

*Universidad Nacional de Río Cuarto*

*Facultad de Ciencias Exactas Físico- Químicas y Naturales*

*Departamento de Microbiología e Inmunología*



**EVALUACION DE LA VIABILIDAD E  
INOCUIDAD DE BACTERIAS LACTICAS  
PROBIOTICAS FRENTE A FITOCOMPUESTOS Y  
EXCIPIENTES A SER INCLUIDOS EN UNA  
FORMULACION PARA LA PREVENCION DE LA  
MASTITIS BOVINA**

**SANTAMARINA, Sofía Carla**

**2018**

El presente trabajo para optar al título de Microbiólogo fue realizado en el Departamento de Microbiología e Inmunología, de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicoquímicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

**Tesista:**

Santamarina, Sofía Carla.

**Director de Tesis:**

Dr. Pellegrino, Matías Santiago.

**Co-Directora de tesis:**

Dra. Bogni, Cristina Inés.

Aprobado por el tribunal de tesis:

\_\_\_\_\_  
Dr. Matías S. Pellegrino

\_\_\_\_\_  
Dra. Cristina Torres

\_\_\_\_\_  
Dra. Mariana García

Río Cuarto, 27 de Marzo del 2018

## INDICE GENERAL

RESUMEN .....	12
1. INTRODUCCION .....	13
1.1 LECHE BOVINA .....	13
1.1.1. Definición .....	13
1.1.2. Propiedades de la leche .....	13
1.2. PRODUCCION LECHERA.....	14
1.2.1. Situación de la industria lechera en Argentina.....	14
1.2.2. El estado de la lechería argentina a nivel mundial .....	16
1.3. GLANDULA MAMARIA .....	18
1.3.1. Anatomía, función y características de la ubre.....	18
1.3.2. Estructura interna de la glándula mamaria.....	18
1.3.3. Inmunidad de la glándula mamaria bovina .....	19
1.4. MASTITIS BOVINA .....	24
1.4.1. Definición.....	24
1.4.2. Patogenia de la enfermedad .....	25
1.4.3. Clasificación de la mastitis.....	27
1.4.4. Etiología.....	28
1.4.5. Control de la mastitis bovina.....	29
1.4.6. Pérdidas económicas causadas por mastitis: .....	30
1.4.7. Tratamiento de la mastitis bovina.....	31
1.5. PROBIÓTICOS.....	35
1.5.1. Definición y características.....	35
1.5.2. Mecanismo de acción.....	35
1.5.3. Géneros considerados probióticos.....	36
1.5.4. Aplicaciones .....	36
1.6. FITOCOMPUESTOS.....	39
1.6.1. <i>Aloe vera</i> .....	40
1.6.2. <i>Equinacea spp</i> .....	40
1.6.3. <i>Centella asiática</i> .....	41
HIPOTESIS:.....	42
2. OBJETIVO GENERAL .....	43
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	43

3. MATERIALES Y METODOS.....	44
3.1. CEPAS BACTERIANAS .....	44
3.1.1. Bacterias Lácticas (BL) probióticas .....	44
3.2. ANIMALES DE EXPERIMENTACION.....	44
3.3. MEDIOS DE CULTIVO Y DE CONSERVACION .....	44
3.4. DROGAS E INSUMOS COMERCIALES.....	45
3.4.1. Fitocompuestos.....	45
3.4.2. Compuestos con actividad inmunomoduladora .....	46
3.4.3. Excipientes .....	46
3.4.4. Insumos.....	46
3.5. SOLUCIONES Y REACTIVOS.....	46
3.6. EQUIPOS DE LABORATORIO .....	47
3.7. MANTENIMIENTO Y EVALUACION DE CEPAS BACTERIANAS.....	48
3.7.1. Evaluación de cultivos .....	48
3.7.2. Conservación de bacterias del ácido láctico .....	48
3.7.3. Activación de bacterias del ácido láctico .....	49
3.8. CINETICA DE CRECIMIENTO .....	49
3.8.1. Curvas de calibrado.....	49
3.8.2. Curvas de crecimiento .....	50
3.9. MICROTÉCNICA DE CIM .....	51
3.10. DILUCIÓN EN AGAR.....	53
3.11. CURVAS DE MUERTE:.....	55
3.11.1. Preparación del inóculo bacteriano .....	55
3.11.2. Preparación de los compuestos a ensayar:.....	55
3.11.3. Inoculación de la microplaca .....	57
3.11.4. Recuento en placa en superficie (RPS) .....	57
3.11.5. Calculo de las diluciones necesarias .....	58
3.11.6. Preparación de las diluciones .....	58
3.11.7. Siembra y recuento en placa .....	58
3.12. ENSAYOS DE INOCUIDAD DE LOS EXCIPIENTES USADOS EN LA FI EN BOVINOS EN EL PERÍOO DE SECADO. ....	59
3.12.1. Selección del establecimiento lechero para la inoculación. ....	59
3.12.2. Relevamiento del establecimiento lechero.....	60
3.12.3. Grupo experimental.....	60

3.12.4.	Inoculación .....	60
3.12.5.	Muestreo post- inoculación y análisis del estado de los animales .....	62
3.12.6.	Recuento Celular Somático directo .....	63
3.12.7.	Análisis bacteriológico para muestras de leche.....	64
3.13.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	65
4.	RESULTADOS Y DISCUSION: .....	66
4.1.	CINÉTICA DE CRECIMIENTO .....	66
4.1.1.	Curva de crecimiento y de calibrado .....	66
4.2.	DETERMINACIÓN DE LA CIM POR MICROTÉCNICA .....	68
4.3.	EFFECTO INHIBITORIO EN PLACA .....	77
4.4.	CURVAS DE MUERTE .....	80
4.4.1.	Fitocompuestos.....	80
4.4.2.	Excipientes .....	86
4.4.3.	Selección de los compuestos y curva de muerte combinada .....	92
4.5.	ENSAYO A CAMPO .....	93
4.5.1.	Relevamiento del establecimiento lechero.....	93
4.5.2.	Resultados de la Inoculación y Recuento de Células Somáticas.....	96
5.	CONCLUSIONES: .....	101
6.	BIBLIOGRAFÍA .....	102

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Distribución de los establecimientos con actividad de Tambo en la República Argentina.....	14
<b>Figura 2:</b> Cuencas Lecheras Pampeanas y Extra-Pampeana.....	16
<b>Figura 3:</b> Estructura del Mercado Mundial de Productos Lácteos .....	17
<b>Figura 4:</b> Estructura interna de la glándula mamaria bovina .....	19
<b>Figura 5:</b> Protocolo empleado para la realización de curva de calibrado. ....	50
<b>Figura 6:</b> Protocolo empleado para la realización de curvas de crecimiento. ....	51
<b>Figura 7:</b> Protocolo empleado para la realización de la técnica de dilución en agar. ....	54
<b>Figura 8:</b> Fotografías obtenidas del ensayo de Dilución en Agar .....	55
<b>Figura 9:</b> Ejemplo de placa con crecimiento de 24hs, para recuento de curva de muerte. ....	59
<b>Figura 10:</b> Inoculación intramamaria. ....	61
<b>Figura 11:</b> Esquema de toma de muestras e inoculación realizada en el ensayo a campo. ....	63
<b>Figura 12:</b> Curvas de crecimiento correspondientes a <i>L. lactis subs lactis</i> CRL1655 y <i>L. perolens</i> CRL1724.....	66
<b>Figura 13:</b> Curva de calibración perteneciente a <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> CRL 1655....	67
<b>Figura 14:</b> Curva de calibración perteneciente a <i>Lactobacillus perolens</i> CRL 1724.....	68
<b>Figura 15:</b> Concentración inhibitoria mínima (CIM) (microtécnica) para Vitamina C .....	70
<b>Figura 16:</b> Concentración inhibitoria mínima (CIM) (microtécnica) para Vitamina D .....	71
<b>Figura 17:</b> Concentración inhibitoria mínima (CIM) (microtécnica) para Ácido salicílico.....	73
<b>Figura 18:</b> Concentración inhibitoria mínima (CIM) (microtécnica) para Fructosa. ....	74
<b>Figura 19:</b> Concentración inhibitoria mínima (CIM) (microtécnica) para Sepigel. ....	76
<b>Figura 20:</b> Curva de muerte de <i>Lactococcus lactis subsp lactis</i> CRL 1655 en presencia de diferentes concentraciones de Aloe vera.....	81
<b>Figura 21:</b> Curva de muerte de <i>Lactobacillus perolens</i> CRL1724 en presencia de diferentes concentraciones de Aloe vera. ....	82
<b>Figura 22:</b> Curva de muerte de <i>Lactococcus lactis subsp lactis</i> CRL 1655 en presencia de diferentes concentraciones de Centella asiática. ....	83
<b>Figura 23:</b> Curva de muerte de <i>Lactobacillus perolens</i> CRL 1724 en presencia de diferentes concentraciones de Centella asiática. ....	84
<b>Figura 24:</b> Curva de muerte de <i>Lactococcus lactis subsp lactis</i> CRL1655 en presencia de diferentes concentraciones de Echinacea. ....	85
<b>Figura 25:</b> Curva de muerte de <i>Lactobacillus perolens</i> CRL 1724 en presencia de diferentes concentraciones de Echinacea.....	86
<b>Figura 26:</b> Curva de muerte de <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> CRL 1655 en presencia de diferentes concentraciones de Vitamina C. ....	87
<b>Figura 27:</b> Curva de muerte de <i>Lactobacillus perolens</i> CRL 1724 en presencia de diferentes concentraciones de Vitamina C.....	88

<b>Figura 28:</b> Curva de muerte <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> CRL 1655 en presencia de diferentes concentraciones de Fructosa.....	89
<b>Figura 19:</b> Curva de muerte de <i>Lactobacillus perolens</i> CRL 1724 en presencia de diferentes concentraciones de Fructosa.....	90
<b>Figura 30:</b> Curva de muerte de <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> CRL 1655 en presencia de diferentes concentraciones de Sepigel. ....	91
<b>Figura 31:</b> Curva de muerte de <i>Lactobacillus perolens</i> CRL 1724 en presencia de diferentes concentraciones de Sepigel.....	91
<b>Figura 32:</b> Curva de muerte de ambas BLs con los distintos diluyentes .....	92
<b>Figura 33:</b> Distribución según el Recuento de Células Somáticas de los animales muestreados durante el relevamiento del establecimiento lechero seleccionado.....	94
<b>Figura 34:</b> Recuento de células somáticas (RCS) de todos los cuartos incluidos en el ensayo de inoculación.....	96

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> <i>Compuestos y concentraciones utilizadas para realizar el ensayo de micro CIM.....</i>	52
<b>Tabla 2:</b> <i>Compuestos y concentraciones utilizadas para realizar el ensayo de dilución en agar. .....</i>	54
<b>Tabla 3:</b> <i>Composición de los diluyentes completos.....</i>	57
<b>Tabla 4:</b> <i>Condiciones de inoculación y cantidad de cuartos utilizados en el ensayo de inoculación en animales. ....</i>	62
<b>Tabla 5:</b> <i>Resultados de la inhibición de los compuestos evaluados por la Técnica de Dilución en Agar.....</i>	78

## ABREVIATURAS:

**µl:** Microlitros

**BHI:** Caldo infusión cerebro-corazón

**BLs:** Bacterias ácido lácticas

**c.s.p:** Cantidad suficiente para

**CIM:** Concentración inhibitoria mínima

**cm<sup>2</sup>:** Centímetro cuadrado

**CMH:** Complejo mayor de histocompatibilidad

**CS:** Células somáticas

**DD:** Cuarto delantero derecho

**DI:** Cuarto delantero izquierdo

**Dil1:** Diluyente 1

**Dil2:** Diluyente 2

**Dil3:** Diluyente 3

**DO:** Densidad óptica

**FAO:** Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

**FI:** Formulaci3n intramamaria

**g:** Gramos

**GM:** Glándula mamaria

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de hidrogeno

**IgA:** Inmunoglobulina A

**IgE:** Inmunoglobulina E

**IgG:** Inmunoglobulina G

**IgM:** Inmunoglobulina M

**Igs:** Inmunoglobulinas

**IIM:** Infección intramamaria

**IMM:** Intramamaria

**KNO<sub>3</sub>:** Nitrato de potasio

**L:** linfocitos

**I:** Litros

**LEL:** Medio Leche extracto de levadura

**MC:** Mastitis clínica

**Mg:** Miligramos

**min:** Minutos

**ml:** Mililitros

**MRS:** Man Rogosa y Sharpe

**Mφ:** Macrófagos

**NaCl:** Cloruro de sodio

**NK:** Células natural killer

**NMC:** National Mastitis Council

**NO<sub>2</sub>:** Nitrito

**NO<sub>3</sub>:** Nitrato

**OMS:** Organización mundial de la salud

**PBI:** Producto bruto interno

**pH:** Potencial hidrógeno

**PMN:** Polimorfonucleares

**r.p.m.:** Revoluciones por minuto

**RCS:** Recuento de células somáticas

**RPS:** Recuento en placa en superficie

**SARM:** *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes

**SF:** Solución fisiológica

**TD:** Cuarto trasero derecho

**TI:** Cuarto trasero izquierdo

**TSA:** Agar tripticasa soya

**TVS:** Terapia de la vaca seca

**UFC:** Unidades formadoras de colonias

**Zn:** Cinc

## RESUMEN

La mastitis bovina se define como la inflamación de la glándula mamaria y es la enfermedad infecciosa del ganado lechero de mayor impacto económico en el mundo. El período de secado, junto con el periparto, son los períodos de mayor susceptibilidad de la glándula a las infecciones intramamarias, es por ello que las medidas preventivas y de control se dirigen a cubrir dichos períodos.

Hoy en día, la aplicación intramamaria de antibióticos es la medida más efectiva para prevenir nuevas infecciones y tratar las existentes, lo que significa un uso masivo de los mismos antibióticos, incluso con fines profilácticos. Esto representa diversas desventajas, no solo económicas, sino también el desarrollo de resistencia a los antimicrobianos. Además, la tendencia mundial está dirigida a la obtención de productos orgánicos producidos por animales sanos y el mayor desafío de la industria lechera moderna es reducir el uso de antibióticos en animales productores de alimentos para el consumo humano. En este contexto, la investigación se ha orientado hacia la búsqueda de métodos de control alternativos basados en el desarrollo de inmunomoduladores o sustancias naturales, como un enfoque racional para controlar las infecciones.

En los últimos años, en el campo de la salud animal, los probióticos se han utilizado principalmente para prevenir infecciones gastrointestinales o para propósitos nutricionales. El término **probiótico** hace referencia a microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas confieren un efecto benéfico al huésped. El control biológico de la mastitis bovina por medio de la inoculación intramamaria de una formulación probiótica brindaría una alternativa natural para la prevención de esta enfermedad infecto-contagiosa. Por esta razón, el objetivo principal de este trabajo fue abordar la problemática de la prevención de la mastitis bovina a través del desarrollo de productos basados en formulaciones alternativas y complementarias a las medidas de control existentes en los tambos para ser aplicadas al momento del secado.

Para el cumplimiento de este objetivo, se realizaron ensayos de actividad antimicrobiana de tres **fitocompuestos** conocidos (*Aloe vera*, *Centella asiática* y *Echinacea spp.*), dos **vitaminas** (Vitamina C y D), y **excipientes** como la fructosa (crioprotector) y sepigel (espesante), con el fin de evaluar la capacidad de las Bacterias Lácticas (BLs), *Lactococcus lactis subsp. lactis* CRL 1655 y *Lactobacillus perolens* CRL 1724, previamente seleccionadas como potencialmente probióticas, de resistir a estos compuestos y así poder incluirlos en una formulación final para la prevención de la mastitis bovina. Además, una vez seleccionados los compuestos y sus concentraciones adecuadas, se realizó un ensayo a campo en animales, que involucró la inoculación vía intramamaria de los diferentes compuestos seleccionados por separado, y también un diluyente final compuesto por una combinación de estos. De este modo, se determinó mediante la técnica de micro Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), dilución en agar, y ensayos de sobrevida, que ninguno de los tres fitocompuestos en una concentración de hasta 50mg/ml inhiben el desarrollo microbiano de *Lactobacillus perolens* CRL 1724 y de *Lactococcus lactis subsp. lactis* CRL1655. Resultados similares se observaron para vitamina C en concentraciones menores a 12,5mg/ml, Sepigel hasta 2%, Vitamina D en ninguna concentración ensayada (hasta 40mg/ml) y fructosa en una concentración menor de 300mg/ml.

Por otra parte, el ensayo en animales evidenció que todos los compuestos ensayados, así como la combinación de éstos, están libres de efectos adversos sobre la glándula mamaria bovina, y al administrarlos juntos con las BLs, inducen la activación del sistema inmune de las vacas, aumentando el Recuento Celular Somático (RCS). Estos resultados nos animan a pensar que en un futuro próximo una formulación probiótica podría convertirse en una valiosa herramienta para prevenir la mastitis bovina y ayudar a reducir el uso indiscriminado de los antibióticos utilizados con fines preventivos durante el período seco para combatir esta enfermedad.

## 1. INTRODUCCION

### 1.1 LECHE BOVINA

#### 1.1.1. Definición

La leche es una secreción nutritiva de color blanquecino opaco producida por las glándulas mamarias de las hembras de los mamíferos (Knight, 1991; Sandholm y col., 1995). La principal función de la leche es la de nutrir a las crías hasta que sean capaces de digerir otros alimentos. Además protege el tracto gastrointestinal de la inflamación producida por patógenos y toxinas y contribuye a la salud regulando los procesos de obtención de energía (Besser y Gay, 1994). La leche es el único fluido que ingieren las crías de los mamíferos hasta el destete, por lo que su producción ocurre inmediatamente después del parto.

Según el Código Alimentario Argentino, la leche es un alimento básico, obtenido del ordeño total e ininterrumpido de vacas lecheras en buen estado de salud y alimentación, proveniente de tambos inscriptos y autorizados por la Autoridad Bromatológica Sanitaria Jurisdiccional, sin el agregado de ningún tipo de aditivos.

#### 1.1.2. Propiedades de la leche

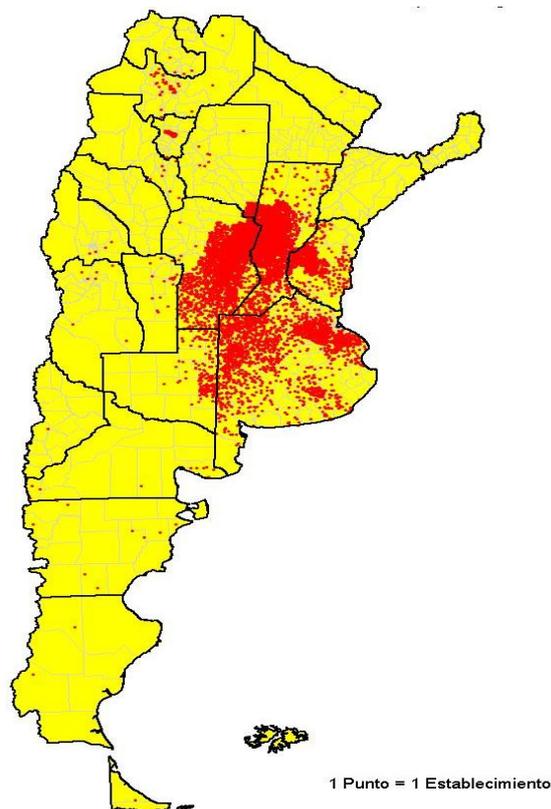
La leche de vaca tiene una densidad media de 1,032 g/l y un pH ligeramente ácido (entre 6,6 y 6,8). Es una mezcla compleja y heterogénea compuesta por un sistema coloidal de tres fases: solución (minerales e hidratos de carbono disueltos en agua), suspensión (sustancias proteicas en agua) y emulsión (grasa emulsificada en agua). Contiene cerca de un 87% de agua, mientras que el resto lo constituye el extracto seco (similar al de un alimento sólido, alrededor de 130 g/l) (Sandholm y col., 1995).

Además de lo mencionado anteriormente, en la leche podemos encontrar una gran variedad de vitaminas que varían en concentración y actividad, entre ellas: A, D, E, K, B1, B2, B6, B12 y C. Por otro lado, es una fuente excelente de la mayoría de los minerales requeridos para el crecimiento del lactante. La digestibilidad del calcio y fósforo es generalmente alta, en parte debido a que se encuentran asociados con la caseína. Otro mineral de interés es el hierro. Las bajas concentraciones de este metal no alcanzan a satisfacer las necesidades del lactante, pero este bajo nivel pasa a tener un aspecto positivo debido a que limita el crecimiento bacteriano en la leche (Besser y Gay, 1994).

## 1.2. PRODUCCION LECHERA

### 1.2.1. Situación de la industria lechera en Argentina

La lechería conforma uno de los complejos agroindustriales más importantes de la Argentina. Al igual que en otros países productores de leche, la estructura del sector primario en nuestro país es el resultado de un proceso de concentración y especialización de varios años, con una disminución en el número de tambos y un aumento en su escala productiva (Gutman y col., 2003). En 2017, el mapa de la lechería argentina mostró una estructura primaria de aproximadamente 2 millones de vacas en lactancia ubicadas en 11.800 tambos que actualmente ocupan 3 millones de hectáreas (Figura 1). Estos produjeron en la última campaña alrededor de 11.400 millones de litros de leche, con una producción individual de 5.150 litros por lactancia (SENASA, 2017).



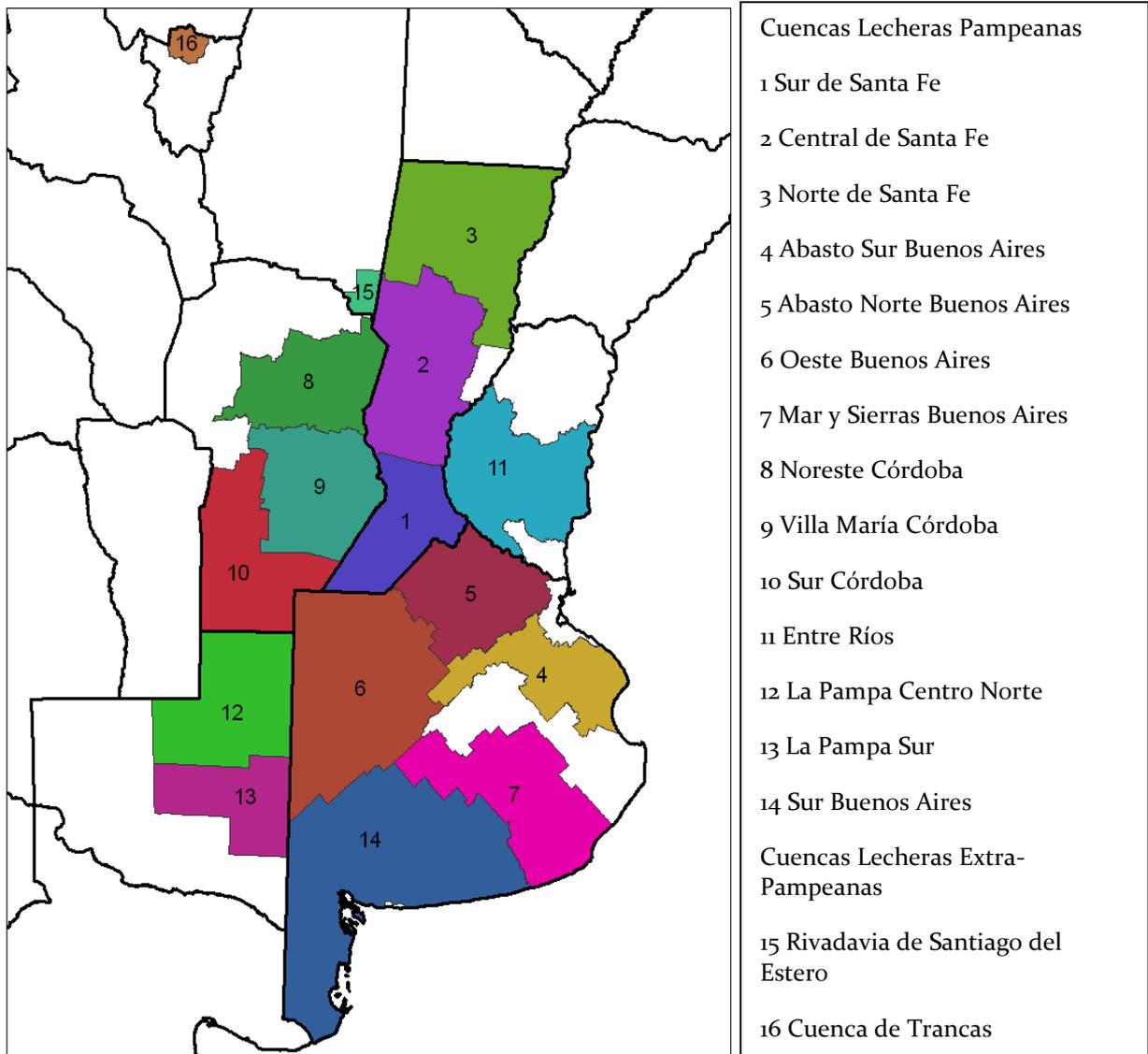
**Figura 1: Distribución de los establecimientos con actividad de Tambo en la República Argentina. Un punto indica la existencia de un establecimiento en el departamento y no su localización geográfica.**

**(Fuente: Dirección de Control de Gestión y Programas Especiales – Dirección Nacional de Sanidad Animal. Información según SIGSA al 31/01/2017).**

La producción total de leche cruda en Argentina ubica al país como 2º productor de América Latina y 11º en el orden mundial (Sánchez y col., 2012).

En los últimos cuatro años (2013-2017), un conjunto de factores afectó recurrentemente la producción lechera de las principales cuencas de la pampa húmeda, pudiendo citar entre las causas: precios deprimidos de la materia prima y de los productos lácteos en general, récords de excedentes de lluvia con anegamientos de larga duración y reiteradas recomposiciones de la base forrajera. Esta situación colaboró en el aumento de la tasa de cierre de tambos. Sumado a esto, a principios del 2017, las inundaciones provocadas por las intensas lluvias empeoraron la situación de las zonas afectadas en los años anteriores, agravando el descenso de la producción del primer trimestre, llevando a la disminución del 16% de la producción láctea. A pesar de los factores desfavorables, se logró el mantenimiento de los niveles de producción, con una menor cantidad de tambos, debido al aprovechamiento de economías de escala y por un aumento de la eficiencia media por tambo (Petrecola, 2016).

En la región pampeana es donde se concentra la producción láctea de Argentina, localizándose en ella las principales “cuencas lecheras”. Estas cuencas son regiones dentro de las provincias en las cuales existe una mayor densidad de tambos. En la provincia de Buenos Aires se encuentran ubicadas cinco cuencas lecheras (Mar y Sierras, Oeste, Sur, Abasto Sur, Abasto Norte), tres en Santa Fe (Norte, Sur, Central), tres en Córdoba (Sur, Villa María, Noreste), dos en La Pampa (Centro- Norte, Sur) y por último, en Entre Ríos solo una (Entre Ríos). Las 5 provincias productoras totalizan 14 cuencas lecheras, aunque la mayor cantidad de vacas y unidades productoras están concentradas en las cuencas de Santa-Fe Centro, Córdoba-Noreste, Córdoba-Villa María y Buenos Aires-Oeste. Existen además otras zonas productoras de importancia económica a nivel regional, debido a que se ubican cerca de importantes centros urbanos a los cuales provee de leche fresca. Estas cuencas lecheras extra pampeanas son la Cuenca de Trancas (Tucumán) y Rivadavia (Santiago del Estero) (Figura 2).



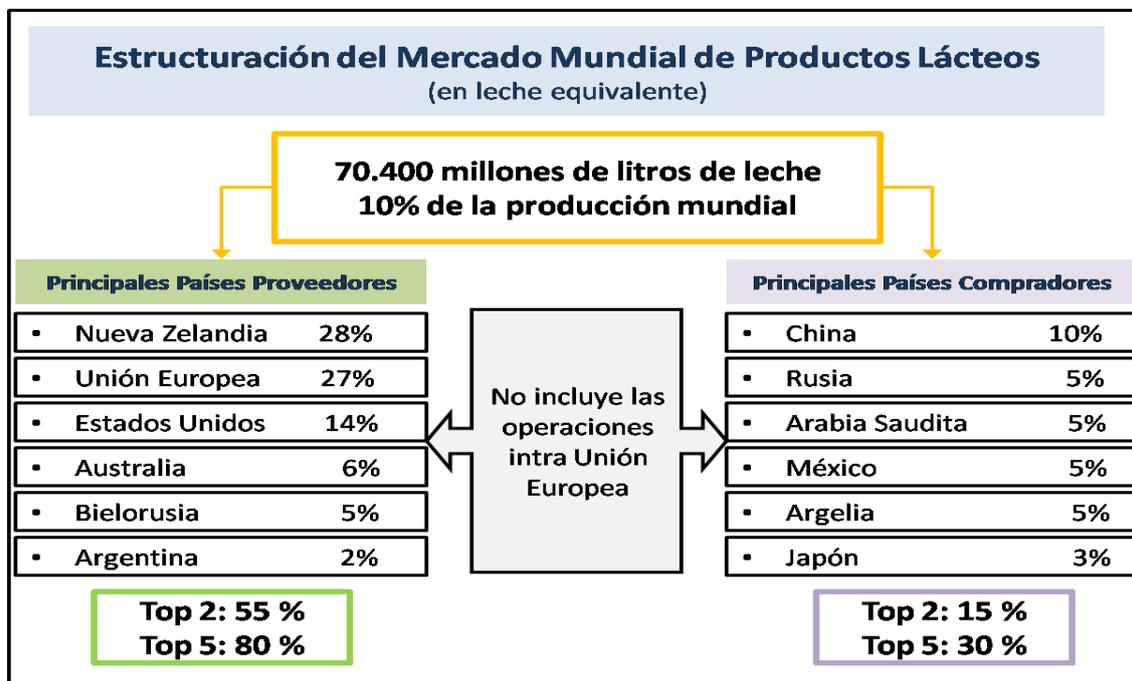
**Figura 2: Cuencas Lecheras Pampeanas y Extra-Pampeana**

(Fuente: Marino, Castignani y Arzubi, 2011)

### 1.2.2. El estado de la lechería argentina a nivel mundial

La creciente demanda mundial de productos lácteos plantea una excelente oportunidad de mercado para los próximos años para nuestro país que, según cifras oficiales provisionarias, entre enero y octubre de 2017 exportó 181.000 toneladas provenientes de establecimientos nacionales (Schaller, 2017). Actualmente, Argentina es uno de los principales países exportadores del mundo, con una capacidad de producción que supera ampliamente los volúmenes requeridos para satisfacer la

demanda interna y asumir el desafío de la exportación, siendo responsable del 2% de la leche que se exporta a China, Rusia, México, Arabia Saudita, entre otros. (Figura 3)



**Figura 3: Estructura del Mercado Mundial de Productos Lácteos. Argentina se encuentra dentro de los principales países proveedores de leche siendo responsable de un 2% a nivel mundial.**

(Fuente: elaborado por el OCLA en base datos de FIL: World Dairy Situation).

El comercio mundial de dicho producto, a pesar de presentar un volumen de producción significativo, es relativamente bajo en términos porcentuales. Esto se debe a que la oferta se encuentra muy concentrada en pocos países y hay una cierta atomización en la demanda. Ese volumen pequeño, sumado a la alta relación que tiene con algunas variables de la economía mundial (precio del petróleo, valor del dólar, comportamiento del PBI, etc.), le da al mercado lácteo su propia característica de alta volatilidad y gran incertidumbre para todos los actores de la cadena de valor (USDEC, 2018). Hay países de Europa con consumos que superan los 300 litros por persona y por año y países por debajo de los 50 litros. Por otro lado, los países desarrollados en promedio consumen 240 litros y los países en desarrollo 80 litros por persona y por año. El consumo mínimo recomendado por la Organización Mundial de la Salud, es del orden de los 150 litros por persona y por año.

### 1.3. GLANDULA MAMARIA

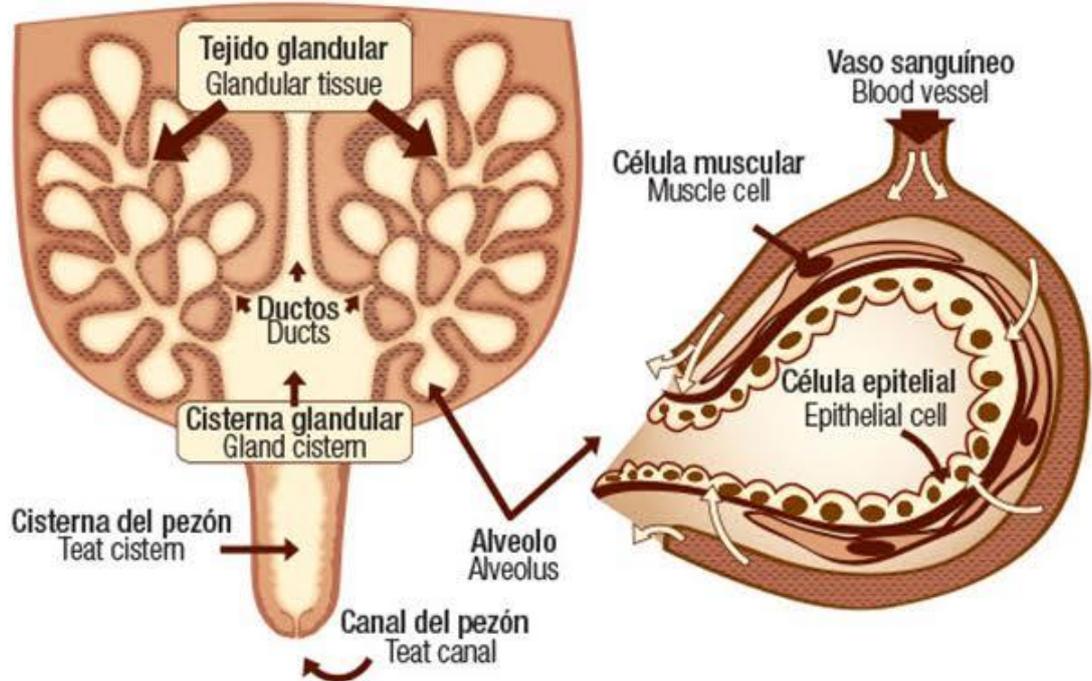
#### 1.3.1. Anatomía, función y características de la ubre

Cubierta por una piel suave al tacto y provista de vellos finos, excepto en los pezones, la ubre se encuentra adherida externamente a la cavidad abdominal por medio del aparato suspensorio. La ubre es una glándula epitelial exocrina, que sintetiza leche en células especializadas y que es secretada por medio de un sistema de conductos de estructura ramificada (Turner, 1952; Schmidt, 1974). La ubre bovina consta de cuatro glándulas mamarias (cuartos), donde cada uno de estos cuatro complejos glandulares es completamente independiente, con su propia estructura secretora y que se comunican con el exterior a través de su propio pezón. Los cuartos posteriores están ligeramente más desarrollados que los anteriores, y contienen entre un 25% y un 50% más de tejido secretor, pudiendo llegar a producir hasta el 60% de la leche total secretada por la ubre (Schmidt, 1974; Agrobot, 2004; Avila Téllez y Gutierrez Chavez, 2006a y 2006b). Los cuatro cuartos están, a pesar de su independencia funcional, íntimamente ligados y reunidos bajo la piel de la ubre y situados en la región inguinal, contra la pared abdominal y la cara ventral del suelo de la pelvis, de la que se encuentra separada por una gruesa almohadilla de grasa.

#### 1.3.2. Estructura interna de la glándula mamaria

El parénquima glandular está dividido en pequeños lóbulos por septos interlobulares que derivan de membranas que conforman el aparato suspensorio. Estos septos son muy ricos en vasos sanguíneos, linfáticos y nervios, lo que permite una adecuada irrigación sanguínea, linfática y sensorial a la glándula. Cada lóbulo se encuentra dividido en lobulillos que en su interior se observan entre 150 a 220 alveolos separados entre sí por venas, arterias y lámina propia. Los alvéolos se vacían mediante pequeños ductos en unos túbulos llamados ductos intralobulillares, que desembocan en un espacio colector central, del cual emergen los ductos interlobulillares o galactóforos que vierten la leche en los llamados conductos lactíferos (Schmidt, 1974; Delouis y Richard., 1991; Pellegrino, 2010). Estos conductos atraviesan el parénquima y llevan la leche de los alvéolos hasta el seno lactífero (Schwarse y Schroider., 1984). El seno lactífero se halla dividido irregularmente por pliegues de la mucosa en una porción glandular o cisterna de la ubre y una porción papilar o cisterna del pezón. Cada cisterna del pezón culmina en una estructura llamada canal del pezón, formado por fuertes músculos que permanecen cerrados impidiendo la entrada o salida de cualquier material, mediante el cual la leche, previa estimulación, puede alcanzar el medio externo. El seno o canal del pezón se continua

hacia el exterior por el conducto papilar, del que está separado por unos pliegues de la mucosa, la "roseta de Furstenberg", que junto con el esfínter papilar será de gran importancia para evitar la salida pasiva de la leche, así como la entrada de gérmenes y sustancias extrañas a la glándula (Figura 4).



**Figura 4: Estructura interna de la glándula mamaria bovina**

Estudios de los últimos años muestran que en el canal del pezón habita una microbiota muy heterogénea y compleja que varía constantemente, y que puede presentarse en una concentración de  $10^3$ - $10^{11}$  bacterias/ml. Esta microbiota está conformada por micrococos (6-20%), corynebacterias (10-16%), bacterias coliformes (0,8-30%), otras bacterias Gram negativas (11-27%) y bacterias aeróbicas formadoras de esporas (0,5-3,6%) (Sandholm y Korhonen., 1995).

### 1.3.3. Inmunidad de la glándula mamaria bovina

Los componentes de la respuesta inmune en la glándula mamaria bovina (GM) involucran diversos factores físicos, celulares y moleculares que se engloban dentro de la inmunidad innata y adaptativa. La inmunidad innata, también llamada inmunidad natural o espontánea, constituye la primera línea de defensa del hospedador durante las etapas tempranas de la interacción con el organismo infectante. Es el factor clave determinante del establecimiento, la progresión y la gravedad de la infección, así como

del desarrollo de la respuesta inmune adaptativa. Los mecanismos de la inmunidad innata son específicos para estructuras comunes a grupos de microorganismos afines. Esta respuesta es activada rápidamente en el sitio de la infección a través de numerosos estímulos, pero no aumenta por exposiciones repetidas al mismo agente (Sordillo y Streicher, 2002; Sordillo, 2005; Vivier y Malissen, 2005; Alnakip y col., 2014). Los dos componentes más importantes de la inmunidad innata son el reconocimiento de patógenos y la capacidad de montar una respuesta proinflamatoria, una compleja interacción de células y procesos moleculares destinados a la detección y posteriormente eliminación de patógenos (Rainard y Riollet, 2006). Dependiendo de la eficiencia de estos mecanismos, los patógenos pueden ser eliminados en cuestión de minutos u horas después de la invasión. Si esto ocurre, no se producirán cambios notables en la función de la GM o en la composición de la leche (Wellnitz y Bruckmaier, 2012). Las defensas naturales o innatas de la glándula mamaria son mediadas por la barrera física que constituye el canal del pezón, los macrófagos, los neutrófilos, las células Natural Killer (NK) y algunos factores solubles (Alnakip y col., 2014).

Si un patógeno es capaz de evadir o no es completamente eliminado por la defensa innata, se activa la inmunidad adaptativa, la cual reconoce determinantes antigénicos específicos de los patógenos. Si el huésped encuentra el mismo antígeno más de una vez, ocurre una respuesta intensificada como consecuencia de la memoria inmunológica de ciertos linfocitos B. En comparación con la primera exposición al antígeno, la respuesta de memoria suele ser mucho más rápida, considerablemente más fuerte, más duradera y más efectiva en la eliminación del patógeno. La respuesta inmune adaptativa solamente puede ocurrir si los antígenos están combinados con las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) presente en la superficie de ciertas células, mediante un proceso denominado presentación de antígenos. El reconocimiento de los factores patogénicos para su eliminación, está mediado por macrófagos, algunos linfocitos y las inmunoglobulinas o anticuerpos (Sordillo, 2005).

La resistencia de la glándula mamaria a la entrada de un patógeno está dada principalmente por tres componentes: *el anatómico, el celular y el soluble*.

#### **1.3.3.1. Componente Anatómico**

El canal del pezón junto con la piel, son considerados como la primera barrera de defensa contra los patógenos. La condición de la piel de la glándula es de vital importancia. Cuando la piel se encuentra sana la mayoría de los patógenos tienen limitadas chances de sobrevivir. El canal del pezón es la principal puerta de entrada a

la ubre de numerosos microorganismos causantes de mastitis (Sandholm y Korhonen, 1995). El músculo liso y la elasticidad de los tejidos alrededor del conducto del pezón, hacen que este se mantenga cerrado limitando así el ingreso bacteriano (Sordillo y col., 1997). El diámetro del pezón y en menor medida la longitud del mismo, tienen una relación directa con la incidencia de enfermedades intramamarias. A mayor diámetro, mayor tasa de nuevas infecciones (Meglia y Mata, 2001).

Asimismo, a medida que el proceso involutivo progresa, la glándula se torna más resistente, debido a la formación del tapón de queratina en el conducto del pezón, el cual previene el ascenso y multiplicación bacteriana en la glándula. Se han identificado en su estructura algunos componentes bacterioestáticos tales como el ácido mirfítico, el ácido palmitoleico y el ácido linoleico (Craven, 1985; Sordillo, 2005). Por otro lado, las proteínas catiónicas asociadas a la queratina, pueden unir patógenos a través de uniones electrostáticas, alterándoles su pared celular, aumentando la susceptibilidad a la presión osmótica, causando lisis y muerte del microorganismo. Luego, las bacterias retenidas en la queratina, más las células en proceso normal de descamación, son removidas por la columna de leche durante el ordeño (Corbellini, 1996)

Diferentes estudios demuestran que la remoción de esta sustancia está asociada al aumento en la susceptibilidad de la glándula a la invasión y colonización bacteriana (Craven, 1985; Sordillo y Streicher, 2002; Alnakip y col., 2014). Si bien ese tapón de queratina se remueve casi completamente durante el ordeño, dentro de las 3 horas posteriores se restablece completamente la función de defensa del canal del pezón (Seanq, 2009).

De esta manera, el canal del pezón constituye una barrera física, que opera en forma mecánica mediante la formación natural de un tapón de queratina que evita la entrada de agentes patógenos al interior de la glándula mamaria durante el período de no lactancia (período seco), y una barrera bioquímica por la acción bactericida de la queratina.

#### **1.3.3.2. Componente celular**

La secreción láctea posee un componente celular constituido básicamente por macrófagos ( $M\phi$ ), 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 Rota, 2001).

*Neutrófilos:* son el tipo celular predominante en tejidos mamarios y leche durante una inflamación temprana (Nickerson, 1985; Sordillo y Streichery 2002; Alnakip y col., 2014). Estas células de la inmunidad innata viajan desde la sangre hasta la glándula mamaria en respuesta a una variedad de mediadores inflamatorios como citoquinas (Vangroenweghe y col., 2001 y 2002). Una vez en el sitio de infección, la principal función de los PMN es de fagocitosis y destrucción de microorganismos, siendo considerados como la primera barrera de defensa celular de la glándula mamaria contra los patógenos (Paape y col., 1979). Su capacidad bactericida está dada por mecanismos dependientes e independientes de oxígeno.

*Macrófagos:* Los macrófagos de los tejidos, entre ellos la glándula mamaria, derivan de los monocitos presentes en la sangre. Son el tipo celular predominante en la leche y tejidos sanos de vacas lactantes (Sordillo y Streicher, 2002; Rainard y Riollet, 2006; Alnakip y col., 2014). La fagocitosis por macrófagos aumenta considerablemente en presencia de anticuerpos opsónicos para algunos patógenos particulares. Además de participar en la respuesta inmune innata, los macrófagos juegan un papel importante en la presentación de antígenos, vía CMH-II, a los linfocitos (Sordillo y Streicher, 2002).

*Linfocitos:* De gran importancia en la inmunidad adaptativa, son las únicas células del sistema inmune que reconocen antígenos a través de receptores en sus membranas que son específicos para cada patógeno. Entre ellos podemos encontrar a los Linfocitos T, que reconocen antígenos a través de receptores específicos de membrana que definen las características inmunológicas de especificidad, diversidad y reconocimiento, Linfocitos B, cuyo papel principal es el de producir anticuerpos y Linfocitos NK, que son células grandes, granulares, también denominados linfocitos no inmunes, que poseen la habilidad de destruir en ausencia de moléculas del CMH.

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

Las denominadas células somáticas están constituidas principalmente por células de sistema inmune (80% en cuartos no infectados y 99% en cuartos con mastitis) (Sordillo y col., 1997; Pillai y col., 2001). La presencia de células somáticas es un indicador de los procesos inflamatorios que pueden estar ocurriendo en el tejido mamario. Son parte del mecanismo de defensa natural del huésped e incluyen linfocitos, macrófagos, neutrófilos y algunas células epiteliales (Pillai y col., 2001). El

RCS es frecuentemente utilizado para distinguir entre cuartos infectados y no infectados y representa una medida general del estado de infección y de la respuesta de la glándula mamaria. Diferentes investigaciones permitieron arribar a la conclusión que un valor promedio entre 200.000 cél/ml y 250.000 cél/ml, permite distinguir entre cuartos infectados y no infectados (Dohoo y Leslie, 1991; Leavens y col., 1997; Leslie y col., 1997; Schepers y col., 1997).

### 1.3.3.3. Defensas solubles

Como parte de esta clasificación, entre los mecanismos inmunológicos solubles cabe mencionar al complemento y a las inmunoglobulinas.

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), lisis de bacterias (C5b-9) (Craven y Williams, 1985). Más recientemente, se ha informado que el complemento puede actuar modulando la respuesta inmune (Reid, 1995). La concentración de complemento en la glándula mamaria varía dependiendo del momento de la lactancia y del grado de infección de la glándula. Su concentración se halla elevada en calostro, leche mastítica y durante el último tercio de la lactancia (Craven y Williams, 1985).

Cuatro clases de inmunoglobulinas (Ig) han sido descritas en la glándula mamaria, IgA, IgE, IgG (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>) e IgM (Butler, 1986), las cuales pueden ser producidas en la misma glándula o derivar del torrente sanguíneo. La concentración de Igs en la glándula varía de acuerdo al momento de la lactancia y al grado de salud de la misma. En leche normal su concentración es relativamente baja en comparación con el calostro (50 – 150 mg/ml), o con la glándula inflamada, incrementándose en este último caso entre 2 y 3 veces sobre el valor normal (Sordillo y col., 1997; Norcross, 1991).

Además de los componentes mencionados anteriormente, se pueden encontrar otros compuestos bacteriostáticos no específicos que ejercen una función independiente y en conjunto con Igs y factores celulares para proporcionar protección a la glándula mamaria. Entre ellos se encuentran la lactoferrina, lisozima, y lactoperoxidasa (Sordillo y Streicher, 2002; Sordillo, 2005). Por último, las citoquinas, juegan un papel importante en la regulación de la actividad de las células que participan en respuestas de tipo innata y adaptativa. Numerosos trabajos han demostrado la capacidad inmunomoduladora de citoquinas sobre importantes funciones de las células inmunes (Sordillo y Streicher, 2002; Sordillo, 2005).

## 1.4. MASTITIS BOVINA

### 1.4.1. Definición

La mastitis se define como la inflamación de la glándula mamaria como respuesta del tejido a un daño. El propósito de esta respuesta inflamatoria es de destruir o neutralizar a los agentes infecciosos y a sus toxinas. El principal efecto de la mastitis es la reducción de la cantidad y la calidad de la leche producida por la glándula mamaria, lo cual finalmente afecta la rentabilidad de la materia prima. (National Mastitis Council, 2012).

Ocurre comúnmente como consecuencia de una infección microbiana causada por patógenos (70% a 90%) que penetran a la glándula a través del canal del pezón, pero también puede ser causada por una lesión (herida) y, menos frecuente, por alergia y neoplasmas (Menzies y Ramanoon, 2001).

Se caracteriza por diferentes cambios ya sea físicos o químicos de la glándula mamaria (Seegers y col., 2003; Zhao y Lacasse, 2008). Es reconocida comúnmente por signos clínicos, elementalmente por las anomalías en la leche y la ubre. Los síntomas clínicos incluyen una disminución en la producción de leche, aumento en el número de leucocitos, composición y apariencia alterada (grumos) de la leche, fiebre, cuartos mamarios enrojecidos, hinchados e hipertérmicos (Bedolla, 2004; Hillerton y Berry, 2005). Sin embargo, vacas con mastitis subclínica no muestran ninguna señal obvia de la enfermedad (Kerr y Wellnitz, 2003), y a menudo presentan una disminución en la producción de leche, un conteo elevado de leucocitos y un aumento en el contenido de bacterias en la leche (Hansen y col., 2004; Hillerton y Berry, 2005).

Es causada por múltiples factores y generalmente se da como respuesta a un daño local. En la propagación de esta patología intervienen una gran variedad de factores, los cuales se pueden agrupar en tres biosistemas denominado “triángulo epidemiológico”: el huésped, los agentes infecciosos y el medio ambiente (NMC, 2003; Chaves, 2009).

Es considerada una enfermedad altamente prevalente en el ganado lechero, y es una de las más importantes que afecta mundialmente la industria lechera; pues ocasiona pérdidas económicas muy fuertes a todos los productores de leche en el mundo debido a la disminución de la calidad y cantidad de leche producida y un aumento en el número de tratamientos y servicios veterinarios, y pérdida de animales (Ceron-Muñoz y col., 2002; Wellenberg y coll., 2002; Tomasinsig y col., 2010).

#### 1.4.2. Patogenia de la enfermedad

La infección de la glándula mamaria ocurre, generalmente, a través del conducto del pezón a partir de dos fuentes principales de contaminación, dependiendo del agente etiológico: un cuarto infectado y/o el medio ambiente. La contaminación de las manos de los ordeñadores, los paños de lavado y las unidades de ordeño pueden diseminar con rapidez la infección a los pezones de otros animales por la leche procedente de cuartos infectados (Radostits y col., 2002).

La invasión microbiana de la glándula mamaria, ocurre siempre siguiendo la vía del conducto del pezón y a primera vista, el desarrollo de la inflamación después de la infección se desarrolla como un fenómeno natural. Sin embargo, la aparición de la mastitis es más compleja de lo que este concepto puede indicar y quizás resulte más satisfactorio explicarla en términos de tres etapas: invasión, infección e inflamación y destrucción alveolar (Bedolla, 2008).

##### 1.4.2.1. Invasión del pezón

La principal vía de entrada de los distintos agentes patógenos a la ubre bovina, es el orificio del pezón y sólo en casos excepcionales la llegada puede producirse por vía hematológica (Chaves, 2009; Alnakip y col., 2014).

El canal del pezón es la comunicación directa con el exterior de la ubre y es altamente especializado en prevenir tanto la salida de la leche como la entrada de bacterias, jugando así un papel importante en la defensa de la ubre contra la mastitis (Muelas y col., 2004; Paulrud, 2005). Por este motivo, el pezón es la *primera barrera de defensa* contra el ingreso de bacterias a la ubre.

La invasión del pezón ocurre generalmente durante el ordeño cuando los microorganismos presentes en el equipo, en la leche o en la punta del pezón pueden ser impulsados dentro del canal y de la cisterna debido a la entrada indeseable de aire en la unidad de ordeño. Por otro lado, luego del ordeño, el canal permanece dilatado por una o dos horas e inclusive, si está dañado, puede permanecer parcial o totalmente abierto. Este proceso genera que los microorganismos del ambiente o aquellos que se encuentran en la piel, puedan invadir fácilmente el canal (NMC, 2004).

##### 1.4.2.2. Infección e inflamación

Estos procesos se desencadenan cuando los microorganismos se multiplican rápidamente e invaden el tejido mamario y se establece una población bacteriana que

se disemina por toda la glándula. Estos procesos están estrechamente relacionados a la patogenicidad de cada microorganismo.

La inflamación de la glándula mamaria es el resultado de la reacción del huésped a los factores de invasión y multiplicación de los microorganismos. (Bogni y col., 1997; Barkema y col., 2006; Alnakip y col., 2014). Es un mecanismo de protección que sirve para eliminar a los microorganismos, neutralizar sus toxinas y ayudar a reparar al tejido productor de leche para que la glándula mamaria vuelva a funcionar normalmente. Además trae aparejadas modificaciones en la composición de la leche como la disminución de la cantidad y calidad de caseínas sintetizadas, de grasa butirosa y de lactosa. Además se observa un aumento de la concentración de sodio, cloruros, proteínas del suero sanguíneo, enzimas y células somáticas (Chaves, 2009).

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

Por otro lado, otros factores inhibidores de crecimiento bacteriano aumentan en la inflamación: lactoferrina, linfocitos T, B e inmunoglobulinas (Seanq, 2009).

Aun así, si las bacterias no son totalmente destruidas, pueden continuar multiplicándose y comenzar a invadir los pequeños conductos y áreas alveolares. Las células secretoras de leche que son dañadas por las toxinas, liberan sustancias irritantes que conducen a un incremento en la permeabilidad de los vasos sanguíneos. Leucocitos adicionales, conjuntamente con fluidos, minerales y factores de coagulación, se mueven al lugar de la infección y penetran el tejido alveolar. La leche coagulada puede cerrar conductos y en efecto, aislar las regiones infectadas. Todo lo anterior deriva en una inflamación (mastitis) y aumenta notablemente el RCS en la leche ordeñada (Reza, 2000).

#### 1.4.2.3. Destrucción del tejido alveolar

Algunas veces los microorganismos son eliminados rápidamente y la infección se resuelve. En este caso, los conductos tapados se abren y la composición y producción de leche retorna a la normal en algunos días. Aun así, a medida que la infección persiste y los conductos se mantienen tapados, la leche encerrada hace que las células secretoras pasen a una etapa de descanso (sin producir) y el alvéolo comienza a reducir su tamaño. Las sustancias liberadas por los leucocitos conducen a una destrucción completa de las estructuras alveolares, que son reemplazadas por tejido conectivo y cicatriza. La destrucción del tejido secretor de leche es, en efecto, la *tercera línea de defensa* de la vaca para mantener a la infección bajo control. A medida que la enfermedad progresa el número de células somáticas en la leche se eleva y se asocia con una reducción permanente en la producción de leche (NMC, 2004).

#### 1.4.3. Clasificación de la mastitis.

En los tambos la mastitis generalmente es causada por microorganismos, principalmente bacterias, que invaden la ubre, se multiplican y sintetizan toxinas que causan el daño. Según el National Mastitis Council (2003), dependiendo del grado de inflamación y daño causado, la mastitis se puede clasificar en:

**Mastitis subclínica:** no se detectan cambios en la ubre y no se observan anomalías en la leche. Sin embargo, pueden aislarse microorganismos de la leche y detectarse un aumento en el RCS. En la mayoría de los tambos, este tipo de mastitis es la prevalente y causa las mayores pérdidas económicas por una reducción en la producción de leche. Además, esta infección asintomática constituye un reservorio importante de microorganismos que pueden infectar a otros animales.

**Mastitis clínica subaguda:** esta forma de mastitis puede variar en severidad, dependiendo en parte, del tipo de microorganismo que produjo la infección. Se pueden observar alteraciones en la leche como coágulos y apariencia acuosa. Síntomas como calor, hinchazón y sensibilidad en la ubre pueden presentarse en forma leve o estar ausentes.

**Mastitis clínica aguda:** se caracteriza por un avance repentino de la enfermedad con enrojecimiento, hinchazón, calentamiento y dolor de la ubre, anomalías importantes en la leche (sangre, coágulos, apariencia acuosa) y

reducción en la producción de la misma. Se pueden presentar algunos síntomas sistémicos como fiebre, pérdida del apetito, reducción en la función del rumen, pulso rápido, deshidratación, debilidad y depresión.

**Mastitis crónica:** es la infección de la ubre que se presenta por un tiempo prolongado. La mastitis crónica 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.

**Mastitis no bacteriana:** en esta forma de inflamación de la ubre no es posible aislar microorganismos en muestras de leche. Puede presentarse como casos clínicos o subclínicos.

#### 1.4.4. Etiología

En la actualidad se han reportado más de 100 microorganismos como causantes de infección intramamaria. Sin embargo, la mayoría de las infecciones son ocasionadas por especies de estafilococos, estreptococos y bacterias Gram-negativas, esencialmente coliformes. Clásicamente estos microorganismos causantes de mastitis han sido divididos en patógenos contagiosos y ambientales sobre la base de su asociación epidemiológica con la enfermedad y a su proclividad de causar la infección oportunista, persistente o transeúnte, respectivamente. (Bradley y Green, 2001; Riffon y col., 2001; Rossitto y col., 2002; Bedolla y Castañeda, 2003).

Los **patógenos contagiosos** de mayor importancia incluyen a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium* spp., y *Mycoplasma* spp. (Riffon y col., 2001; Rossitto y col., 2002; Djabri y col., 2002). Estos microorganismos se transmiten de vaca a vaca o de cuarto a cuarto, siendo el reservorio primario el animal infectado o el cuarto de la ubre (Rossitto y col., 2002; Zadoks y col., 2001). La exposición de los cuartos mamarios no infectados se restringe al proceso del ordeño (Bradley y Green, 2001, Zadoks y col., 2001; Zadoks, 2002; Bedolla y Castañeda, 2003). Su transmisión puede ocurrir en el momento del ordeño por prácticas como el uso compartido de toallas para lavar y secar las ubres, por medio de las manos contaminadas de los ordeñadores o por el uso de pezoneras no desinfectadas entre vacas en los ordeños mecánicos (Calderón y Rodríguez, 2008)

Los **patógenos ambientales**, a diferencia de los contagiosos, son transmitidos por el ambiente que sirve como la fuente primaria de estos microorganismos. Los patógenos principales en este grupo son los bacilos entéricos Gram-negativos (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp.), *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, y *Enterococcus* spp. (Rossitto y col., 2002; Bedolla y Castañeda, 2003).

#### **1.4.5. Control de la mastitis bovina**

La mastitis bovina ha sido motivo de atención y la preocupación para mejorar su control en nuestro país es notoria desde hace varias décadas. La necesidad de adecuar la calidad de nuestra leche a las exigencias internacionales se hizo patente en la década del 80, con la puesta en marcha de programas y planes de control en diferentes provincias (Dupuy y col., 1989). La inclusión del RCS en los sistemas de pago de la leche en la década del 90 fue el punto de inflexión para el mejoramiento de la calidad sanitaria de la leche. (Calvinho y Tirante, 2005). El Nacional Mastitis Council (2003) postula que los principios de prevención pueden ser sintetizados en 5 puntos fundamentales, denominados el “plan de cinco puntos”, que tiene como objetivo reducir el grado y la duración de la infección (NMC, 2003).

El plan incluye:

**1) Utilización de medidas que mejoren la rutina de ordeño como:**

*Correcto uso del equipo de ordeño y su evaluación periódica.*

*Limpieza y secado de los pezones antes del ordeño.*

*Desinfección de los pezones pre y posordeño (pre-dipping y teat-dipping).*

*Lavado y desinfección de las pezoneras y de la línea de producción antes y después del ordeño.*

**2) Aplicación del plan de vacunación.**

**3) Tratamiento antibiótico de los cuartos al momento del secado.**

**4) Tratamiento rápido de los casos de mastitis clínicas**, a través del diagnóstico precoz.

**5) Eliminación de vacas con mastitis crónicas.**

En los países de lechería más avanzada, donde los productores han aplicado sistemáticamente programas de control basados en higiene y terapia antibiótica, se ha observado una disminución de la prevalencia de los organismos patógenos contagiosos y un incremento relativo de los ambientales (Todhunter y col., 1995).

Serán necesarias tareas de investigación complementarias para cubrir el déficit de conocimientos en problemas puntuales que hacen al control de la enfermedad y desarrollar medidas alternativas que permitan hacer más eficiente el control de esta enfermedad en el futuro.

#### **1.4.6. Pérdidas económicas causadas por mastitis:**

Desde el punto de vista económico, distintos estudios se han orientado a determinar la relación costo/beneficio de un programa preventivo para mastitis bovina. Los mismos establecieron que dicha relación es de 1/5, lo cual realza la importancia de aplicar un programa preventivo efectivo para evitar la mastitis en el rodeo lechero. Los costos asociados a mastitis incluyen disminución en la producción y calidad de leche, leche descartada, gastos derivados de honorarios veterinarios, compra de drogas, trabajo extra, descarte de vacas y ocurrencia de enfermedades concomitantes (Schepers y Dijkhuizen, 1991; Halasa y col., 2007). Estos factores pueden explicar las variaciones de costos totales de la enfermedad e influir drásticamente en la conveniencia o no del control de la misma a nivel del tambo.

Las pérdidas por producción atribuidas a la mastitis están relacionadas a sus formas de presentación, clínica y subclínica, las que afectan en diferente grado el nivel de producción, el riesgo de descarte (Seegers y col., 2003) o muerte de la vaca (Miller y col., 1993) y las chances de fallas reproductivas (Lavon y col., 2011). Una parte importante de las pérdidas asociadas a la mastitis podrían deberse a la forma subclínica de la enfermedad, como fue documentado en los trabajos de Yalcin (2000) y Huijps y col., (2008). Asimismo, las pérdidas por descarte prematuro y otras derivadas de la forma clínica de presentación han sido reportadas como las más relevantes (Halasa y col 2007, Hagnestam-Nielsen y Østergaard 2009).

Hasta el año 2012, en Argentina no se disponía de estadísticas actualizadas acerca de las pérdidas económicas causadas por la mastitis según lo informado por Calvino y Tirante, (2005). Las últimas estimaciones, realizadas hace tres décadas, indicaron que las pérdidas anuales fueron de US\$ 115 a US\$ 220 millones por año (González y col 1980). En el año 2015, Vissio y col., realizaron un análisis sobre los costos de dicha enfermedad en cuencas lecheras de la provincia de Córdoba, y reportaron que oscila alrededor de 0,99 US\$/vaca/día, valor que fue superior a las cifras publicadas por Huijps y col., (2008) de 0,39 S\$/vaca/día, a las registradas por Hagnestam-Nielsen y Ostergaard (2009) de US\$ 0,46/vaca/día, y a los US\$ 0,40/vaca/día reportados por Halasa y col., (2009) (comparación realizada a moneda constante del año 2012).

En Argentina, diferentes estudios confirman grandes pérdidas económicas como consecuencia de la disminución en la capacidad potencial de producción, gastos de control y tratamiento y reducción del valor biológico del producto en al menos un 7%, lo que representa más de 150 millones de dólares por año (Pellegrino y col., 2011). El costo de mastitis representa el 16% de los ingresos brutos, donde el componente más importante corresponde a las pérdidas por mastitis subclínica, que representaron en promedio el 87% del costo total (Vissio y col., 2015).

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 que algunos agentes causantes de mastitis son patógenos en humanos, que puede haber residuos de antibióticos o químicos en la leche por el tratamiento de la ubre y que el consumidor exige que la leche provenga de animales sanos

#### **1.4.7. Tratamiento de la mastitis bovina**

Resulta dificultoso para los veterinarios determinar si los tratamientos de mastitis tienen éxito porque no hay un resultado estándar que se utilice para determinarlo. Para la mayoría de los ganaderos, el objetivo práctico del tratamiento es producir rápidamente una reducción en los síntomas clínicos, eventualmente reducir el recuento de células somáticas (RCS), prevenir la recurrencia de nuevos casos clínicos y mantener el rendimiento esperado de leche. La interpretación de los resultados del tratamiento puede ser confusa porque la mayoría de los casos de mastitis causadas por los patógenos se presentan con signos clínicos leves o moderados. Cuando las vacas presentan casos leves de la mastitis, los signos clínicos normalmente desaparecen en 4-6 días, independiente del tratamiento. Sin embargo, la desaparición de los síntomas clínicos no siempre indica que la infección ha sido tratada con éxito. Mientras que la leche puede aparecer visualmente normal, muchos de estos casos puede simplemente haber pasado a un estado subclínico y mantener el RCS elevado. Este hecho es especialmente cierto para algunos de los patógenos Gram positivos (Hoe y Ruegg, 2006).

Las tasas de curación bacteriológica se utilizan generalmente en los estudios de investigación como el principal indicador de la eficacia del tratamiento, pero pocos ganaderos o veterinarios evalúan la desaparición de los agentes patógenos de las glándulas afectadas. La capacidad de lograr una curación bacteriológica depende del patógeno, la gravedad de caso, la variación en la respuesta inmune en las vacas, la

eficacia del protocolo de tratamiento y la prontitud de iniciar el tratamiento (Hillerton y Berry, 2005). En un estudio reciente se reportó que la curación bacteriológica fue de 7 veces más probable en los casos de mastitis que se dan por primera vez en comparación con los casos recurrentes (Pinzón- Sánchez y col., 2010).

La relación entre la incidencia de infecciones intramamarias causadas por patógenos del medio ambiente y el nº de partos del ganado (o la edad) ha sido bien estudiada en los últimos 25 años (Smith y col., 1985). Las vacas más viejas tienen un mayor riesgo de tener tanto mastitis subclínica como clínica y varios estudios han indicado que las vacas de más lactaciones responden peor al tratamiento en comparación con el ganado joven (Fernandez Bolaños y col., 2012).

El efecto del nº de partos debe ser considerado por los veterinarios antes de iniciar el tratamiento de mastitis; se han encontrado tasas de curación clínica y bacteriológica del 39% para animales de primera lactación y de 26-30% para vacas multíparas (Pyorla y col., 1998; Deluyker y col., 1999). Seguidamente Sol y col., (2000), y McDougall y col.,(2007b), informaron que la curación bacteriológica después de la terapia de mastitis fue menor en las vacas multíparas

#### 1.4.7.1. Terapia de secado

En los sistemas de producción de leche, se requiere de un cese de la producción antes de la próxima lactancia, con el fin que las glándulas mamarias puedan regenerar el epitelio secretor y, de esta forma, asegurar que en la próxima lactancia, la producción de leche sea óptima; este tiempo es conocido como **período seco**. El proceso de regeneración epitelial puede haber finalizado 25 días después de iniciado el secado de las vacas (Elizondo, 2007), pero asimismo este periodo dura 45 días en vacas de primer parición y alrededor de 60 días en vacas multíparas.

Se define a la **terapia de la vaca seca (TVS)**, como la aplicación por vía intramamaria (IMM) de un antibiótico de lenta liberación después del ordeño y que debe mantener una concentración mínima inhibitoria durante varias semanas, con el fin de disminuir o curar las infecciones IMM existentes y/o prevenir las nuevas durante el período seco (Bradley y Green, 2001). Además, dependiendo de los patógenos involucrados (distribución tisular y perfil de resistencia) se pueden usar diferentes drogas tanto por vía intramuscular, subcutánea o por administración intramamaria, siempre que tengan esta indicación para su uso en ganado lechero. Estos incluyen: beta-lactámicos, aminoglucósidos, tetraciclinas, macrólidos, lincosamidas,

polipéptidos, trimetoprim-sulfonamidas, combinaciones de ambos e incluso fluoroquinolonas (Ehinger y Kietzmann, 1998).

El uso del tratamiento de secado de la vaca es un componente eficaz en todo programa de control de la mastitis bovina (Philpot y Nickerson, 2000), que debe también incluir: procedimientos de ordeño apropiados usando un equipo adecuado de ordeño; sumergir los pezones inmediatamente después del ordeño en un producto que se conoce que es seguro y efectivo; buena higiene de la ubre entre los ordeños; registros 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 descarte de vacas con mastitis crónica.

Los productos que se utilizan contienen altos niveles de uno o más antibióticos en una base de lenta liberación, que mantiene niveles terapéuticos en la ubre seca, durante un tiempo significativamente largo; la mayoría están diseñados para eliminar infecciones existentes causadas por las bacterias Gram-positivas, particularmente *Staphylococcus aureus* e infecciones por estreptococos en el secado, y para prevenir nuevas infecciones por *S. aureus* y estreptococos al inicio del período seco.

El tratamiento de todos los cuartos de todas las vacas es una práctica de muy buena aceptación y las infecciones existentes, como las nuevas, se ven marcadamente reducidas con el uso correcto de la TVS (Ruegg, 2004).

Por otro lado, el uso intensivo de antibióticos en el tratamiento y control de la mastitis viene acompañado por un aumento considerable en la resistencia de los microorganismos a los antibióticos (Ryan y col., 1999a; Makovec y Ruegg, 2003; Turutoglu y col., 2009; Pellegrino y col., 2011). Además, su aplicación genera residuos que aparecen en los productos comestibles obtenidos de los animales tratados (Noa-Lima y col., 2009). Estos residuos, contenidos en los alimentos, representan un peligro potencial para la salud del consumidor por causar: alergias, alteración de la flora intestinal, reducción de la síntesis de vitaminas y estimulación de bacterias antibióticoresistentes; siendo esta última la de mayor importancia por la aparición de resistencia múltiple en bacterias patógenas al ser sometidas a bajas concentraciones sub-terapéuticas (Magariños, 2000). De esta manera, a pesar que la aplicación de esta terapia ha sido relativamente efectiva, la utilización de antibióticos de manera preventiva y que ocasiona la aparición de residuos en leche de vacas tratadas,

sumado a la resistencia de patógenos y microbiota indígena, le confieren grandes desventajas (Calvinho y col., 2002; Gentilini y col., 2002; Movassagh, 2011).

#### 1.4.7.2. Tratamientos alternativos

Uno de los mayores desafíos de la industria lechera moderna es aplicar terapias que reduzcan el uso de antibióticos en los animales productores de alimentos, conjuntamente con el retiro del animal enfermo del circuito productivo (Vangroenweghe y col., 2002).

El uso de antibióticos como medida profiláctica está siendo sometido a un debate considerable en todo el mundo debido a su conexión con la aparición de resistencia bacteriana, particularmente con la prevalencia de microorganismos tales como *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes (SARM), prevalentes en pacientes nosocomiales (David y Daum, 2010).

Estas preocupaciones han llevado a la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), en sesiones de la Comisión del Codex Alimentarius, a buscar medidas destinadas a reducir la resistencia a los antimicrobianos en terapias con antibióticos en bovinos (González-Gracia, 2011). Algunos investigadores (Browning y col., 1990, Crispie y col., 2004; Klostermann y col., 2008) han recomendado que la terapia con antibióticos de vaca seca no debe usarse como una rutina de medida profiláctica, sino más bien se debe restringir al tratamiento de las vacas infectadas. Es por esto que, existen en la actualidad numerosas líneas de investigación dirigidas a la búsqueda de métodos alternativos contra la mastitis.

La aplicación de vacunas (Giraud y col., 1997; Pellegrino y col., 2008 y 2010) constituye una alternativa interesante, ya que su aplicación contribuye no solo a disminuir la frecuencia y severidad de las mastitis clínicas sino también a eliminar las mastitis crónicas. Algunas de las vacunas más estudiadas son: "REDUMAST" elaborada con antígenos capsulares extraídos de cepas patógenas de *S. aureus* (Giraud 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 ., 1997; Giraud y col., 1997; Reinoso y col., 2002; Pellegrino y col., 2008, 2010, 2016), entre otras.

Por otro lado, se pueden mencionar también los inmunomoduladores (Dallard, 2007; Bogni y col., 2011) y los microorganismos probióticos y sus metabolitos (Ryan y col., 1998 y 1999b; Ross y col., 1999; Twomey y col., 2000; Crispie y col., 2005 y 2008; Beecher y col., 2009; Klostermann y col., 2008 y 2010).

La generación de formulaciones no antibióticas para el tratamiento y la prevención de la mastitis en las vacas tiene potencial para reducir la dependencia veterinaria de los antibióticos en el control de esta enfermedad persistente y costosa (Ryan y col., 1999). En este sentido, el uso de bacterias probióticas ha sido ampliamente estudiado como un enfoque novedoso para prevenir infecciones en animales, especialmente en el tracto gastrointestinal y vaginal (Otero y Nader-Macías, 2007; Walsh y col., 2008).

## 1.5. PROBIÓTICOS

### 1.5.1. Definición y características

El término probiótico literalmente significa "para la vida" y fue acuñado por primera vez en la década de 1960. De acuerdo con el informe de la Organización mundial de la salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) (2002), los probióticos son "microorganismos vivos que cuando se administran en adecuadas cantidades confieren un beneficio para la salud del hospedero". Es a partir de esta visión que nace el concepto "bacterioterapia", término utilizado cuando una cepa inofensiva se implanta en la microflora del huésped para mantener o restablecer un microbioma natural por la interferencia y/o la inhibición de otros microorganismos, especialmente patógenos, lo cual es concordante con la definición de probióticos. La bacterioterapia nos conduce a formas alternativas de lucha contra enfermedades infecciosas, con menos efectos colaterales que los fármacos convencionales, y también ayuda en el tratamiento de trastornos que parecen no tener relación con las bacterias. (Fierro-Monti y col, 2017).

### 1.5.2. Mecanismo de acción

Los probióticos pueden ejercer sus efectos beneficiosos sobre la salud del huésped por diferentes y varios mecanismos: adhesión al epitelio celular, colonización, formación de biopelículas, producción de biotensioactivos, agregación y co-agregación, producción de metabolitos antagonistas (ácidos orgánicos, peróxido de

hidrógeno, bacteriocinas), competencia por nutrientes, producción de enzimas y / o modulación del sistema inmune, siendo este, uno de los efectos benéficos más importantes (Corthésy y col., 2007; Charalampopoulos y Rastall, 2012). En función a esto se ha observado que, en bacterias Gram positivas probióticas, la pared celular actuaría como activadora de la respuesta inmune (Ross y col., 1999). Es probable que estos microorganismos pueden ejercer sus efectos como resultado de uno o más de estos mecanismos (Espeche y col., 2009).

Las bacterias productoras de bacteriocinas, así como las bacteriocinas per se, son de creciente interés como controles biológicos en la fabricación de bebidas y productos fermentados, principalmente en el área de productos lácteos. Estas bacterias también se han propuesto como probióticos para uso humano o animal (Ocaña, 2004).

### 1.5.3. Géneros considerados probióticos

Actualmente los microorganismos más utilizados como probióticos, tanto en humanos como animales, son: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, levaduras como *Saccharomyces* y *Torulopsis* y hongos del género *Aspergillus* (Dunne y col., 2001).

La combinación de la actividad metabólica de cepas bacterianas potencia la actividad antimicrobiana contra microorganismos patógenos, en comparación con la actividad que pueden presentar las cepas microbianas en forma individual. La formulación mixta de bacterias ácido lácticas ha sido estudiada para la producción de preparados probióticos con actividad antimicrobiana contra patógenos (García Gonzales y col, 2017).

### 1.5.4. Aplicaciones

En un estudio previo, Espeche y col. (2009) aislaron varias bacterias ácido lácticas (BLs) de la leche de bovino con el objetivo de estudiar sus propiedades para el diseño de un producto probiótico para la prevención de la mastitis bovina.

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). Pero 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 (Espeche y col., 2012; Reid, 2004).

Se sabe que los lactobacilos tienen un efecto protector contra algunas infecciones. Esta capacidad se ha relacionado con las propiedades de adhesión a las células epiteliales, que inhiben la adhesión de patógenos específicos por la competencia o por impedimento estérico, así como a la inhibición del crecimiento de patógenos por la secreción de bacteriocinas,  $H_2O_2$ , u otros compuestos antimicrobianos, la competencia por los nutrientes y la modulación de la respuesta inmune del huésped (Reid y Burton 2002). Por otra parte, el uso de una bacteriocina producida por *Lactococcus lactis* se informó ser tan eficiente como una terapia con antibióticos convencionales para el tratamiento de mastitis estafilococcicas (Beecher y col., 2009; Klostermann 2008). Ryan y col., (1999ab), Ross y col. (1999), Twomey y col. (2000), Crispie y col. (2005 y 2008), Beecher y col., (2009) y Klostermann y col., (2008 y 2010) informan sobre una posible utilización intramamaria tanto de la cepa de *L. lactis* como de su bacteriocina, la *lacticina 3147*. Mientras que Even y col., (2009), demuestran que algunos genes de virulencia de *S. aureus* fueron selectivamente regulados en forma negativa en un cultivo mixto con *L. lactis*. Asimismo, la nisina, un polipéptido antimicrobiano producido por *Lactococcus lactis*, ofrece una mayor tasa de curación de la mastitis causada por *S. aureus* (Shaheen y col., 2016). Una de las características que se aplica para la selección de cepas probióticas es la capacidad de adhesión al epitelio celular (Otero y col., 2006). La adhesión es una de las estrategias que promueven el avance y la colonización de las bacterias y también es el primer paso en la formación de una barrera o una biopelícula para evitar la colonización por microbios indeseables.

Es bien sabido que BLs puede inhibir patógenos oportunistas como *S. aureus* en matrices alimentarias y también en el ecosistema vaginal mediante la producción de peróxido de hidrógeno. De hecho, la mayor parte de las BLs aisladas de la microbiota de la vagina humana o bovina sana son grandes productores de peróxido de hidrógeno y ejercen un efecto beneficioso (Espeche y col, 2012). En los últimos años ha aumentado el interés en desarrollar enfoques alternativos para la prevención de IIM, particularmente en vacas secas (Crispie y col., 2004b, 2005). En el año 2007 se comenzó a trabajar en forma conjunta con el grupo de investigación de la Dra. Nader-Macías (CERELA-CONICET) a través de la firma de un convenio de Investigación para el desarrollo de formulaciones probióticas de uso veterinario para la prevención de la mastitis bovina (Convenio CONICET-UNRC). En el marco de este convenio, en una **primera etapa**, se aislaron y caracterizaron BLs de glándula mamaria de animales sanos y con mastitis clínica y subclínica de las provincias de

Tucumán y Córdoba. En los microorganismos aislados se determinaron 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). En la **segunda etapa**, se realizaron ensayos de inoculación para evaluar la inocuidad de una de las cepas 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 (Frola y col., 2012). A partir de los resultados obtenidos se seleccionaron 3 cepas BLs (*Lactobacillus perolens* CRL1724; *Enterococcus hiriae* CRL1835; *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CRL1655) que presentaron características interesantes para ser incluidas en un producto para la prevención de la mastitis bovina. Ensayos *in vitro* e *in vivo*, demostraron que no existe inhibición cruzada entre estas cepas y que no producen ningún efecto adverso al ser inoculadas en una concentración adecuada en ubres de bovinos en el período seco (datos no publicados). Por último, en una **tercera etapa**, se decidió continuar los ensayos con 2 de las cepas seleccionadas, *Lactobacillus perolens* CRL1724 y *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CRL1655. Se avanzó en el estudio de la respuesta inmunológica desencadenada al inocular estas cepas en ubres bovinas, siendo el primer trabajo que describe el efecto inmunológico de la inoculación de BLs en la ubre bovina en el período de secado (Pellegrino y col., 2017). Los resultados mostraron que estos microorganismos probióticos pueden actuar como inmunomoduladores en la ubre de los bovinos y estimular tanto la inmunidad local como sistémica (Pellegrino y col. 2017). Además, se determinó la viabilidad de las cepas luego de la liofilización en diferentes medios crioprotectores y a diferentes períodos de tiempo (24h, 30d, 90d y 180d). En este trabajo, se evaluó la adición de otros componentes (fitocompuestos, vitaminas y excipientes) al producto que puedan realzar el efecto protector de los probióticos per se, sin causar inhibición de estos.

## 1.6. FITOCOMPUESTOS

El uso de plantas medicinales para el alivio o cura de enfermedades se remonta a los orígenes de la humanidad. Después de siglos de uso empírico de preparaciones herbáceas, recién a comienzos del siglo XIX se obtuvo la idea de utilizar como medicamento a un compuesto químicamente puro obtenido a partir de una planta con acción terapéutica; surgiendo así, la primera separación de un compuesto químico (morfina) de una droga natural (“opio”) por parte del farmacéutico alemán Friedrich W. A. Seruner.

En la última década, el interés por las drogas naturales ha sufrido un crecimiento progresivo debido, principalmente, al surgimiento y al desarrollo de la ecología como una forma de vida que permitió modificar y adoptar costumbres o hábitos acordes a una vida más saludable. Los rodeos lecheros son especialmente susceptibles a la mastitis durante el parto y el secado, donde se produce una disminución de los mecanismos de defensa de la glándula mamaria. En estos períodos la función inmune está desbalanceada y hay una susceptibilidad incrementada a infecciones. Una de las posibles causas es la declinación de la población de linfocitos T, que lleva a una inmunosupresión (Sordillo, 2005; Thompson-Crispi y col., 2014).

Debido a esto es necesario realzar la respuesta inmune del animal, objetivo que se persigue con la administración de una formulación intramamaria con bacterias probióticas en combinación con fitocompuestos. Se conoce que geles herbales calmantes y no irritantes son eficaces en el tratamiento y profilaxis de la mastitis bovina, y además tienen efecto inmunomodulador. La fitoterapia o los remedios herbales están asumiendo pertinencia en años recientes en vista del desarrollo de la resistencia a los antibióticos y persistencia de residuos de fármacos en la leche.

En la actualidad, existe una gran preocupación basada en la gradual reducción del número de antimicrobianos eficientes y en los efectos tóxicos de los residuos de los mismos en productos alimenticios de origen animal. (Voss-Rech y col., 2011). De este modo, la nueva fitoterapia incluye la preparación y validación de formulaciones a base de diversas especies vegetales, realizadas por profesionales especializados, con el fin de satisfacer las necesidades de los usuarios en aspectos importantes como la prevención y la salud (Carballo y col., 2005).

Ciertas hierbas, incluida la *Echinacea*, son utilizadas en veterinaria en el norte de América y Europa, y aunque relativamente pocos informes han descrito estudios

básicos análogos a los descritos para enfermedades humanas, o incluso ensayos controlados en animales, invariablemente, los tratamientos se concluyeron como seguros y gratuitos de efectos secundarios significativos (Karsch-Völk y col., 2014)

Dentro de los fitocompuestos más estudiados, y que se evaluaron en el marco de este trabajo de investigación, se encuentran:

### 1.6.1. *Aloe vera*

La especie de planta *Aloe vera*, conocida dentro de la medicina herbolaria como sábila, pertenece a la familia Liliaceae. Es muy utilizada en medicina tradicional como laxante, antiulcerosa, antituberculosa, analgésico y antiinflamatorio, entre otros usos (Carlini, 1988; Martínez y col, 1996) Estudios farmacológicos han confirmado sus efectos como cicatrizante de heridas y quemaduras, laxante, antiulceroso, antiinflamatorio, analgésico y hepatoprotector. Además, se ha reportado la actividad antimicrobiana del jugo de las hoja fresca frente a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Corynebacterium xerosis*, y el jugo de la planta seca es efectivo ante *Pseudomonas aeruginosa* y *Proteus vulgaris*. Además se le han encontrado propiedades como fungicida y analgésico en uso externo.

### 1.6.2. *Equinacea spp*

La *Equinacea* purpúrea es una planta nativa perteneciente a la familia Compositae. Presenta una gran relevancia en el mercado de la medicina herbolaria en Europa, Canadá y Estados Unidos (Rawls, 1996).

Entre sus propiedades, se destaca la inmunomodulación,; en diferentes estudios se ha demostrado su capacidad de aumentar el recuento leucocitario, la actividad y proliferación de macrófagos, la función de células natural killer, la activación del complemento, la amplificación de la respuesta de factores tales como factor de necrosis tumoral, interleuquinas 1, 6 y 10, y la inhibición de la enzima hialuronidasa.

En cuanto a su actividad antimicrobiana, algunos artículos disponibles en la literatura científica concluyen que la *Echinacea* no posee una actividad antimicrobiana considerable (Wendakoon y col., 2012). Por otro lado, se ha propuesto que la

*Echinacea angustifolia* tendría un importante efecto antioxidante (Barrett, 2003; Nematalla y col., 2011), incluyendo la capacidad de atrapar radicales libres y especies reactivas del oxígeno, fundamentalmente el radical hidroxilo, lo que produciría una disminución de la lipoperoxidación en células humanas (Hu y Kitts, 2000).

### 1.6.3. *Centella asiática*

Es una enredadera herbácea perenne, perteneciente a la familia Apiaceae, ampliamente utilizada en Asia y que poco a poco se va haciendo su lugar en Occidente. En el siglo XIX, la *Centella asiática* y sus extractos se incorporaron a la farmacopea india, en la que además de la cicatrización de heridas, se recomendaba para el tratamiento de diversas afecciones cutáneas como la lepra, el lupus, las úlceras varicosas, el eczema, la psoriasis, la diarrea, la fiebre, amenorrea y enfermedades del tracto genitourinario femenino (Brinkhaus y col, 2000).

Un estudio preclínico informó que varias formulaciones (ungüento, crema y gel) de un extracto de *Centella asiática* acuoso aplicado a heridas abiertas en ratas (3 veces al día durante 24 días) dieron como resultado una proliferación celular aumentada y síntesis de colágeno en el sitio de la herida (Sunilkumar y col, 1998).

## **HIPOTESIS:**

El agregado en una concentración adecuada de fitocompuestos (*Equinacea*, *Centella asiática*, *Aloe vera*), no fitocompuestos (vitamina D, ácido ascórbico) y excipientes (Fructosa, Sepigel, Ácido salicílico, (Vaselina líquida y sólida) y Estearato de aluminio), no afecta la viabilidad de las Bacterias Lácticas y no producen efectos adversos en los animales al ser inoculados de forma intramamaria.

## 2. OBJETIVO GENERAL

Abordar la problemática de la prevención de la mastitis bovina a través del desarrollo de productos basados en formulaciones alternativas y complementarias a las medidas de control existentes en los tambos.

### 2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A) Evaluar la viabilidad de las Bacterias Lácticas seleccionadas frente a diferentes concentraciones de fitocompuestos (*Equinacea*, *Centella asiática*, *Aloe vera*) y vitaminas (vitamina D y ácido ascórbico) con actividad inmunomoduladora demostrada.
- B) Evaluar la viabilidad de las Bacterias Lácticas seleccionadas frente a diferentes concentraciones de excipientes de uso frecuente en las Formulaciones Intramamarias (estearato de aluminio, vaselina (líquida y sólida), fructosa, ácido salicílico).
- C) Realizar ensayos de inocuidad de los excipientes usados en la Formulación Intramamaria en bovinos en el período de secado.

### 3. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1. CEPAS BACTERIANAS

##### 3.1.1. Bacterias Lácticas (BL) probióticas

- *Lactobacillus perolens* CRL1724
- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CRL1655.

Aisladas a partir de leche bovina. Las mismas fueron caracterizadas y seleccionadas sobre la base de sus propiedades probióticas. Estas cepas se obtuvieron en el marco de un Convenio de Investigación Conjunta entre la UNRC y el CERELA-CONICET (Centro de Referencia para Lactobacilos). Las cepas se encuentran depositadas en el cepario del CERELA, Tucumán (CERELA-CONICET) (Espeche y col., 2009; Frola y col., 2011; Espeche y col., 2012, Pellegrino y col., 2012).

#### 3.2. ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Se utilizaron 11 vacas Holando-Argentino en lactancia próximas al secado, pertenecientes a un tambo ubicado en la localidad de Malena asentado y aprobado por el ente fiscalizador pertinente (SENASA).

#### 3.3. MEDIOS DE CULTIVO Y DE CONSERVACION

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

- **Caldo Man Rogosa y Sharpe (MRS) (Britania).**
- **Agar Trypticosa Soya (TSA) (Britania)**
- **Caldo Infusión Cerebro-Corazón (BHI) (Oxoid)**
- **Agar Cristal Violeta- Rojo Neutro- Bilis- Glucosa (VRBG) (Britania)**

- **Agar Eosina Azul de Metileno (Britania)**

Por otro lado, los medios preparados en el laboratorio fueron elaborados según se describe a continuación:

- **Caldo Nitrato:**

Extracto de carne	5 g
Peptona	5 g
KNO <sub>3</sub>	1 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

- **Caldo Indol:**

Peptona de Carne	10 g
Cloruro de Sodio	5 g
Agua Destilada	c.s.p.1000 ml

- **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 se adicionaron 0,5 ml de glicerol por cada 4,5 ml de LEL.

### 3.4. DROGAS E INSUMOS COMERCIALES:

#### 3.4.1. Fitocompuestos

Los mismos fueron obtenidos en forma de polvo sólido, obtenido del macerado de la planta completa. Para su utilización fueron diluidos en caldo MRS estéril, calentados durante 15 minutos a baño maría a 75°C, y la solución obtenida fue sometida a filtración clarificante.

- **Extracto seco de *Equinacea* (Parafarm)**
- **Extracto seco de *Centella asiática* (Parafarm)**
- **Extracto seco de *Aloe Vera* (Parafarm)**

### 3.4.2. Compuestos con actividad inmunomoduladora

Ambas vitaminas fueron disueltas en caldo MRS estéril.

- **Vitamina D (Parafarm)**
- **Vitamina C (Parafarm)**

### 3.4.3. Excipientes:

- **Estearato de aluminio**
- **Vaselina (líquida y sólida)**
- **Ácido salicílico de uso externo (Parafarm)**
- **Fructosa pura (Parafarm).**

Para su uso, fue disuelta en caldo MRS estéril y luego calentado en la llama del mechero para favorecer su disolución.

- **Sepigel 305**

Antes de su utilización, fue esterilizado en autoclave durante 15 min a 120°C. Luego, se diluyó en caldo MRS estéril para conseguir las concentraciones deseadas.

La viabilidad *in vitro* de las cepas BL frente a los compuestos mencionados anteriormente fue evaluada por dos técnicas descriptas para tal fin (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2008).

### 3.4.4. Insumos

Discos Millipore de 0,4 µm: para filtrado clarificante.

Jeringas de 10 ml

Filtros

### 3.5. SOLUCIONES Y REACTIVOS

- **Solución fisiológica (SF)**

NaCl 0,9 g

Agua destilada c.s.p 100 ml

- **Alcohol (Porta) 70%**

Alcohol 70 ml

Agua destilada 30 ml

- **Reactivos para la tinción de Gram**
  - Cristal violeta
  - Safranina
  - Lugol
  - Alcohol 100%
- **Agua oxigenada**
- **Reactivos para la prueba de reducción de nitratos**
  - Reactivo A
    - $\alpha$ -naftilamina 5 g
    - Ácido acético (5N) al 30% c.s.p. 1000 ml
  - Reactivo B
    - Ácido sulfanílico 8 g
    - Ácido acético (5N) al 30% c.s.p 1000 ml
- **Reactivo de Zinc**
- **Glicerol (Cicarelli)**
- **Reactivo de Kovacs**
- **Reactivo para tinción de células somáticas**
  - Azul de Metileno 0,6 g
  - Alcohol etílico 54 ml
  - Tetracloroetano 40 ml
  - Ácido acético glacial 6 ml

Mezclar el alcohol etílico con tetracloroetano y calentar a baño maría (60 – 70°C). Agregar el Azul de Metileno y agitar. Después de enfriar, agregar el ácido acético glacial y filtrar.

### 3.6. EQUIPOS DE LABORATORIO

**Microscopio óptico Zeizz (Primo Star).**

**Centrifuga refrigerada (Thermo Scientific Sorvall ST16R)**

**Lector para placas de ELISA (Labsystem Multiscan MS)**

**Estufa de cultivo**

### 3.7. MANTENIMIENTO Y EVALUACION DE CEPAS BACTERIANAS

#### 3.7.1. Evaluación de cultivos

Para realizar la conservación de las BLs, es necesario comprobar su pureza, para lo cual se realizó lo siguiente:

Se realizó la tinción de Gram de los cultivos activos de ambas BLs. Aquellos microorganismos Gram positivos (+) fueron sometidos a distintas pruebas metabólicas con el fin de corroborar que fueran las cepas de bacterias lácticas aisladas.

Producción de Catalasa: Se tomó una colonia de cada microorganismo y se la homogeneizó en una gota de agua oxigenada dispuesta sobre un portaobjeto. El peróxido de hidrógeno, por acción de la enzima catalasa, se desdobra en oxígeno y agua. La reacción es positiva (+) cuando se observa la formación de burbujas. Las BL son negativas para esta prueba.

Prueba de Reducción de Nitratos: Se inoculó un tubo de caldo Nitrato con 400 µl de un cultivo activado y se incubó a 37°C durante 5-7 días. Posteriormente se agregaron unas gotas del reactivo A seguido de unas gotas del reactivo B. El desarrollo de un color rojo dentro de los 30 segundos después de agregar los reactivos, indica la presencia de NO<sub>2</sub>. y representa una reacción positiva. Si no se observa color, puede que el NO<sub>3</sub>. no fue reducido a NO<sub>2</sub>. o que se haya reducido a otros productos. Por lo tanto, es necesario agregar una pequeña cantidad de polvo de Zn al tubo. Si se produce un color rojo, indica presencia de NO<sub>3</sub>. y confirma la reacción negativa. Si el medio continúa incoloro significa que ya no queda más NO<sub>3</sub>. por reducir y la prueba es, entonces, positiva. Las BLs son negativas para esta prueba.

Prueba de Indol: Se inoculó un tubo de caldo Indol con 400 µl de un cultivo activado y se incubó a 37°C durante 5-7 días. Luego se agregó entre 0,2-0,3 ml de reactivo de Kovacs y se observó al cabo de 10 minutos. La presencia de un anillo rojo en la superficie del cultivo, indica reacción positiva. Las BLs son negativas para esta prueba.

Para ambas pruebas bioquímicas se utilizaron los siguientes controles: Control (-): tubo sin inocular. Control (+): tubo inoculado con una cepa positiva para estas pruebas.

#### 3.7.2. Conservación de bacterias del ácido láctico

Las cepas se conservaron en medio LEL a -20°C. Previo a su conservación, fueron chequeadas respecto a su viabilidad y pureza mediante siembras en placas de

MRS, tinción de Gram, y la realización de las pruebas bioquímicas catalasa, indol y nitrato, para las cuales deber ser negativas. A partir de las placas con colonias aisladas, se tomó un colonia y se resuspendió en 5ml de caldo MRS estéril. Luego de una incubación de 24hs a 37°C se centrifugó durante 5 minutos a 10000 r.p.m. y se descartó el sobrenadante. El pellet obtenido se resuspendió en 2 ml de LEL-glicerol en tubos crioviales y se conservaron a -20°C hasta su utilización.

### **3.7.3. Activación de bacterias del ácido láctico**

Para activar las cepas se siguió la metodología descrita por Hütt y col. (2006) y Frola y col. (2011), con algunas modificaciones.

Se inocularon alícuotas de 400 µl de cada cepa conservada en LEL en 5 ml de caldo MRS estéril. Los tubos fueron incubados a 37°C durante 24 hs y se realizaron repiques sucesivos en medio MRS fresco trasvasando 400 µl del cultivo crecido. Los tubos inoculados correspondientes al tercer repique, se conservaron a 4°C hasta su utilización, en un periodo de tiempo que no superase los 21 días. Previo a su utilización, los cultivos fueron incubados a 37°C durante 24 h para la realización de los diferentes ensayos.

## **3.8. CINETICA DE CRECIMIENTO**

### **3.8.1. Curvas de calibrado**

Se colocó una alícuota de 1 ml de un cultivo activo en un Erlenmeyer que contenía 20 ml de caldo MRS estéril, por duplicado (denominado cultivo inicial). Se homogenizó e incubó a 37°C hasta alcanzar una Densidad Óptica (DO) a 600nm de 0,6. Luego el cultivo inicial se diluyó en MRS, para lograr diluciones 1:2, 1:4, 1,8 y 1:10 y se midieron sus respectivas DO. Paralelamente, a partir del cultivo inicial, se realizaron diluciones seriadas en base 10 hasta llegar a la dilución  $10^{-7}$ , y se sembraron las diluciones  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$  por la técnica de microgota, es decir gotas de 20 µl por triplicado. Las placas se incubaron a 37°C durante 24-48 horas y se contaron las gotas que contenían entre 3 y 30 colonias (Figura 5). Este ensayo se realizó por triplicado para cada una de las BLs.

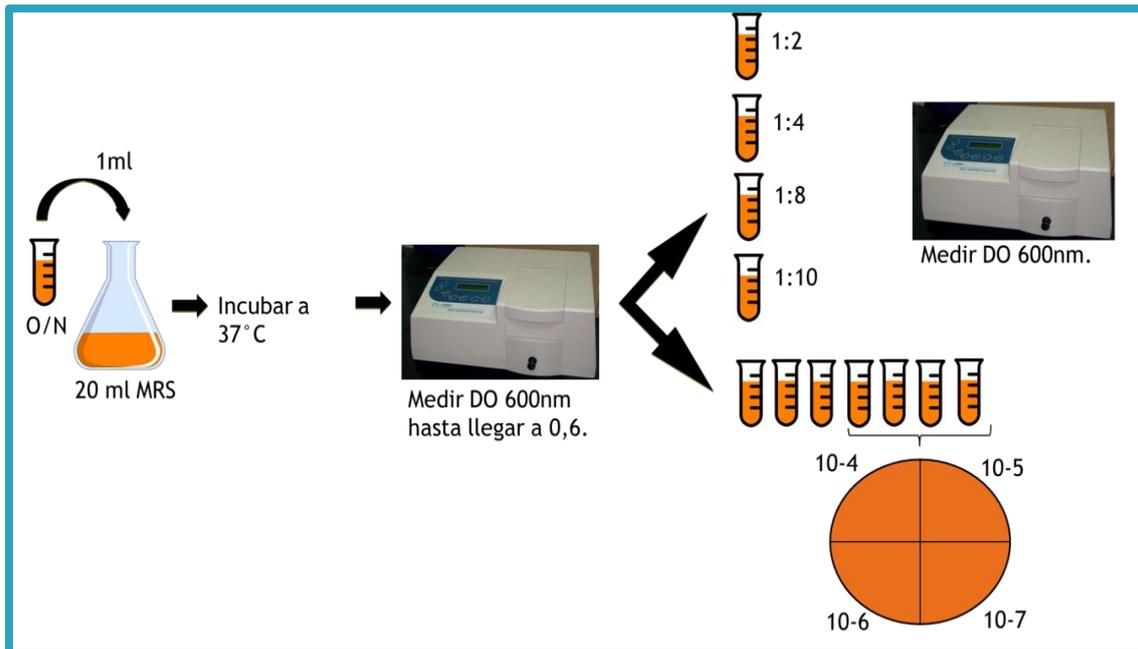
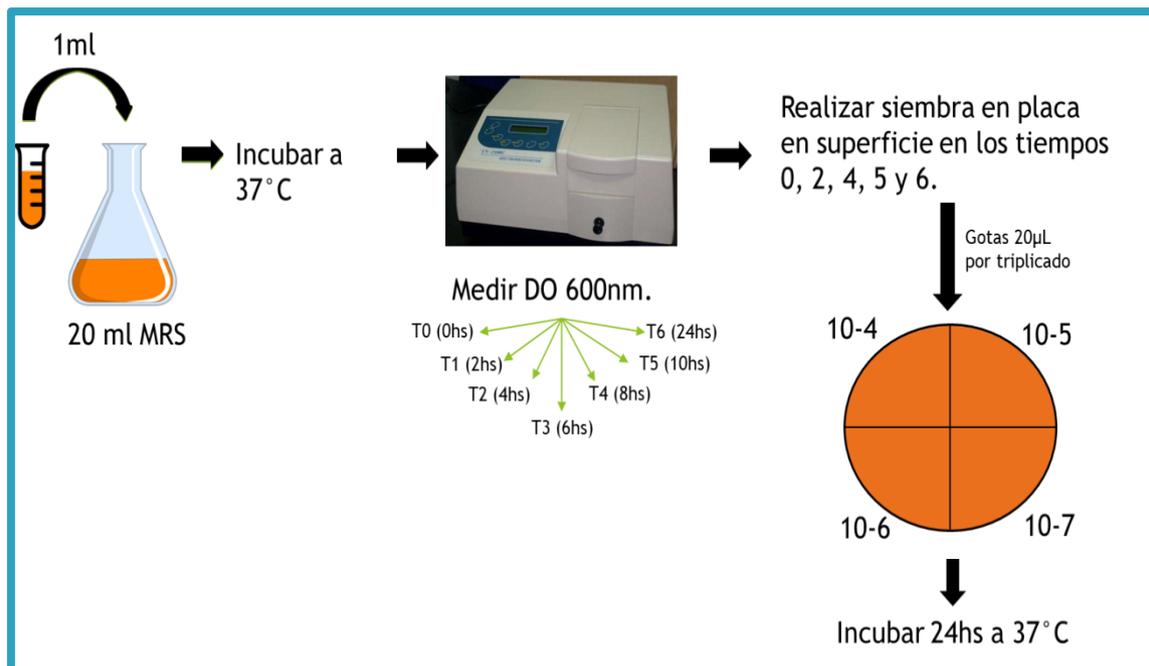


Figura 5: Protocolo empleado para la realización de curva de calibrado.

### 3.8.2. Curvas de crecimiento

Se colocó una alícuota de 1 ml de un cultivo activo en un Erlenmeyer que contenía 20 ml de caldo MRS estéril, y se midió la turbidez a DO<sub>600nm</sub> inmediatamente después de la inoculación (0 h). Luego, se incubó en estufa a 37°C, y cada dos horas se realizaron sucesivas mediciones de la DO<sub>600nm</sub>, correspondiendo a los tiempos 1 (2h), 2 (4h), 3 (6h), 4 (8h), 5 (10h) y 6 (24h).

A partir del cultivo inicial se realizaron diluciones seriadas en base 10 hasta llegar a la dilución 10<sup>-7</sup>. Se sembraron las diluciones 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup> y 10<sup>-7</sup> por la técnica de microgota, en placas de MRS y luego de la incubación a 37°C durante 24-48 h se contaron las gotas que contenían entre 3 y 30 colonias. Este ensayo se realizó por triplicado (Figura 6)



**Figura 6: Protocolo empleado para la realización de curvas de crecimiento.**

Una vez obtenidas las curvas correspondientes, se determinaron los siguientes parámetros de crecimientos:

- Velocidad de crecimiento para ambas cepas.
- Tiempo de generación.

### 3.9. MICROTÉCNICA DE CIM

Esta técnica se utilizó para evaluar el efecto inhibitorio de distintas concentraciones de los compuestos a incluir en la formulación intramamaria, como se detalla en la tabla 1.

**Tabla 1: Compuestos y concentraciones utilizadas para realizar el ensayo de micro CIM.**

Compuestos	Concentraciones
Fitocompuestos (Centella asiática, Aloe vera y Equinacea)	0;6,25; 12,5; 25 y 50 mg/ml
Vitamina C	0; 12,5; 25; 50 y 100 mg/ml
Vitamina D	0; 5; 10; 20 y 40mg/ml
Fructosa	0, 150, 300, 450 y 600mg/ml
Ácido salicílico	0; 0,25; 0,5; 1 y 3%
Sepigel 305 ®	0; 1; 1,2; 1,5 y 2%

Se llevó a cabo en placas estériles de poliestireno de 96 pocillos con fondo plano para microtitulación. Se realizó una solución stock en 5ml de MRS para cada compuesto con una concentración final de 600mg/ml. A partir de este se realizaron diluciones seriadas, para obtener las concentraciones deseadas. Paralelamente se realizaron diluciones seriadas de cada una de las dos cepas de BL. Las concentraciones a probar fueron:  $1 \times 10^8$ UFC/ml,  $1 \times 10^7$ UFC/ml y  $1 \times 10^6$ UFC/ml.

Posteriormente, se colocaron 90ul de cada dilución de los compuestos (por triplicado) y 10ul del inóculo (por triplicado para cada concentración), obteniendo un volumen final de 100ul. Las placas se incubaron a 37°C y se midió turbidez mediante  $DO_{600nm}$  a los tiempos 0 (al momento de la inoculación) y 3, 6, 12, 24 y 48 horas luego de la siembra. En cada experimento se realizaron dos controles: un control positivo de microorganismos (sin el agregado del compuesto) y un control negativo sin bacterias y con el compuesto en su máxima concentración.

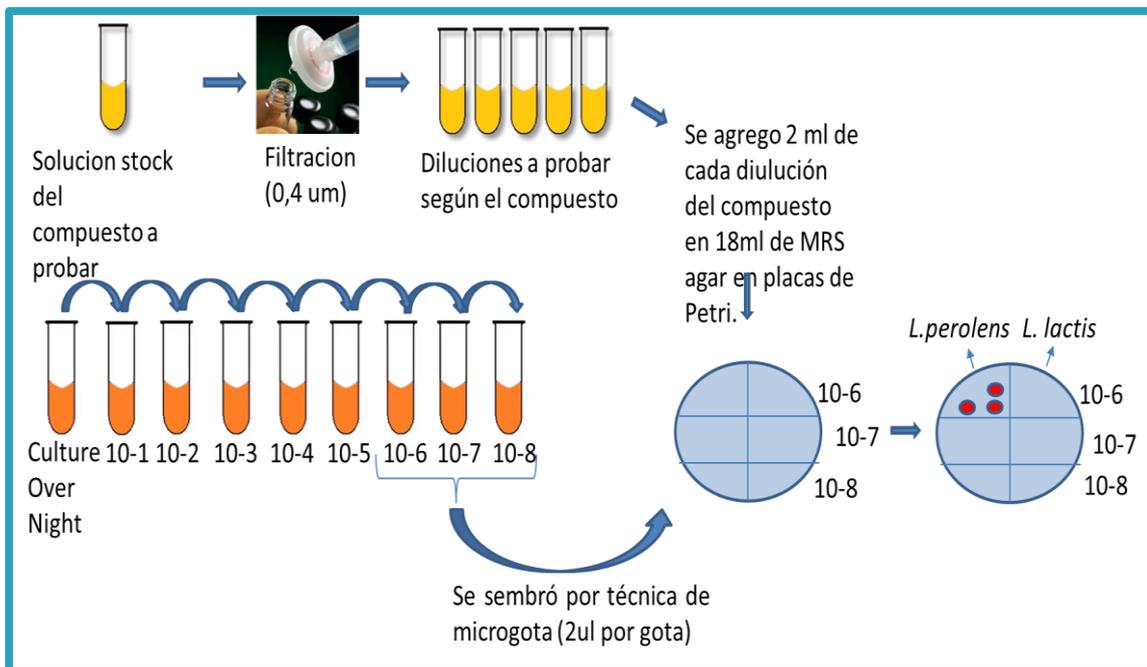
### 3.10. DILUCIÓN EN AGAR:

Es una técnica cualitativa, en la cual solo se observa la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano. Se determinó si *L. lactis* subs *lactis* CRL 1655 y *L. perolens* CRL 1724 eran inhibidos a diferentes concentraciones de los compuestos (Tabla 1). Para esto, se preparó una solución de cada uno de los compuestos 10 veces más concentrada la que se muestra en la Tabla 1, y 2 ml de estas, se mezclaron con el medio de cultivo agarizado estéril templado a 40-45°C, diluyéndose en este. Se colocaron 18 ml de MRS agar y 2 ml de la solución de compuesto. Se dejaron solidificar sobre una superficie plana, y luego se secaron en estufa. (Figura 7)

Luego, estas placas fueron inoculadas utilizando una micropipeta con gotas de 2 µl de las diluciones  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  y  $10^{-8}$ , realizadas a partir de un cultivo de 24 horas de crecimiento (Figura 7). Después de incubar las placas durante 24hs a 37°C se observaron los resultados determinando si hubo crecimiento o no, basándose en la Figura 8 para la interpretación. Se tuvo en cuenta como positivo cuando se observó crecimiento en todas las gotas, negativo cuando no creció ninguna gota y variable (+/-) cuando creció solo en las gotas con inóculo más concentrado.

**Tabla 2: Compuestos y concentraciones utilizadas para realizar el ensayo de dilución en agar.**

Compuestos	Concentraciones
Fitocompuestos (Centella asiática, Aloe vera y Equinacea)	0, 6,25; 12,5; 25 y 50 mg/ml
Vitamina C	0; 12,5; 25, 50 y 100 mg/ml
Vitamina D	0; 5; 10; 20 y 40mg/ml
Fructosa	0, 150, 300, 450 y 600mg/ml
Ácido salicílico	0; 0,25; 0,5; 1 y 3%
Sepigel 305 ®	0; 1; 1,2; 1,5 y 2%



**Figura 7: Protocolo empleado para la realización de la técnica de dilución en agar.**

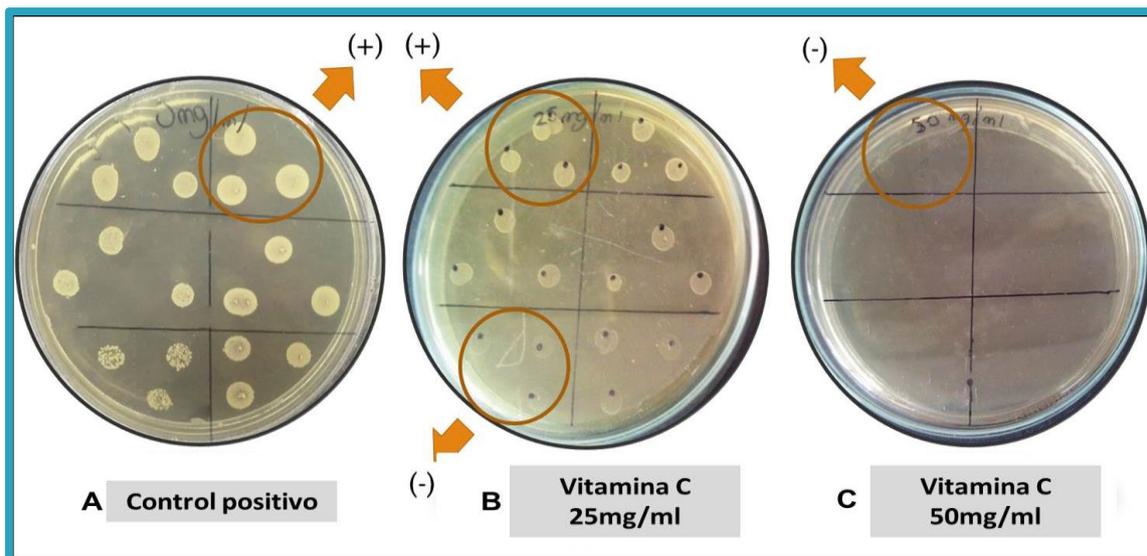


Figura 8: Fotografías obtenidas del ensayo de Dilución en Agar. Interpretación de los resultados. A. control positivo: crecimiento confluyente en todos los inóculos sembrados, (+) B. crecimiento confluyente (+) y ausencia de crecimiento en los inóculos más diluidos, (+/-). C. Inhibición total, ninguno de los inóculos presenta crecimiento, (-).

Con los resultados obtenidos mediante estos ensayos, se eligieron las concentraciones mínimas inhibitorias de cada compuesto y se realizaron las curvas de muerte correspondiente para cada BLs.

### 3.11. CURVAS DE MUERTE:

#### 3.11.1. Preparación del inóculo bacteriano:

Se realizó un pre-cultivo de 4 horas a 37°C en MRS a partir de un cultivo crecido durante 24hs a 37°C. Para esto se inoculó 10 ml de caldo MRS estéril con 0,5 ml del cultivo y se llevó a estufa a 37°C durante 4hs.

#### 3.11.2. Preparación de los compuestos a ensayar:

Se prepararon las diluciones de los compuestos a probar según las concentraciones deseadas:

- **Fitocompuestos**

Se pesaron 2gr de cada fitocompuesto, y se diluyeron en 4ml de MRS estéril, en una botella estéril. Esta se llevó a baño maría a 70°C durante 15 minutos, con el fin de emulsionar los componentes principales de los fitocompuestos y separarlos del residuo sólido, el cual se separó mediante filtración con filtros clarificantes de 0.44µm. El

producto obtenido de la filtración se colocó en frascos estériles hasta su utilización. A partir de este, se realizaron las diluciones necesarias para alcanzar las concentraciones deseadas.

Este procedimiento se repitió cada vez que se necesitó utilizar el preparado de fitocompuestos, ya que resultó imposible su conservación, ya que luego de 2 días se observó precipitado y cristalización en el fondo del frasco.

- **Excipientes**

Para el ácido ascórbico y la fructosa, se pesó la cantidad necesaria y se diluyó en MRS estéril. Ambos compuestos luego de ser diluidos se guardaron hasta su utilización. Para la fructosa el procedimiento fue similar, con el agregado de calentado cerca de la llama del mechero para lograr una completa disolución. En el caso de Sepigel 305 ®, se esterilizó en autoclave 15 minutos a 120°C antes de la preparación del stock diluido.

- **Diluyentes con compuestos combinados**

Sobre la base de los resultados obtenidos en todos los ensayos presentados anteriormente, en los que se determinó cuales concentraciones no afectan a la viabilidad de las BLs, y considerando las propiedades de cada uno de los compuestos analizados, se seleccionaron la vitamina C (12,5mg/ml), *Echinacea* (6,25mg/ml), Fructosa (10mg/ml) y Sepigel (1%) como excipientes para ser incluidos a la formulación probiótica. Considerando esto, se realizó un ensayo de sobrevida (curva de muerte) para analizar el efecto de todos estos compuestos sobre el crecimiento de ambas BLs en distintas combinaciones, como se muestra en la tabla 2.

**Tabla 3: Composición de los diluyentes completos.**

	Diluyente 1	Diluyente 2	Diluyente 3
<b>Fructosa (10mg/ml)</b>	X	X	
<b><i>Echinacea spp.</i> (6,25 mg/ml)</b>	X	X	X
<b>Sepigel (1%)</b>	X	X	X
<b>Vitamina C (12,5mg/ml)</b>	X		X

### 3.11.3. Inoculación de la microplaca

Se efectuó el ensayo en placas estériles de poliestireno de 96 pocillos con fondo plano para microtitulación. La inoculación se llevó a cabo luego de las 4 horas del inicio del pre-cultivo. (Volumen final por pocillo: 200 µl; Volumen de inóculo: 180µl; Volumen de solución de compuestos: 20 µl)

En la microplaca se inoculó un pocillo para cada tiempo en el que se hizo el recuento para *L. perolens* CRL 1724, y un solo pocillo para todos los tiempos en el caso de *L. lactis* subs *lactis* CRL 1655. En cada ensayo se consideraron los siguientes controles:

- Control de esterilidad del medio: Caldo MRS sin inocular.
- Control de esterilidad de los compuestos: Caldo MRS + COMPUESTOS.
- Control Positivo: Caldo MRS + BACTERIAS

Se midió la DO<sub>600nm</sub> a los tiempos 0, 2, 4, 6 y 8.

### 3.11.4. Recuento en placa en superficie (RPS)

Esta técnica de recuento de microorganismos viables permite conocer la concentración bacteriana que posee un cultivo. Este dato es de suma utilidad para calibrar y poner a punto las diferentes técnicas utilizadas.

### 3.11.5. Cálculo de las diluciones necesarias

En trabajos anteriores realizados en el Laboratorio de Genética Microbiana, se determinó que la concentración bacteriana de las cepas de BLs, luego de una incubación a 37°C durante 18-24 h, estaba en el orden de  $10^7$  y  $10^9$  UFC/ml. Sobre la base de estos resultados, se contemplaron estas concentraciones al realizar el recuento de viables.

$$RPS: N^{\circ} \text{ de colonias} \times \text{Factor de dilución} \times \text{Factor Alícuota}$$

En el recuento de BLs, debido al tamaño de sus colonias, se deben utilizar para el recuento aquellas gotas donde hayan desarrollado entre 3 y 30.

### 3.11.6. Preparación de las diluciones

Partiendo de un cultivo crecido a 37 °C durante 18-24 h, una alícuota de 100  $\mu$ l se depositó en un tubo conteniendo con 900  $\mu$ l de solución fisiológica estéril. Dicho tubo representa la primer dilución decimal ( $10^{-1}$ ). Se homogeneizó con *vortex* y a partir de la dilución  $10^{-1}$  se tomó otra alícuota de 100  $\mu$ l y se la colocó en otro tubo con 900  $\mu$ l de solución fisiológica estéril, realizando la segunda dilución decimal ( $10^{-2}$ ). Este procedimiento se repitió sucesivamente hasta alcanzar la dilución  $10^{-6}$ .

### 3.11.7. Siembra y recuento en placa

Se añadió a cada placa de Petri estéril entre 15-20 ml de medio MRS agar fundido, se dejaron solidificar y se secaron en estufa durante 15 min como mínimo. Posteriormente se tomaron 20 $\mu$ l de las diluciones  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  y se depositaron en la superficie del agar de cada una de las placas por duplicado. Se dejaron en reposo sobre una superficie plana durante 1h, para que las gotas se secan sobre el medio de cultivo. Las placas sembradas se incubaron invertidas a 37 °C durante 24-48h (Figura 9).



**Figura 3: Ejemplo de placa con crecimiento de 24hs, para recuento de curva de muerte.**

Para calcular la concentración bacteriana, se contó aquella dilución que presentó entre 3 y 30 colonias, y se calculó el número de microorganismos viables totales por mililitro de cultivo según la siguiente fórmula:

$$\textit{Formula de recuento: } \text{promedio del n}^\circ \text{ de colonias} \times \text{Factor de dilución} \times 50 \\ \text{(Factor de alícuota)}$$

Se hicieron recuentos en placa en superficie al momento del inicio del pre-cultivo (Tiempo- 4), a las 4 horas de incubación (Tiempo 0) y cada dos horas hasta las 8 horas luego de la inoculación (Tiempos 2, 4 6 y 8).

### **3.12. ENSAYOS DE INOCUIDAD DE LOS EXCIPIENTES USADOS EN LA FI EN BOVINOS EN EL PERÍOO DE SECADO.**

#### **3.12.1. Selección del establecimiento lechero para la inoculación.**

Con el objetivo de seleccionar el establecimiento para la realización del ensayo de inoculación en vacas al momento del secado, se tuvieron en cuenta diferentes características como: proximidad a la UNRC, número de vacas en ordeño, antecedentes de mastitis clínicas y subclínicas y predisposición de los propietarios para realizar el ensayo.

### **3.12.2. Relevamiento del establecimiento lechero**

Una semana antes de la realización del ensayo, se realizó un muestreo de todas las vacas en lactación próximas al secado, con el propósito de conocer el estado sanitario de las ubres de dichos animales (Figura 11). Para tal fin, se les extrajo de manera estéril una muestra de cuartos de leche para la determinación de RCS y estudios bacteriológicos. Las muestras fueron refrigeradas a 4°C, transportadas al laboratorio y procesadas dentro de las 24 h posteriores a la toma de muestras.

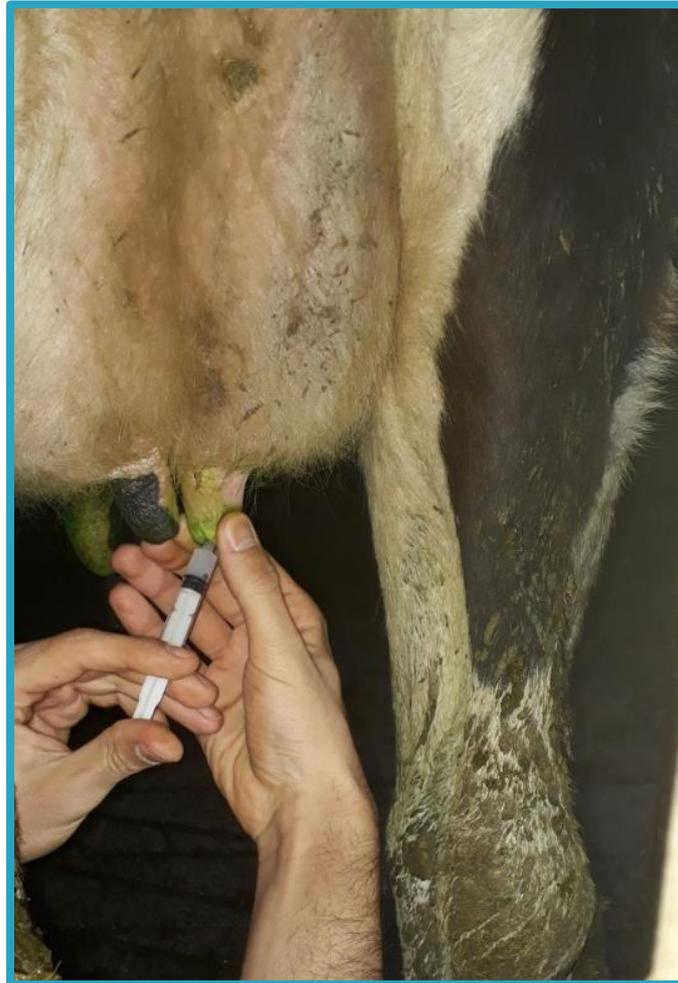
Además, en esta instancia se recolectaron datos del control lechero de los animales muestreados, como número de pariciones, fecha de parto, días en lactancia y litros producidos.

### **3.12.3. Grupo experimental**

Sobre la base de los resultados obtenidos del relevamiento del establecimiento lechero realizado, se seleccionaron 8 vacas próximas al secado, sanas y en buen estado de salud. Las mismas fueron negativas al examen bacteriológico (libres de los principales patógenos de mastitis bovina) y con un recuento de células somáticas inferior a 250.000 cél/ml.

### **3.12.4. Inoculación**

Previo a la inoculación de las vacas, todos los pezones fueron lavados con agua, desinfectados con alcohol al 70% y secados con papel absorbente, y se extrajo de manera estéril una muestra de cuartos de leche para la determinación de RCS y bacteriología. La dosis fue introducida por vía intramamaria a una profundidad de 17 mm (dentro del canal del pezón) mediante el empleo de una jeringa sin aguja (Ryan y col., 1999a; Crispie y col., 2008; Frola y col., 2011). Seguidamente, los pezones fueron masajeados suavemente con la finalidad de favorecer el ascenso de la dosis (Figura 10). Todas las inoculaciones fueron realizadas el día del secado, considerado en este estudio como día cero, luego del ordeño matutino



**Figura 10: Inoculación intramamaria.**

De un total de 32 cuartos pertenecientes a los 8 animales seleccionados, se inocularon 25 cuartos, según se detalla en la Tabla 3. Se administró 1 ml de compuesto y de forma aleatoria entre todos los cuartos seleccionados. No se inoculó a dos cuartos de una misma vaca con el mismo compuesto para evitar efectos adversos que pudieran afectar al estudio por cuestiones intrínsecas de cada animal, como por ejemplo alergias.

**Tabla 4: Condiciones de inoculación y cantidad de cuartos utilizados en el ensayo de inoculación en animales.**

Condición en el ensayo	Cantidad de cuartos
Control	3
Antibiótico habitual	2
Fructosa	2
<i>Echinacea spp.</i>	3
Sepigel	4
BLs	2
Diluyente completo solo	4
Diluyente completo + BLs	5

### 3.12.5. Muestreo post- inoculación y análisis del estado de los animales

A las 24hs luego de la inoculación, se evaluó el estado general de los cuartos de los animales inoculados y no inoculados respecto a signos y síntomas clínicos. Además, se extrajo de manera estéril una muestra de cuartos de leche para la determinación de RCS y bacteriología. Las muestras fueron refrigeradas a 4°C, transportadas al laboratorio y procesadas dentro de las 24 h posteriores a la toma de muestras. Lo mismo se realizó a las 48hs post-inoculación y a los 7 días (Figura 11).

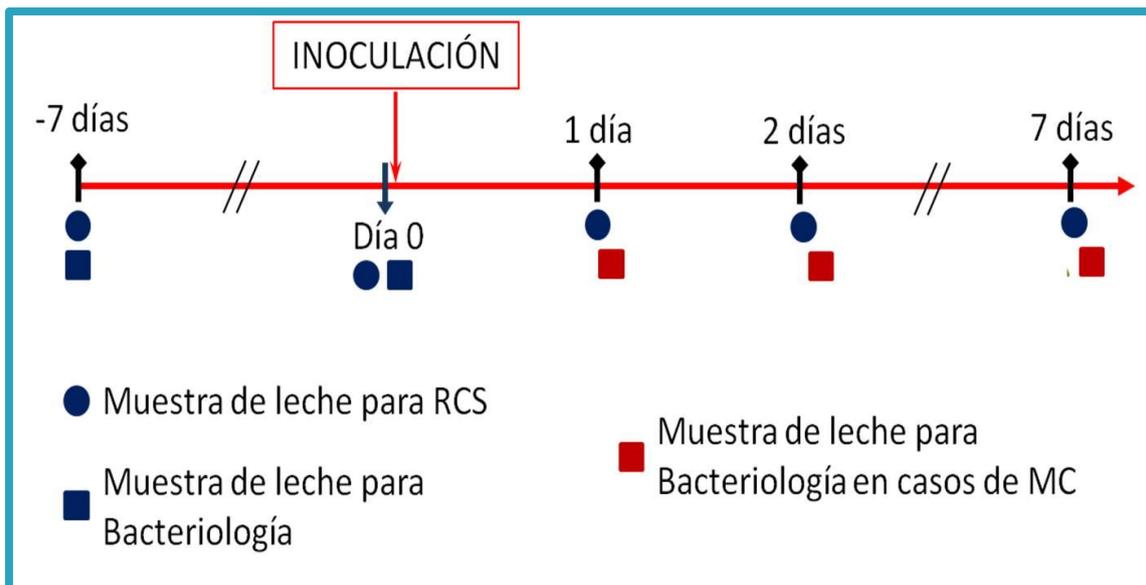


Figura 11: Esquema de toma de muestras e inoculación realizada en el ensayo a campo.

### 3.12.6. Recuento Celular Somático directo

Para llevar a cabo este análisis se desarrolló el método directo de recuento celular en leche según lo describe la IDF (1979). Se extendieron 0,01 ml de leche en una superficie de 1 cm<sup>2</sup> con una micropipeta en un portaobjeto limpio y libre de grasa. Se dejó secar a temperatura ambiente durante 6 horas. Luego se realizó la tinción de los extendidos durante 10 minutos con el reactivo para RCS preparado como se detalla en la sección 11.9., se eliminó el excedente de colorante y se dejó secar a temperatura ambiente durante 6-8 horas. Finalmente se lavó tres veces con agua tibia.

*Cálculo del Factor del Microscopio:* se calculó el área del campo del objetivo y se lo convirtió a cm<sup>2</sup>. Posteriormente se determinó el número de campos por cm<sup>2</sup>, dividiendo el cm por el área del campo. Como la cantidad de leche que se extiende sobre 1 cm<sup>2</sup> es 0,01 ml, se debe multiplicar el número de campos por mililitros de leche.

La siguiente fórmula resume las conversiones necesarias para lograr el resultado en 1 ml de leche.

$$F.M.= 10000/(\pi r^2)$$

*Lectura:* se examinó con objetivo de inmersión contando tantos campos como exactitud se quiera otorgar al conteo; en conteos de rutina el promedio ronda los 50 – 100 campos.

Se contaron todas las células somáticas nucleadas dentro del campo, incluyendo aquellas de la periferia con más del 50% de su cuerpo dentro del campo. Los núcleos libres que representan más del 50% del material nuclear también se contaron. No se computaron masas citoplasmáticas sin núcleo ni pequeños fragmentos celulares con poco material nuclear.

Para obtener el número de células somáticas por ml de leche, se multiplicó el factor del microscopio por el promedio de células por campo.

$$\text{RCS} = \text{F.M} \times \text{Promedio de células por campo}$$

### 3.12.7. Análisis bacteriológico para muestras de leche

Las muestras de leche se llevaron a temperatura ambiente y se homogenizaron. Se sembraron 10 µl de leche, con ansa calibrada para tal fin, en agar TSA conteniendo sangre de carnero al 5%. Las placas se incubaron a 37°C durante 24h-48 h y se registró la morfología de la colonia, el patrón hemolítico ( $\alpha$  y/o  $\beta$ ) y la producción de pigmento. Las colonias crecidas fueron transferidas con ansa a una placa conteniendo TSA, a partir de la cual se les realizó la tinción de Gram. A los microorganismos con morfología de cocos y tinción correspondiente a Gram (+), se les realizó la prueba de la catalasa para diferenciarlos en *Streptococcus* spp y *Staphylococcus* spp. A los cocos Gram (+) catalasa (+) se les realizó la prueba de la coagulasa.

Las pruebas utilizadas para la identificación de familia se detallan a continuación:

**Producción de catalasa:** se realizó siguiendo la metodología descrita en el punto 13.1. de esta sección.

**Producción de hemolisinas:** la producción de  $\alpha$  y  $\beta$  hemolisinas se evidenció en placas de agar TSA conteniendo sangre de carnero al 5% como un halo transparente ( $\alpha$ ) o translúcido verdoso ( $\beta$ ) luego de 24 h de incubación a 37°C y transparente luego de 12h-24 h a 4°C.

**Producción de coagulasa:** se inocularon 5 ml de caldo BHI, y se lo incubó durante 18h a 37°C con agitación para obtener microorganismos en fase exponencial de crecimiento. Posteriormente, 300 µl del cultivo se colocaron en un tubo estéril, al cual se le agregaron 300 µl de plasma de conejo. El tubo se incubó en baño de agua a 37°C, y se observó la formación de coágulo a las 4 h y a las 24 h.

### 3.13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos se cargaron en hojas de cálculos del programa estadístico INFOSTAT. Se realizaron gráficos particionados por cepas y dilución y se calcularon las medidas de resumen (media, varianza, mínimos y máximos). Para determinar la significancia de los resultados, se realizó un ANOVA para medidas repetidas considerando un  $p < 0,05$  como una diferencia estadísticamente significativa

## 4. RESULTADOS Y DISCUSION:

### 4.1. CINÉTICA DE CRECIMIENTO

#### 4.1.1. Curva de crecimiento y de calibrado

Al realizar las curvas de crecimiento de ambas cepas probióticas, se observó una curva característica de crecimiento bacteriano (Figura 12). Durante las primeras horas de incubación, se pudo observar un periodo de latencia en el cual las bacterias son capaces de adaptarse a las nuevas condiciones de cultivo, seguida por una fase de crecimiento exponencial, en el cual se alcanza la mayor velocidad de crecimiento. Este es uno de los parámetros que permite, junto al tiempo de generación, comparar la cinética de crecimiento de ambas bacterias y además ver el comportamiento de estas frente a diferentes condiciones de cultivo. Luego, se observa una fase estacionaria, en la cual el crecimiento bacteriano comienza a disminuir por agotamiento de nutrientes y acumulación de residuos que hacen del medio de cultivo un ambiente no apto para el crecimiento bacteriano.

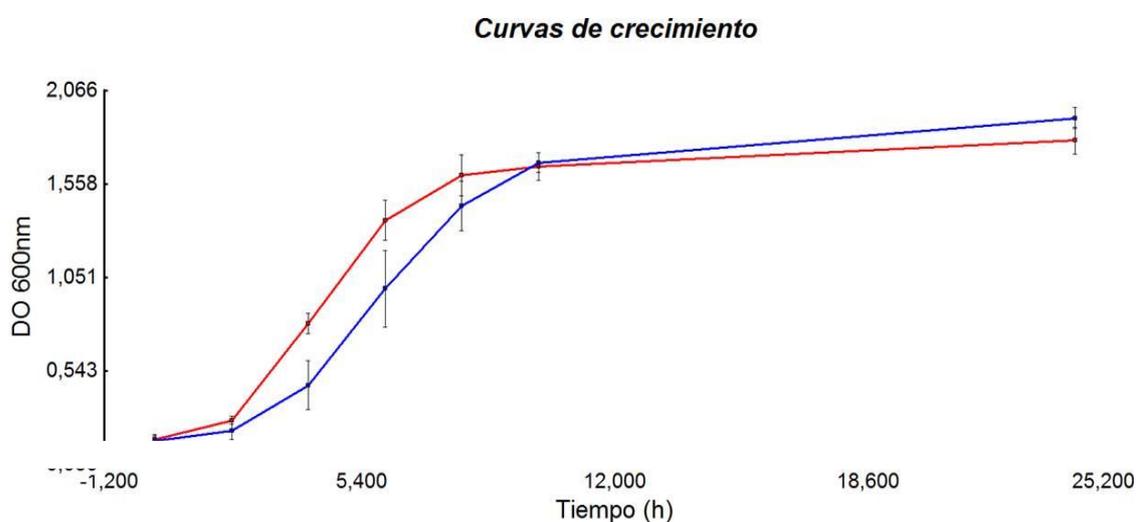
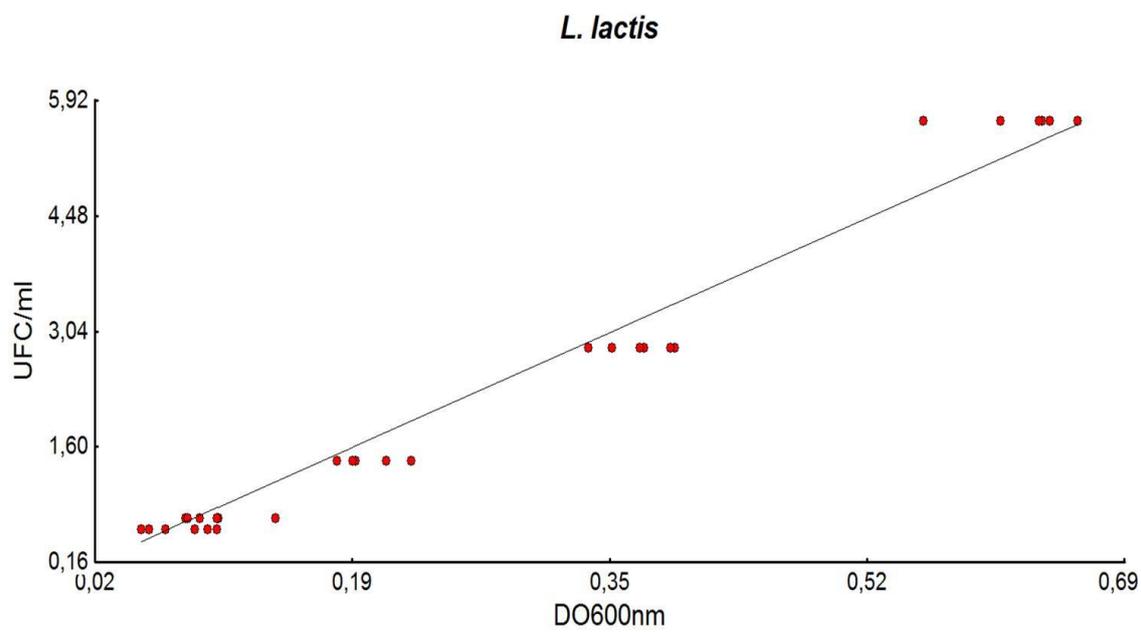


Figura 12: Curvas de crecimiento correspondientes a *L. lactis subsp lactis* CRL1655 (rojo) y *L. perolens* CRL1724 (azul).

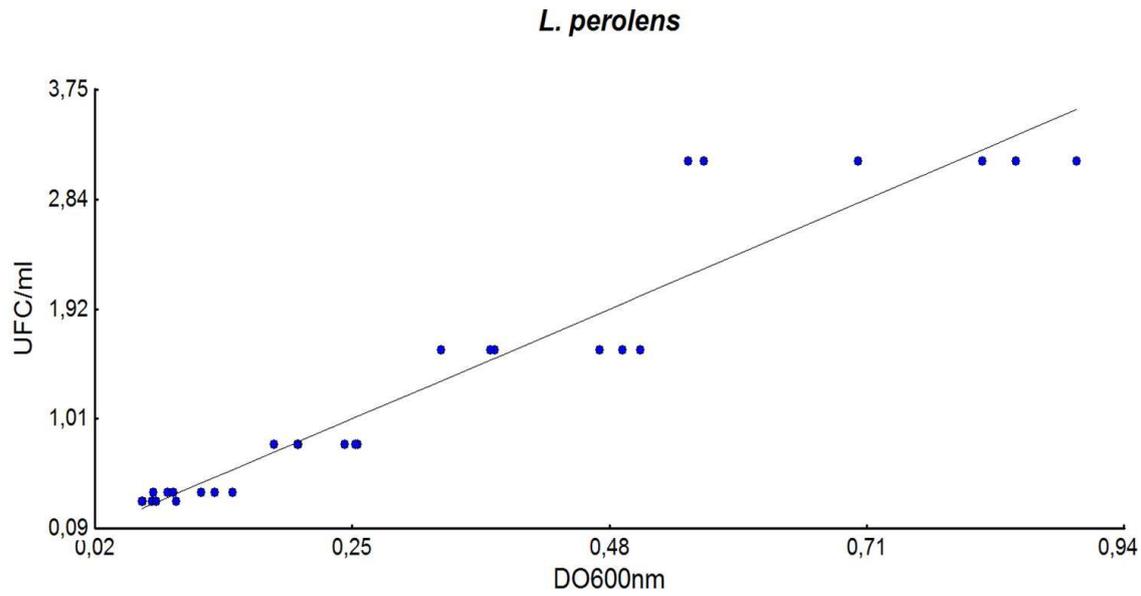
■ *Lactococcus lactis subsp. Lactis* CRL 1655    ■ *Lactobacillus perolens* CRL 1724

Para *Lactococcus lactis* subs *lactis* CRL 1655 se obtuvo una velocidad de crecimiento de 0,21 generaciones/hora y un tiempo de generación de 3,21 hora\*generación<sup>-1</sup>, lo cual significa que cada 3,21hs toda la población se duplica. En el caso de *Lactobacillus perolens* CRL 1724, la velocidad de crecimiento fue menor, siendo esta de 0,308 generaciones/hora. El tiempo de generación fue de 2,24 hora\*generación<sup>-1</sup>. Esto permitió concluir que *Lactococcus lactis* subs *lactis* CRL 1655 presenta un crecimiento superior a *Lactobacillus perolens* CRL 1724.

En la Figura 13 y Figura 14, se presentan las curvas de calibrado de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CRL 1655 y *Lactobacillus perolens* CRL1724, respectivamente. Se puede observar una tendencia lineal entre las UFC/ml y la DO600nm en ambos casos, lo cual permite realizar inferencias sobre el recuento bacteriano simplemente midiendo la DO600nm.



**Figura 13: Curva de calibración perteneciente a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CRL 1655.**



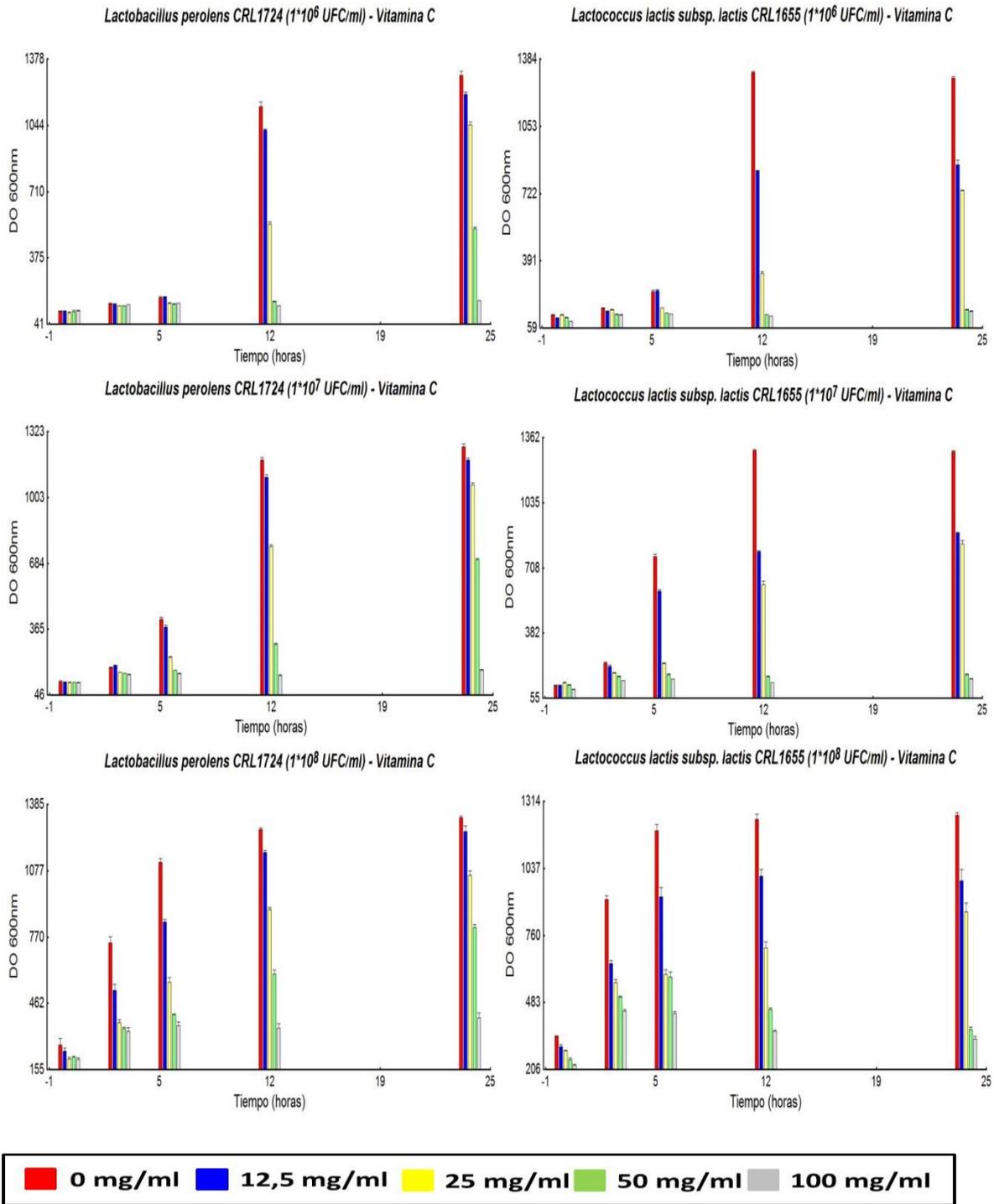
**Figura 14: Curva de calibración perteneciente a *Lactobacillus perolens* CRL 1724.**

#### 4.2. DETERMINACIÓN DE LA CIM POR MICROTÉCNICA

Mediante esta técnica, se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias de la vitamina C, vitamina D, del ácido salicílico, la fructosa y del Sepigel. La inhibición del crecimiento por la microtécnica de CIM, no se pudo llevar a cabo para los fitocompuestos, ya que estos presentaron una coloración intensa y partículas en suspensión en el sobrenadante, lo que hizo imposible poder determinar este parámetro utilizando densidad óptica.

Al analizar los resultados obtenidos al ensayar la Vitamina C, se encontró que este compuesto presenta un efecto antimicrobiano para ambas BLs a concentraciones de 50 y 100mg/ml. Esto se evidenció por una gran diferencia en cuanto a la medición de la DO600nm de estos casos en comparación con el control (MRS + bacterias) ( $p < 0,05$ ). Esto puede observarse en la Figura 15, donde las barras verde y gris permanecieron prácticamente del mismo tamaño a largo de todo el ensayo, indicando que la presencia de la vitamina a estas concentraciones no permitió el crecimiento bacteriano, excepto cuando la concentración de inóculo inicial fue la más elevada. *Lactobacillus perolens* CRL 1724 mostró un retraso del crecimiento a 50 mg/ml, concentración que inhibió fuertemente el crecimiento de *L. lactis subs lactis* CRL 1655, en todas las concentraciones bacterianas probadas. En cuanto a aquellas concentraciones menores, de 25 y 12,5 mg/ml, barras amarilla y azul respectivamente,

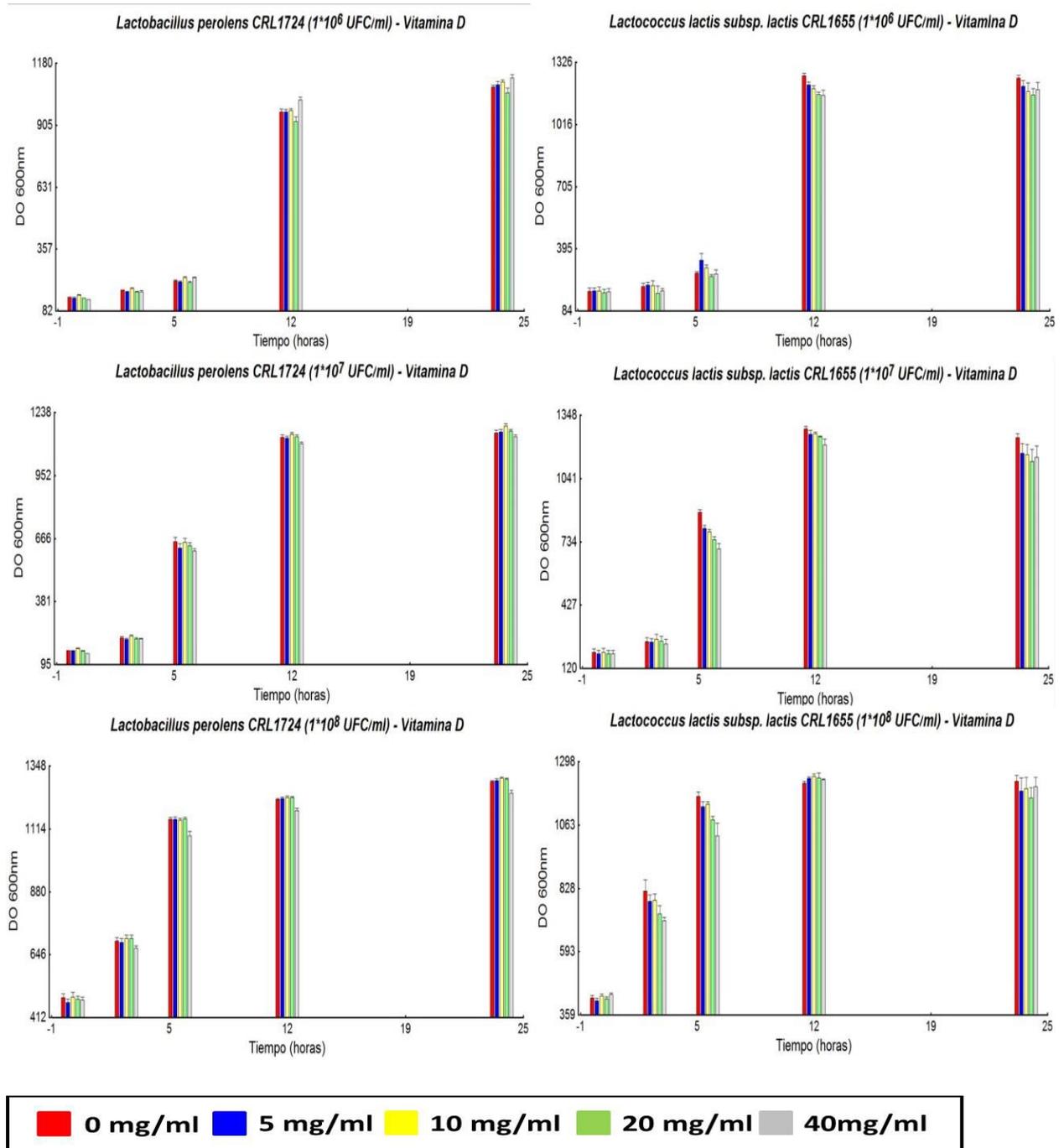
las medidas obtenidas fueron menores a las del control pero la diferencia no fue significativa ( $p > 0,05$ ) para *Lactobacillus perolens* CRL1724. Por su parte, *Lactococcus lactis* subs *lactis* CRL 1655 si fue inhibido a una concentración de 25 mg/ml, pero no a 12,5 mg/ml. Es decir, **la única concentración que no mostró efecto antimicrobiano** ( $p > 0,05$ ) **sobre ninguna de las dos BLs fue la de 12,5 mg/ml.**



**Figura 15: Concentración inhibitoria mínima (CIM) (microtécnica) para Vitamina C. Barras a la izquierda: *Lactobacillus perolens* CRL. Barras a la derecha: *Lactococcus lactis subsp. lactis* CRL 1655.**

Con respecto a la vitamina D, no se observó inhibición del crecimiento para ninguna de las BLs a las concentraciones ensayadas independientemente de las

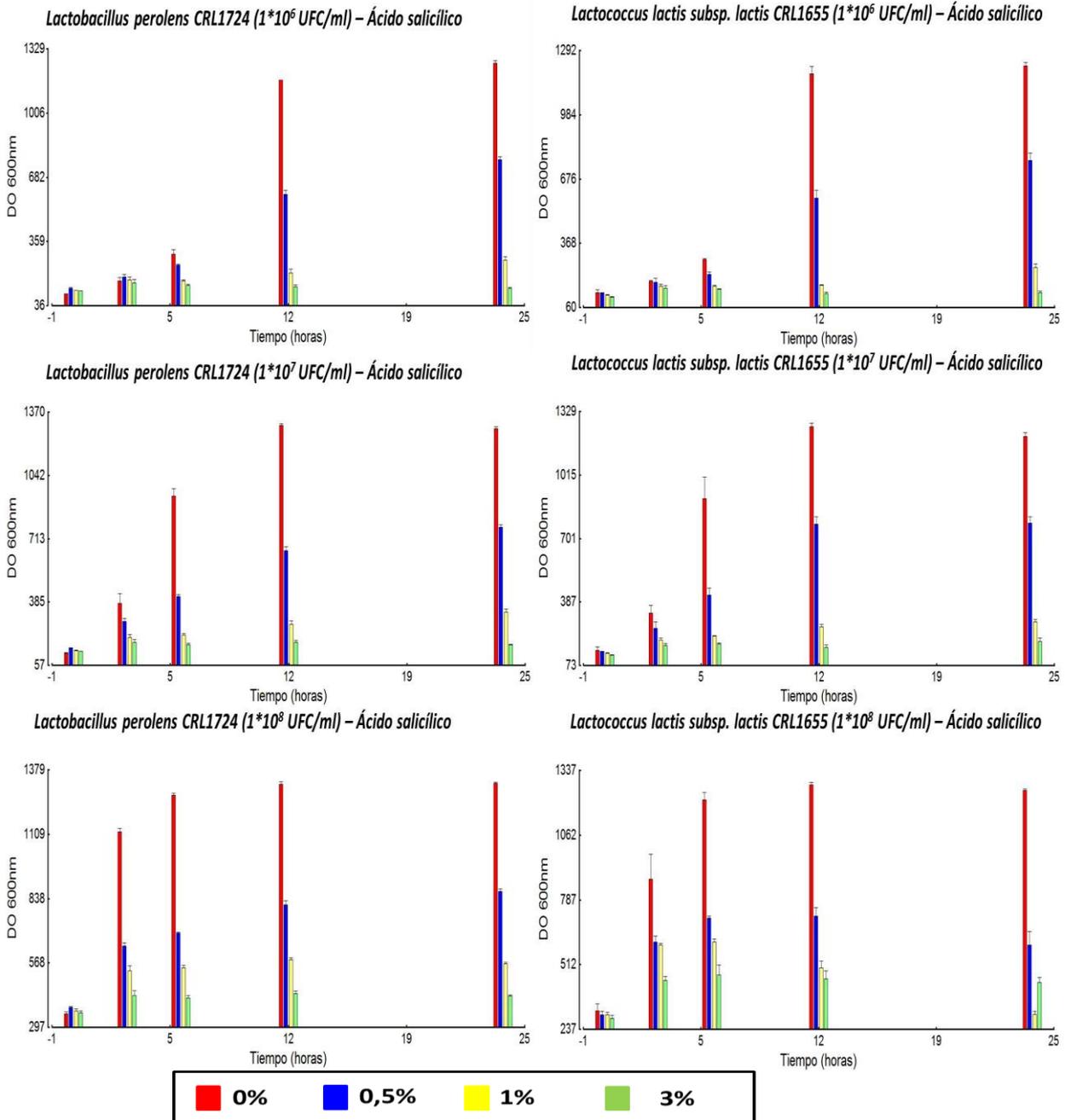
concentraciones bacterianas empleadas. Las pequeñas diferencias observadas no fueron estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ )



**Figura 16: Concentración inhibitoria mínima (CIM) (microtécnica) para Vitamina D. Barras a la izquierda: *Lactobacillus perolens* CRL. Barras a la derecha: *Lactococcus lactis subsp. lactis* CRL 1655.**

Por otro lado, como se observa en la Figura 17, el ácido salicílico, que posee acción reparadora del tejido, demostró un efecto inhibitor en todas las concentraciones evaluadas (0,5 – 3%) para las tres concentraciones bacterianas

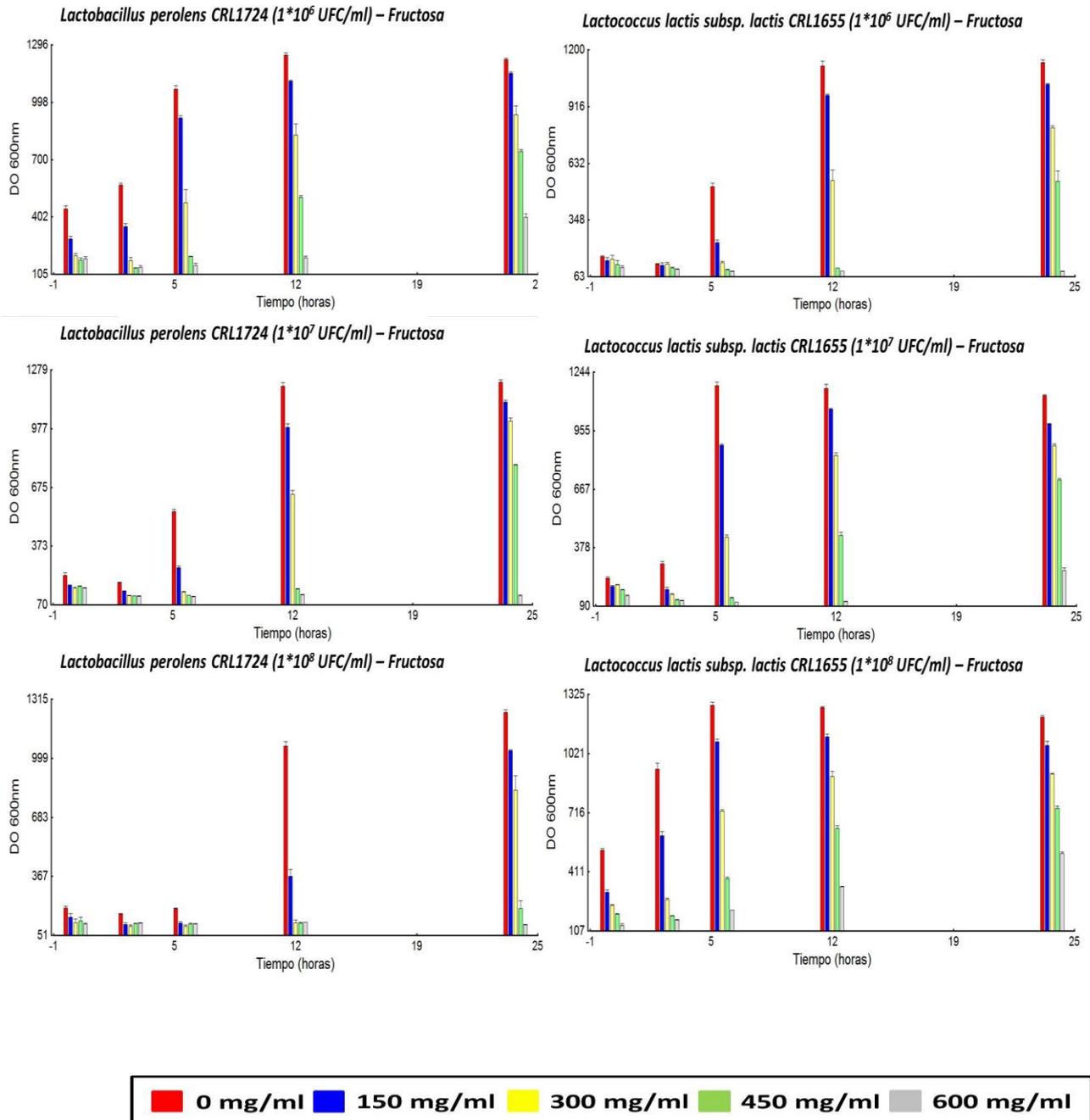
probadas en ambas cepas probióticas ( $p < 0,05$ ). Las barras correspondientes al control (MRS + bacterias), muestran un crecimiento normal, mientras que en el resto de las barras se evidencia la inhibición provocada por el ácido salicílico. Las diferencias observadas de las medidas de absorbancia fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) para ambas cepas en todas las concentraciones probadas.



**Figura 17: Concentración inhibitoria mínima (CIM) (microtécnica) para Ácido salicílico. Barras a la izquierda: *Lactobacillus perolens* CRL. Barras a la derecha: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CRL 1655.**

En el caso de la fructosa (Figura 18), utilizada como crioprotector, se observó una inhibición total del crecimiento en ambas BLs a una concentración de 600 mg/ml ( $p < 0,05$ ). Concentraciones de 300 y 450 mg/ml evidenciaron un retardo del crecimiento de ambas BLs a una concentración del inóculo inicial de  $1 \cdot 10^6$  UFC/ml ( $p < 0,05$ ), mientras que no tuvieron un efecto inhibitorio a concentraciones bacterianas de  $1 \cdot 10^8$  y  $1 \cdot 10^7$  UFC/ml a las

24 horas de crecimiento ( $p>0,05$ ). A 150 mg/ml las BLs, no fueron inhibidas a ninguna de las concentraciones de inóculo ( $p>0,05$ ).



**Figura 18 : Concentración inhibitoria mínima (CIM) (microtécnica) para Fructosa. Barras a la izquierda: *Lactobacillus perolens* CRL. Barras a la derecha: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CRL 1655.**

Por otro lado, se decidió probar excipientes que permitieran dar mayor consistencia al producto con el fin de evitar el derrame del mismo al ser inoculado en las glándulas mamarias. Entorno a esto se probaron: estearato de aluminio y, vaselina líquida y sólida. Ambos mostraron dificultad a la hora de homogenizarlos. El estearato de aluminio (insoluble en agua y alcohol) pudo ser resuspendido solamente en una solución de aceites minerales que mostró inhibición total en el crecimiento de ambas BLs ( $p < 0,05$ ). Lo mismo sucedió con la vaselina, tanto en forma líquida como sólida.

Considerando que las BLs liofilizadas necesitan ser hidratadas y se deben resuspender de manera homogénea en la formulación, se decidió evaluar Sepigel 305. Este compuesto permitió obtener una consistencia espesa, al ser agregado en una concentración del 1%, similar a la que presentan los pomos de antibióticos utilizados al secado. Por esta razón, se decidió probar si esta concentración, inhibía el crecimiento de las BLs. Los resultados (Figura 19) mostraron que no hubo inhibición de ninguna de las dos cepas probióticas, siendo considerado este compuesto a la concentración ensayada como un posible agente espesante a ser incluido en el producto final.

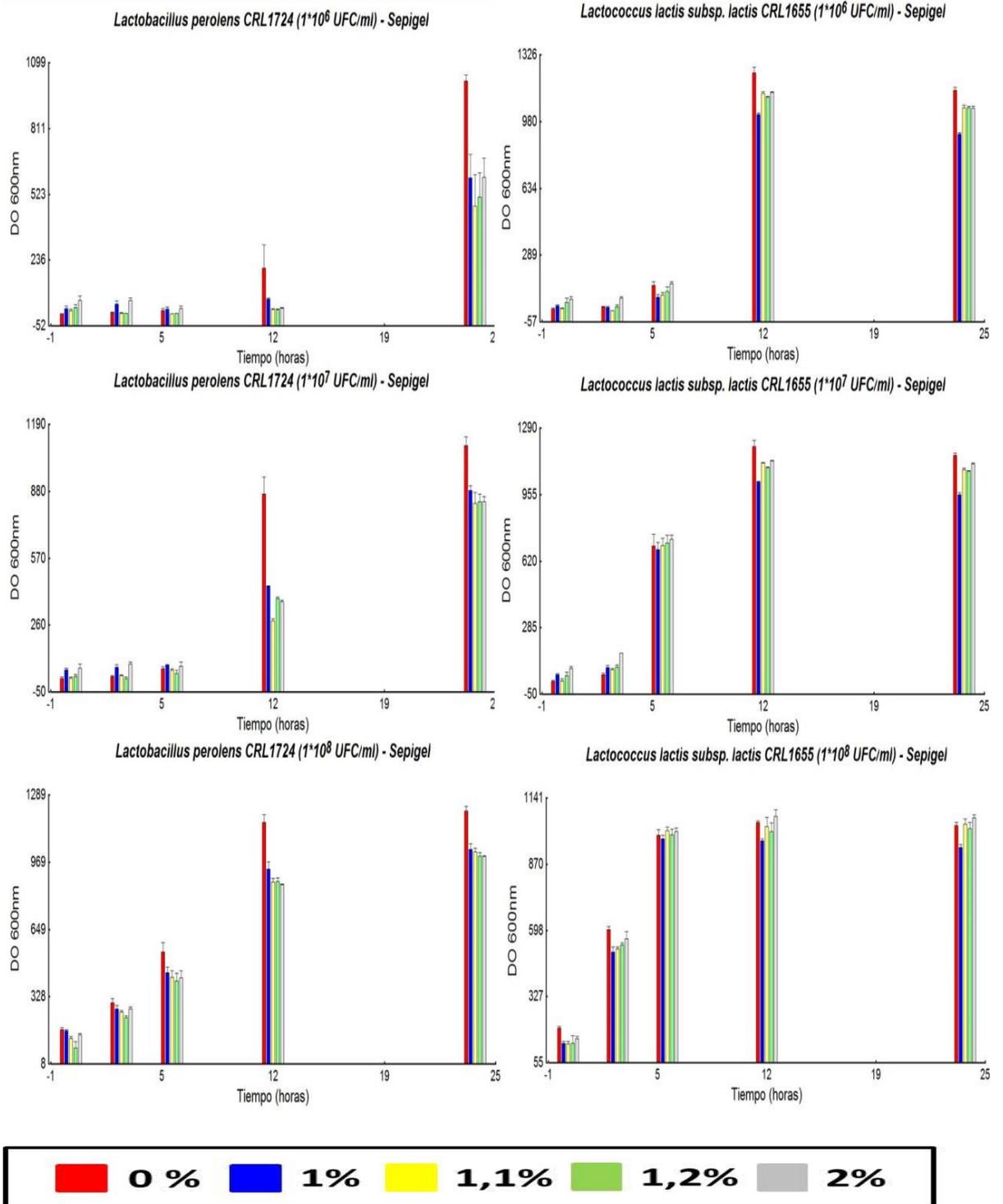


Figura 19: Concentración inhibitoria mínima (CIM) (microtécnica) para Sepigel. Barras a la Izquierda: *Lactobacillus perolens* CRL. Barras a la derecha: *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* CRL 1655.

Los resultados obtenidos de estos ensayos permitieron seleccionar a ambas vitaminas, a la fructosa y al Sepigel como candidatos a ser agregados al producto final

y continuar con los siguientes ensayos, en los cuales también pudieron ser evaluados los fitocompuestos. Debido a su característica de presentar efecto antimicrobiano, la vaselina, tanto líquida como sólida, el estearato de aluminio, y el ácido salicílico fueron descartados.

#### 4.3. EFECTO INHIBITORIO EN PLACA

En el caso de los tres fitocompuestos ensayados (*Equinacea*, *Aloe vera* y *Centella asiática*), se observó que ninguna de las concentraciones utilizadas (6,25 y 50 mg/ml) produjo inhibición de ninguna de las dos cepas probióticas (Tabla 5). Si bien en numerosos trabajos se utilizan a estos compuestos por su actividad antimicrobiana, en este caso, lo que se persigue es conseguir un efecto inmunomodulador en el animal, por lo que las concentraciones utilizadas son mucho menores a las comúnmente usadas, y no causan inhibición del desarrollo de ninguna de las BLs en estudio, en concentraciones de hasta 50 mg/ml.

La vitamina D y el Sepigel, mostraron un comportamiento similar al de los fitocompuestos, sin provocar efecto antimicrobiano, observándose desarrollo y crecimiento en todas las placas sembradas, sin importar la concentración utilizada de ambos compuestos (Tabla 5).

Para ambas BLs, la vitamina C, a una concentración de 12.5 mg/ml, no tuvo efecto inhibitorio (Tabla 5). Además, a una concentración de 25 mg/ml se pudo observar que el efecto inhibitorio depende de la concentración del inóculo con el cual se trabajó, siendo un agente antibacteriano a una concentración de  $10^6$  UFC/ml, pero no a  $10^7$  ni a  $10^8$  UFC/ml, lo que se evidenció de una manera cualitativa dependiendo de la opacidad de la gota crecida.

Lo mismo sucedió con la fructosa, que a concentraciones menores a 300 mg/ml no causó efecto bactericida, a 300 mg/ml dependió del inóculo inicial, y a mayores concentraciones no se observó desarrollo microbiano. Esto se puede deber a que concentraciones elevadas, mayores a 300 mg/ml, la fructosa disminuya considerablemente el agua disponible en el medio de cultivo, imposibilitando así el desarrollo de las BLs (Tabla 5).

En el caso del ácido salicílico, al igual que lo ocurrido en la determinación de la CIM, mostró efecto inhibitorio a todas las concentraciones probadas (0,25 – 3%) para ambas BLs.

**Tabla 5: Resultados de la inhibición de los compuestos evaluados por la Técnica de Dilución en Agar**

<b>Compuestos evaluados por Técnica de Dilución en Agar</b>					
<b>Vitamina C (mg/ml)</b>					
	0	12,5	25	50	100
<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> CRL 1655	+	+	+/-	-	-
<i>Lactobacillus perolens</i> CRL 1724	+	+	+/-	-	-
<b>Vitamina D (mg/ml)</b>					
	0	5	10	20	40
<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> CRL 1655	+	+	+	+	+
<i>Lactobacillus perolens</i> CRL 1724	+	+	+	+	+
<b>Aloe vera (mg/ml)</b>					
	0	6,25	12,5	25	50
<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> CRL 1655	+	+	+	+	+
<i>Lactobacillus perolens</i> CRL 1724	+	+	+	+	+
<b>Equinacea (mg/ml)</b>					
	0	6,25	12,5	25	50
<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> CRL 1655	+	+	+	+	+
<i>Lactobacillus perolens</i> CRL 1724	+	+	+	+	+
<b>Centella asiática (mg/ml)</b>					
	0	6,25	12,5	25	50

<b><i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> CRL 1655</b>	+	+	+	+	+
<b><i>Lactobacillus</i> <i>perolens</i> CRL 1724</b>	+	+	+	+	+
<b>Ácido Salicílico (%)</b>					
	<b>0</b>	<b>0,25</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>	<b>3</b>
<b><i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> CRL 1655</b>	+	+/-	-	-	-
<b><i>Lactobacillus</i> <i>perolens</i> CRL 1724</b>	+	+/-	-	-	-
<b>Sepigel 305 (%)</b>					
	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1,1</b>	<b>1,2</b>	<b>2</b>
<b><i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> CRL 1655</b>	+	+	+	+	+
<b><i>Lactobacillus</i> <i>perolens</i> CRL 1724</b>	+	+	+	+	+
<b>Fructosa (mg/ml)</b>					
	<b>0</b>	<b>150</b>	<b>300</b>	<b>450</b>	<b>600</b>
<b><i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> CRL 1655</b>	+	+	+/-	-	-
<b><i>Lactobacillus</i> <i>perolens</i> CRL 1724</b>	+	+	+/-	-	-

(+): Sin efecto inhibitorio en todas las concentraciones bacterianas ensayadas.  
 (+/-): son efecto inhibitorio en al menos una de las concentraciones bacterianas ensayadas. (-): con efecto inhibitorio en todas las concentraciones bacterianas ensayadas.

Considerando los resultados obtenidos en las técnicas de micro CIM e inhibición en placa, se seleccionaron los siguientes compuestos y concentraciones para realizar las curvas de muerte, a fin de corroborar todos los resultados obtenidos y realizar el ensayo a campo para evaluar el efecto en ubres de bovinos al secado.

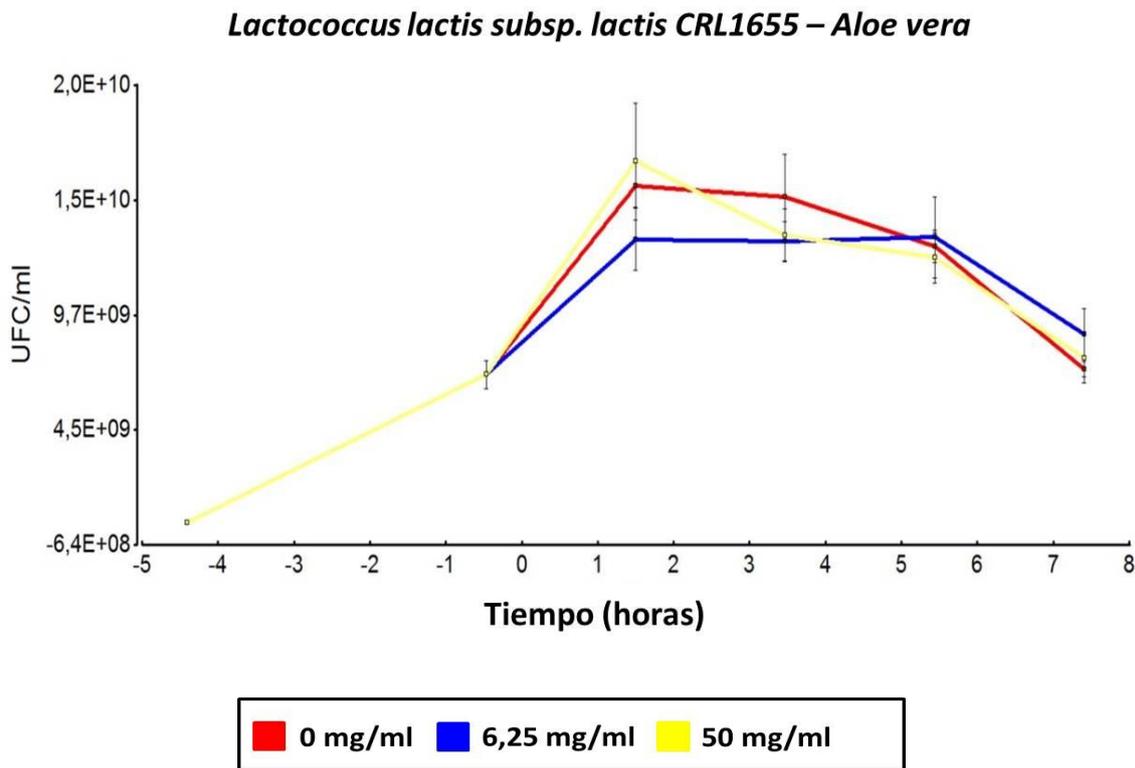
- Fitocompuestos (*Equinacea*, *Aloe vera* y *Centella asiática*): 6,25mg/ml y 50mg/ml.
- Vitamina C: 12,5mg/ml y 25mg/ml
- Fructosa: 10mg/ml y 400mg/ml.
- Sepigel: 1%

El ácido salicílico fue descartado como excipiente por su fuerte efecto inhibitorio de ambas BLs. Además, la vitamina D es liposoluble, lo que dificulta su solubilidad en el medio de cultivo utilizado, haciendo complicada la realización de los ensayos. Además, en el formulado final se espera que contenga uno de los tres fitocompuestos, el agente espesante, fructosa, una de las vitaminas y ambas BLs liofilizadas. Todo esto, formaría parte de un preparado seco, que debe ser re-hidratado antes de ser aplicado, para lo cual se utiliza agua, lo que dificulta la solubilización de la vitamina D. También, es una vitamina de muy alto costo, que elevaría el precio del producto final, disminuyendo la rentabilidad del tamero. Es por esto, que si bien la vitamina D no ejerció efecto inhibitorio de las BLs en estudio, fue descartada.

#### 4.4. CURVAS DE MUERTE

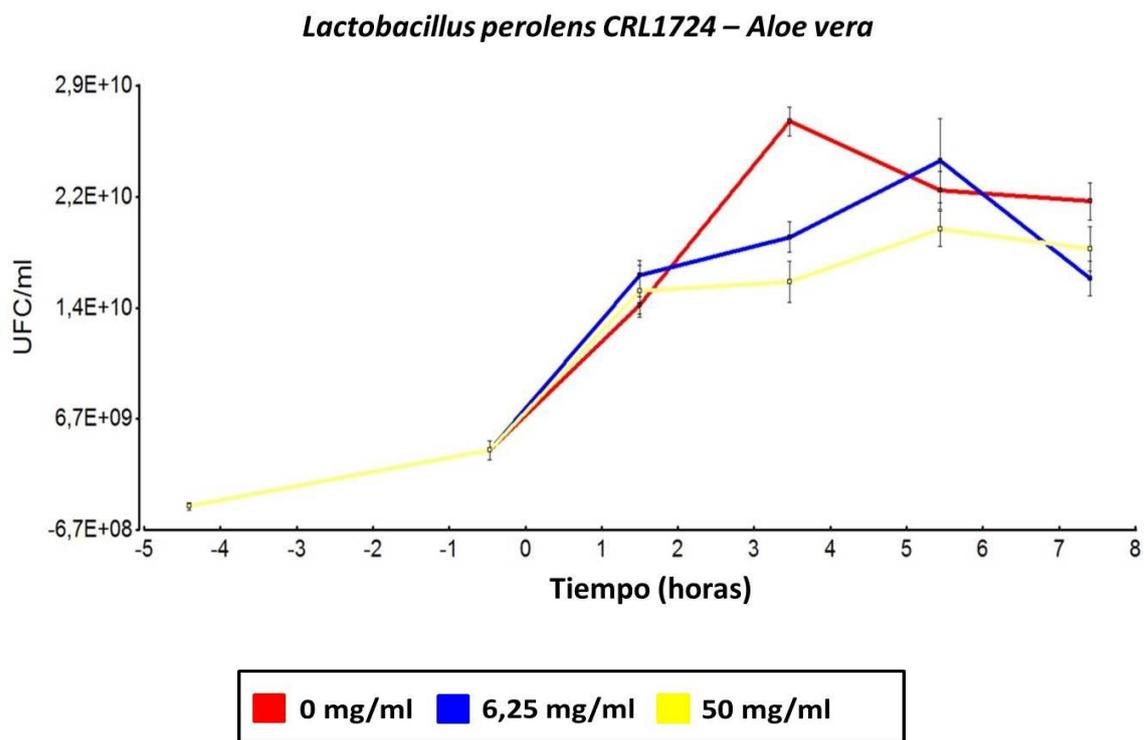
##### 4.4.1. Fitocompuestos

En el caso del *Aloe vera*, se observó, al igual que en los ensayos realizados anteriormente, que no posee actividad antimicrobiana a ninguna de las dos concentraciones ensayadas para ambas BLs, ya que no hubo diferencia significativa de los recuentos de estos en comparación con el control positivo ( $p > 0,05$ ). Además, a lo largo del tiempo, siempre actuó de igual manera sobre los microorganismos, sin importar el tiempo que este en contacto con las bacterias, no las inhibe. Los dos tratamientos efectuados (6,25 mg/ml y 50 mg/ml) y el control de crecimiento, se comportaron de manera similar y se obtuvo una curva de muerte normal. En la Figura 20 se puede observar el efecto de ambas concentraciones de este fitocompuesto (6,25 y 50 mg/ml) frente a *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CRL 1655. En dicha Figura se puede observar que las tres curvas siguen un patrón similar, y no se separan abruptamente a lo largo del tiempo. Si bien la línea roja, correspondiente al control de crecimiento (sin fitocompuestos), pareciera representar un crecimiento mayor de este, al final de la curva, todos los tratamientos decaen hasta un recuento muy similar ( $p > 0,05$ ).



**Figura 20:** Curva de muerte de *Lactococcus lactis subsp. lactis* CRL1655 en presencia de diferentes concentraciones de *Aloe vera*.

Resultados similares se obtuvieron para *Lactobacillus perolens* CRL 1724 (Figura 21), donde se puede observar que no hay diferencias significativas entre las 3 curvas ( $p > 0,05$ ), y en este caso, la línea amarilla, correspondiente a una concentración de *Aloe vera* de 50 mg/ml, siempre permanece por debajo de las otras dos.



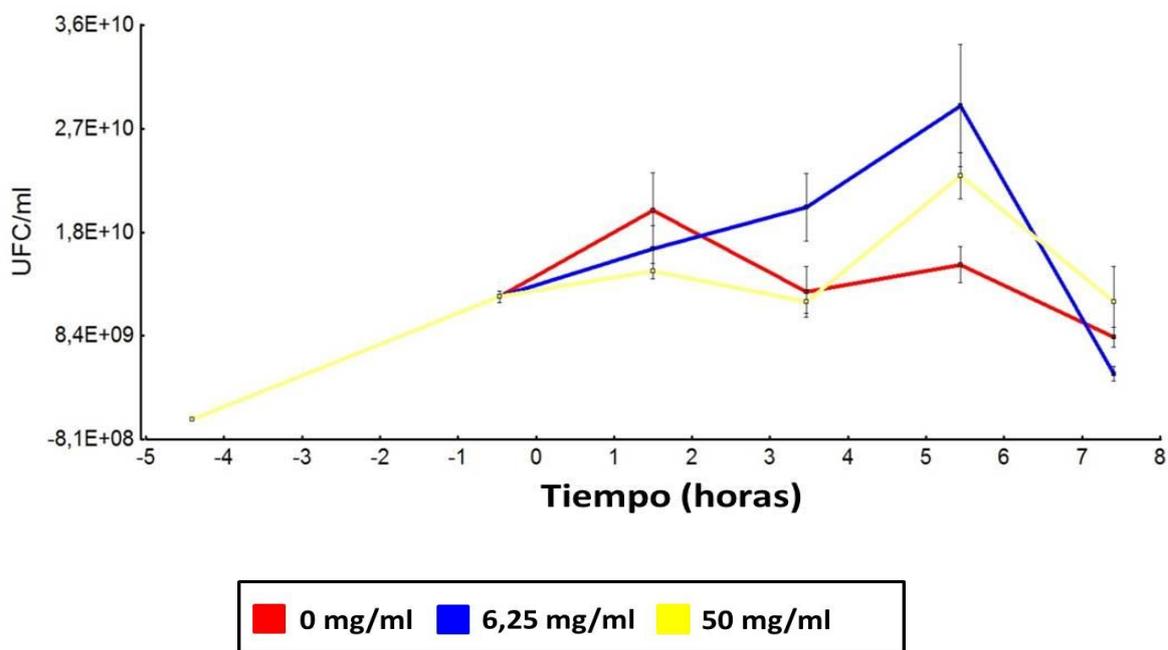
**Figura 21: Curva de muerte de *Lactobacillus perolens* CRL1724 en presencia de diferentes concentraciones de *Aloe vera*.**

Los resultados obtenidos están en concordancia con los encontrados en los ensayos previos. En un estudio realizado por Martínez y col. (1996), se evaluó el efecto antimicrobiano de un extracto liofilizado de *Aloe vera* sobre diferentes especies bacterianas patógenas, como *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, etc. El extracto fue probado a una concentración de 10 y 50 mg/ml, y los resultados obtenidos indicaron que el compuesto liofilizado de *Aloe vera* no tiene efecto inhibitorio alguno sobre los microorganismos estudiados. Si bien Sánchez-Monge (1980), en un estudio previo, había determinado que el *Aloe vera* inhibe a *P. aeruginosa*, tal diferencia pudo atribuirse a que el efecto antibacteriano descrito se obtuvo con el jugo de hojas frescas y de la planta seca y no con liofilizados preparados a partir de un extracto acuoso. Esta información, permitiría inferir porqué el extracto seco utilizado para evaluar la actividad antimicrobiana de las BLs no fue inhibitorio.

La *Centella asiática*, al igual que el *Aloe vera*, demostró no ser inhibitoria a ninguna de las dos concentraciones probadas (6,25 y 50 mg/ml) para las dos BLs. Si bien en las Figuras 22 y 23, correspondientes a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CRL 1655 y *Lactobacillus perolens* CRL 1724 respectivamente, se puede apreciar una

diferencia más marcada entre la curva del control y las correspondientes a las dos concentraciones de *C. asiática*, la diferencia observada no fue significativa ( $p > 0,05$ ).

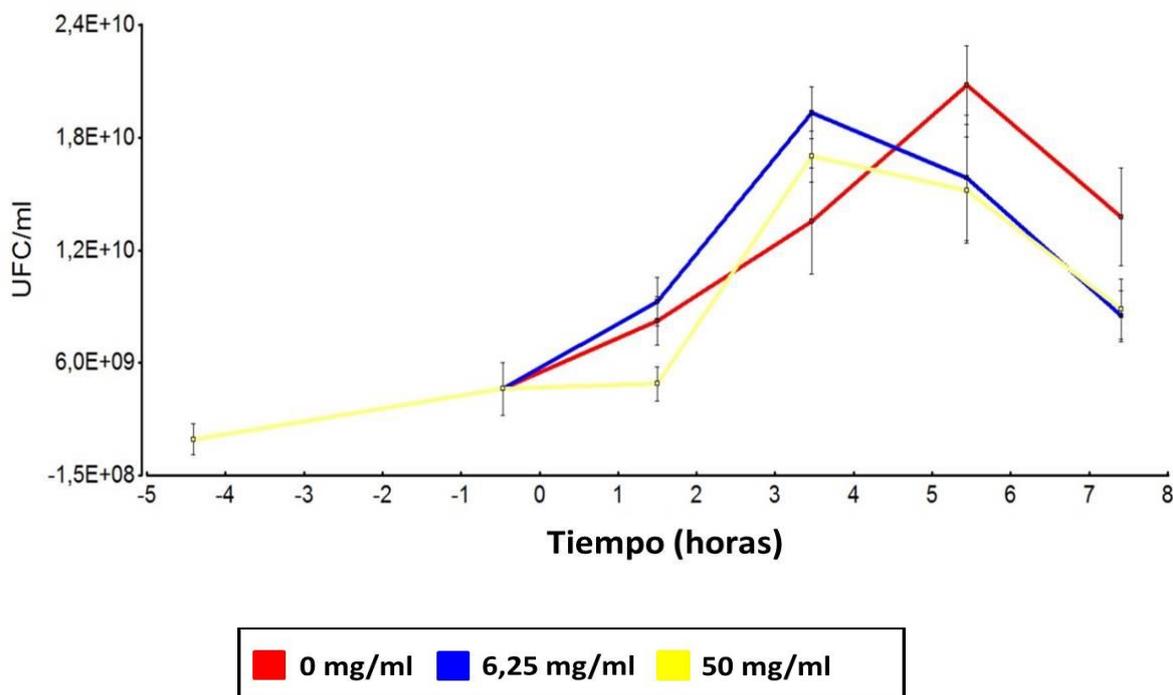
***Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CRL1655 – *Centella asiática***



**Figura 22: Curva de muerte de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CRL 1655 en presencia de diferentes concentraciones de *Centella asiática*.**

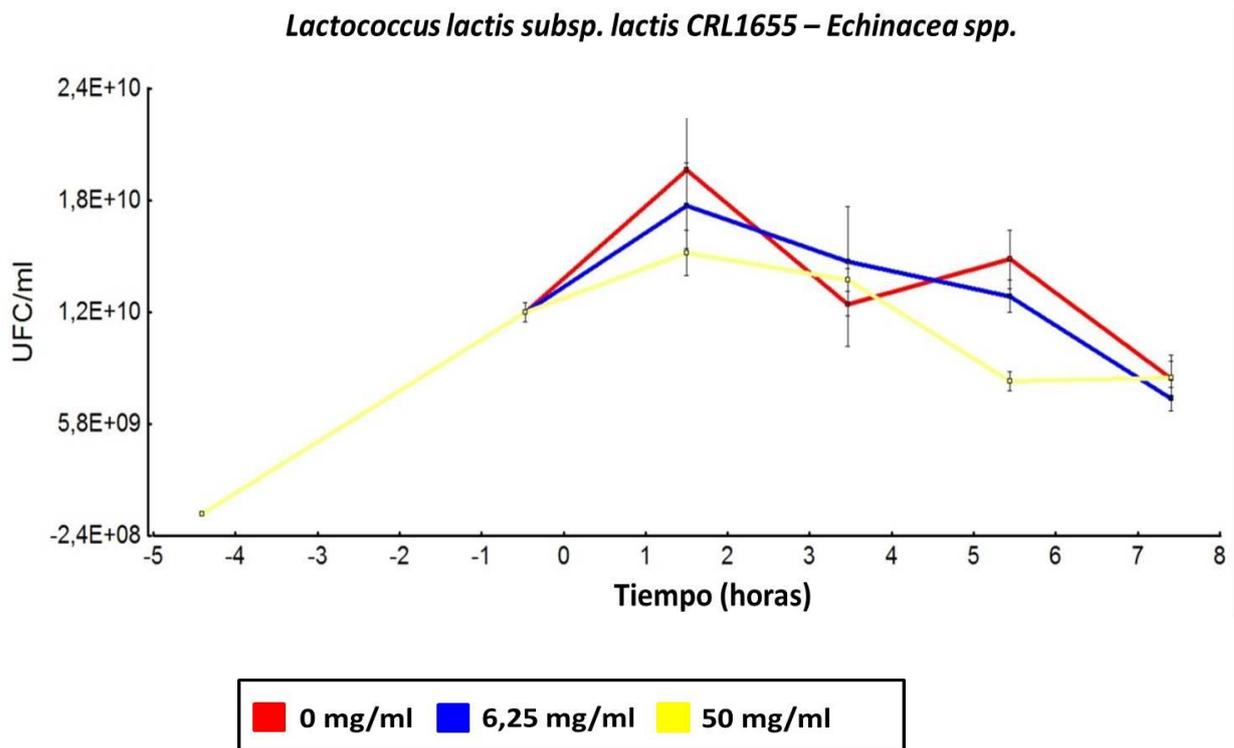
Por otro lado, para *Lactobacillus perolens* CRL 1724, a partir de las 4 h, las curvas correspondientes a las dos concentraciones de *Centella asiática* comenzaron a disminuir su recuento, mientras que el control siguió aumentando y empezó a disminuir en el tiempo 6. Esto significa que la sobrevivencia de *Lactobacillus perolens* CRL 1724 comienza a decaer a las 4 hs de estar expuesto a *Centella asiática*, mientras que si no se lo expone a este compuesto, su fase de muerte comienza dos horas más tarde. Esto podría indicar que la *Centella asiática* podría estar acelerando el proceso de muerte, sin embargo los valores de recuento bacteriano obtenidos a los tiempos analizados, no mostraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre el control y las dos concentraciones del fitocompuesto.

***Lactobacillus perolens* CRL1724 – Centella asiática**



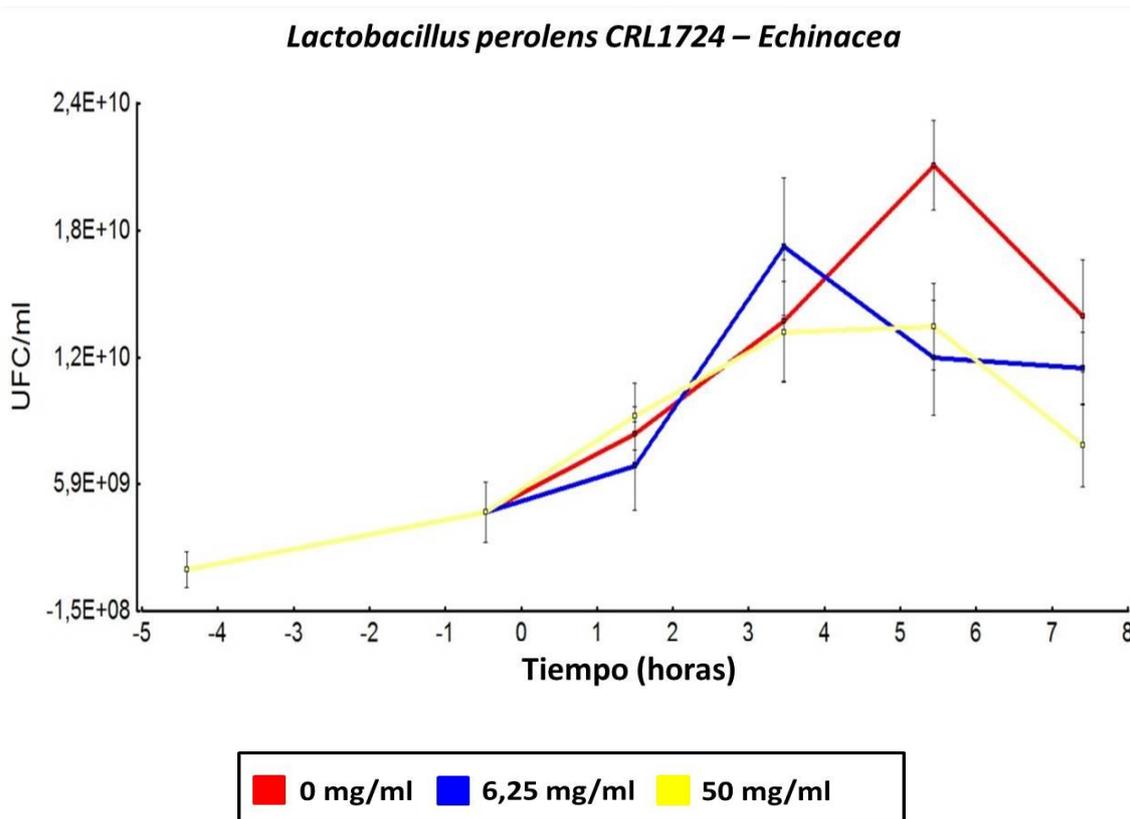
**Figura 23: Curva de muerte de *Lactobacillus perolens* CRL 1724 en presencia de diferentes concentraciones de *Centella asiática*.**

Por último, *Echinacea* no inhibió el crecimiento de *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CRL1655 a ninguna de las concentraciones ensayadas (6,25 y 50 mg/ml) ( $p > 0,05$ ) (Figura 24). Además, se observó que el mayor recuento bacteriano ocurrió en el tiempo 2 para los dos tratamientos y el control de crecimiento, mientras que si comparamos esto con *Centella asiática*, dicho recuento se observó luego de 4 hs de incubación.



**Figura 24:** Curva de muerte de *Lactococcus lactis subsp. lactis* CRL1655 en presencia de diferentes concentraciones de *Echinacea*.

Al analizar el efecto de *Echinacea* sobre *Lactobacillus perolens* CRL1724 (Figura 25), se pudo observar que no hubo diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) en el recuento de viables para ambas concentraciones. Si bien, en la Figura 25 se puede ver que en el tiempo 6 el control presenta un mayor recuento, la diferencia no fue significativa ( $p > 0,05$ ).



**Figura 25:** Curva de muerte de *Lactobacillus perolens* CRL 1724 en presencia de diferentes concentraciones de *Echinacea*.

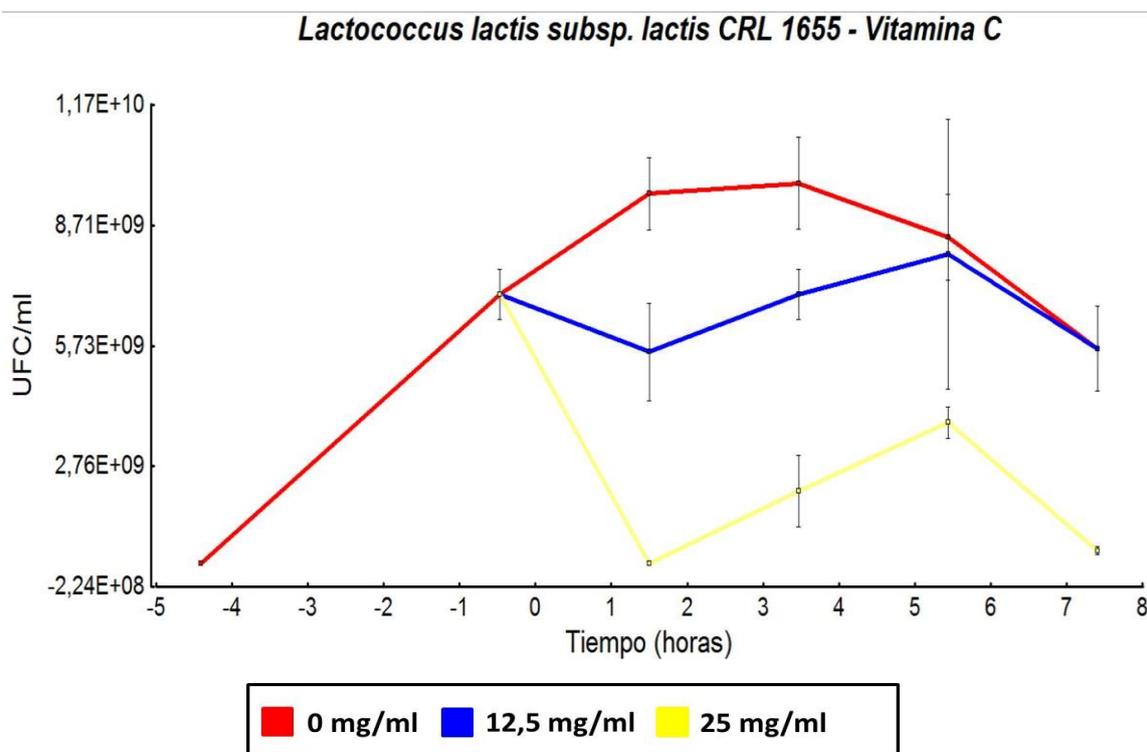
Otras investigaciones demostraron que la *Echinacea angustifolia* no tiene una actividad antimicrobiana relevante, salvo por una ligera inhibición de crecimiento sobre aislamientos de *Streptococcus pyogenes* (Wendakoon y col., 2012). Del mismo modo, Sharma y col. (2008) comprobaron la ausencia de actividad antimicrobiana de la tintura de *Echinacea angustifolia*, excepto también por una inhibición sobre *Streptococcus pyogenes* y *Legionella pneumophila*. Otros autores sugieren que la *Echinacea angustifolia* podría ejercer una importante actividad inmunomoduladora (Hudson y col, 2010).

#### 4.4.2. Excipientes

Al ensayar la vitamina C, se comprobó la actividad antimicrobiana de este compuesto, tanto a concentraciones bajas (12,5 mg/ml) como altas (25 mg/ml), siendo las diferencias con el control altamente significativas para ambas BLs ( $p < 0,05$ ), excepto en el caso de *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CRL 1655, que a una concentración de 12,5 mg/ml (línea azul), el recuento resultó igual al recuento obtenido

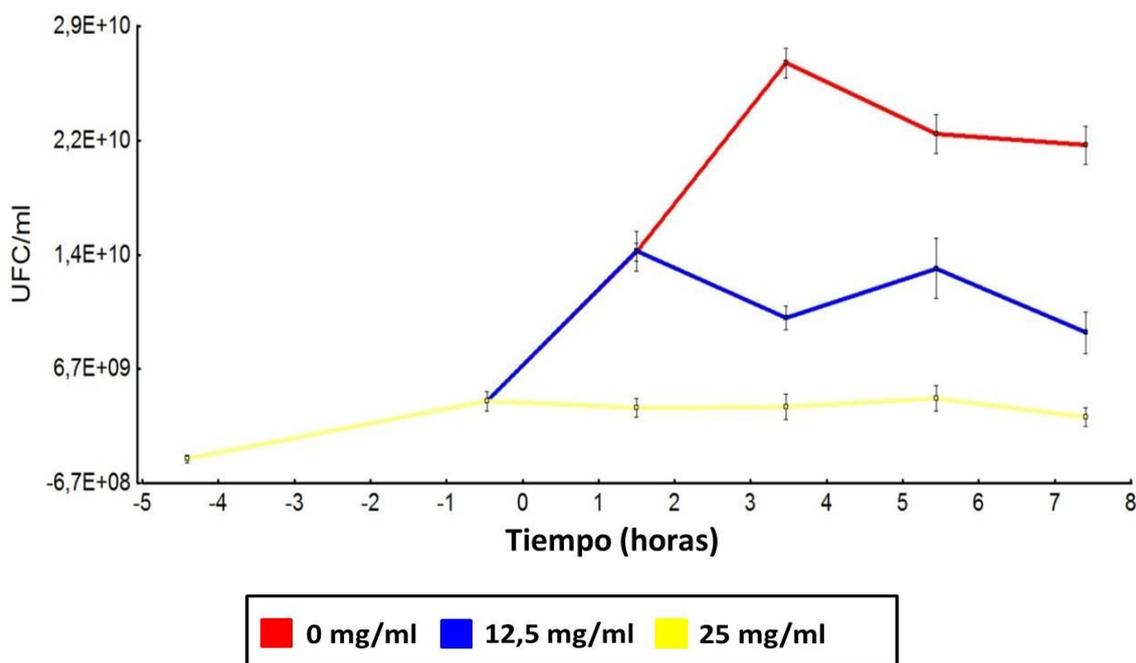
en el control (línea roja) ( $p > 0,05$ ) a las 8 horas (Figura 26). A 25 mg/m la inhibición del crecimiento fue total para ambas BLs. (Figura 26 y 27).

Este resultado difiere de lo observado en el ensayo de dilución en agar, en el cual se observó desarrollo microbiano similar al control en la menor concentración (12,5 mg/ml) utilizada. Esto podría deberse a que la vitamina C a 12,5 mg/ml no posea realmente un efecto antimicrobiano, sino que solo retarde el crecimiento, por lo cual se obtiene un menor recuento en la curva de muerte, y al evaluar de forma cualitativa el crecimiento, mediante la técnica en placa, al final del ensayo se observa crecimiento normal



**Figura 26:** Curva de muerte de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CRL 1655 en presencia de diferentes concentraciones de Vitamina C.

***Lactobacillus perolens* CRL1724 – Vitamina C**

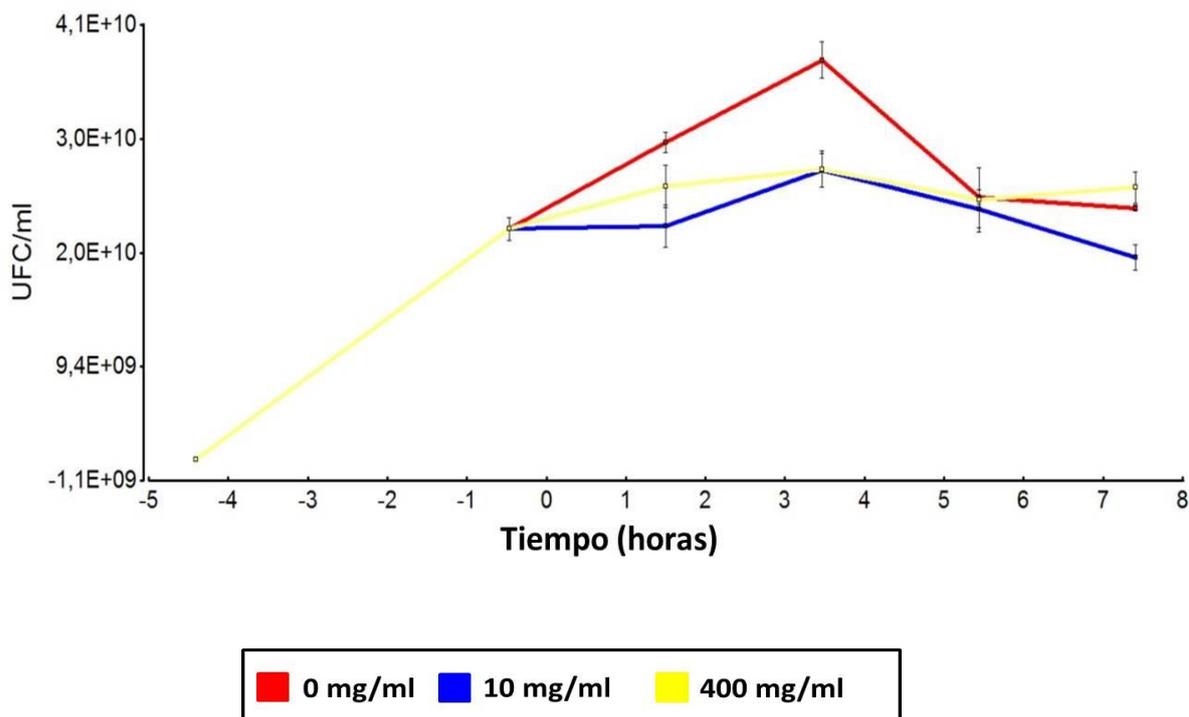


**Figura 27: Curva de muerte de *Lactobacillus perolens* CRL 1724 en presencia de diferentes concentraciones de Vitamina C.**

La fructosa no resultó ser inhibitoria para ninguna de las dos BLs (Figuras 28 y 29) a ninguna de las dos concentraciones ensayadas (10 y 400 mg/ml) ( $p > 0,05$ ).

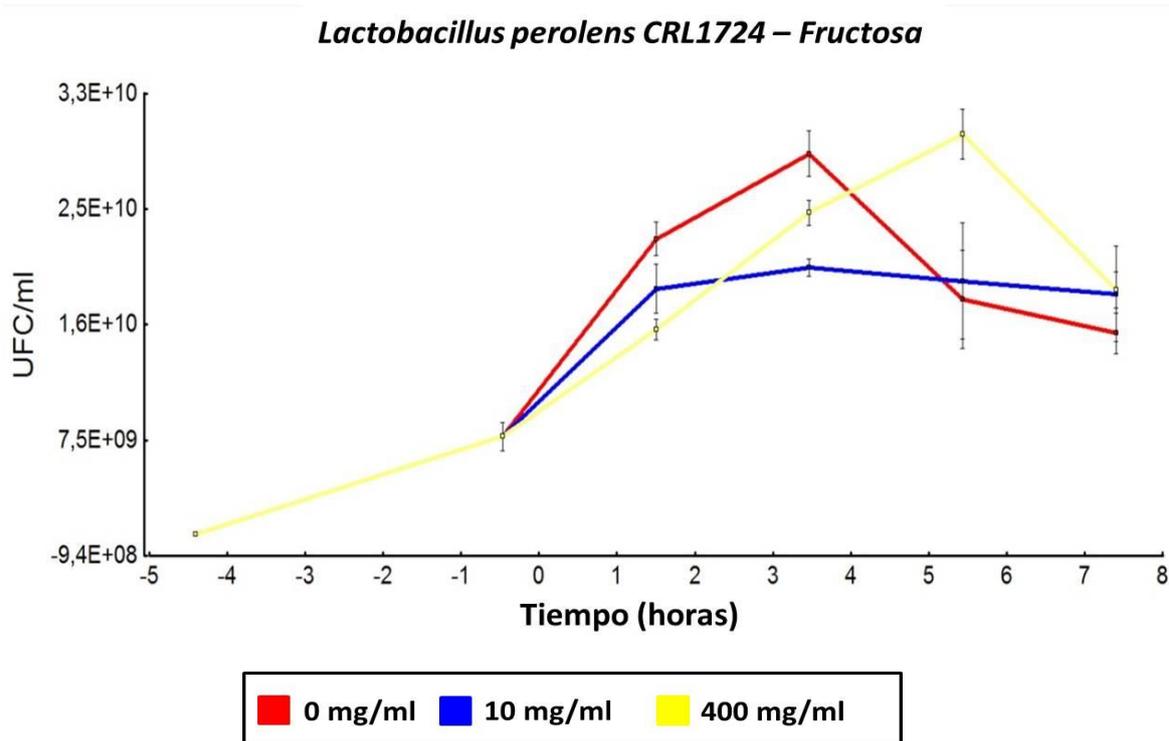
En los ensayos realizados previamente, la fructosa había demostrado tener efecto inhibitorio para ambas a BLs a concentraciones de 400 mg/ml, lo cual no concuerda con lo obtenido en la curva. Es posible, que la fructosa a concentraciones tan elevadas, disminuya considerablemente la disponibilidad de agua en el medio, por lo que al realizar la micro CIM, teniendo a las bacterias siempre en el mismo medio con poca disponibilidad acuosa, estas no tuvieron la posibilidad de recuperarse de este estrés, mientras que al hacer el recuento, las bacterias solo están expuestas durante 8 horas a la fructosa, y luego son sembradas en un medio sólido normal, encontrando aquí la posibilidad de crecer.

***Lactococcus lactis subsp. lactis* CRL1655 – Fructosa**



**Figura 28: Curva de muerte *Lactococcus lactis subsp. lactis* CRL 1655 en presencia de diferentes concentraciones de Fructosa.**

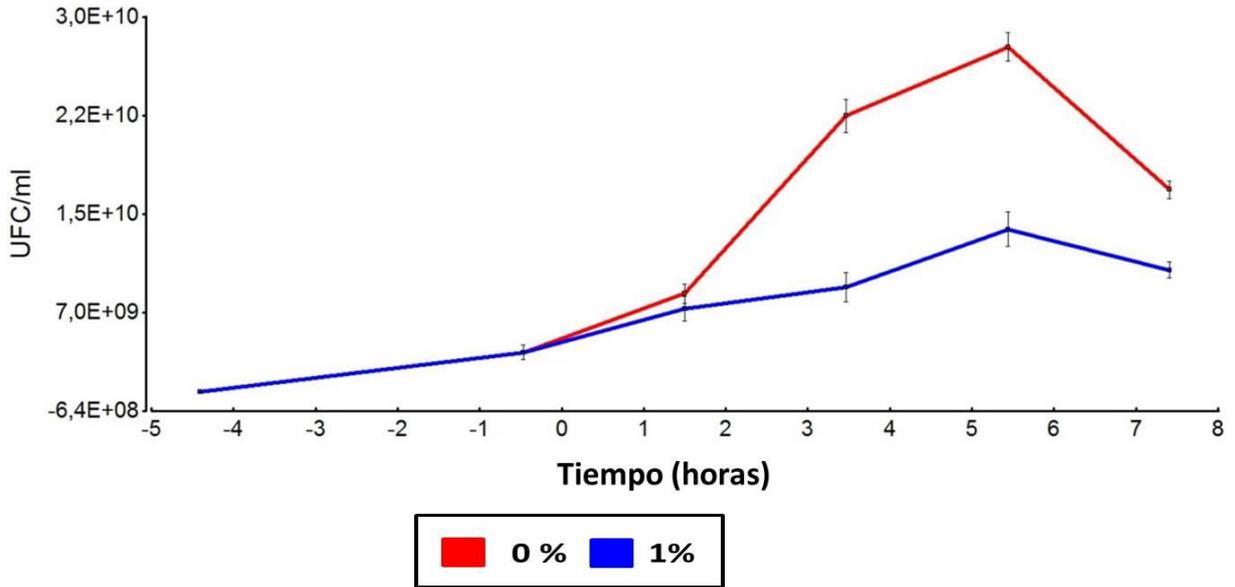
Como se observa en la Figura 29, en el caso de *Lactobacillus perolens* CRL 1724, se observó que durante las primeras 4 h de exposición de las bacterias a la fructosa, el control presentó mayor viabilidad, pero luego de este tiempo, el crecimiento descendió drásticamente, mientras que en los dos tratamientos con fructosa, el recuento permaneció constante en una concentración de 10mg/ml y continuó ascendiendo con 400mg/ml durante dos horas más antes de disminuir bruscamente. Al final del ensayo, el menor recuento se obtuvo con el control, pero no hubo diferencia entre este y los dos tratamientos ( $p>0,05$ ).



**Figura 29: Curva de muerte de *Lactobacillus perolens* CRL 1724 en presencia de diferentes concentraciones de Fructosa.**

El Sepigel no demostró efecto inhibitorio para ninguna de las BLs al ser aplicado al 1% (Figuras 30 y 31). Si bien *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CRL 1655, presentó recuentos menores a los del control a partir del tiempo 2, la diferencia observada en la Figura 30 no fue estadísticamente significativa ( $p > 0,05$ ).

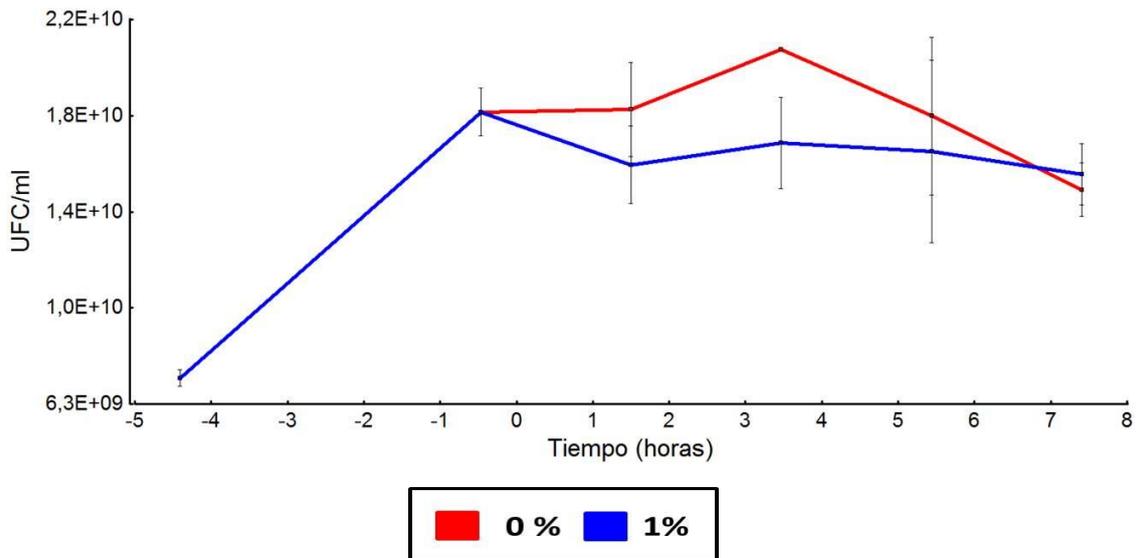
***Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CRL1655 – Sepigel**



**Figura 30:** Curva de muerte de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CRL 1655 en presencia de diferentes concentraciones de Sepigel.

En el caso de *L. perolens* CRL 1724 (Figura 31), si bien en los tiempos 2 y 4 la curva del control se encuentra por encima de la curva correspondiente a Spigel 1%, la diferencia no fue significativa ( $p > 0,05$ ).

***Lactobacillus perolens* CRL 1724 - Sepigel**

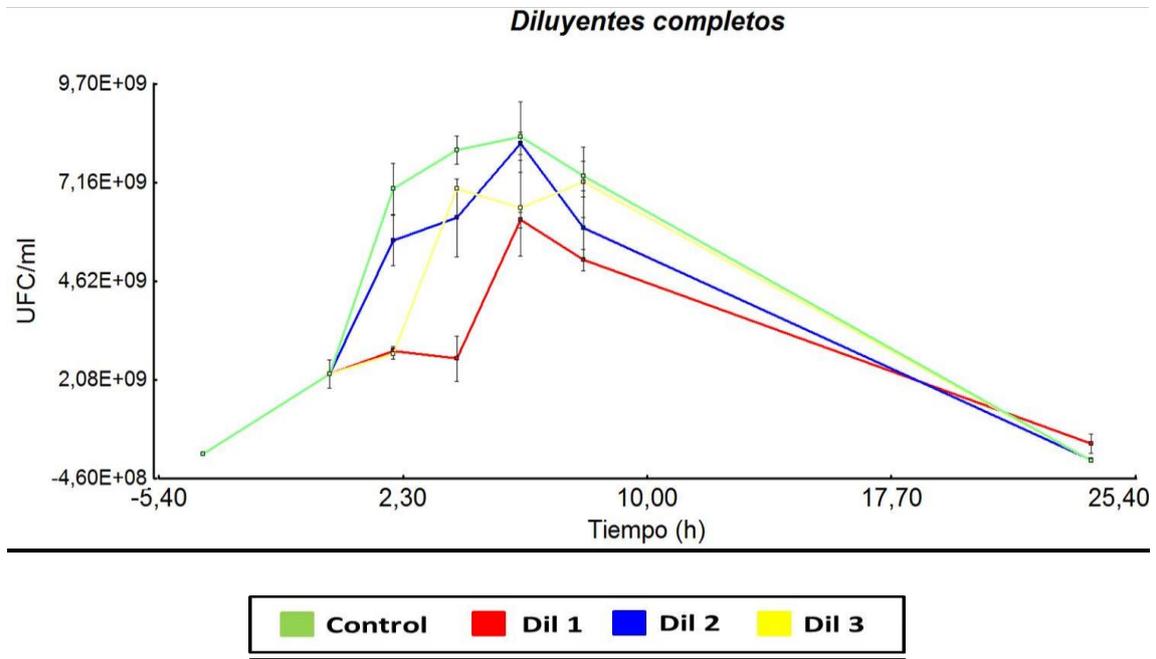


**Figura 4:** Curva de muerte de *Lactobacillus perolens* CRL 1724 en presencia de diferentes concentraciones de Sepigel.

#### 4.4.3. Selección de los compuestos y curva de muerte combinada

Sobre la base de los resultados obtenidos en todos los ensayos presentados anteriormente, y considerando las propiedades de cada uno de los compuestos analizados, se seleccionaron la vitamina C (12,5 mg/ml), *Echinacea* (6,25 mg/ml), Fructosa (10 mg/ml) y Sepigel (1%) como excipientes para ser incluidos a la formulación probiótica. Considerando esto, se realizó un ensayo de sobrevivencia (curva de muerte) para analizar el efecto de todos estos compuestos sobre el crecimiento de ambas BLs. Para este fin, se evaluaron los tres diluyentes descritos en el punto 3.11.2. En la Figura 32 se presentan los resultados obtenidos. En dicha Figura se puede observar que tanto en los tiempos 6, 8 y 24, las curvas se encuentran muy cerca, y entre los recuentos obtenidos para los tres diluyentes, no hay diferencia significativa entre estos y el control ( $p > 0,05$ ). No ocurre lo mismo en los tiempos 2 y 4. A las 2 horas de exponer a las BLs a los diferentes diluyentes se encontró diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) del control con el diluyente 1, el cual contenía todos los compuestos seleccionados para esta etapa.

Luego de 2 horas más de incubación, es decir en el tiempo 4, la diferencia observada fue significativa para todos los diluyentes, excepto para el **Dil 2**.



**Figura 32: Curva de muerte de ambas BLs con los distintos diluyentes. Dil 1: Fructosa 10 mg/ml, *Echinacea* 6,25 mg/ml, Vitamina C 12,5 mg/ml y Sepigel 1%. Dil 2: Fructosa 10 mg/ml, *Echinacea* 6,25 mg/ml y Sepigel 1%. Dil 3: *Echinacea* 6,25 mg/ml, Vitamina C 12,5 mg/ml y Sepigel 1%.**

Es posible que la razón por la cual el **Dil 1** y **3** causen inhibición, sea la presencia de Vitamina C a 12,5 mg/ml. Es por esto, que sobre la base de estos resultados, se seleccionó el **Diluyente 2** para realizar el ensayo a campo.

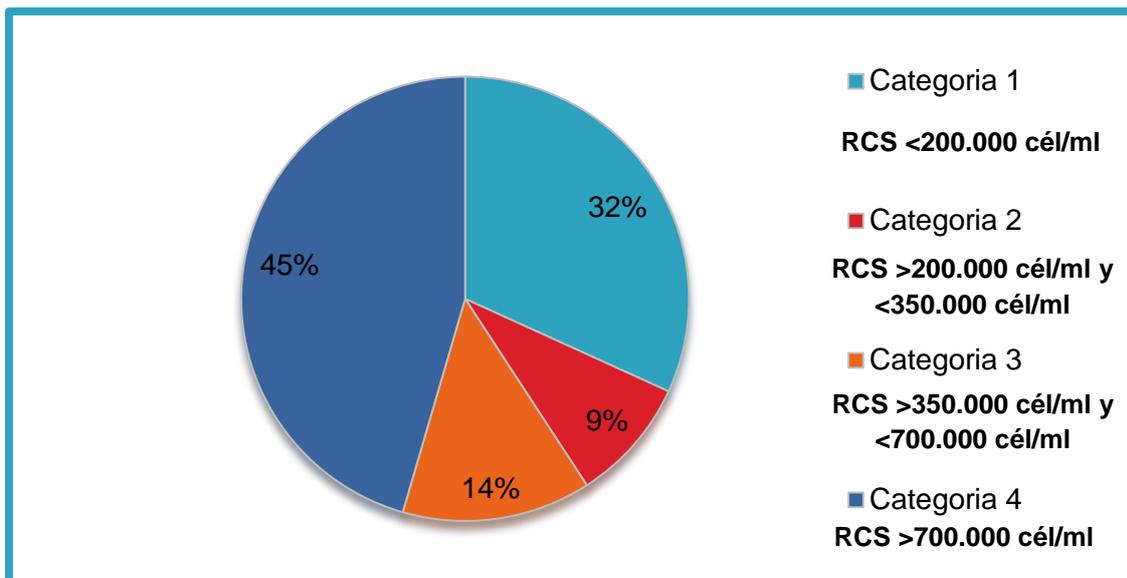
#### 4.5. ENSAYO A CAMPO

Se seleccionó un tambo ubicado a quinientos metros al sur de la localidad de Malena, provincia de Córdoba (33°29'50,18" S, 64°25'49,50" O) y a 42 km de la ciudad de Río Cuarto. El mismo contaba con cómodas y completas instalaciones que permitieron la realización del ensayo.

##### 4.5.1. Relevamiento del establecimiento lechero

Se muestrearon un total de 11 vacas Holando-Argentina próximas al secado con una gestación de aproximadamente 6-7 meses.

El RCS es considerado una herramienta de gran utilidad e importancia en rodeos lecheros, ya que es monitoreado constantemente por las empresas lácteas, y sobre la base del mismo, la leche es clasificada y el precio final varía dependiendo de este parámetro (Anuario de lechería Argentina, 2013). El ensayo se realizó durante el periodo seco, en el cual los animales no son ordeñados y su leche o secreción es escasa y no es comercializada. Por esto, el RCS en este período carece de valor, o no es significativo, a tal punto que no es monitoreado. Si bien es considerado un recuento bajo como aquel que presenta <200.000 cél/ml, y alto cuando es >200.000 cél/ml, a los fines prácticos y de acuerdo a los resultados obtenidos del muestreo se dividieron las muestras en cuatro categorías. De los 44 cuartos muestreados, pertenecientes a 11 vacas Holando-Argentinas con los 4 cuartos funcionales, solo el 31,8% (14 cuartos) presentaron un RCS <200.000 cél/ml (Categoría 1), el 9% (4 cuartos) se ubicaron con un recuento >200.000 cél/ml y <350.000 cél/ml (Categoría 2), el 13,63% (6 cuartos) se ubicaron con un recuento >350.000 cél/ml y <700.000 cél/ml (Categoría 3), y el 45,45% (20 cuartos) presentaron un >700.000 cél/ml (Categoría 4) (Figura 33).



**Figura 5: Distribución según el Recuento de Células Somáticas de los animales muestreados durante el relevamiento del establecimiento lechero seleccionado.**

De todas las muestras analizadas, el 36,36% de las muestras (16 cuartos) resultaron positivos al análisis bacteriológico, siendo el principal microorganismo aislado *Corynebacterium bovis* con una prevalencia del 50%. En segundo lugar, se aisló *Staphylococcus aureus* en el 31,25% de las muestras (5 muestras), presentándose también un caso de coinfección de los dos patógenos anteriormente mencionados, y por último en el 25% (4 cuartos) se aislaron *Staphylococcus no aureus*. El 63,64% de todas las muestras analizadas resultaron negativas para dicho análisis.

En la **Categoría 1**, el 93% de las muestras (13 cuartos) resultaron negativas para el análisis bacteriológico, lo cual es indicativo de un buen estado sanitario de la ubre. El 7% (1 cuarto) restante corresponde a un cuarto con bacteriología +, del cual se aisló *S. no aureus*, los cuales son microorganismos ambientales o patógenos menores que pueden estar presentes en la glándula mamaria sin generar grandes alteraciones sobre el número de células somáticas, ya que la respuesta es más intensa frente a microorganismos que poseen factores de virulencia que le permiten invadir y colonizar la glándula (Alnakip y col., 2014).

El 100% (4 cuartos) de las muestras correspondientes a la **Categoría 2** resultaron negativas para el análisis bacteriológico, y en la **Categoría 3**, el 84% fue negativo para la bacteriología encontrándose un solo cuarto infectado con *S. no*

*aureus*, correspondiente al 16% del grupo. Es de esperar que las muestras con RCS alto presenten análisis bacteriológicos positivos, ya que, las células somáticas migran desde la sangre hacia el interior de la glándula mamaria y aumentan habitualmente ante la presencia de microorganismos foráneos que penetran el canal del pezón (Schällibaum, 2001), pero se debe tener en cuenta que estos animales se encontraban en un estadio muy cercano al período seco, y se sabe que en este período los valores de RCS se elevan por procesos fisiológicos naturales (Ting-Chieh Yu y col., 2011; Alnakip y col., 2014). Por otro lado, los análisis bacteriológicos fueron realizados con el fin de detectar la presencia de los microorganismos más frecuentes y puede que algunos patógenos poco comunes no hayan sido detectados. Por otro lado, puede que algunos de los animales hayan estado infectados recientemente y al ser tratados se eliminó eficientemente a los microorganismos, pero el RCS aun permanezca elevado. Además, el RCS también puede verse afectado por razones no vinculadas a un microorganismo, como inflamaciones de la glándula por causas físicas, químicas o traumáticas (Corbellini, 1996).

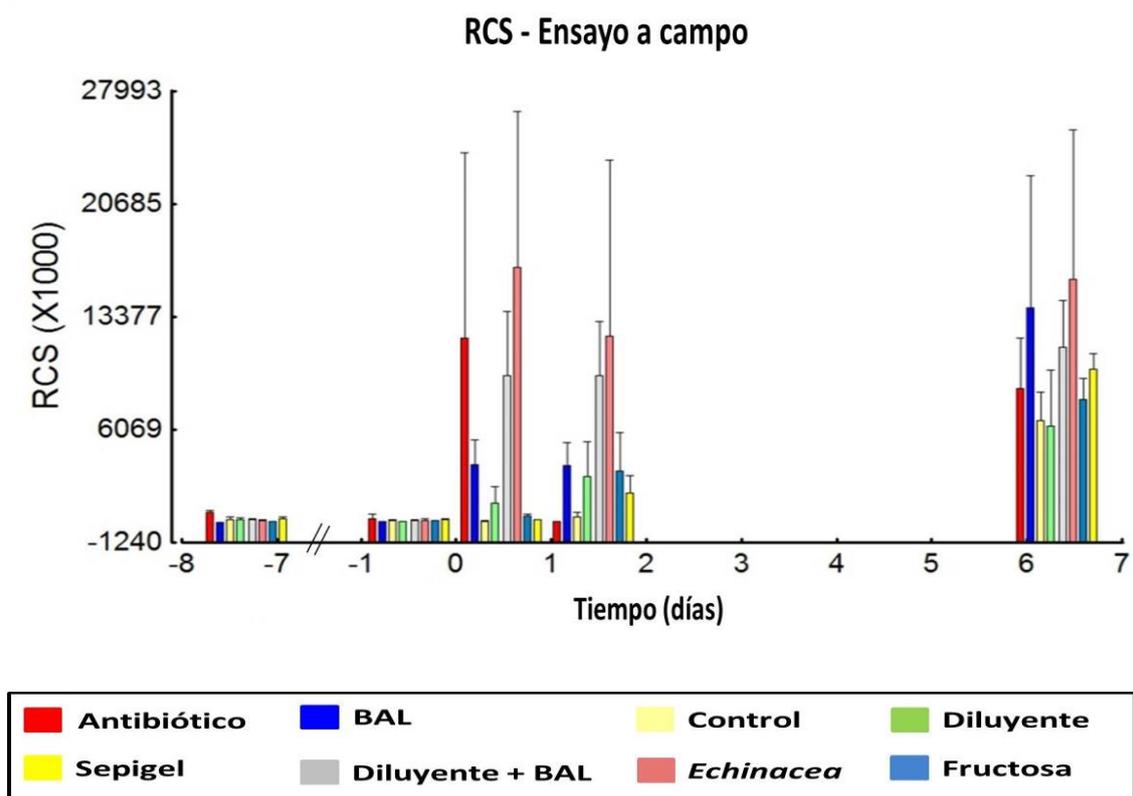
Por último, en la **Categoría 4**, en la cual los recuentos fueron mayor a 700.000 cel/ml, el 73,68% de las muestras fueron positivas para el análisis bacteriológico, con un 57% de predominio de aislamientos de *Corynebacterium bovis*, un 28% *S. aureus* y 21,4% *S. no auerus*. En este caso se cumple que las muestras con RCS alto presenten análisis bacteriológicos positivos. *S. aureus* es un microorganismo patógeno contagioso, y si bien *C. bovis* es un patógeno menor, puede ser, dependiendo del caso, un patógeno contagioso, y su alta prevalencia puede deberse a que el reservorio de estos patógenos son los cuartos infectados y su transmisión ocurre principalmente durante el ordeño, por encontrarse en las máquinas de ordeño y en las manos de los operadores.

Al analizar estos resultados en combinación con las características de las instalaciones y las prácticas implementadas, se puede concluir, que si bien las instalaciones eran aceptables y las prácticas de ordeño buenas, la higiene en general del establecimiento era deficiente (escasa limpieza de las instalaciones, ausencia de control de plagas e insectos, presencia de otros animales en la sala de ordeño, y mala evacuación y tratamiento de aguas servidas). Por otro lado se observó un mal estado de los corrales por inclemencias climáticas que sumado a lo anterior, podría haber sido causal de la aparición de patógenos menores, principalmente ambientales, en el rodeo lechero.

El grupo muestreado demostró que la sanidad del rodeo es buena y se encontraron animales saludables en su estado general. Finalmente, sobre la base de estos resultados, se procedió a la selección de 9 animales.

#### 4.5.2. Resultados de la Inoculación y Recuento de Células Somáticas

En la Figura 34 se puede observar los RCS en todos los tiempos y para todos los tratamientos juntos. No se evidencia diferencia entre los RCS del ensayo preliminar realizado 7 días antes de la inoculación, con los RCS del día de la inoculación, lo cual es lo que se esperaba, ya que indica que no hay ningún tipo de inflamación de la glándula mamaria previa a la inoculación, y por ende todos los animales que se utilizaron en el ensayo se encontraban en buen estado de salud hasta ese momento.



**Figura 34: Recuento de células somáticas (RCS) de todos los cuartos incluidos en el ensayo de inoculación.**

En el caso del control, se pudo observar que el RCS aumentó considerablemente a los 7 días del ensayo de inoculación. Si bien a estos cuartos no se les administró nada, es normal el incremento estas células, porque en este periodo de secado ocurre un cambio anatómico y fisiológico de la ubre y del epitelio mamario,

el contenido de leche excretado disminuye, y también se ve afectada la composición de dicho fluido, ya que es más espesa y puede estar separada en fases más acuosas y otras más grumosas debido a la presencia de acúmulos celulares. Esto ocasiona que las células somáticas se concentren y eleven el recuento. Algunos estudios han reportado una rápida acumulación de plasmina soluble y proteínas específicas en la secreción mamaria de vacas secas junto con un aumento paralelo en el recuento de células somáticas (Ting-Chieh Yu y col., 2011). Esto afecta el análisis del RCS con respecto a la sensibilidad, especificidad y reproducibilidad, factores que disminuyen su confiabilidad.

En todos los tiempos posteriores a la inoculación, el mayor RCS se obtuvo en los cuartos a los que se les administró *Echinacea*. En este caso, se observó que hubo un gran incremento de las células somáticas 24 h después de la inoculación, la cual se mantuvo constante hasta los 7 días post inoculación dándole al animal una mayor capacidad inmunológica para defenderse de los posibles patógenos durante al menos una semana. A los 7 días de realizada la inoculación, los valores de RCS, permanecieron altos en todos los cuartos ensayados. Este era el resultado esperado, debido a que entre las propiedades de esta hierba, la inmunomodulación ha alcanzado importancia científica. Existe evidencia de que la *Equinacea* estimula al cuerpo a producir más glóbulos blancos, el pilar principal del cuerpo contra la infección bacteriana y viral. Distintos estudios han demostrado su capacidad de aumentar el recuento leucocitario, la actividad y proliferación de macrófagos, la función de células NK, la activación del complemento, la amplificación de la respuesta de factores tales como factor de necrosis tumoral, interleuquinas 1, 6 y 10, y la inhibición de la enzima hialuronidasa. La *Equinacea*, al igual que otros remedios naturales potenciadores del sistema inmune, son complejos compuestos, lo que lo hace muy difícil, si no imposible, para las bacterias desarrollar resistencia, siendo aún más importante su uso para la prevención de la enfermedad, y como finalidad para reemplazar los antibióticos usualmente utilizados.

La fructosa y el Sepigel, se incluirían en el producto final como crioprotector y espesante respectivamente, por lo cual no deben aumentar el RCS, evidenciando así que no causan ningún tipo de alergia o inflamación de la glándula mamaria. Esto se comprobó ya que en todos los tiempos ambos recuentos fueron similares entre ellos y similares al control.

En el caso de las BLs, se puede observar que tuvieron un efecto positivo, provocando un aumento considerable del RCS, principalmente a los 7 días de la inoculación, lo cual significa que produce un aumento gradual y a largo plazo del RCS, protegiendo así al epitelio mamario de las posibles infecciones del periodo seco. Se evidencia un aumento progresivo de la cantidad de células presentes en la glándula mamaria a medida que transcurre el tiempo. Estos resultados concuerdan con los encontrados por trabajos de inoculación con estas BLs realizados en el Laboratorio de Genética Microbiana, donde se observa un aumento significativo del RCS luego de la inoculación (Pellegrino y col, 2017). Esto podría deberse a una primera inflamación aguda local de la ubre, en la cual se reclutan diversas células blancas presentes en la glándula y de ganglios próximos, principalmente los supramamarios, generando el aumento del RCS (Sordillo y Streicher 2002; Alnakip y col., 2014).

En el caso de los RCS de los cuartos a los que se les administro el diluyente completo solo, se observa un pequeño incremento en el recuento los primeros días tras la inoculación, y aumenta hasta los 7 días posteriores al ensayo, pero se esperaba que el incremento fuese mucho mayor, ya que si bien este diluyente no contenía a las BLs, si contenía *Echinacea*, con actividad inmunomoduladora, y en los cuartos a los que se les administro solo este compuesto el incremento observado en el RCS fue mucho mayor. Este resultado se puede deber que haya algún tipo de efecto inhibitorio entre los compuestos ensayados, y que al inocularse de manera conjunta disminuya el efecto que cada uno puede producir por separado en la glándula mamaria, pero no hay información disponible publicada.

La inoculación del diluyente completo con las BLs, ocasionó un aumento considerable del RCS en leche. Al tratarse de vacas en periodo seco, esto no afecta la economía del productor, ni la calidad de la leche del establecimiento, pero si ayuda a mantener una ubre inmunológicamente activa durante ese período. La reclusión de células blancas en la ubre, principalmente neutrófilos, podría estar optimizando los procesos de remodelación e incluso, potenciar la auto curación de glándulas infectadas o dañadas y así lograr que el animal ingrese a su próximo ciclo de lactancia sano y en su máximo nivel de producción. Dado que los neutrófilos son el tipo celular predominante en la leche (Riollet y col., 2000) y la secreción mamaria de vacas al secado (Lee y col., 2005), podrían jugar un papel crucial no sólo en la defensa local, sino también en la remodelación de la glándula mamaria de las vacas en período de

secado (Ting-Chieh Yu y col., 2011). Por otro lado, el ensayo realizado se extendió hasta el día 7 del periodo de secado, lo que significa que de aquí en adelante, restan al menos unos cuarenta y cinco días más hasta el parto, tiempo suficiente para restablecer el RCS a valores normales

Si bien se esperaba que el RCS de las BLs con el diluyente fuera mayor al de las BLs solas, el resultado obtenido demostró que esto es así, excepto a los 7 días de realizada la inoculación, donde el RCS obtenido de los cuartos a los que se les administro el diluyente completo con las BLs, es menor que si solo se administran las BLs.

Los recuentos observados al tratar a los cuartos con antibióticos, son diferentes en cuanto al comportamiento que se observó en todos los otros casos. Aquí se evidencio un fuerte incremento de las células somáticas a las 24hs post inoculación, y luego una disminución, siendo menor el recuento a los 2 y 7 días.

En lo que respecta al análisis bacteriológico, solo se aislaron microorganismos luego de incubar las placas de agar sangre a 37°C durante 48 a 72 horas.

De los 4 cuartos a los que se les administro Sepigel, el 75% resultaron en un análisis bacteriológico positivo, encontrándose en estos enterobacterias, como *Escherichia coli*, un día luego de la inoculación y *Streptococcus* ambiental el último día del ensayo. Si bien este resultado podría indicar que la presencia del Sepigel produce una mayor susceptibilidad de la GM a las infecciones bacterianas, los cuartos a los que se les administraron los diluyentes completos, ya sea solo o con BLs, presentaron un análisis bacteriológico positivo solo en el 11% (2 cuartos).

También se aisló *Bacillus spp.* en un cuarto al que se le había colocado el pomo de antibiótico habitual.

Es importante destacar, que en el ensayo, a una misma vaca se le administro en 2 cuartos diferentes (Trasero Derecho y Trasero Izquierdo) Sepigel, y en el cuarto Delantero Izquierdo el pomo de secado habitual, y estos tres cuartos resultaron en un análisis bacteriológico positivo, siendo probable que el animal haya estado bajo condiciones de estrés o inmunológicamente deprimido, favoreciendo así la colonización bacteriana.

Se utilizó la metodología de análisis bacteriológico de muestras de leche descripta por el NMC. Se debe tener en cuenta que los estudios realizados fueron acotados y dirigidos a la detección de los principales patógenos.

Los RCS correspondientes a los cuartos que presentaron el análisis bacteriológico positivo, no fueron tenidos en cuenta al momento de realizar el análisis estadístico.

## 5. CONCLUSIONES:

Al evaluar todos los compuestos, se observó que los excipientes, en su mayoría son inhibidores del crecimiento bacteriano, por lo cual fueron descartados y/o reemplazados:

- El estearato de aluminio, la vaselina líquida y sólida, que se habían propuesto como posibles espesantes del producto, fueron reemplazados por Sepigel 305 a una concentración del 1% y el ácido salicílico, por su alta inhibición, no fue utilizado.
- Los tres fitocompuestos (*Aloe vera*, *Centella asiática* y *Echinacea spp.*), no mostraron efecto inhibitorio de ambas cepas probióticas a concentraciones de 6,25mg/ml. De acuerdo a sus características inmunomoduladoras y a un mayor conocimiento de las propiedades de la *Echinacea spp*, esta fue la que se incorporó en el producto final.
- Con respecto a las vitaminas, la vitamina D puede ser incorporada por no ser inhibidora del crecimiento bacteriano, pero presenta el inconveniente de ser de alto costo, por lo cual no es rentable su incorporación al formulado final, mientras que la vitamina C inhibe a las BLs a la menor concentraciones ensayada (12,5mg/ml) al ser evaluada en combinación con los otros compuestos, por lo que deberían realizarse más ensayos de inhibición de esta vitamina antes de ser incorporada al formulado final.
- La fructosa, inhibe a ambas cepas a concentraciones de 300mg/ml y mayores a esta, por lo cual la concentración óptima a utilizar sería de 10 mg/ml, concentración a la cual el crecimiento bacteriano no se ve afectado.

Además de no ser agentes antimicrobianos, se comprobó la ausencia de efectos adversos en la ubre bovina, es decir que se consideran inocuos para dicho animal.

- La inoculación intramamaria conjunta de un diluyente compuesto por Sepigel 1%, fructosa 10mg/ml, y *Echinacea spp* 6,25mg/ml, y ambas BLs, produjo un aumento considerable del RCS. Este efecto, ayudaría al animal a transitar el periodo de mayor susceptibilidad a las infecciones intramamarias, con un sistema inmune fortalecido que le permitiría prevenir la colonización del epitelio mamario por microorganismos productores de mastitis bovina.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Agrobot. 2004. Prevención y detección de la mastitis. Ganadería. Software de gestión agropecuaria. Disponible en Internet:
- ❖ Alnakip, M., Quintela-Baluja, M., Böhme, K., Fernández-No, I., Caamaño-Antelo, S., Calo-Mata, P. y Barros-Velázquez, J. 2014. The Immunology of Mammary Gland of Dairy Ruminants between Healthy and Inflammatory Conditions. *J. Vet. Med. Volume*, Article ID 659801. Rewiew.
- ❖ Anuario de Lechería Argentina. 2013. Fundación para la Promoción y el Desarrollo de la Cadena Láctea Argentina (funPEL).
- ❖ Asociación Argentina De Lucha Contra Mastitis. 1983. Estimación de las pérdidas en volumen de producción de leche provocadas por la mastitis bovina en la República Argentina. *Com. Fed. Lechería Arch. Lechería* 6:73.
- ❖ 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.
- ❖ Barkema, H.W., Schukken, Y.H., Zadoks, R.N. 2006. Invited Review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *J. Dairy Sci.* 89: 1877-1895.
- ❖ Barrett, B., 2003. Medicinal properties of Echinacea: A critical review. *Phytomedicine*, 10: 66-86.
- ❖ Bedolla CC. 2004a. Mastitis Bovina. Cuatro Vientos. No 41. Febrero-Marzo. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. pp. 24-26.
- ❖ Bedolla, C. C., y Castañeda, V. H. 2003. Agentes patógenos causantes de la mastitis bovina. Cuatro vientos. N° 38. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Pp. 27-29.
- ❖ Bedolla, C.C. 2008. Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina en la industria lechera. Disponible en internet: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040408/040805.pdf>
- ❖ Beecher, C., Daly, M., Berry, D.P., Klostermann, K., Flynn, J., Meaney, W. 2009. Administration of a live culture of *Lactococcus lactis* DPC 3147 into the bovine mammary gland stimulates the local host immune response, particularly IL-1 and IL-8 gene expression. *J. Dairy Res.* 76 (3): 340-348.

- ❖ Besser, T. and Gay, C. 1994. The Importance of Colostrum to the Health of the Neonatal Calf. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 10(1):107-117.
- ❖ 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, I., 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.
- ❖ Bradley, J. y Green, M. J. 2001. Adaptation of *Escherichia coli* to the Bovine Mammary Gland *Journal of Clinical Microbiology*. 39:1845 -1849.
- ❖ Brinkhaus B, Lindner M, Schuppan D, Hahn EG. 2000. Chemical, pharmacological and clinical profile of the East Asian medical plant *Centella asiatica*. *Phytomedicine* . 2000;7:427–48.
- ❖ Browning JW, Mein GA, Barton M, Nicholls TJ & Brightling P 1990 Effects of antibiotic therapy at drying off on mastitis in the dry period and in early lactation. *Australian Veterinary Journal* 67 440–442
- ❖ Butler, J.E. 1986. Biochemistry and biology of ruminant immunoglobulins. *Progress in Veterinary Microbiology and Immunology* 2: 1–53.
- ❖ Calderón A, Rodríguez VC. 2008. Prevalencia de mastitis bovina y su etiología infecciosa en sistemas especializados en producción de leche en el altiplano cundiboyacense (Colombia). *Revista Colombiana De Ciencias Pecuarias*.
- ❖ Callejo Ramos, A. Breve introducción a la anatomía de la ubre y a la fisiología del ordeño. [http://ocw.upm.es/produccion-animal/ordeno-ecanico/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-ecanico/Tema_1._Anatomia_y_Fisiologia/breve-introduccion-a-la-anatomia-de-la-ubre-y-a-la-fisiologia-del-ordeno)
- ❖ Calvinho, L.F. y Tarabla, H.D. 1997. Bases racionales para el tratamiento antibiótico de mastitis. En: *Temas de Producción Lechera*. Pub. Misc. N°84. EEA INTA Rafaela. Pp. 97-106.

- ❖ Calvinho, L.F. y Tirante, L. 2005. Prevalencia de microorganismos patógenos de mastitis bovina y evolución del estado de salud de la glándula mamaria en Argentina en los últimos 25 años. *FAVE-Ciencias Veterinarias*. 4 (1-2): 29-40.
- ❖ Calvinho, L.F., Toselli, F.G., Weimann, W.R., Canavesio, V.R., Neder, V.E., Iguzquiza, I.A. 2002. Antimicrobial sensitivity of coagulase-positive staphylococcal strains isolated from bovine mastitis in the central dairy catchment area of Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.* 34: 171-175.
- ❖ Carballo A.M, Cortada C.M, Gadano A.B., 2005. Riesgos y beneficios en el consumo de plantas medicinales. Disponible en internet: <http://www.ubiobio.cl/theoria/v/v15/a10.pdf>
- ❖ Carlini J. 1988. Simposio de Plantas Medicinales de Brasil. Sao Paulo.
- ❖ Ceron-Muñoz, M., Tonhati, H., Duarte, J., Oliveira, J., Muñoz-Berrocal, M., Jurado-Gámez, H. 2002. Factors Affecting Somatic Cell Counts and Their Relations with Milk and Milk Constituent Yield in Buffaloes. *J. Dairy Sci.* 85:2885-2889.
- ❖ Charalampopoulos D., Rastall R. 2012. Prebiotics in foods. Elsevier Science. 187-91
- ❖ Chaves, J. 2009. Calidad de leche y mastitis bovina. Curso: Sistemas de producción lechera de Argentina y Cuba. Facultad de Ciencias Veterinarias de la UBA. Chaves & Asoc., Olivos, Buenos Aires, Argentina. Comisión Técnica de Almast. Aprocal. Disponible en Internet: [http://www.aprocal.com.ar/wpcontent/uploads/mastitis\\_bovina.htm.pdf](http://www.aprocal.com.ar/wpcontent/uploads/mastitis_bovina.htm.pdf).
- ❖ Corbellini, C. 1996. Conferencia dictada en el Congreso Nacional de Calidad de Leche y Mastitis. UNRC.
- ❖ Corthésy, B., Gaskins, H.R., Mercenier, A. 2007. Cross-talk between probiotic bacteria and the host immune system. *J. Nutr.* 137: 781-790.
- ❖ Craven, N. 1985. Do rising fat-globules assist microbial invasion via the teat duct between milking? *Kieler Milch. Forschung.* 37:554–558.
- ❖ Craven, N. and Williams, M. 1985. Defenses of the bovine mammary gland against infection and prospects for their enhancements. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 10:71–127.
- ❖ Crispie, F., Flynn, J., Ross, R.P., Hill, C., y Meaney, W.J. 2004. Update on the development of a novel dry cow therapy using a bismuth-based intramammary teat seal in combination with the bacteriocin lacticin 3147. *Irish Veterinary Journal* 57 652–656

- ❖ Crispie, F., Alonso-Gómez, M., Collette O'Loughlin, Klostermann, K., Flynn, J., Arkins, S., Meaney, W., Ross, R.P., Hill, C. 2008. Intramammary infusion of a live culture for treatment of bovine mastitis: effect of live lactococci on the mammary immune response. *J. Dairy Res.* 75: 374-384.
- ❖ Crispie, F., Twomey, D., Flynn, J., Hill, C., Ross, P., Meaney, W. 2005. The lantibiotic lacticin 3147 produced in a milk-based medium improves the efficacy of a bismuthbased teat seal in cattle deliberately infected with *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy Res.* 72: 159-167.
- ❖ Dallard, B. 2007. Estudio histofisiológico del efecto de un agente inmunomodulador intramamario en la involución de la glándula mamaria bovina. Tesis Doctoral. Doctorado en Ciencias Biológicas. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe.
- ❖ David, M.Z., y Daum, R.S. 2010. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clinical Microbiology Reviews* 23 616–687.
- ❖ Delouis, C. and Richard, P. 1991. Lactation. In: *Reproduction in mammals and man*. Thibault and M. Levasseur, Editors. INRA. Paris. p.487-514.
- ❖ Deluyker, H.A., Chester, S.T., Van Oye, S.N. 1999. A multilocation clinical trial in lactating dairy cows affected with clinical mastitis to compare the efficacy of treatment with intramammary infusions of a lincosin/neomycin combination with an ampicillin/cloxacillin combination. *J. Vet. Pharm. Ther.* 22:274-282.
- ❖ Djabri B, Barielle N, Beaudéau F, Seegers H. 2002. Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: a meta analysis. *Vet. Res.* 33:335-357.
- ❖ Dohoo, I. and y Leslie, K. 1991. Evaluation of changes in somatic cell counts as indicators of new intramammary infections. *Prev. Vet. Med.* 10:225-237.
- ❖ Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrisen, D., O'Halloran, S., Feeney M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O'Sullivan, G., Shanahan, F., Collins, J.K. 2001. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 386-392.
- ❖ Dupuy, J., F. Cravero, G. Heer, M. Taverna, C. Barrenechea, N. Manía, A. Becker, R. Magnanini, C. Tardioli, O. Daga, M. Molfino, J. Raciti, A. Ferrari, B. Murphy, & J.P. Romano. 1989. Programas Regionales de Calidad de Leche. 2<sup>das</sup> Jor. Int. Calidad de Leche (JICAL II). Buenos Aires. pp. 110-112.
- ❖ Ehinger, A.M. y Kietzmann, M. 1998. Aspectos farmacocineticos de la terapia antimastitica. *Berl. Munich. Tierärztl. Wschr.* 111 (9): 337-343.

- ❖ Elizondo S., J.A. 2007. Periodo seco corto en ganado de leche. REDVET. Revista electrónica de Veterinaria 1695-7504. 8(5):1-7. Disponible desde Internet en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050507/050707.pdf>
- ❖ Espeche, M.C., Otero, M.C., Sesma, F., Nader-Macias, M.E.F. 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, M.C.-Pellegrino, M., Frola, I., Larriestra, A., Bogni, C., Nader-Macías, M.E.F. 2012. Lactic acid bacteria from raw milk as potentially beneficial strains to prevent bovine mastitis. Anaerobe. pp: 1-7.
- ❖ Even S, Charlier C, Nouaille S, Ben Zakour N, Cretenet M, Cousin F, Gautier M, Coccagn-Bousquet M, Loubie`re P and Le Loir Y. 2009. *Staphylococcus aureus* Virulence Expression Is Impaired by *Lactococcus lactis* in Mixed Cultures. Applied and Environmental Microbiology. 4459–4472 Vol. 75, No. 13
- ❖ FAO (Food and Agriculture Organization). 2002. Anuario de producción <http://apps.fao.org/>
- ❖ Fernández, B., Omar, F., Trujillo Graffe, Eduardo , Peña Cabrera, John Jaiver , Cerquera Gallego, Jefferson y Granja Salcedo, Yury Tatiana2 . 2012. Mastitis bovina: generalidades y métodos de diagnóstico. Revista Veterinaria REDVET 13(11).).
- ❖ Fierro-Monti C., Aguayo-Saldías C., Lillo-Climent F., Riveros- Figueroa F. 2017. Rol de los Probióticos como bacterioterapia en Odontología. Revisión de la literatura. Odontostomatología. Vol. XIX - Nº 30
- ❖ Frola I. D., Pellegrino M. S., Espeche M. C., Giraudo J. A., Nader-Macias M. E. F. and Bogni C. I. 2011. Effects of intramammary inoculation of *Lactobacillus perolens* CRL1724 in lactating cows' udders Journal of Dairy Research, Page 1 of 9.
- ❖ Frola I. D., Pellegrino M. S., Magnago G., Giraudo J. A., Espeche M. C., Nader-Macias M. E. F. and Bogni C. I. 2012. Histological examination of non-lactating bovine udders inoculated with *Lactobacillus perolens* CRL 1724. of Dairy Research 0 1–8.
- ❖ Garcia- Gonzales E., Gracia Salazar, A.P., Rojas Dorado, M.C., Ordoñez-Artuduaga, D.A., Serna Cock,L. 2017. Formulación mixta de bacterias lácticas para el control de *Listeria monocytogenes*. Rev. colomb. biotecnol., Volumen 19, Número 1, p. 38-41

- ❖ Gentilini, E., Denamiel, G., Betancor, A., Rebuelto, M., Rodríguez Fermepin, M., De Torrest, R.A. 2002. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative *staphylococci* isolated from bovine mastitis in Argentina. J. Dairy Sci. 85: 1913-1917.
- ❖ Giraudó, J., Calzolari, A., Rampone, H., Giraudó, A., Bogni, C., Larriestra, A., Nagel, R. 1997. Fields trials of a vaccine against Bovine Mastitis. I. Evaluation in Heifers. J. Dairy Sci. 80:845-853
- ❖ González, R.N., J.A. Giraudó y J.J. Busso. 1980. Investigación en mastitis subclínicas. II Agentes etiológicos bacterianos. Rev. Med. Vet. 61:225-234.
- ❖ González-Gracia, R. 2011. La OMS y la FAO quieren mayor vigilancia de los antibióticos para el ganado. Un problema de seguridad alimentaria mundial. Disponible en internet: <http://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/10289/actualidad/la-oms-y-la-fao-quieren-mayor-vigilancia-de-los-antibioticos-para-el-ganado.html>
- ❖ Green, M. J., Green, L. E., Schukken, Y. H., Bradley, A. J., Peeler, E. J., Barkema, H. W., de Haas, Y., Collis, V. J. y Medley, G. F. 2004. Somatic Cell Count Distributions During Lactation Predict Clinical Mastitis. J. Dairy Sci. 87:1256–1264.
- ❖ Gutman, Guiguet, y Rebolini. 2003. Los ciclos en el complejo lácteo argentino análisis de políticas lecheras en países seleccionados.
- ❖ Hagnestam-Nielsen C, Ostergaard S. 2009. Economic impact of clinical mastitis in a dairy herd assessed by stochastic simulation using different methods to model yield losses. Animal. 3(2):315-28.
- ❖ Halasa, T., Huijps, K., Osteras, O. and Hogeveen, H. 2007. Economics effects of bovine mastitis and mastitis management: Review article. Vet. Quat. 29(1):18-31.
- ❖ Halasa, T., Nielen, M., Whist, A.C., Osterås, O., 2009. Meta-analysis of dry cow management for dairy cattle. Part 2. Cure of existing intramammary infections. J. Dairy Sci. 92, 3150–3157. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2008-1741>.
- ❖ Hansen PJ, Soto P, y Natzke RP. 2004. Mastitis and Fertility in Cattle-Possible Involvement of Inflammation or Immune Activation in Embryonic Mortality. American Journal of Reproductive Immunology. 51: 294-301.
- ❖ Hillerton, JE y Berry, EA. 2005, Methods of detection of the bovine mastitis. Journal of Applied Microbiology, Vol. VIII, Nº 9, 2007.

- ❖ Hoe F., y Ruegg P. 2006. Opinions and practices of Wisconsin dairy producers about biosecurity and animal well-being. *J Dairy Sci* 89:2297-2308.
- ❖ Hogan, J.S., Weiss, W.P., Todhunter, D.A., Smith, K.L., Schoenberger, P.S. 1992. Efficacy of an *Escherichia coli* J5 mastitis vaccine in an experimental challenge trial. *J. Dairy Sci.* 75: 415-422
- ❖ Hogeveen H. 2008. Costs of mastitis: facts and perception. 75(1):113-20.  
[http://www.agrobit.com/Info\\_tecnica/anaderia/enfermedades/GA000008en.htm](http://www.agrobit.com/Info_tecnica/anaderia/enfermedades/GA000008en.htm).
- ❖ Hu, C., y Kitts, D.D. 2000. Studies on the antioxidant activity of Echinacea root extract. *J. Agric. Food Chem.* 48(5):1466-72.
- ❖ Hudson B., Pleschka S., Stein M., y Schoop R. 2010. Actividad de un extracto de equinácea purpúrea frente a los virus de la influenza H1N1, H5N1 y H7N7. *Separata de la revista de Fitoterapia* 9 (2): 115-124.
- ❖ Huijps K, Lam TJ, Hogeveen H. 2008. Costs of mastitis: facts and perception. *J. Dairy Res.*
- ❖ Hütt, P., Shchepetova, J., Lõivukene, K., Mikelsaar, M. 2006. Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero- and uropathogens. *J. Appl. Microb.* 100 (6): 1324-1332.
- ❖ International Dairy Federation. 1979. Somatic Cells in Milk. Document 114
- ❖ Jauregui A. 1991. Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de plantas que crecen en Cuba. Trabajo de Diploma. Facultad de Biología, Universidad de La Habana.
- ❖ Karsch-Völk, M., Barrett, B., Kiefer, D., Bauer, R., Ardjomand-Woelkart, K., Linde, K. 2014. Echinacea for preventing and treating the common cold. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, Issue 2. Art. No.: CD000530. DOI: 10.1002/14651858.CD000530.pub3
- ❖ Kehrl, M. Jr. and Harp, J. 2001. Immunity in the mammary gland. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 17:495–516.
- ❖ Kerr, D.E. y Wellnitz, O. 2003. Mammary expression of new genes to combat mastitis. *J. Anim. Sci.* 81 (3): 38-47.
- ❖ Klostermann, K., Crispie, F., Flynn, J., Meaney, W.J., Paul Ross, R., Hill, C. 2010. Efficacy of a teat dip containing the bacteriocin lacticin 3147 to eliminate Gram-positive pathogens associated with bovine mastitis. *J. Dairy Res.* 77: 231-238.
- ❖ Klostermann, K., Crispie, F., Flynn, J., Ross, R.P., Hill, C., Meaney, W. 2008. Intramammary infusion of a live culture of *Lactococcus lactis* for treatment of

- bovine mastitis: Comparison with antibiotic treatment in field trials. *J. Dairy Res.* 75 (3): 365-373.
- ❖ Knight, C. 1991. Mammary gland biology. *Flem. Vet. J.* 64: 33-41.
  - ❖ Lavon, Y., Ezra, E., Leitner, G. y Wolfenson, D. 2011. Association of conception rate with pattern and level of somatic cell count elevation relative to time of insemination in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 94(9):4538-45
  - ❖ Leavens, H., Deluyker, H., Schukken, Y., De Meulemeester, L., Vandermeersch, R., De Muelenaere, E. and De Kruif, A. 1997. Influence of parity and stage of lactation on somatic cell count in bacteriologically negative dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80:3219-3226
  - ❖ Lee, J., O'Brien, C., Guidry, A., Paape, M., Shafer-Weaver, A. and Zhao, X. 2005. Effect of a trivalent vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis subpopulations, antibody production, and neutrophil phagocytosis. *Can. J. Vet. Res.* 69:11-18.
  - ❖ Leitner, G., Krifucks, O., Kiran, M.D., Balaban, N. 2011. Vaccine development for the prevention of staphylococcal mastitis in dairy cows. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 142 (1-2): 25-35.
  - ❖ Leslie, K., Schukken, Y., Sargeant, J. and y Mitchell, M. 1997. Inhibitor violations during 10 years in Ontario. Association with Somatic Cell Count reduction program. Report to the Ontario Buro of Veterinary drugs.
  - ❖ Magariños, H. 2000. Producción higiénica de la leche cruda. Una guía para la pequeña y mediana empresa. pp: 1-95. Disponible en Internet: [http://www.educapalimentos.org/libros/leche\\_all.pdf](http://www.educapalimentos.org/libros/leche_all.pdf).
  - ❖ Makovec, J.A. y Ruegg, P.L. 2003. Antimicrobial resistance of bacteria isolated from dairy cow milk samples submitted for bacterial culture: 8.905 samples (1994-2001). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 222 (11): 1582-1589.
  - ❖ Marino, Castignani y Arzubi. 2011. Caracterización de los tambos pequeños en las cuencas lecheras pampeanas. INTA. Publicación Técnica N° 61. 48 p. ISSN 0485-9057
  - ❖ Martínez, M.J., Betancourt, J., Alonso González, N. 1996. Ausencia de actividad antimicrobiana de un extracto acuoso liofilizado de *Aloe vera*. *Rev. Cubana Plant. Med.* v.1 n.3

- ❖ McDougall, S., Arthur, D.G., Bryan, M.A., Vermunt, J.J, Weir, A.M. 2007a. Clinical and bacteriological response to treatment of clinical mastitis with one of three intramammary antibiotics. *New Zealand Vet J* 55:161-170.
- ❖ McDougall, S., Agnew, K.E., Cursons, R., Hou, X.X., Compton, C.R.W. 2007b. Parenteral treatment of clinical mastitis with tylosin base or penethamate hydriodide in dairy cattle. *J. Dairy. Sci.* 90:779-789.
- ❖ McInerney, J.P., Howe, K.S., Schepers, J.A. 1992. A framework for the economic analysis of disease in farm livestock. *Prev. Vet. Med.* 13, 137-154.
- ❖ Meglia, G.E. y Mata, H.T., 2001. Mecanismos específicos e inespecíficos de defensa, con referencia a la glándula mamaria de los bovinos productores de leche. Disponible en internet: [cerac.unlpam.edu.ar/index.php/veterinaria/article/download/1990/1946](http://cerac.unlpam.edu.ar/index.php/veterinaria/article/download/1990/1946)
- ❖ Menzies, P. I., Ramanan, S. Z. 2001. Mastitis of sheep and goats. *Veterinary clinics of North America: Food Animal Practice.* 17(2):333- 358.
- ❖ Miller RH, PC Bartlett, SEE Lance, J Anderson, LE Heider. 1993. Costs of clinical mastitis and mastitis prevention in dairy herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 202, 1230-1236.
- ❖ Movassagh, M.H. 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.
- ❖ Muelas, R., Días, J.R., Duch Marti, X., Romero, G. 2004. Anatomía y morfología del pezón en ganado vacuno. *Bovis.* 118: 8-16. Disponible en Internet: <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=997097>.
- ❖ National Mastitis Council (NMC). 1997. Summary of peer-reviewed publications on efficacy of pre-milking and post-milking teat disinfectants published since 1980. Proc. 36th Annual Meeting National Mastitis Council, Albuquerque, New Mexico, USA. p. 276-287.
- ❖ National Mastitis Council, 2003 NMC Publication "Laboratory and Field Handbook on Bovine Mastitis" (1999) pg. 139.
- ❖ 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.

- ❖ Nematalla, K.M., Ghada, S.A.A., Yousef, M., Shabib, Z.A., 2011. Effect of Echinacea as antioxidant on markers of aging. *Aust. J. Basic Appl. Sci.* 5, 18–26. Nowak, R., Szewczyk, K., Gawli
- ❖ Nickerson, S. 1985. Immune mechanisms of the bovine udder: Review article. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 187(1):41-45.
- ❖ Noa-Lima, E., Noa, M., González, D.G., Landeros, P., Reyes, W. 2009. Evaluación de la presencia de residuos de antibióticos y quimioterapéuticos en leche en Jalisco, México. *Rev. Salud Anim.* 31 (1): 29-33.
- ❖ Norcross, N.L. 1991. Specific defence mechanisms of the udder. *Flem. Vet. J.* 62 (Suppl. 1): 129–139.
- ❖ Ocaña, V.S., Nader- Macías, M.E. 2004. Production of Antimicrobial Substances by Lactic Acid Bacteria II. *Public Health Microbiology*.
- ❖ Otero, M.C.; Morelli, L.; Nader-Macias, M.E. 2006. Probiotic properties of vaginal lactic acid bacteria to prevent metritis in cattle. *Lett. Appl. Microbiol.* 43, 91–97.
- ❖ Paape, M., Shafer-Weaver, K., Capuco, A., Van Oostveldt, K. and Burvenich, C. 2000. Immune surveillance of mammary tissue by phagocytic cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 480:259–277.
- ❖ Paape, M.J.; Wergin, W.P.; Guidry, A.J.; Pearson, R. E. 1979. Leukocytes – Second line of defense against invading mastitis pathogens. *J. Dairy Sci.* 62: 135–153.
- ❖ Paulrud, C.O. 2005. Basic concepts of the bovine teat canal. *Vet. Res. Commun.* 29 (3): 215-245.
- ❖ Pellegrino, M., Frola, I., Odierno, L., Bogni, C. 2011. Mastitis bovina: resistencia a antibióticos de cepas de *Staphylococcus* aisladas de leche. *RedVet.* 12 (7): 1-14.
- ❖ Pellegrino, M., Giraudo, J., Raspanti, C., Nagel, R., Odierno, L., Primo, V. and Bogni, C. 2008. Experimental trial in heifers vaccinated with *Staphylococcus aureus* avirulent mutant against bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 127:186-190.
- ❖ Pellegrino, M., Giraudo, J., Raspanti, C., Odierno, L., Bogni, C. 2010. Efficacy of immunization against bovine mastitis using a *Staphylococcus aureus* avirulent mutant vaccine. *Vaccine* 28 (28): 4523-4528.
- ❖ Petrecola D., 2016. Estudio sobre las Condiciones de Competencia en el Sector Lechero de la República Argentina. Disponible en internet: <http://www.ocla.org.ar/contents/news/details/10013004-estudio-sobre-las-condiciones-de-competencia-en-el-sector-lechero-de-la-republic>

- ❖ Philpot, W.N. and Nickerson, S.C. 1991. Mastitis: Counter Attack: A Strategy to Combat Mastitis. Badson Brothers Co.
- ❖ Pillai, S., Kunze, E., Sordillo, L. and Jayarao, B. 2001. Application of differential inflammatory cell count as a tool to monitor udder health. J. Dairy Sci. 84:1413-1420.
- ❖ Pinzón-Sánchez, C.,V. E. Cabrera and P.L. Ruegg. 2010. Decision tree analysis of treatment strategies for mild and moderate cases of clinical mastitis. Accepted J. Dairy Sci. .
- ❖ Prenafeta, A., March, R., Foix, A., Casals, I., Costa, L. 2010. Study of the humoral immunological response after vaccination with a *Staphylococcus aureus* biofilmembedded bacterin in dairy cows: possible role of the exopolysaccharide specific antibody production in the protection from *Staphylococcus aureus* induced mastitis. Vet. Immunol. Immunopathol. 134 (3-4): 208-217.
- ❖ Pyorala, S.H., Pyorala, E.O.1998. Efficacy of parenteral administration of three antimicrobial agents in treatment of clinical mastitis in lactating cows: 487 cases (1989-1995). J. Am. Vet. Med. Ass. 212:407-412.
- ❖ Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. 2002. Medicina Veterinaria. Mastitis Bovina. Edit. Mcgraw-hill. 9o Edición. Vol 1. Madrid, España. pp 728, 810.
- ❖ Rainard, P. y Riollet, C. 2006. Innate immunity of the bovine mammary gland. Review article. Vet. Res. 37:369–400.
- ❖ Rawls, R. 1996. Europe's strong herbal brew. Chemical & Engineering News. 23: 53-60.
- ❖ Reid, G. y Burton, J. 2002. Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. Microb. Infect. 4: 319-324.
- ❖ Reid, G., Burton, J., Devillard, E. 2004. The rationale for probiotics in female urogenital healthcare. Med. Gen. Med. 6 (1): 49-62.
- ❖ Reid, K.B. 1995. The complement system. A major effectors mechanism in humoral immunity. The immunologist 3: 206–211.
- ❖ Reinoso, E., Magnano, G., Giraudo, J., Calzolari, A. and Bogni, C. 2002. Bovine and rabbit models for study of a *Staphylococcus aureus* avirulent mutant RC122. Can. J. Vet. 66(4):285-288.

- ❖ Reza, G. L. C. 2000. Mastitis bovina su reconocimiento clínico, programas de prevención y su terapia con antimastíticos a base de cefapirinas. Mastitis bovina su reconocimiento clínico. México D. F.: 1-13.
- ❖ Riffon, R., Sayasith, K., Khalil, H., Dubreuil, P., Drolet, M. y Lagacé, J. 2001. Development of a Rapid and Sensitive Test for Identification of Major Pathogens in Bovine Mastitis by PCR. Journal of Clinical Microbiology. 39: 2584-2589.
- ❖ Riollet, C., Rainard, P. y Poutrel, B. 2000 Differential induction of complement fragment C5a and inflammatory cytokines during intramammary infections with *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Clin Diagn Lab Immunol. 7(2):161-167.
- ❖ Rodriguez-Palacios, A., Staempfli. H.R., Duffield, T., Weese, J.S. 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, R.P., 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.
- ❖ Rossitto, P. V., Ruiz, L., Kikuchi, Y., Glenn, K., Ruiz, K., Watts, J. L. y Cullor, J. S. 2002. Antibiotic susceptibility patterns for environmental streptococcus isolated from bovine mastitis in central California dairies. J. Dairy Sci. 85: 132-138.
- ❖ Ruegg, L.P. 2004. Calidad de leche y manejo sanitario de la vaca seca, U. Wisconsin, Madison. 7p. Disponible en Internet: [http://www.uwex.edu/MilkQuality/PDF/dry\\_cow\\_en\\_enspanol.pdf](http://www.uwex.edu/MilkQuality/PDF/dry_cow_en_enspanol.pdf)
- ❖ Ryan, M.P., Flynn, J., Hill, C., Ross, R.P., Meaney, W.J. 1999a. The natural food grade inhibitor lactacin 3147 can prevent mastitis in non-lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 82: 2625-2631.
- ❖ Ryan, M.P., Jack, R.W., Josten, M., Jung, G. 1999b. Extensive posttranslational Modification, including serine to d-alanine conversion, in the two-component lantibiotic, lactacin 3147. J. Biol. Chem. 274: 37544-37550.
- ❖ Sanchez, C., Suero M., Castignani H., Terán J.C., Marino M. 2012. La lechería argentina: estado actual y su evolución (2008 a 2011).
- ❖ Sánchez-Monge E. 1980. Diccionario de plantas agrícolas. Madrid: Editorial Ministerio de Agricultura.

- ❖ Sandholm, M. y Korhonen, H. 1995. Infection of the udder-Udder inflammation. In: The bovine udder and mastitis. Ed. Sandholm, M., Honkanen- Buzalski, T., Kaartinen, L., Pyorala, S. pp: 37-48.
- ❖ Schaller A., 2017. Informe de coyuntura de la cadena láctea.
- ❖ Schällibaum, M. 2001. Impact of SCC on the quality of fluid milk and cheese. In: Annual Meeting National Mastitis Council, 40. Reno. Proceedings. Madison: National Mastitis Council. p.38-46.
- ❖ Schepers JA, AA Dijkhuizen. 1991. The economics of mastitis and mastitis control in dairy cattle-a critical analysis of estimates published since 1970. *Prev. Vet. Med.* 10, 213-224.
- ❖ Schepers, A.J., Lam, T.J., Schukken, Y.H., Wilmink, J.B., Hanekamp, W.J. 1997. Estimation of variance components for somatic cell counts to determine thresholds for uninfected quarters. *J. Dairy Sci.* 80: 1833-1840.
- ❖ Schmidt, G. 1974. Lactation Biology. Spain: Freeman & Co. Ltd. Publications.
- ❖ Schwarse, E. and Schroider, L. 1984. Compendio de Anatomía Veterinaria. Acribia, Zaragoza, España.
- ❖ Seanq, R. 2009. Mastitis en ganado bovino.
- ❖ Seegers H, C Fourichon, F Beaudeau. 2003. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet Res* 34, 475-491.
- ❖ Shafer-Weaver, K. and Sordillo, L. 1996. Enhancing bactericidal activity of bovine lymphoid cells during the periparturient period. *J. Dairy Sci.* 79:1347.
- ❖ Shaheen, M., Tantary, H.A., y Nabi, S.U. 2016. A Treatise on Bovine Mastitis: Disease and Disease Economics, Etiological Basis, Risk Factors, Impact on Human Health, Therapeutic Management, Prevention and Control Strategy. *J. Adv. Dairy Res.* 4:150. doi: 10.4172/2329-888X.1000150
- ❖ Sharma M, Vohra S, Arnason JT, Hudson JB. 2008. Echinacea Extracts contain significant and selective activities against human pathogenic bacteria. *Pharmac Biol*; 46: 111-116.
- ❖ Smith KL, DA Todhunter, PS Schoenberger. 1985. Environmental mastitis: cause, prevalence, prevention. *J. Dairy Sci.* 68:1531-1553.
- ❖ Sol J, OC Sampimon, HW Barkema, YH Schukken. 2000. Factors associated with cure after therapy of clinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. *J Dairy Sci* 83:278-284.
- ❖ Sordillo, L and Streicher, K. 2002. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia* 7:135-146.

- ❖ Sordillo, L. 2005. Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility. Review article. *Livestock Production Science* 98:89–99.
- ❖ Sordillo, L., Shafer-Weaver, K. and DeRosa, D. 1997. Immunobiology of the mammary gland. Review article. *J. Dairy Sci.* 80:1851-1865.
- ❖ Sunilkumar, Parameshwaraiah S, Shivakumar HG. Evaluation of topical formulations of aqueous extract of *Centella asiatica* on open wounds in rats. *Indian J Exp Biol.* ;36:569–72.
- ❖ Suvas, S. and y Rouse, B. 2006. Treg control of antimicrobial T cell responses. *Current Opinion in Immunology.* 18:344–348.
- ❖ Thompson-Crispi, K., Atalla, H., Miglior, F., Mallard, B.A. 2014. Bovine Mastitis: *Frontiers in Immunogenetics. Frontiers in Immunology.* ;5:493. doi:10.3389/fimmu.2014.00493.
- ❖ Ting-Chieh Yu, Chai-Ju Chang, Chin-Han Ho, Huo-Cheng Peh, Shuen-Ei Chen, Wen-Bor Liu, Hsin-Yi Peng, Piya Piomya, 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. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 144 210– 219.
- ❖ Todhunter, D.A., K.L. Smith, & J.S. Hogan. 1995. Environmental streptococcal intramammary infections of the bovine mammary gland. *J. Dairy Sci.* 78:2366-2374.
- ❖ Tomasinsig, L., De Conti, G., Skerlavaj, B., Piccinini, R., Maria Mazzilli, D'Este, F., Tossi, A. y Zanetti, M. 2010. BroadSpectrum Activity against Bacterial Mastitis Pathogens and Activation of Mammary Epithelial Cells Support a Protective Role of Neutrophil Cathelicidins in Bovine Mastitis. *Infection and Immunity.* Vol. 78 (4): 1781–1788.
- ❖ Turner, C. 1952. *The Mammary Gland.* Columbia, Mo, Missouri: Lucas Brothers Publications.
- ❖ Turutoglu, H., Hasoksuz, M., Ozturk, D., Yildirim, M., Sagnak, S. 2009. Methicillin and aminoglycoside resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis and sequence analysis of their mecA genes. *Vet. Res. Commun.* 33: 945-956.
- ❖ Twomey, D.P., Wheelock, A.I., Flynn, J., Meaney, W.J., Hill, C., Ross, R.P. 2000. Protection against *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cows using a

- bismuth-based teat seal containing the bacteriocin, lacticin 3147. *J. Dairy Sci.* 83 (9): 1981-1988.
- ❖ USDEC, 2018. Disponible en internet: <http://www.ocla.org.ar/contents/newswelcome/newsstories/?page=1>
  - ❖ Vangroenweghe F., Dosogne H., Mehrzad J. y and Burvenich C. 2001. Effect of milk sampling techniques on milk composition, bacterial contamination, viability and functions of resident cells in milk, *Vet. Res.* 32:565– 579.
  - ❖ Vangroenweghe, F., Dosogne, H. and Burvenich, C. 2002. Composition and milk cell characteristics in quarter milk fractions of dairy cows with low cell count. *Vet. J.* 164:254–260.
  - ❖ Vissio C., Agüero D.A, Raspanti C.G., Odierno L.M, Larriestra A.J 2015. Pérdidas productivas y económicas diarias ocasionadas por la mastitis y erogaciones. *Arch. med. vet.* vol.47 no.1
  - ❖ Vivier, E. and Malissen, B. 2005. Innate and adaptive immunity: specificities and signaling hierarchies revisited. *Nat. Immunol.* 6:17–21.
  - ❖ Voss-Rech, D., Klein, C.S., Techio, V.H, Scheuermann, G.N., Rech, G., y Fiorentin, L. 2011. Antibacterial activity of vegetal extracts against serovars of Salmonella. *Ciência Rural*, 41(2), 314-320. <https://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782011000200022>.
  - ❖ Walsh, M.C., Gardiner, G.E., Hart, O.M., Lawlor, P.G., Daly, M.y Lynch, B. 2008. Predominance of a bacteriocin-producing *Lactobacillus salivarius* component of a five-strain probiotic in the porcine ileum and effects on host immune phenotype. *FEMS Microbiology Ecology* 64 317–327
  - ❖ Wellenberg, G.J., van der Poel, W. H. M. and Van Oirschot, J. T. 2002. Viral infections and bovine mastitis: a review. *Veterinary Microbiology*, Article 2361, pp. 2-21.
  - ❖ Wellnitz O. y Bruckmaier R.M. 2012. The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection. *Vet J.* 192(2):148-52.
  - ❖ Wendakoon C., Calderon P. y Gagnon D. 2012. Evaluation of Selected Medicinal Plants Extracted in Different Ethanol Concentrations for Antibacterial Activity against Human Pathogens. *Journal of Medicinally Active Plants* 1, (2):60-68.

- ❖ Yalcin C. 2000. Cost of mastitis in Scottish Dairy Herds with low and high subclinical mastitis problem. *Tur J Vet Anim Sci* 24, 465-472.
- ❖ Zadoks, R. N. 2002. Molecular and mathematical epidemiology of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis* mastitis in dairy herds. Dissertation Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine: 2-3, 239.
- ❖ Zadoks, R. N., Allore, H. G., Barkema, H. W., Sampimon, O. C., Gröhn, Y. T., Schukken, Y. H. 2001. Analysis of an outbreak of *Streptococcus uberis* mastitis. *J. Dairy Sci.*: 84(3): 590-599.
- ❖ Zhao, X. y Lacasse, P. 2008. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. *J. Anim. Sci.* 86:57–65.