análisis bacteriológico. Como se observa en la Figura 16 pasadas las primeras 24 y 48 h, la presencia de células en leche aumentó considerablemente, alcanzando valores promedios de  $4,9 \times 10^7$  y  $6,2 \times 10^7$  cél/ml en los cuartos inoculados con la FP y con el excipiente, respectivamente, mientras que los cuartos sin inocular permanecieron con RCS bajos, 443.000 cél/ml y 346.000 cél/ml a las 24 y 48 h respectivamente. No se observaron signos clínicos de inflamación en la ubre como hinchazón, enrojecimiento o dolor, aunque la apariencia de la secreción/leche presentó un aspecto aguachento/cortado y a las 48 h presencia de grumos y aumento de pH en algunas muestras. La heterogeneidad de las muestras de leche a causa del elevado número de células afecta el análisis del RCS con respecto a la sensibilidad, especificidad



y reproducibilidad, factores que disminuyen su confiabilidad, por lo que valores de 24 h y 48 h presentan una gran desviación estándar. A los 8 días de la inoculación se realizó un nuevo muestreo en el que se observó que el RCS de todos los cuartos, incluidos los sin inocular, oscilaba entre  $4 \times 10^6$  y  $17 \times 10^6$  cél/ml. Valores similares se obtuvieron a los 14 días de inoculación.



**Figura 16.** Evolución del RCS durante el ensayo de inoculación. Los datos son expresados como la media  $\pm$  E.E.

El elevado RCS observado a las 24 h, que continuó hasta las 48 h, muestra una importante respuesta inflamatoria. Esta respuesta causa la modificación en la apariencia de la leche y el aumento del pH, resultado del pasaje de sustancias desde la sangre, principalmente iones bicarbonato. Si bien, trabajos previos de inoculación intramamaria con BAL vehiculizadas en solución fisiológica muestran un RCS elevado los días posteriores a la inoculación (Frola y col.,



2013), en el presente ensayo se observó un recuento mayor, tanto en los cuartos inoculados con la FP como en los inoculados con el excipiente, por lo que se deduce que la mayor reacción de la glándula fue en respuesta al excipiente, compuesto principalmente por alginato de calcio. El alginato ha sido ampliamente utilizado en microencapsulación de células, administración de fármacos, y la ingeniería de tejidos, no obstante, a menudo contiene impurezas, incluyendo lipopolisacáridos, un potente activador de la inmunidad innata (Yang y col., 2009).

A los 8 días de la inoculación, el RCS de los cuartos inoculados disminuyó a los valores obtenidos en el grupo control, lo que estaría indicando la disminución de la respuesta inmune provocada por la inoculación y el RCS elevado es propio del periodo de secado. Finalizada esta etapa luego del parto el RCS disminuyó a valores normales estimados para cuartos sanos en periodo de ordeño.

Con el fin de determinar el estado de salud de la ubre después del período de secado se realizó el muestreo dentro de los 30 días después del parto de todos los cuartos de los animales incluidos en el ensayo. Los resultados mostraron que el RCS disminuyó a valores promedios de 132.000 col/ml para cuartos inoculados con la FP completa, 150.000 col/ml para los inoculados con excipientes únicamente y 184.000 col/ml para los cuartos sin inocular.

Si bien dicha respuesta inmunológica se desarrolla y resuelve en el periodo de secado de la glándula, es idóneo que los excipientes no presenten actividad, por lo que se evalúa a futuro el remplazo de alginato por otros gelificantes.

## CAPÍTULO 6

## CONCLUSIONES

En el presente trabajo se evaluaron las condiciones de supervivencia durante la liofilización y el almacenamiento de dos cepas con potencial tecnológico para su uso en un producto probiótico veterinario para prevenir la mastitis bovina, donde se buscó garantizar la supervivencia y estabilidad de su actividad metabólica. Diferentes estudios demostraron que las condiciones de liofilización y almacenamiento son críticos para la recuperación de células liofilizadas. No hay información previa relativa a *L. lactis* o *L. perolens*, por lo que fue necesario realizar los ensayos presentados ya que, como informan algunos autores, diferentes cepas, incluso de la misma especie, pueden mostrar un comportamiento diferente durante el secado y el almacenamiento en forma de estado seco.

De los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis se puede concluir:

- El agregado de leche descremada a la solución de liofilización incrementa considerablemente la tasa de supervivencia en ambas cepas (cerca del 90%).
- La adición de lactosa mejora la resistencia al estrés causado por la liofilización.
- El agregado de ácido ascórbico tiene un efecto adverso sobre la viabilidad de las BAL, mientras que la inulina no afecta de manera significativa la estabilidad de la formulación probiótica.
- El almacenamiento del producto en oscuridad y a 4°C garantizó la estabilidad de las BAL por 6 meses sin pérdidas considerables en la viabilidad.
- Los perfiles genéticos de bandas obtenidos por PFGE permiten diferenciar e identificar claramente a las BAL que integran la FP y constituyen una herramienta muy importante para asegurar la integridad del producto.
- Si bien el alginato de sodio adicionado a la FP mostró ser un espesante adecuado e inocuo para las BAL, la administración del mismo en la glándula mamaria mostró una intensa reacción inflamatoria orientando la investigación hacia la búsqueda de nuevos excipientes inocuos.

El presente trabajo sienta las bases para estudios futuros de inoculación experimental en bovinos al secado con una FP que permitirá analizar el carácter preventivo del producto y evaluar su efectividad en comparación con el uso de antimicrobianos.

## BIBLIOGRAFIA

- Abadias M, Teixido N, Usall J, Benabarre A, Vinas I. 2001. Viability, efficacy, and storage stability of freeze-dried biocontrol agent *Candida sake* using different protective and rehydration media. *J. Food Prot.* 64(6):856-61.
- Acuña C, Chertcoff R, Martínez MB, Nimo JM. 2001. Udder pathogens prevalence in dairy cows from Argentina. Proc. 40th. Annual Meeting, National Mastitis Council. Reno, Nevada. pp 177-178.
- Agrobit. 2004. *Prevención y detección de la mastitis. Ganadería.* Software de gestión agropecuaria. Disponible en Internet: [www.agrobit.com/Info\\_tecnica/Ganaderia/enfermedades/GA000008en.htm](http://www.agrobit.com/Info_tecnica/Ganaderia/enfermedades/GA000008en.htm). Activo en octubre de 2016.
- Alais C, Lacasa Godina A. 1985. *Ciencia de la leche: principios de técnica lechera.* Barcelona, España. Reverte.
- Alnakip M, Quintela-Baluja M, Böhme K, Fernández-No I, Caamaño-Antelo S, Calo-Mata P, Barros-Velázquez J. 2014. The Immunology of Mammary Gland of Dairy Ruminants between Healthy and Inflammatory Conditions. *J. Vet. Med.* 2014;1. doi:10.1155/2014/659801
- Amand de Mendieta V, Micheo C, Soriano C, Tabera A., Stefano A, Casasnovas G, Purrán P, Corradetti A, Carabajal S. 2001. Aislamiento e identificación de patógenos mamarios de animales bovinos lecheros de la Cuenca Mar y Sierras. *Vet. Arg.* 18:499-504.
- Anderson R, and Lukey P. 1987. A biological role for ascorbate in the selective neutralization of extracellular phagocyte-derived oxidants. *ann. N.Y. Acad. Sci.* 498:229-247.
- Anderson RA. 1987. Chromium. *Trace Elements in Human and Animal Nutrition.* Academic Press, New York, pp. 225-244
- Anuario de Lechería Argentina.* 2013. Fundación para la Promoción y el Desarrollo de la Cadena Láctea Argentina (funPEL). Disponible en internet: [http://issuu.com/cilarg/docs/anuario\\_2013\\_funpel](http://issuu.com/cilarg/docs/anuario_2013_funpel). Activo en octubre de 2016.
- Avila Téllez S y Gutiérrez Chávez A. 2006a. *Producción de ganado lechero.* Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnica. Universidad Nacional Autónoma de México. 6: 217-250.
- Avila Téllez S y Gutiérrez Chávez A. 2006b. *Producción de ganado lechero.* Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnica. Universidad Nacional Autónoma de México. 8: 1-123.
- Bachman KC y Schairer ML. 2003. Invited review: bovine studies on optimal lengths of dry periods. *J. Dairy Sci.* 86: 3027-3037.

- Bachowski GJ, Thomas JP, Girotti AW. 1988. Ascorbate-enhanced lipid peroxidation in photooxidized cell membranes: Cholesterol product analysis as a probe of reaction mechanism. *Lipids*. 23:580-586
- Barkema HW, Schukken YH, Zadoks RN. 2006. The role of cow, pathogen and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *J. Dairy Sci.* 89: 1877-1895.
- 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. *J. Dairy Res.* 76 (3): 340-348.
- Bogni C. 1997. *Estudios fisiológicos, inmunológicos y de patogenicidad de mutantes avirulentas de S. aureus de origen bovino*. Tesis Doctoral. Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.
- Bogni C, Odierno L, Raspanti C, Giraud 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, number #3. pp: 483-493.
- Booth JM. 1981. *The importance of udder health in relation to milk quality improvement and control. Milk Quality Improvement and Control*. Eds. J.D. Collins and J. Hannan. University College Dublin. p. 1-11.
- Buelink D, Schaller, Labriola. 1996. *Principales cuencas lecheras argentinas*. Sec. Agr., Pesca y Aliment. Subs. Aliment., Depto. de Lechería. Pp. 54.
- Butler JE. 1986. Biochemistry and biology of ruminant immunoglobulins. *Prog. Vet. Microb. Immunol.* 2: 1-53.
- Bradley A. 2002. Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet. J.* 164: 116-128.
- Bramley A, Cullor J, Erskine R, Fox L, Harmon R, Hogan J, Nickerson S, Oliver S, Larry Smith K, Sordillo L. 2003. *Concepts of Bovine Mastitis*. 4th ed. 421 S. Nine Mound Rd. Verona, WI: National Mastitis Council Publications.
- Calvinho, Vitulich, Zurbriggen, Canavesio, Tarabla. 1991. Prevalencia de microorganismos patógenos de la ubre en rodeos de la cuenca lechera santafesina. *Therios* 18: 188-196.
- Calvinho LF, Toselli FG, Weimann WR, Canavesio VR, Neder VE, Iguzquiza IA. 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.

- Carvalho AS, Silva J, Ho P, Teixeira P, Malcata FX, Gibbs P. 2003. Effect of various growth media upon survival during storage of freeze-dried *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus durans*. *J Appl Microbiol* 94(6):947–52.
- Carvalho AS, Silva J, Ho P, Teixeira P, Malcata FX, Gibbs P. 2003. Protective effect of sorbitol and monosodium glutamate during storage of freeze-dried lactic acid bacteria. *Le Lait* 83:203–10.
- Carvalho AS, Silva J, Ho P, Teixeira P, Malcata FX, Gibbs P. 2004. Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *Int Dairy J* 14:835–47.
- Castellano A, Issaly L, Iturrioz G, Mateos M, Terán J. 2009. “Análisis de la Cadena de la Leche en Argentina”. *Estudios Socioeconómicos de los Sistemas Agroalimentarios y Agroindustriales N°4*, Ediciones INTA. ISSN 1852-4605.
- Charalampopoulos D, Rastall RA. 2012. Prebiotics in foods. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23, 187–191.
- Chaves CJ, Tirante, Pol, Bas, Vandoni, Olivieri. 2001. *Prevalence of intramammary infections in 74 dairy herds located in Argentina*. 40th. Ann. Meet. Natl. Mastitis Council. Reno, Nevada. pp 205-206.
- 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://por.agro.uba.ar/sites/default/files/agronomia/la-mastitis-bovina-y-su-impacto-sobre-calidad-de-leche.pdf>. Activo en Noviembre de 2016.
- Chertcoff R, L Tirante CJ, Chaves M, La Manna R, Olivieri. 1996. *Relevamiento de infecciones mamarias en tambos de distintas cuencas lecheras del país*. En: Memorias del Cong. Nacional de Cal. de Leche y Mastitis. Río Cuarto, Argentina. P. A-12
- Código Alimentario Argentino*. Capítulo VIII: *Alimentos lácteos*. Disponible en internet: [http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO\\_VIII.pdf](http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO_VIII.pdf). Activo en octubre de 2016.
- Corthésy B, Gaskins HR, Mercenier A. 2007. Cross-talk between probiotic bacteria and the host immune system. *J Nutr.* 2007; 137(3 Suppl 2), 781S–90S
- Craven N, Williams MR. 1985. Defenses of the bovine mammary gland against infection and prospects for their enhancements. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 10: 71-127.
- Crispie F, Twomey D, Flynn J, Hill C, Ross P, Meaney W. 2005. The lantibiotic lactacin 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 RP, 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.
- Crittenden RG, Playne MJ, En Lee YK, Salminen S. 2009. *Handbook of Probiotics and Prebiotics* 2nd ed. John Wiley. pp: 535-581.
- Cross ML. 2002. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 34: 245-253.
- Cruz Alamilla M. 2007. *La mastitis bovina y su impacto en la calidad de la leche*. Entorno ganadero. 4(25).
- Dallard BE. 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
- Dallard BE, Baravalle C, Andreotti C, Ortega HH, Neder V, Calvino LF. 2011. Intramammary inoculation of *Panax ginseng* extract in cows at drying off enhances early mammary involution. *J. Dairy Res.* 78(1):63-71.
- Dallard BE, Pujato SA, Baravalle C, Pereyra EA, Rey F, Renna MS, Calvino LF. 2013. Intramammary infusion of *Panax ginseng* extract in the bovine mammary gland at cessation of milking modifies components of the insulin-like growth factor system during involution. *Res. Vet. Sci.* 94 462-470.
- Dhewa T, Pant S, Mishra V. 2014. Development of freeze dried synbiotic formulation using a probiotic strain of *Lactobacillus plantarum*. *J. Food Sci. Technol.* 51(1):83-89
- Diepers A, Krömker V, Zinke C. 2016. *In vitro* ability of lactic acid bacteria to inhibit mastitis-causing pathogens. *Sust Chem Pharm* (In press) <http://dx.doi.org/10.1016/j.scp.2016.06.002>
- Dunne C, O'Mahony L, Murphy L, Thornton G, Morrissey D, O'Halloran S, Feeney M, Flynn S, Fitzgerald G, Daly C, Kiely B, O'Sullivan GC, Shanahan F, Collins JK. 2001. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am. J. Clin. Nutr.* 73:386S-392S
- Espeche MC, Otero MC, Sesma F, Nader-Macías MEF. 2009. Screening of surface properties and antagonistic substances production by lactic acid bacterial isolated from the mammary gland of healthy and mastitic cows. *Vet. Microbiol.* 135: 346-357.
- Espeche MC-Pellegrino M, Frola I, Larriestra A, Bogni C, Nader-Macías MEF. 2012. Lactic acid bacteria from raw milk as potentially beneficial strains to prevent bovine mastitis. *Anaerobe.* 18(1):103-9.



Food and Agriculture Organization of the United Nations (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: [https://web.archive.org/web/20121022161702/http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/en/probiotics.pdf](https://web.archive.org/web/20121022161702/http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf). Activo en noviembre de 2016.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). *Producción lechera*. Disponible en internet: <http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/produccion-lechera/es/#.V7xYwvnhDDc>. Activo en noviembre de 2016.

Frola ID, Pellegrino MS, Espeche MC, Giraud JA, Nader-Macías MEF, Bogni CI. 2011 Effects of intramammary inoculation of *Lactobacillus perolens* CRL1724 in lactating cows udders. *J. Dairy Res.* 78:1-9.

Frola ID, Pellegrino MS, Magnano G, Giraud JA, Espeche MC, Nader-Macías MEF and Bogni CI. 2012. Histological examination of nonlactating bovine udders inoculated with *Lactobacillus perolens* CRL 1724. *J. Dairy Res.* 1-8.

Frola ID, 2013. *Aplicación potencial de probióticos para la "prevención y control de la mastitis bovina"*. Tesis Doctoral. Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

García A. 2007. *Mastitis contagiosa vs. ambiental*. South Dakota State University. Disponible en Internet: [http://www.extension.org/pages/Mastitis\\_Contagiosa\\_vs.\\_Ambiental](http://www.extension.org/pages/Mastitis_Contagiosa_vs._Ambiental). Activo en octubre de 2016.

Gardiner GE, O'Sullivan E, Kelly J, Auty MA, Fitzgerald GF, Collins JK. 2000. Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. *Appl Environ Microbiol.* ;66(6):2605-12.

Gasqué Gómez R. 2008. *Glándula mamaria y secreción láctea*. In: *Enciclopedia Bovina*. Capítulo 11. 1ra Edición. México: UNAM; 2008:415-426

Gentilini E, Denamiel G, Betancor A, Rebuelto M, Rodríguez Fermepin M, De Torrest RA. 2002. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis in Argentina. *J. Dairy Sci.* 85: 1913-1917.

Giraud J, H Rampone, L Martínez, A Calzolari. 1995. Recuento de células somáticas en leche bovina de cuartos mamarios con aislamiento negativo e infectados. *Rev. Med. Vet.* 76, 6-10.

Giraud, A., Cheung, A. and Nagel, R. 1997. The *sae* locus of *Staphylococcus aureus* controls exoprotein synthesis at the transcriptional level. *Arch. Microbiol.* 168: 53-58.

- Gutman, Guiguet, Rebolini. 2003. *Los ciclos en el complejo lácteo argentino. Análisis de políticas lecheras en países seleccionados*. SAGPyA. 259 p.
- Hernández Reyes J, Bedolla Cedeño J. 2008. Importancia del conteo de células somáticas en la calidad de la leche. *REDVET. Rev. elec. Vet.* 1695-7504.
- Hogan JS, Weiss WP, Todhunter DA, Smith KL, Schoenberger PS. 1992. Efficacy of an Escherichia coli J5 mastitis vaccine in an experimental challenge trial. *J. Dairy Sci.* 75: 415-422.
- Jalali M, Abedi D, Varshosaz J, Najjarzadeh M, Mirlohi M, Tavakoli N. 2012. Stability evaluation of freeze-dried Lactobacillus paracasei subsp. tolerance and Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus in oral capsules. *Res. Pharm. Sci.* 7:31-36
- Kareem, Ling, Chwen, Foong, Asmara. 2014. Inhibitory activity of postbiotic produced by strains of Lactobacillus plantarum using reconstituted media supplemented with inulin. *Gut Pathogens*, 6:23
- 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. *J. Dairy Res.* 75 (3): 365-373.
- Klostermann K, Crispie F, Flynn J, Meaney WJ, Paul Ross R, Hill C. 2013. 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.
- Kruze J. 1998. *La rutina de ordeño y su rol en los programas de control de mastitis bovina*. Archivos de medicina veterinaria, Valdivia 30: 07-16
- Kurtmann L, Carlsen CU, Risbo J, Skibsted LH. 2009. Storage stability of freeze-dried Lactobacillus acidophilus (La-5) in relation to water activity and presence of oxygen and ascorbate. *Cryobiology.* 58:175-180.
- Kurtmann L, Skibsted LH, Carlsen CU. 2009. Browning of freeze-dried probiotic bacteria cultures in relation to loss of viability during storage. *J. Agric. Food Chem.* 57(15):6736-41
- Leitner G, Krifucks O, Kiran MD., Balaban N. 2011. Vaccine development for the prevention of staphylococcal mastitis in dairy cows. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 142 (1-2): 25-35.
- Leslie S, Israeli E, Lighthart B, Crowe L. 1995. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3592-3597
- Li B, Tian F, Liu X, Zhao J, Zhang H, Chen W. 2011. Effects of cryoprotectants on viability of Lactobacillus reuteri CICC6226. *Appl Microbiol Biotechnol* 92:609-616
- Lian WC, Hsiao HC, Chou CC. 2002. Survival of bifidobacteria after spraydrying. *Int. J. Food Microbiol.* 74:79-86.

- Lilly DM, Stillwell RH. 1965. Probiotics: growth-promoting factors produced by micro-organisms. *Science*. 147 (3659): 747–8.
- Linders L, Wolkers W, Hoekstra F, van't Riet K. 1997. Effect of added carbohydrates on membrane phase behavior and survival of dried *Lactobacillus plantarum*. *Cryobiology* 35, 31-40
- Makinen K, Berger B, Bel-Rhliid R, Ananta E. 2012. Science and technology for the mastership of probiotic applications in food products. *J. Biotechnol.* 162, 356– 365.
- Makovec JA, Ruegg PL. 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.
- Marino, Castignani, Arzubi. 2011. *Caracterización de los tambos pequeños en las cuencas lecheras pampeanas*. INTA. Publicación Técnica N° 61. 48 p. ISSN 0485-9057.
- Meglia GE, Mata HT. 2001. *Mecanismos específicos e inespecíficos de defensa, con referencia a la glándula mamaria de los bovinos productores de leche*. Ciencias Veterinarias. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLPam. 29-40.
- Movassagh MH. 2011. Study of antibiotics residues in cow raw milk by copan milk test in Parsabad region, Ardabil province, Iran. Scholars Research Library. *Annals Biol. Res.* 2 (4): 355-359.
- Nader-Macías MEF, Bogni C, Sesma FJM, Espeche MC, Pellegrino M, Saavedra L, Frola I. 2011. "Milk Production" in *Alternative approaches for the prevention of bovine mastitis. Probiotics, bioactive compounds and vaccines*. Ed. Nova Science Publishers, Inc. 400 Oser Ave Suite 1600. Hauppauge NY 11788-3619. United States of America.
- Nagpal R. 2007. Potential of probiotic and prebiotics for symbiotic functional dairy foods: an overview. *In. J. Prob. Preb.* 2: 75-84.
- 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.
- National Mastitis Council . 2006. *Dry Cow Therapy*. Disponible en internet: <http://nmconline.org/drycow.htm>. Activo en noviembre de 2016
- Otero MC, Espeche MC, Nader-Macías ME. 2007. Optimization of the freeze-drying media and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* for veterinarian probiotic applications. *Process Biochemistry* 42, 1406–1411.

- 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: 4523-4528.
- Pellegrino M, Rodriguez N, Vivas A, Giraudo J, Bogni C. 2016. *Staphylococcus aureus* avirulent mutant vaccine induces humoral and cellular immune responses on pregnant heifers. *Vaccine* 34:3356–62.
- Playne MJ, Crittenden RG, Nasser JR, German JB. 2004. *Bioprocesses and Biotechnology for Functional Food and Nutraceuticals*. Marcel Dekker pp 99-134
- 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: [http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad\\_intoxicaciones\\_metabolicos/infecciosas/bovinos\\_leche/34-mastitis\\_ambientales.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_leche/34-mastitis_ambientales.pdf). Activo en octubre de 2016.
- Potts M. 1994. Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol. Rev.* 58(4):755-805.
- 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): 208–17. doi: 10.1016/j.vetimm.2009.09.020
- Ramos AC. 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](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 Noviembre de 2016.
- 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 study of a *Staphylococcus aureus* avirulent mutant RC122. *Can. J. Vet.* 66(4):285-288.
- Rodriguez-Palacios A, Staempfli HR, Duffield T, Weese JS. 2009. Isolation of bovine intestinal *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus acidilactici* with inhibitory activity against *Escherichia coli* O157 and F5. *J. Appl. Microbiol.* 106(2):393-401.
- Ross RP, Galvin M, McAuliffe O, Morgan S, Ryan M, Twomey D, Meaney W, Hill C. 1999. *Developing applications for lactococcal bacteriocins*. Antonie van Leeuwenhoek. 76: 337-346.
- Ruegg P. 2001. Mastitis Control. Dairy Updates Milking and Milk Quality 405: 1-10.

- Ruegg PL. 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](http://milkquality.wisc.edu/wp-content/uploads/2011/09/calidad-de-leche-y-manejo-sanitario-de-las-vaca-seca_spanish.pdf). Activo en octubre de 2016.
- Ruegg P, Rodrigues AC. 2007. *Implementing milk quality programs on-farms: lessons learned from milk money*. NMC 46th Annual Meeting Proceedings. San Antonio, Texas. pp: 21-24.
- Ryan MP, Meaney WJ, Ross RP, 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 MP, Jack RW, 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.
- Sandholm M, Korhonen H. 1995. Infection of the udder - Udder inflammation. In: *The bovine udder and mastitis*. Edt. M. Sandholm, T. Honkanen - Buzalski, L. Kaartinen, S. Pyorala. 37-48.
- Santivarangkna C, Kulozik U, Foerst P. 2008. Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes., *J. Appl. Microbiol.* 105(1):1-13.
- Savini M, Cecchini C, Verdenelli MC, Silvi S, Orpianesi C, Cresci A. 2010. Pilot-scale production and viability analysis of freeze-dried probiotic bacteria using different protective agents. *Nutrients.* 2(3):330-9.
- Selmer-Olsen E, Birkeland SE, Srhaug T. 1999. Effect of protective solutes on leakage from and survival of immobilized *Lactobacillus* subjected to drying, storage and rehydration. *J. App. Microbiol.* 87, 429-437.
- Senasa. *Informes Y Estadísticas*. Disponible en internet: <http://www.senasa.gov.ar/cadena-animal/bovinos-y-bubalinos/informacion/informes-y-estadisticas>. Activo octubre de 2016.
- Signorini ML, Canavesio VR, Neder VE, Molineri AI, Vitulich CA, Tarabla HD, Calvino LF. 2008. Valores predictivos y sensibilidad a nivel de rodeo de mastitis a partir de las características de las pruebas diagnósticas individuales y el tamaño del muestreo. *In Vet.* 2008, 8(1): 91-102
- Smith KL, Oliver SP. 1981. Lactoferrin: a component of nonspecific defense of the involuting bovine mammary gland. *Adv. Exp. Med. Biol.* 137:535-554.
- Sordillo LM, Shafer-Weaver K, DeRosa D. 1997. Immunobiology of the mammary gland. *J. Dairy Sci.* 80: 1851-1865.
- Subsecretaria de lechería- Ministerio de Agroindustria, Ganadería y Pesca. Disponible en internet: [http://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/ss\\_lecheria/estadisticas/index.php](http://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/ss_lecheria/estadisticas/index.php). Activo octubre de 2016.



- Szajewska H, Mrukowics JZ. 2001. Probiotics in the treatment and prevention of acute infectious diarrhea in infants and children: a systematic review of published randomized, double blind, placebo controlled trials. *J Pediatr Gastroentl Nutr*; 33(Supl2):S17-25
- Teixeira P, Castro H, Kirby R. 1995. Spray drying as a method for preparing concentrated cultures of *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Lett. Appl. Microbiol.* 78:456–62.
- Teixeira P, Castro H, Mohacsi-Farkas C, Kirby R. 1997. Identification of sites of injury in *Lactobacillus bulgaricus* during heat stress. *J. Appl. Microbiol.* 13:219–226. doi: 10.1046/j.1365- 2672.1997.00221.x
- Ting-Chieh Yu, Chai-Ju Chang, Chin-Han Ho, Huo-Cheng Peh, Shuen-Ei Chen, Wen-Bor Liu, Hsin-Yi Peng, Piya Piameya, Ming-Tsao Chen, Hajime Nagahata. 2011. Modifications of the defense and remodeling functionalities of bovine neutrophils inside the mammary gland of milk stasis cows received a commercial dry-cow treatment. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 144 (2011) 210– 219.
- Tirante, Bas, Pol, Olivieri, Vandoni, Chaves. 1998. *Prevalencia y etiología de infecciones intramamarias en vacas de 38 hatos lecheros en Argentina*. En: Memorias Cong. Panamericano de Cont. Mast. y Cal. de Leche. Mérida, México. P. 122
- Tizard L. 1996. *Veterinary Immunology: an introduction*. 5 th Edition. W. B. Saunders Company, Philadelphia, USA, 531 pp.
- 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 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. *J. Dairy Sci.* 83 (9): 1981-1988.
- Tymczyszyn E, Sandonato N, Pataro A, Gerbino E, Gomez-Zavaglia A. 2010. Sitios de daño durante la preservación de las bacterias lácticas. Efecto protector de los azúcares. In *Aspectos probióticos y tecnológicos de las Bacterias Lácticas*. ISBN: 978-84-96023-96-3. La Plata, Argentina
- Van Asseldonk MAPM, RJ Renes, TJGM Lam, H Hogeveen. 2010. Awareness and perceived value of economic information in controlling somatic cell count. *Vet. Rec.* 166, 263-267.
- Van den Berg. 2012. Selective dry cow therapy and the influence of milk yield at drying-off under Dutch practical circumstances. *Res. pro. Vet. Med. Utrecht Univ.* M.M.– 3258467
- Vissio C, Agüero DA, Raspanti CG, Odierno LM, Larriestra AJ. 2015. Productive and economic daily losses due to mastitis and its control expenditures in dairy farms in Córdoba, Argentina. *Arch. Med. Vet.* 47, 7-14.



Watts J. 2003. Etiological agents of mastitis. *Vet. Microbiol.* 16, 41-66.

Wolter W, Castañeda V, Kloppert B, Zschoeck, M . 2002. *La Mastitis Bovina*. Disponible en Internet: <http://infolactea.com/wp-content/uploads/2015/03/608.pdf>. Activo noviembre de 2016

Yang D, Jones K. 2009. Effect of alginate on innate immune activation of macrophages. *Wiley InterScience*. DOI: 10.1002/jbm.a.32096

Zarate G, Nader-Macias ME. 2006. Viability and biological properties of probiotic vaginal lactobacilli after lyophilization and refrigerated storage into gelatin capsules. *Process Biochem.* 41:1779–1785.

Zayed G, Roos YH. 2004. Influence of trehalose and moisture content on survival of *Lactobacillus salivarius* subjected to freeze-drying and storage. *Process Biochem.* 39; 1081–1086.

73381

70