



*Empleo del aditivo zotécnico SULTILPROBIO® en la
prevención y control de la mastitis bovina*

Autor: José Alejandro Mesa Roy

Tutoras: Dr. C. Ana Julia Rondón Castillo

Dr. C. Aymara Valdivia Ávila

Dr. C. Marlen Rodríguez Oliva

Matanzas, 2018

UNIVERSIDAD DE MATANZAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS



Tesis en opción al título de Ingeniero Agrónomo

**Empleo del aditivo zotécnico SULTILPROBIO® en la
prevención y control de la mastitis bovina**

Autor: José Alejandro Mesa Roy

Tutoras: Dr. C. Ana Julia Rondón Castillo

Dr. C. Aymara Valdivia Ávila

Dr. C. Marlen Rodríguez Oliva

Matanzas, 2018

PENSAMIENTO

La mente es igual que un paracaídas, solo funciona si se abre.

Albert Einstein

DECLARACIÓN DE AUTORIDAD

Declaro que yo, José Alejandro Mesa Roy, soy el único autor de este Trabajo de Diploma, en calidad de lo cual autorizo a la Universidad de Matanzas para hacer uso del mismo con la finalidad que estime pertinente.

Firma

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo de diploma a mi abuela Zunilda García García, por brindarme su amor de forma incondicional, por su paciencia y toda la dedicación que me ha dado a lo largo de mi vida. A mi abuelo José Mesa Sánchez, por su constante preocupación por mi educación y por inculcarme los valores morales que poseo. Sé, que estaría orgulloso de mí. Siempre estarás en mi corazón. A ustedes les debo todo lo que soy.

A mis padres Mavys Roy Gutiérrez y José Mesa García, por el amor y apoyo que me dan día a día. Gracias por ser los excelentes padres que son.

A mis tutoras, por la paciencia y dedicación que tuvieron con la realización de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por su apoyo en estos 5 años de carrera.

A mis tutoras Ana Julia Rondón Castillo, Aymara Valdivia Ávila y Marlen Rodríguez Oliva por la paciencia y el tiempo que han dedicado a la asesoría y revisión del presente trabajo.

A la profesora Yasmery Rubio Fontanills y el resto de profesores del Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Matanzas. Muchísimas Gracias.

Al profesor Agustín Beruvides Rodríguez, por el apoyo y la amistad que me brindó en estos 5 años.

A mis profesores de la Facultad de Ciencias Agropecuarias.

A mis compañeros y amigos de carrera.

A los trabajadores de la vaquería 65 de la Empresa Pecuaria Genética de Matanzas, en especial a su administradora Arelis Jiménez, por toda su ayuda en la realización del experimento con los animales.

OPINIÓN DEL TUTOR

Por medio de la presente hacemos constar que el Trabajo de Diploma presentado en opción al título de Ingeniero Agrónomo titulado: “Empleo del aditivo zootécnico SULTILPROBIO® en la prevención y control de la mastitis bovina” es resultado de una consagrada labor científica del aspirante José Alejandro Mesa Roy. El estudiante ha realizado una labor profesional durante el desarrollo de su Trabajo de Diploma. La inteligencia e independencia que manifestó durante el trabajo práctico de laboratorio y en el experimento de campo, le permitió ejecutar la presente investigación con un elevado rigor científico. Ha de destacarse que durante la realización de este trabajo se superó de manera autodidacta en temáticas relacionadas con las propiedades del SUBTILPROBIO® como probiótico y la importancia de estos aditivos en la inhibición de microorganismos patógenos de los animales, lo cual le permitió aportar al desarrollo de la investigación y concluir esta etapa de su vida académica.

Mostró durante toda la secuencia experimental gran sacrificio al asistir diariamente a la vaquería en los horarios del ordeño para la aplicación del probiótico como sellante y aplicó conocimientos adquiridos en la carrera de diferentes asignaturas como Microbiología, morfofisiología animal, zootecnia, nutrición y sistema de producción animal, entre otras.

A través de todo el trabajo mostró mucho interés y fue receptivo a todas las sugerencias realizadas por las tutoras.

Tutoras:

Lic. Ana Julia Rondón Castillo, Dr. C.

Dra. MV. Aymara Valdivia Ávila, Dr. C.

Dra. MV. Marlen Rodríguez Oliva, Dr. C.

RESUMEN

Los probióticos a base de *Bacillus subtilis* inhiben a microorganismos patógenos de los animales. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto del aditivo zotécnico SULTILPROBIO® en la prevención y el control de la mastitis bovina en la vaquería 65 de la Empresa Pecuaria Genética de Matanzas (EPGM). Se aislaron bacterias del canal del pezón de vacas con mastitis subclínica, las cuales se enfrentaron a SULTILPROBIO® por el método de difusión de sustancias en agar. Los tres aislados con mayores halos de inhibición se identificaron por técnicas microbiológicas tradicionales. Posteriormente se realizó un experimento con diseño completamente aleatorizado para la evaluación del efecto de este probiótico como sellante en vacas en ordeño. Se emplearon tres tratamientos: 1. Control, con agua hervida; 2. Tratamiento con propolina al 10% y 3. Tratamiento con SULTILPROBIO®. Por último se contabilizaron los costos incurridos con los sellantes evaluados. Como resultado, se aislaron 20 cepas potencialmente patógenas de vacas con mastitis y 10 de ellas mostraron sensibilidad ante SULTILPROBIO®. Los tres aislados que manifestaron mayor halo de inhibición (13,67-16,67 mm) se identificaron como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, los cuales se encuentran entre los principales causantes de mastitis en Cuba. La aplicación del aditivo zotécnico como sellante del canal del pezón provocó mayor proporción de cuartos recuperados total y parcialmente. Los costos disminuyeron con el empleo del SULTILPROBIO® en comparación con la propolina, por lo que se concluye que este aditivo posee potencial para usarse en el control y la prevención de esta enfermedad.

ABSTRACT

Probiotics based on *Bacillus subtilis* inhibit pathogenic microorganisms of animals. The objective of this work was to evaluate the effect of the zootechnical additive SULTILPROBIO® in the prevention and control of bovine mastitis in the dairy farm 65 of the Matanzas Genetic Cattle Enterprise (EPGM). Bacteria were isolated from the nipple canal of cows with subclinical mastitis, which faced SULTILPROBIO® by the diffusion method of substances in agar. The three isolates with greater inhibition halos were identified by traditional microbiological techniques. Subsequently, an experiment with a completely randomized design was carried out to evaluate the effect of this probiotic as a sealant in milking cows. Three treatments were used: 1. Control, with sterile water; 2. Treatment with propoline and 3. Treatment with SULTILPROBIO®. Finally, the costs incurred with the evaluated sealants were accounted for. As a result, 20 potentially pathogenic strains of cows with mastitis were isolated and 10 of them showed sensitivity to SULTILPROBIO®. The three isolates that showed the greatest halo of inhibition (13.67-16.67 mm) were identified as *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, which are among the main causes of mastitis in Cuba. The application of the zootechnical additive as sealant of the nipple channel caused a greater proportion of partially and totally recovered quarters. Costs decreased with the use of SULTILPROBIO® compared to propoline, so it is concluded that this additive has potential to be used in the control and prevention of this disease.

ABREVIATURAS Y SIGLAS

| | |
|---------------|---|
| CEBIO | Centro de Estudios Biotecnológicos |
| EE | Error estándar |
| EPGM | Empresa Pecuaria Genética de Matanzas |
| FAO | Food and Agriculture Organization |
| h | horas |
| L | Litro |
| mL | mililitro |
| mm | milímetros |
| °C | Grados Celsius |
| P | Probabilidad |
| PROBIOLEV® | Hidrolizado Enzimático de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| SULTILPROBIO® | Biopreparado elaborado con <i>Bacillus subtilis</i> |
| UFC | Unidades Formadoras de Colonias |
| UM | Universidad de Matanzas |
| WHO | <i>World Health Organization</i> |

| ÍNDICE | Pág. |
|---|-------------|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| Problema científico | 3 |
| Hipótesis | 3 |
| Objetivo general y específicos | 3 |
| I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA | 4 |
| I.1 Morfología interna de la glándula mamaria bovina. | 4 |
| I.2 Mastitis bovina, concepto y formas de presentación de la enfermedad | 6 |
| I.3 Agentes etiológicos de la mastitis bovina | 10 |
| I.4 Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis subclínica | 11 |
| I.5 Control y prevención de la mastitis bovina. | 13 |
| I.6 Probióticos, historia y definición | 14 |
| I.6.1 Microorganismos utilizados con fines probióticos. | 16 |
| I.6.2 Mecanismos de acción de los probióticos | 18 |
| I.7 SULTILPROBIO®. | 21 |
| I.8 Uso de probióticos en los tratamientos y prevención de la mastitis. | 22 |
| Capítulo II. Materiales y Métodos | 24 |
| II. 1 Aislamiento de microorganismos potencialmente patógenos causantes de mastitis en la vaquería 65 de la EPGM. | 24 |
| II.1.1 Diagnóstico de vacas con mastitis subclínica | 24 |
| II.1.2 Toma de muestras y aislamiento de bacterias asociadas a la mastitis subclínica | 26 |
| II.2 Determinación in vitro del efecto antibacteriano del aditivo zootécnico SULTILPROBIO® en los microorganismos aislados de animales con mastitis | 28 |
| II.2.1 Evaluación del efecto antibacteriano por el método de la difusión de sustancias en el agar | 28 |
| II.2.2 Identificación de las bacterias que inhibieron su crecimiento frente a SULTILPROBIO® por métodos microbiológicos tradicionales | 29 |

| | |
|--|-----------|
| II.2.3 Conservación de cepas indicadoras | 29 |
| II.2.4 Elaboración del SUBTILPROBIO® | 29 |
| II.3 Evaluación in vivo del efecto de la aplicación del aditivo zootécnico SULTILPROBIO® en la prevención y control de mastitis bovina | 31 |
| II.4 Comparación de la factibilidad económica del uso del SULTILPROBIO® y la propolina como sellantes del pezón de vacas en ordeño | 33 |
| II. 5 Procesamiento estadístico | 33 |
| Capítulo III. Resultados y Discusión | 34 |
| III.1 Aislamiento de bacterias potencialmente patógenas de vacas con mastitis subclínica y evaluación de la actividad antibacteriana de SUBTILPROBIO® frente a ellas | 34 |
| III.2 Evaluación del efecto antibacteriano de SUBTILPROBIO, utilizado como sellante en vacas en ordeño | 39 |
| III.3 Análisis de los costos de la aplicación de SUBTILPROBIO® y propolina durante el experimento | 43 |
| IV. CONCLUSIONES | 45 |
| V. RECOMENDACIONES | 46 |
| VI. REFERENCIAS BIBLIOPGRÁFICAS | 47 |

Introducción

INTRODUCCIÓN

Entre los alimentos más consumidos se encuentran la leche y los derivados lácteos. Según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), en el año 2014 la producción mundial fue de 780 millones de toneladas. En Cuba en el 2017 se alcanzaron 532,3 millones de litros de leche (Ministerio de la Agricultura, 2017); sin embargo, estos niveles aún no satisfacen las necesidades de la población.

La mejor etapa productiva de la lechería en Cuba fue en la década del 80, a partir de los 90's se redujeron estos niveles (3-4 L/vaca), pues el país comienza a transitar por el período especial con muchas dificultades en los insumos, manejo y eficiencia de la producción, de las cuales algunas se mantienen (Ruíz *et al.*, 2016). Entre los problemas actuales se encuentra la incidencia de mastitis, considerada una de las enfermedades más importantes que afectan al ganado bovino de leche. Este padecimiento consiste en la inflamación de la glándula mamaria cuyo origen puede ser infeccioso, traumático o tóxico; y es una patología que se reconoce mundialmente por causar grandes pérdidas económicas, tanto al productor como a la industria. Se estima que entre el 15 y el 20% de las vacas de un hato lechero se afectan de alguna forma con mastitis, en uno o más cuartos mamarios (Uchuari, 2018).

Los cálculos mundiales revelan que la mastitis representa el 30% del costo total de todas las enfermedades en el ganado lechero. En este sentido, existen pocos datos de la situación actual en Cuba de esta enfermedad, aunque estudios de varios rebaños lecheros de diferentes regiones reportan pérdidas similares y en algunos casos superiores, dadas fundamentalmente por fallas e incluso ausencia de los programas de control de la misma. Los resultados emanados de tales investigaciones indican que en la zona occidental y centro (Villa Clara) del país, la prevalencia de mastitis clínica y subclínica es elevada, aproximadamente de 45% y 75% respectivamente; observándose además una alta incidencia de mastitis clínica y crónica (Armenteros *et al.*, 2006; Ruíz *et al.*, 2012).

De todas las pérdidas atribuidas a la mastitis, la que más destaca y mayor rango tiene, es la disminución de la producción por la infección subclínica, ya que puede variar entre 70 y 80% (Carrión, 2013; Fetrow, 2013). Entre los microorganismos que más inciden están *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium* spp., *Streptococcus uberis*, *Enterococcus* spp. y *Candida albicans* (Castañeda *et al.*, 2013; Aguilar *et al.*, 2014; Sartori *et al.*, 2014; Raspanti *et al.*, 2016).

Dentro de los métodos empleados para el control de la mastitis se presentan los antibióticos, los cuales como se conoce, provocan la generación de genes de resistencia en los microorganismos patógenos del hombre y los animales (Castanon, 2007). Por esta razón desde hace varios años se trabaja en la búsqueda de otras alternativas naturales que disminuyan el efecto de estos agentes infecciosos, tales como los probióticos. Estos biopreparados se consideran cultivos simples o mezclas de microorganismos vivos que, aplicados a los animales o al hombre, benefician al hospedador al mejorar las propiedades de la microbiota intestinal original (Sanders, 2011; Delgado, 2017). En la actualidad se desarrollan múltiples estudios con sólido apoyo experimental, con la finalidad de ampliar su uso, así como de definir los límites de su efectividad no solo en el tracto digestivo, sino en otros ecosistemas como vagina y glándula mamaria (Casals, 2017; Laurencio *et al.*, 2017).

Entre los microorganismos que más se utilizan como probiótico se encuentran los del género *Bacillus* ya que marcan una importante función en la producción de sustancias antimicrobianas del tipo bacteriocinas o antibióticos que inhiben a microorganismos patógenos (Ansari *et al.*, 2012; Rodríguez, 2017).

En el Centro de Estudios Biotecnológicos de la Universidad de Matanzas (CEBIO) se obtuvo por Milián (2009) un biopreparado probiótico denominado SUBTILPROBIO® que contiene *Bacillus subtilis* y sus endosporas. Este biopreparado se evaluó por otros investigadores en pollos (Crespo, 2014), cerdos (Rodríguez, 2015) y terneros (Silva, 2013), con excelentes resultados en los indicadores productivos y en la salud de los animales. Sin embargo, a pesar de

la comprobada efectividad antimicrobiana de este producto, no se ha evaluado como antiséptico final (sellante) del pezón en rebaños bovinos.

Problema

La mastitis bovina es una de las enfermedades más costosas de la ganadería en Cuba. A pesar de que existen numerosas medidas preventivas y curativas para eliminar esta enfermedad, no se cuenta con un biopreparado probiótico, que aplicado en el ordeño como antiséptico del pezón disminuya los niveles de patógenos causantes de esta infección.

Hipótesis

La aplicación del aditivo zotécnico SULTILPROBIO® como antiseptia final del pezón contribuirá a la disminución de la presentación de mastitis subclínica en rebaños bovinos.

Objetivo General

Evaluar el efecto del aditivo zotécnico SULTILPROBIO® en la prevención y el control de la mastitis subclínica en la vaquería 65 de la Empresa Pecuaria Genética de Matanzas (EPGM).

Objetivos específicos

- Aislar microorganismos potencialmente patógenos causantes de mastitis subclínica en la vaquería 65 de la EPGM.
- Determinar *in vitro* el efecto antibacteriano del aditivo zotécnico SULTILPROBIO® en los microorganismos aislados de animales con mastitis.
- Evaluar *in vivo* la efectividad de la aplicación del aditivo zotécnico SULTILPROBIO® en la prevención y control de mastitis bovina.
- Comparar los costos con el uso de SULTILPROBIO® y la propolina como sellantes del pezón de vacas en ordeño.

Revisión bibliográfica

I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I.1 Morfología interna de la glándula mamaria bovina

La ubre bovina está compuesta de cuatro glándulas mamarias, de origen dérmico, separadas por membranas y ligamentos específicos que dividen las anteriores de las posteriores, las mitades derecha de la izquierda. Cada una de ellas posee una cisterna del pezón, cisterna de la glándula, ductos de leche y tejido glandular que contiene millones de alvéolos, recibe el nombre de cuarto mamario y se considera como una unidad funcional que opera independientemente dentro del complejo de la ubre (Schroeder, 2012). En la figura 1 se presenta un esquema de la estructura interna de la glándula mamaria.

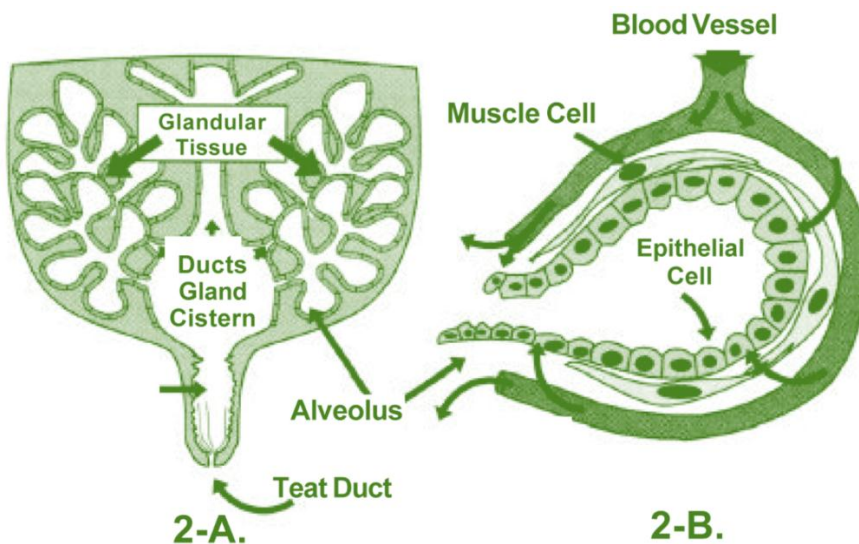


Figura 1: Estructura interna de la glándula mamaria (Tomado de Schroeder, 2012).

En su interior, cada cuarto posee su propio tejido secretor (alvéolo mamario) y un conjunto de ductos encargados de conducir la leche hasta el seno lactífero glandular o cisterna de la glándula. Los alvéolos se consideran la unidad funcional de la ubre. Estos están irrigados por pequeños vasos sanguíneos y rodeados por una serie de células especializadas (conectivas, epiteliales y musculares) (Schroeder, 2012).

A partir de los nutrientes que llegan a la ubre, por vía sanguínea, las células epiteliales se encargan de producir leche. Este alimento nutritivo se libera dentro de la luz del alvéolo y en el momento del ordeño, la oxitocina liberada en sangre ocasiona la contracción de las células musculares que cubren esta estructura. Esta acción conlleva a la eyección láctea (bajada de la leche), la cual sale a los conductos galactóforos y a la cisterna de la glándula (Corzo *et al.*, 2009; Pereyra *et al.*, 2014).

Los alvéolos drenan la leche a los conductos capilares que desembocan en la cisterna a nivel de cada glándula. De esta área pasa al exterior a través del pezón, en cuyo trayecto aparece también una pequeña cisterna. Tras esta, se encuentra un canal rodeado de tejido muscular y conectivo, los que regulan la abertura de salida y contribuyen a evitar la infección de la mama con microorganismos del medio externo (Jiménez, 2013).

Los microorganismos infecciosos, provenientes del medio externo, son la principal causa de inflamación del tejido secretor mamario (mastitis) (Fernández *et al.*, 2013). Las bacterias ingresan a través del canal del pezón, pueden traspasarlo durante o entre ordeños y multiplicarse en las cisternas de este y de la glándula. Inicialmente se afectan los tejidos que rodean los grandes ductos y las cisternas que recogen la leche, luego la infección puede progresar hasta afectar el tejido glandular y los alvéolos (López, 2014).

En la figura 2 se presentan las etapas que se producen durante el proceso de infección. A lo anterior se debe agregar, que tanto los microorganismos, las toxinas producidas por ellos así como los mediadores químicos de la inflamación, dañan al tejido productor de leche, dando como resultado la disminución de la producción láctea. Estas sustancias liberadas al torrente vascular incrementan la permeabilidad de los vasos sanguíneos, de donde los leucocitos (células somáticas) se trasladan (hacia los alvéolos) para atrapar al agente invasor (Pereyra *et al.*, 2014).

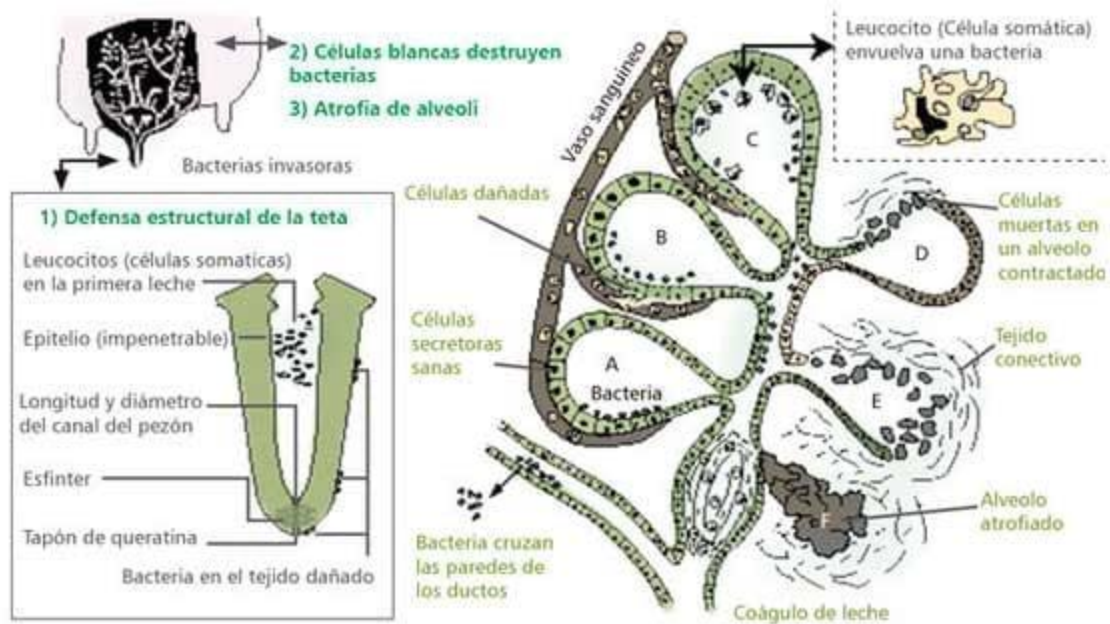


Figura 2: Etapas del proceso infeccioso de la glándula mamaria bovina (Tomado de Carrión, 2013).

Sin embargo, como parte del proceso inflamatorio, estos leucocitos también causan daños a las células productoras de leche. Según Bouchard *et al.* (2015) con el curso de la infección los alvéolos reducen su tamaño, las células epiteliales son destruidas y reemplazadas por cicatriz, hay aumento difuso del tejido conjuntivo, fibrosis, edema, atrofia del tejido mamario, absceso glandular y consecuentemente el cuarto mamario produce menos o se convierte en no funcional.

I.2 Mastitis bovina, concepto y formas de presentación de la enfermedad

La mastitis bovina se define como una reacción inflamatoria de uno o varios lóbulos de la glándula mamaria y sus tejidos secretores. Esta enfermedad productiva puede dar lugar a una falta de funcionalidad y riego sanguíneo en la mama (Fuentes *et al.*, 2013). Se considera la de mayor prevalencia global en los hatos lecheros y en gran parte del mundo se presenta en forma endémica (Bouchard *et al.*, 2015).

Esta patología no solo causa disminución en la producción láctea sino que también induce a una depreciación de la calidad de la leche y condiciona la duración de la lactancia bovina en las hembras afectadas (Fuentes *et al.*, 2013). Los animales eliminados prematuramente de la línea de ordeño, los gastos en medicamentos y honorarios veterinarios, favorecen que sea una de las enfermedades más costosas en la industria lechera a pesar de los métodos modernos establecidos para su control (Asli *et al.*, 2017).

Su etiología puede ser infecciosa, traumática o tóxica, aunque prioritariamente ocurre por invasión de bacterias patógenas a través del canal del pezón. En esta enfermedad, existen cambios físicos y/o químicos en la glándula mamaria que determinan el desarrollo clínico o subclínico de la mastitis, dependiendo además de la naturaleza del agente causal (capacidad de infección, multiplicación y extensión) y particularmente del estado inmunológico de la ubre (Martínez *et al.*, 2015; Vissio *et al.*, 2015).

En la mastitis subclínica no se perciben, en la ubre, cambios externos visibles que manifiesten la condición patológica del animal. Esta forma de presentación evoluciona sin signos inflamatorios aparentes. Se caracteriza por un reducido rendimiento lácteo y alteraciones en la composición de la leche. El análisis bacteriológico suele demostrar la presencia de microorganismo y conjuntamente se acompaña de un aumento en el recuento de células somáticas (RCS) (Green *et al.*, 2014; Fonseca, 2015).

La mastitis subclínica no se detecta rápidamente puede incluso, no reconocerse por el ordeñador (Ponce *et al.*, 2010). De ahí, la importancia epidemiológica de esta enfermedad. Su curso asintomático conlleva a que las hembras afectadas se conviertan en fuentes de infección para otros animales susceptibles. En condiciones de campo se usa frecuentemente la prueba de California (*California Mastitis Test*, CMT.) para su diagnóstico. Este método permite identificar el grado de infección subclínica con alta sensibilidad (98%) y especificidad (95%) (Alonso, 2016). El tipo subclínico es entre 15 a 40 veces más frecuente que la manifestación clínica (Oliveira *et al.*, 2012; Suárez *et al.*, 2014).

En la mastitis clínica la glándula mamaria se inflama (figura 3), hay sensibilidad al tacto, edema y enrojecimiento de toda la zona afectada. En casos severos se presentan signos sistémicos que cursan con: aumento de la temperatura rectal y del pulso, decaimiento, pérdida del apetito y baja de la producción. Esta forma de presentación se caracteriza por anomalías visibles tanto en la ubre como en la leche. Puede ser de forma aguda, caracterizándose por su aparición súbita o puede persistir y evolucionar a crónica. En este caso la infección será de larga duración (Calderón y Rodríguez, 2008; Ramírez *et al.*, 2016).

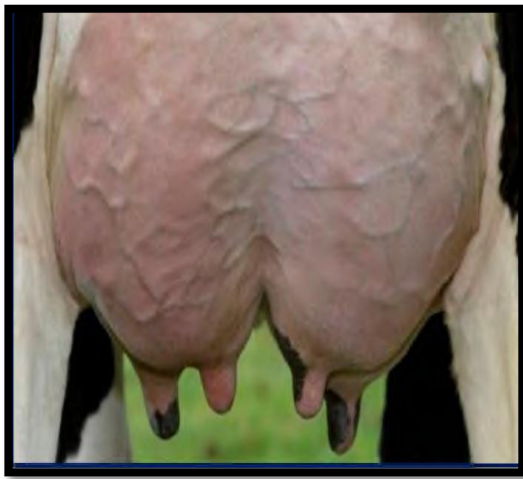


Figura 3: Ubre bovina característica con mastitis clínica (Tomado de ALTA, 2012).

El cuadro clínico se acompaña de una reducción en la capacidad funcional de la glándula mamaria y por ende una menor producción de leche, en la que se manifiestan cambios pronunciados en su composición y apariencia (presencia de grumos, coágulos, pus o sangre). Se eleva la carga bacteriana normal, las células somáticas (principalmente neutrófilos polimorfo nucleares) y el contenido de proteasa (Fernández *et al.*, 2012; Giannechini *et al.*, 2014).

Según Ávila y Gutiérrez (2014) y Almeida (2015), dentro de los casos clínicos de la mastitis se describen otras formas de presentación. Esta clasificación está relacionada con el grado de infección, sintomatología clínica y duración de la enfermedad:

Mastitis suave ligera: puede considerarse un estado intermedio de la enfermedad, en el que se pueden presentar síntomas agudos, llegando en algunos casos a una inflamación crónica.

Mastitis suave o moderada: se presenta súbitamente con disminución en la producción de leche y cambios en su calidad como: aspecto seroso, coágulos o grumos. Igualmente, los animales pueden presentar fiebre, anorexia, depresión y movimientos ruminales disminuidos, sin cambios aparentes en el aspecto de la ubre.

Mastitis aguda: aparece con mucha frecuencia después del parto y se reconoce por su presentación repentina exhibiendo cambios en la leche como grumos o tolondrones y reducción en la producción de esta, en muchos casos con apariencia de suero sanguíneo. La ubre puede presentar inflamación de ligera a dura, caliente y dolorosa. La vaca muestra signos de anorexia, depresión y fiebre.

Mastitis crónica: se presenta cuando la inflamación aguda de la ubre persiste por más de cinco días con endurecimiento y sensación caliente o cuando se aprecian secreciones continuas o intermitentes. La apariencia en los primeros chorros de leche es acuosa, acompañada de hojuelas, grumos, tolondrones, coágulos o fibrones. El animal presenta un cuadro de fiebre, taquicardia, anorexia y atonía ruminal, entre otros síntomas. La mastitis crónica puede manifestarse con eventos agudos y a su vez la mastitis aguda puede volverse crónica.

Mastitis gangrenosa: inicialmente el cuarto afectado se muestra inflamado, enrojecido y caliente, luego en pocas horas la leche se torna acuosa y sanguinolenta. Esta forma de presentación clínica es ocasionada cuando los microorganismos involucrados o sus toxinas producen vasoconstricción, isquemia y muerte del tejido. Al palpar la glándula afectada, esta se encuentra inflamada, fría y cianótica, se observa una línea de demarcación entre el tejido sano y el afectado, viéndose este de color azul o negro.

I.3 Agentes etiológicos de la mastitis bovina

En la glándula mamaria bovina se identifican más de 140 especies, subespecies y serovariedades microbianas que incluyen bacterias medio ambientales, oportunistas, patógenas contagiosas y otros organismos que penetran en la ubre a través del canal del pezón. Estos gérmenes se multiplican rápidamente y dan lugar a inflamación con daño tisular (Beltrán *et al.*; 2015; Alonso, 2016).

Los microorganismos medio ambientales tienen su reservorio en el hábitat donde permanecen los animales (suelo, agua, cama, estiércol) y no en las glándulas mamarias infectadas, siendo por lo general transmitidos entre periodos de ordeños (Breen, 2014). Dentro de este grupo se encuentran los bacilos entéricos Gram negativos como *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Enterococcus spp.* y en menor medida los coliformes (Bradley y Green, 2015).

Dentro de los patógenos contagiosos y de mayor prevalencia se encuentran *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y *Actinomyces pyogenes*. Estos microorganismos tienen su hábitat en la glándula mamaria bovina y se transmiten de ubre a ubre principalmente durante el ordeño de las hembras (Barbosa *et al.*, 2007; Gasque, 2015). En ocasiones estas bacterias se adaptan a las condiciones de la glándula mamaria, desarrollan en ellas estrategias para evadir el sistema inmune y permanecer en la misma (García *et al.*, 2018).

Dentro del grupo de bacterias oportunistas que provocan mastitis están los estafilococos coagulasa negativos (CNS), considerados en la actualidad, patógenos emergentes de la mastitis bovina. Normalmente estos microorganismos se encuentran en las manos del ordeñador y en la piel sana del pezón desde donde logran colonizarlo y penetrar hasta los tejidos secretores (Bradley y Green, 2015).

Con menor frecuencia causan mastitis microorganismos de los géneros *Mycoplasma spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Nocardia spp.*, *Bacillus spp.*, *Pasteurella*

spp. y *Protothecas* spp. y levaduras como *Cryptococcus neoformans* y *Candida albicans*. Para estos agentes la tasa de curación terapéutica suele ser prácticamente nula, independientemente del tratamiento, por lo que en muchos casos se debe sacrificar al animal infectado (Fernández *et al.*, 2012; Martínez *et al.*, 2013).

Se ha observado que la propagación de patógenos infecciosos y ambientales se puede reducir con una buena higiene de la ubre y sumergiendo el pezón en selladores de barrera después del ordeño, lo cual disminuye la incidencia de nuevas infecciones intramamarias. Según reportes (Trujillo *et al.*, 2011; Ruíz *et al.*, 2016), los selladores de barrera actúan al formar una muralla entre el medio ambiente y la piel del pezón, así como un sello en la punta de este, para impedir la entrada de material extraño o microorganismos en la ubre.

I.4 Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis subclínica

La mastitis subclínica es una enfermedad con elevada prevalencia en el ganado lechero, una de las patologías más importantes que afectan a la industria láctea y constituye la primera causa de pérdidas económicas para los productores de leche a nivel mundial. Por ello, se reconoce desde hace algún tiempo como el padecimiento más costoso en los hatos ganaderos (Huijps *et al.*, 2008; García *et al.*, 2018).

En una valoración económica realizada por Vissio *et al.* (2015) en Córdoba, Argentina se determinó que las pérdidas por mastitis subclínica representan un promedio del 87% del costo total calculado para esta enfermedad. Por su parte, Romero (2016) expresó, que este tipo de mastitis es la que más afecta a los pequeños productores en Colombia. En correspondencia con lo anteriormente planteado, los estudios realizados por Ruiz *et al.* (2012) en Cuba, manifestaron que la mayor prevalencia (75%) corresponde a esta misma forma de presentación de la enfermedad (subclínica).

Ante esto, es importante en cualquier sistema de producción, determinar la presencia de mastitis y su control para garantizar la calidad de la leche a través de pruebas que se realizan en laboratorio: determinación de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) y Conteo Celular Somático (CCS). El conteo de UFC hace referencia a la higiene general del ordeño y el CCS a la sanidad del producto obtenido en el establo y al estado infeccioso del rebaño (Vargas, 2012; Beltrán *et al.*, 2015).

Ambas formas de presentación de la enfermedad (clínica y subclínica) afectan tanto la cantidad (Ruiz *et al.*, 2016) como el valor nutritivo de la leche debido al alto CCS y al incremento de enzimas proteolíticas y lipolíticas de origen sanguíneo y bacteriano. Principalmente se ve afectado el contenido proteico de la leche al incrementarse las proteínas séricas y disminuir la caseína (Vargas, 2012).

Según Ruíz *et al.* (2016), la mastitis bovina se ha convertido en la causa más frecuente de leche penalizada en Cuba, sin embargo, no se reconoce el principal efecto negativo de esta enfermedad; la leche no producida. En este sentido, estudios realizados por Vargas (2012) en la Ciudad de Chile, estiman las pérdidas expresas en litros que se pueden ocasionar por efecto del aumento del CCS. La tabla 1 expresa la cantidad de leche dejada de producir, estratificada en siete rangos, por animales de primera, segunda o más lactancias.

Estudios realizados por la NDSU (*North Dakota State University*) expresan cuantiosas pérdidas en la industria láctea debido a la presencia de mastitis en sus rebaños. Según reportes de dicha investigación, el costo anual total de la enfermedad se aproxima a \$ 1,8 mil millones de dólares. Esto representa aproximadamente el 10% del valor total de las ventas de leche de granja, y estiman que dos tercios de esta pérdida se debe a la reducción de la producción de leche en las vacas infectadas de forma subclínica (Schroeder, 2012).

Tabla 1. Pérdidas en producción de leche (litros) por efecto del aumento del recuento de células somáticas, estratificadas en siete rangos, para animales de primera, segunda o más lactancias.

| Primera lactancia | | | | Segunda o más lactancias | | |
|--------------------------|--------|---------------|----------|--------------------------|---------------|----------|
| Producción (L) | | | | Producción (L) | | |
| RCS (x 10 ³) | Diaria | Por lactancia | Pérdidas | Diaria | Por lactancia | Pérdidas |
| <100 | 18,47 | 5.633 | 0 | 20,08 | 6.344 | 0 |
| 100-200 | 17,72 | 5.402 | 228 | 19,91 | 6.073 | 271 |
| 200-500 | 17,24 | 5.258 | 375 | 19,32 | 5.893 | 451 |
| 500-1000 | 16,74 | 5.106 | 527 | 18,75 | 5.719 | 625 |
| 1000-5000 | 16,34 | 4.984 | 649 | 18,26 | 5.569 | 775 |
| 2000-5000 | 15,89 | 4.846 | 787 | 17,71 | 5.402 | 942 |
| >5.000 | 15,07 | 4.596 | 1.037 | 16,93 | 5.164 | 1.180 |

RCS. Recuento de células somáticas.

I.5 Control y prevención de la mastitis bovina

Un manejo adecuado es fundamental e insustituible como medida de control y prevención de las infecciones mamarias, probablemente la mejor. Reducir la prevalencia de la mastitis es una de las tareas importantes en la ganadería cubana (Ruiz *et al.*, 2016).

Según Rodríguez (2010), las instalaciones pecuarias deben mantener el control sobre una serie de normas sanitarias para mantener la productividad y la salud de los rebaños lecheros. Dentro de ellas se enuncian: prácticas de ordeño higiénico, sellado o desinfección de pezones post-ordeño, terapia de vaca seca y adecuado funcionamiento del equipo de ordeño.

Sin embargo, la medida profiláctica más efectiva va dirigida al control de patógenos. Según la literatura consultada para los gérmenes altamente contagiosos (*Staphylococcus aureus*) se debe desinfectar las ubres tras el ordeño sumergiendo durante unos instantes el pezón en una solución desinfectante que puede ser a base de yodo, cloro o ácido láctico (León *et al.*, 2005).

Ante los gérmenes medioambientales como el *Streptococcus uberis* o los estafilococos negativos a la coagulasa se utilizan también baños de pezoneras. En estos casos se emplean soluciones con efecto barrera (mecánica) contra la entrada de gérmenes, nombrados selladores de barrera (Escamilla *et al.*, 2007)

De forma natural, la lámina mucosa de la cara interna del pezón produce queratina; sustancia proteica, muy rica en azufre, que constituye el componente principal de las capas más externas de la epidermis de los vertebrados. La queratina es la responsable de la dureza y resistencia de los cuernos, uñas y para el pezón constituye un elemento esencial de protección mecánica y física, Existe una relación directa entre la producción de leche al momento del secado y el cierre de pezones. A medida que la producción láctea es mayor, el esfínter mamario permanece abierto por más tiempo, sin queratina, lo que permite la exposición de las ubres a diferentes microorganismos (Dingwell *et al.*, 2003).

Existen reportes en la literatura de selladores internos o selladores intramamarios para la prevención de la mastitis bovina. Estos tienen como finalidad cerrar artificialmente y por su cara interna el pezón mamario durante la totalidad del periodo de secado. Los primeros experimentos con este tipo de selladores se llevaron a cabo en los años 50, utilizando para ello metales pesados; los resultados sin embargo no fueron satisfactorios por la irritación causada en la mucosa de la cisterna así como por la inestabilidad de los productos (Scamilla *et al.*, 2007).

Años más tarde Fernández *et al.* (2008) emplearon, en infecciones intramamarias recurrentes, selladores a base de soluciones yodóforas. El producto evaluado resultó ser 75% más efectivo en la prevención de la infección que el tratamiento convencional. Los animales de este experimento disminuyeron en 66% las infecciones recurrentes causadas por *Staphylococcus aureus* y en un 100% las causadas por coliformes fecales.

I.6 Probióticos. Historia y definición

A principios del siglo XX, el científico ruso Elie Metchnikoff (1907) describió los efectos beneficiosos de la ingestión de bacterias ácido-lácticas en la comunidad

microbiana del tracto gastrointestinal (TGI). Este microbiólogo ucraniano atribuyó la longevidad de ciertas poblaciones balcánicas al consumo habitual de lácteos fermentados, portadores de lactobacilos que “promovían la salud y prolongaban la vida”. Contemporáneo con Metchnikoff, Henry Tissier, un médico pediatra francés, observó que los niños con diarrea tenían una baja cantidad de bifidobacterias en sus heces. Estas bacterias, por el contrario, eran abundantes en los niños sanos.

Sin embargo, no fue hasta 1965 que Lilley y Stillwell utilizaron por primera vez el término probiótico, el cual en sus inicios correspondió a cualquier microorganismo o sustancia producida por él, que favorecía el crecimiento de otros. Años más tarde, Parker (1974) lo definió como organismo o sustancia que contribuye al balance microbiano intestinal de los animales. Esta definición era imprecisa, porque cualquier sustancia podía ser llamada probiótico.

Quince años después, Fuller (1989) postuló que los probióticos eran “suplementos microbianos que influyen beneficiosamente en el animal huésped al mejorar su balance microbiano”. En el año 2001 la FAO y la WHO crearon una comisión de expertos para esclarecer dicho término, debido a la rápida incorporación de este tipo de productos en el mercado y su distribución en el ámbito internacional, sin la existencia previa de una normativa comúnmente aceptada. En esta ocasión se redefinió el concepto como: microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidades adecuadas confieren un efecto beneficioso en la salud del hospedero (Sanz *et al.*, 2003).

El concepto evolucionó a través de los años dentro de la comunidad científica (Amores *et al.*, 2004 y Oliveira y González, 2007). Entre las definiciones más amplia está la expresada por Barrios *et al.* (2012), quienes definieron que un probiótico funcional o percedero se refiere a “un microorganismo o mezclas de microorganismos viables, que al ser administrados al huésped en cantidades adecuadas, pueden sobrepasar las barreras gastrointestinales, sobrevivir, adaptarse, colonizar, multiplicarse y a su vez, intervenir en el equilibrio existente del *microbioma*, modificándolo o estabilizándolo, en beneficio de la salud”.

Aquellas cepas con potencialidad probiótica que sean inocuas y a su vez produzcan beneficios, pero que no tengan la capacidad de sobrevivir y multiplicarse en el hospedador, quedarían englobadas bajo la denominación de probióticos de tipo transitorio o no percedero.

Los aditivos probióticos se introducen hoy en los sistemas intensivos de manejo y alimentación animal, como una alternativa al desuso de los antibióticos promotores del crecimiento (Kadaikunnan *et al.*, 2015; Kizerwetter-ŚwidayBinek, 2016). Estos biopreparados naturales fortalecen el equilibrio de la microbiota intestinal, estimulan el sistema inmune e incrementan los rendimientos productivos lo cual contribuye a fomentar una ganadería sostenible y ecológica (Laurencio *et al.*, 2017).

I.6.1 Microorganismos utilizados con fines probióticos

Continuamente se obtienen nuevas cepas microbianas o sus mezclas para utilizarlas en biopreparados para el consumo humano y con destino a la producción animal. Por esta razón, la FAO y la WHO en el 2002 publicaron una guía para establecer los criterios de selección y controles de calidad para los productos probióticos. Entre estos criterios se señala, fundamentalmente, que los microorganismos tienen que identificarse correctamente hasta especie y ser reconocidos como seguros (*Generally Recognized As Safe*, GRAS), caracterizados *in vitro* y evaluados *in vivo* para confirmar su respuesta probiótica. Así como, deben mantenerse con alto nivel de viabilidad durante los procesos de fabricación y almacenamiento o durante el tránsito por el tracto gastrointestinal del hospedero.

Las especies más usadas en las preparaciones probióticas se muestran en la tabla 2. Se reconocen a las bacterias ácido lácticas, fundamentalmente las que pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, como los microorganismos que más se estudian y emplean como probióticos (Laurencio *et al.*, 2017).

Tabla 2. Especies de microorganismos comúnmente usados como probióticos (Adaptado de Pino y Dihigo, 2007; García, 2011).

| ORGANISMOS | |
|---|--|
| <i>Lactobacillus</i> | Streptococcus otros cocos Gram positivos |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> |
| <i>Lactobacillus casei</i> | <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> |
| <i>Lactobacillus del brueckii</i> sub sp. <i>Bulgaricus</i> | <i>Streptococcus diaacetylactis</i> |
| <i>Lactobacillus reuterii</i> | <i>Streptococcus intermedius</i> |
| <i>Lactobacillus brevis</i> | <i>Enterococcus faecium</i> |
| <i>Lactobacillus cellobiosus</i> | <i>Enterococcus faecalis</i> |
| <i>Lactobacillus curvatus</i> | |
| <i>Lactobacillus fermentum</i> | Bifidobacterias |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> | <i>Bifidobacterium bifidum</i> |
| <i>Lactobacillus gasseri</i> | <i>Bifidobacterium animalis</i> |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i> | <i>Bifidobacterium longum</i> |
| <i>Lactobacillus johnsonii</i> | <i>Bifidobacterium thermophilum</i> |
| <i>Bifidobacterium pseudolongum</i> | |
| <i>Bifidobacterium choerinum</i> | |
| Bacillus | Levaduras |
| <i>Bacillus licheniformis</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> evar. <i>Boulardii</i> |
| <i>Bacillus breve</i> | |

Por su composición microbiológica, el contenido del tracto gastrointestinal de diferentes especies animales y las heces fecales, son las principales fuentes de obtención de microorganismos para la elaboración de las preparaciones probióticas (García, 2011; Nguyen *et al.*, 2015). En este sentido, se reconocen otros ecosistemas (jugo de tomate alterado y suelo con sangre de matadero) para el aislamiento y selección de especies microbianas (*Bacillus* spp.) con fines probióticos para ser empleadas en la elaboración de aditivos zootécnicos destinados a mejorar la salud animal e incrementar los rendimientos productivos (Milián *et al.*, 2017).

En los últimos años se reconoce el género *Bacillus* spp. por el potencial que posee para sintetizar metabolitos con actividad antifúngica y antibacteriana. Estas sustancias antimicrobianas son biopéptidos con diferente estructura

química, que se utilizan como agentes terapéuticos contra bacterias y hongos patógenos, capaces de actuar sobre microorganismos de diversa etiología. El efecto bio-controlador que ejerce *Bacillus* spp., es el resultado de diversos mecanismos, entre los que se encuentra la antibiosis, que se produce debido a la producción de péptidos, lipopéptidos y fosfolípidos (Kadaikunnan *et al.*, 2015).

1.6.2 Mecanismos de acción de los probióticos

Entre las funciones que desarrollan los probióticos se considera que modifican la población microbiana intestinal, estimulan el sistema inmunológico, intervienen en los procesos metabólicos, previenen la colonización por patógenos, incrementan la producción de ácidos grasos volátiles (AGV), reducen la absorción de sustancias tóxicas tales como NH₃, aminas, indol, mercaptanos y sulfitos, disminuyen el colesterol en sangre, sintetizan vitaminas especialmente vitaminas K y del complejo B y mejoran la absorción de minerales (Lata *et al.*, 2006; Nocek *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2015).

Hernández *et al.* (2015), resumen los mecanismos de acción de los probióticos de tres tipos: mejora de la barrera intestinal defensiva, modulación inmunológica e incremento de la eficiencia metabólica. La función protectora contra patógenos, puede ejercerse a través de la selección por los nutrientes, la reducción del pH local, la producción de sustancias bactericidas y bacteriostáticas como ácidos orgánicos, bacteriocinas y peróxido de hidrógeno, la estimulación de la producción epitelial de moco y la competencia por los sitios de adhesión.

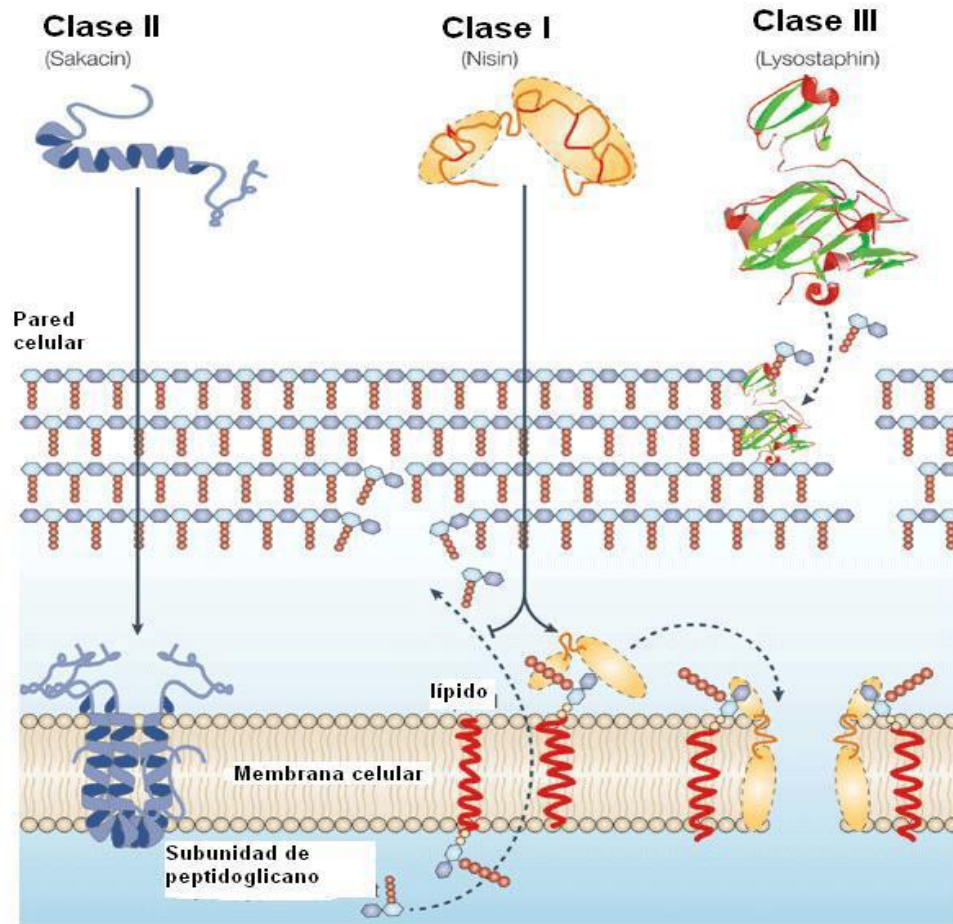
Los cultivos de *Bacillus* spp. que se emplean en la elaboración de probióticos marcan una importante función en la producción de sustancias antimicrobianas del tipo bacteriocinas (Ansari *et al.*, 2012). Estas sustancias son péptidos heterogéneos producidos por síntesis ribosomal, con diferentes niveles en cuanto a espectros de actividad, mecanismos de acción, peso molecular y propiedades fisicoquímicas (Stoyanova *et al.*, 2012).

Las bacteriocinas pueden ser sintetizadas por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, consideradas benéficas para la salud y producción de alimentos. Se

secretan extracelularmente y no son tóxicas para las células eucariotas. Además, ellas presentan alta actividad bactericida o bacteriostática en cepas o especies relacionadas, en microorganismos patógenos y deteriorativos de alimentos (Cotter *et al.*, 2005; Svetoch *et al.*, 2011).

De acuerdo con sus características bioquímicas y genéticas, las bacteriocinas, se clasifican en tres clases generales: Clase I. antibióticos, con poca estabilidad al calor, péptidos policíclicos (< 5 kDa) con aminoácidos modificados; clase II. no antibióticos estables al calor, pequeñas (<10 kDa) y clase III péptidos de gran tamaño (>10 kDa) e inestables al calor. Por lo general, las bacteriocinas destruyen la integridad de la membrana citoplasmática a través de la formación de poros transmembranales, lo que provoca la salida de aminoácidos y ATP, por tanto, no se genera el gradiente electroquímico, ni se alcanza la fuerza protomotriz necesaria en la síntesis de ATP. Estos mecanismos de acción están expuestos en la figura 4 (Birstain-Bausa *et al.*, 2012).

La inhibición o muerte de los microorganismos patógenos también puede desencadenarse debido a la producción de antibióticos. Los representantes del género *Bacillus* spp. se destacan por la producción de una amplia gama de antibióticos lipopeptídicos (Cho *et al.*, 2011). Estos se diferencian por su estructura química, pero también, por los diferentes mecanismos que ejercen en las bacterias patógenas como: destrucción de la pared de la célula patógena, desintegración de la membrana bacteriana, inhibición de la síntesis proteica, del metabolismo de los ácidos nucleicos y del intermediario (Preeti *et al.*, 2006).



Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Microbiology

Figura 4: Mecanismo de acción de las bacteriocinas a nivel de la pared celular y la membrana citoplasmática (Tomado de Birstain-Bausa *et al.*, 2012).

La función inmunomoduladora de los microorganismos probióticos se establece mediante un complejo mecanismo de señales intercelulares, en las que las bacterias, las células epiteliales (células M), las células dendríticas (CD) y del sistema inmunológico actúan coordinadamente. La activación de los macrófagos y CD aumenta la presentación de antígenos a los linfocitos T, lo que desencadena la producción de anticuerpos, específicamente inmunoglobulinas de tipo A (IgA) (Hernández *et al.*, 2015).

Algunos microorganismos probióticos, no relacionados a la microbiota intestinal autóctona como *Bacillus* y sus endosporas, pueden actuar como antígenos a través de tres mecanismos, endocitosis, transcitosis y reconocimiento directo del

antígeno por los linfocitos intraepiteliales (Revolledo *et al.*, 2006). La acción de estas bacterias desencadena reacciones inmunitarias que se traducen en una mayor producción de inmunoglobulinas, principalmente, IgA a nivel intestinal (Rahmani y Speer, 2005).

1.7 SULTILPROBIO®

La Organización Internacional de Epizootias (OIE 2014) trabaja por introducir en los sistemas de producción animal nuevos productos y tecnologías para la obtención de alimentos sanos, que permitan altas producciones con adecuada sostenibilidad económica y con garantía biológica para proteger a los animales y al hombre. Entre estos productos se encuentran los aditivos zootécnicos con efecto probiótico, que representan un avance terapéutico potencialmente significativo y seguro (Pérez *et al.*, 2015; Pérez *et al.*, 2016).

Teniendo en cuenta la importancia de los aditivos zootécnicos con efecto probiótico en nuestros días, debido a la creciente eliminación del uso de los antibióticos como promotores del crecimiento (APC) en la producción animal, la FAO y WHO (2002) definieron un grupo de requisitos y una metodología a seguir para obtener cepas de microorganismos que fueran reconocidas como seguras (GRAS) y que pudieran ser usadas en la elaboración de probióticos.

En Cuba, a escala industrial no se producen los probióticos ni se aplican estos productos de manera generalizada en la producción animal, a pesar de conocer las ventajas que ofrece su empleo. No obstante, varios grupos multidisciplinarios de investigación trabajan en esta temática. El Centro de Estudios Biotecnológicos de la Universidad de Matanzas, fue una de las primeras Instituciones del país en obtener diferentes microorganismos con actividad probiótica para su uso en los sistemas de explotación pecuaria.

De estas investigaciones se obtuvieron cuatro productos, SULTILPROBIO®, PROBIOLACTIL®, PROBIOLEV® y PROBIOMEX®.

I.8 Uso de los probióticos en los tratamientos y prevención de la mastitis

Puesto que la mastitis se considera una disbiosis o cambio anómalo de la microbiota mamaria, el tratamiento con probióticos se considera una buena opción para restablecer el equilibrio de este ecosistema. La bacterioterapia o empleo de ciertos microorganismos beneficiosos para desplazar a los agentes patógenos implicados en un proceso infeccioso se propuso hace más de 25 años, su efectividad se demostró en varios tipos de infecciones recurrentes. El aumento alarmante de la resistencia bacteriana a antibióticos como consecuencia del uso poco controlado de antimicrobianos y la poca efectividad del tratamiento antibiótico en algunas ocasiones, ha hecho que vuelva a aumentar el interés por la probio-terapia (Beltrán *et al.*, 2015).

La estrategia tradicional para el control de la mastitis es la terapia con antibióticos; sin embargo, entre los principales inconvenientes se encuentra la preocupante emergencia de resistencia a antibióticos, los bajos niveles de cura para determinados patógenos y la presencia de residuos de estas sustancias en leche y carne vacuna, por lo que se hace evidente la búsqueda de otras alternativas efectivas de tratamiento con sustancias diferentes a los antibióticos tradicionales (Sánchez y Peña, 2016).

Aunque no están disponibles comercialmente, existen alternativas de tratamiento de la mastitis, como es el empleo de quitosan y antimicrobianos peptídicos aislados de plantas, pero son solo eficientes en el tratamiento de mastitis por *Staphylococcus* spp. (Ochoa *et al.*, 2008). El antibiótico antimicrobiano peptídico sintetizado por *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* DPC3147 pertenece al grupo de la bacteriocina ribosomal y se caracteriza por poseer actividad demostrada contra bacterias patógenas productoras de mastitis, sobre todo contra variedades resistentes a antibióticos (Ryan *et al.*, 1998; Twomey *et al.*, 2000). De este grupo, se ha reportado que solo la nisina y la lacticina se usan para el tratamiento de mastitis; pero algunas bacterias productoras de la enfermedad crearon resistencia a estos péptidos (dos Santos *et al.*, 2005).

Resulta especialmente relevante la capacidad de ciertas cepas de *Lacto bacillus coryniformis* CECT5711, *Lactobacillus fermentum* CECT5716, *Lactobacillus gasseri* CECE5714 y *Lactobacillus salivarius* CECT5713 para inhibir a los principales agentes etiológicos de las mastitis (*Staphylococcus* spp. y *Streptococcus* spp.), adherirse a epitelios, sobrevivir a las condiciones del tracto gastrointestinal y tener actividad anti-inflamatoria e inmunomoduladora (Jiménez *et al.*, 2008; Pérez-Cano *et al.*, 2010).

Los ensayos clínicos para esa investigación fueron realizados en 352 mujeres afectadas de mastitis durante un periodo de tres semanas, se comparó la eficacia individual de las cepas de lactobacilos anteriormente mencionadas frente a la terapia antibiótica clásica. En esta ocasión, se comprobó la efectividad de las cepas probióticas para restaurar el equilibrio de la microbiota mamaria y eliminar los síntomas clínicos de la enfermedad. Además, la probio-terapia presentó una gran ventaja frente al tratamiento con antibióticos, ya que la evolución de los síntomas clínicos fue más favorable y las recurrencias y los efectos adversos fueron menos frecuentes (Olivares *et al.*, 2006; Díaz-Roperó *et al.*, 2007).

Materiales y métodos

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1 Aislamiento de microorganismos potencialmente patógenos causantes de mastitis en la vaquería 65 de la EPGM

Para el aislamiento de los microorganismos patógenos se desarrolló la siguiente secuencia experimental (figura 5).

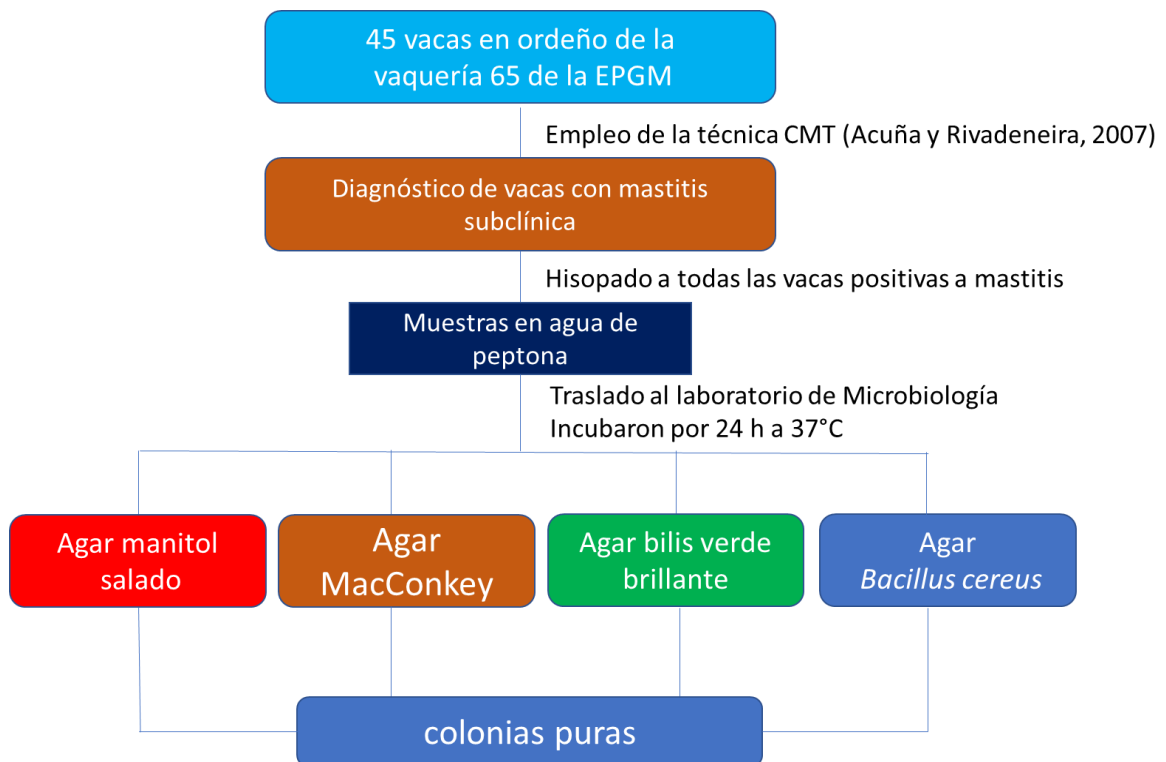


Figura 5. Secuencia experimental desarrollada para el aislamiento de las bacterias causantes de mastitis en vacas.

II.1.1 Diagnóstico de vacas con mastitis subclínica

Se realizó el diagnóstico de mastitis subclínica por la técnica *California Mastitis Test* (CMT) a las 72 vacas que conformaban el rebaño de la vaquería 65, perteneciente a la Empresa Genética de Matanzas (EGM). Esta prueba se efectuó a partir de la metodología descrita por Acuña y Rivadeneira (2007) y se realiza previamente al ordeño, con pezones limpios y secos. Para ello se escurren los 3 o 4 primeros chorros de leche de cada pezón en los compartimentos de la bandeja apropiada, la cual se inclina en un ángulo de 60° para igualar la cantidad

de leche en cada uno de los orificios (deben quedar entre 2 y 4 mL de leche). Posteriormente se agrega una cantidad igual de reactivo revelador (alquilauril sulfato de sodio y bromocresol púrpura) y se inicia un proceso suave de agitación por rotación durante 15 a 20 segundos.

La interpretación de los resultados se analizó según lo descrito por Mellenberger y Roth (2000), quien define diferentes grados de mastitis que se clasifican a partir de las siguientes apreciaciones:

NEGATIVO: no hay precipitado, por tanto, no hay infección.

TRAZAS: ligera precipitación que desaparece al agitar, en este caso es necesario comparar una mama con la otra; si presentan algo de precipitación no se considera infección. Si solamente una mama presenta infección se califica como infectada.

TIPO 1: existe una ligera agitación con algunos filamentos grumosos, al mover la paleta por unos 20 segundos, los grumos tienden a desaparecer. No existe la formación de gel.

TIPO 2: formación de gel con apariencia de clara de huevo.

TIPO 3: formación de gel rápido, no pierde la forma a pesar de la agitación.

En la tabla 3 se presentan los resultados para la interpretación de la CMT de acuerdo al número de células somáticas.

Tabla 3. Interpretación de los resultados de la CMT (Tomado de Mellenberger y Roth, 2000).

| No de células somáticas | Rango de células somáticas | Interpretación |
|-------------------------|----------------------------|---------------------|
| N (negativo) | 0–200,000 | Cuarto sano |
| T (trazas) | 200,000– 400,000 | Mastitis subclínica |
| 1 | 400,000–1,200,000 | Mastitis subclínica |
| 2 | 1,200,000–5,000,000 | Infección seria |
| 3 | Más de 5,000,000 | Infección seria |

II.1.2 Toma de muestras y aislamiento de bacterias asociadas a la mastitis subclínica

Para ello se utilizaron hisopos estériles en los cuatro pezones de la ubre de las vacas que resultaron positivas a tres cruces a la CMT. Los hisopos se depositaron en tubos de ensayos que contenían 7 mL de agua de peptona y se transportaron en frío rápidamente al Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Matanzas, donde se colocaron en la incubadora (MERCALAB) por 24 h a 37°C.

Para realizar el aislamiento de las bacterias asociadas a la mastitis subclínica, las muestras crecidas se sembraron con ayuda de hisopos en placas que contenían medios de cultivo selectivos (tabla 4). Las placas se incubaron en la incubadora (MERCALAB) a 37°C durante 24 horas. Posteriormente se seleccionaron todas las colonias que presentaron morfologías diferentes y se resembraron en tubos con cuñas de agar nutriente para su crecimiento a 37 °C. Para la selección de las colonias se tuvieron en cuenta las características expuestas en la tabla 4.

Tabla 4. Medios de cultivo empleados para el aislamiento de las bacterias causantes de mastitis (Britanialab, 2015).

| Medio de cultivo | Bacterias | Características de las bacterias en el medio |
|-----------------------------|-----------------------------------|--|
| Agar MacConkey | <i>Escherichia coli</i> | Rojas con halo turbio |
| | <i>Klebsiella</i> | Rosadas mucosas |
| | <i>Salmonella</i> | Incoloras, transparentes |
| | <i>Shigella flexneri</i> | Incoloras, transparentes |
| | <i>Proteus mirabilis</i> | Incoloras, transparentes |
| | <i>Enterococcus faecalis</i> | Diminutas, incoloras, opacas |
| Agar manitol sal | <i>Staphylococcus aureus</i> | Excelente crecimiento. Se caracterizan por ser amarillas |
| | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Buen crecimiento. Se caracterizan por ser rojas |
| Agar bilis verde brillante | <i>Escherichia coli</i> | Amarillo-verdosas sobre fondo amarillento |
| | <i>Salmonella</i> | Rosas, blancas o transparentes sobre fondo rojo |
| Agar <i>Bacillus cereus</i> | <i>Bacillus cereus</i> | Crecimiento de colonias de color crema |

Medios de cultivos utilizados:

Medio MacConkey (Biolife): se agregan 54 g de medio en 1 000 mL de agua destilada. Se lleva a ebullición y después esterilizar 121°C por 15 min. Composición: triptona, 17 g; peptona, 3 g; D-sorbitol, 10 g; sales biliares 1,5; Cloruro de sodio 5 g; rojo neutro 0,03; cristal violeta 0,001; agar, 14,5 g. pH 7,1.

Medio caldo o agar infusión cerebro corazón (BioCen): se agregan 52 g en 1 000 mL de agua destilada. Se lleva a ebullición y se esteriliza a 121°C por 15 min. Composición: sólidos de infusión de cerebro, 12,5 g; sólidos de infusión de corazón bovino, 5 g; peptona, 10 g; glucosa, 2 g; cloruro de sodio 5 g; NaHPO₄, 2,5 g. pH 7. El medio sólido se elaboró con la adición de 15 g. L⁻¹ de agar bacteriológico.

Medio agar bilis verde brillante (BioCen): se adicionan 40 g de medio en 1000 mL de agua destilada. Se lleva a ebullición y se esteriliza a 121°C por 15 min. Composición: peptona, 10 g; lactosa, 10 g; bilis de buey 20 g; verde brillante 0,0133 g; agar 15 g.

Medio manitol-sal (Biolife): se agregan 111 g de medio en 1 000 mL de agua destilada. Se lleva a ebullición y después esterilizar a 121°C por 15 min. Composición: peptocomplejo, 10 g; extracto de carne, 1 g; cloruro de sodio (NaCl), 75 g; manitol, 10 g; rojo fenol 0,025 g; agar 15 g.

Medio *Bacillus cereus* (Biolife): se agregan 21,5 g de solución en 450 mL de agua destilada. Se lleva a ebullición y se esteriliza a 121°C por 15 min. Composición: extracto de carne, 1 g; D-Manitol, 10 g; peptona, 10 g; NaCl, 10 g; rojo fenol 0,025 g; agar 12 g.

II.2 Determinación *in vitro* del efecto antibacteriano del aditivo zootécnico SULTILPROBIO® en los microorganismos aislados de animales con mastitis

II.2.1 Evaluación del efecto antibacteriano por el método de la difusión de sustancias en el agar

Se evaluó *in vitro* el efecto antimicrobiano del probiótico SULTILPROBIO® frente a los aislados de bacterias asociadas a la mastitis subclínica. Para ello se empleó el método de difusión de sustancias en el agar (Schillinger y Lucke, 1989). Las bacterias indicadoras se cultivaron toda la noche en tubos que contenían caldo nutriente a 37°C a 120 rpm en zaranda termostata (HDL APPARATUS). Luego se inocularon en caldo Mueller Hinton y se ajustó su concentración al tubo 0,5 de la escala de MacFarland. Posteriormente se sembraron por diseminación, con espátula de Drigalsky en la superficie del medio agar Mueller Hinton y se abrieron pocillos con un orador de 7 mm de diámetro, donde se añadieron 100 µL del biopreparado probiótico libre de células. Este sobrenadante se obtuvo a partir de la centrifugación (MSM HIGH SPEED 18) a 15000 rpm a 5 °C por 10 min, el cual se esterilizó a través de filtros de acetato de celulosa con poros de 0,22 µm (Minisart, satorius 600 kPa max).

Medio de cultivo utilizado

Medio agar Mueller Hinton (Biolife): se añaden 38 g de medio en 1 000 mL de agua destilada y se lleva a ebullición hasta una completa disolución. Se mantuvo en autoclave a 121°C durante 15 min. Se enfrió a 45-50 °C, se mezcló y se distribuyó en placas petri estériles. Composición: Extracto de carne 2 g, ácido digestivo de caseína 17,5 g, almidón soluble 1,5 g y agar 17 g.

Una vez que se inocularon las placas se mantuvieron a 4°C por un tiempo de 4 h para una mejor difusión de las sustancias en el agar. Luego se incubaron entre 18-24 h a 37 °C hasta detectar el crecimiento y la aparición de los halos de inhibición. El diámetro de los halos se midió con regla milimetrada. A cada valor se le restó el diámetro de los pocillos.

II.2.2 Identificación de las bacterias que inhibieron su crecimiento frente a SUBTILPROBIO® por métodos microbiológicos tradicionales

Para la identificación de las bacterias que resultaron sensibles a SUBTILPROBIO® se realizó la caracterización morfológica y bioquímica. En la tabla 5 se describen las técnicas empleadas, las cuales se desarrollaron según lo descrito por Harrigan y McCance (1968).

II.2.3 Conservación de cepas indicadoras

Las cepas potencialmente patógenas se conservaron cultivadas en cuñas de agar nutriente y refrigeradas a 4 °C.

II.2.4 Elaboración del SUBTILPROBIO®

Se elaboraron 14 L del biopreparado probiótico en siete erlenmeyer de 4 L, con 2 L de volumen efectivo de medio para el crecimiento de *Bacillus subtilis* (MCBs) descrito por Milián (2009). Para el inóculo se utilizó la cepa *Bacillus subtilis* E-44, la cual se cultivó en 1400 mL de caldo nutriente a 37°C por 18 h. A continuación, se añadieron 200 mL de inóculo en cada erlenmeyer, los cuales se mantuvieron a 37°C en agitación a 120 rpm en zaranda termostataada (HDL APPARATUS®) durante 72 h. Después de este tiempo, se realizó el conteo de viables y la medición del pH para comprobar la calidad del producto. El número de microorganismos se registró a través del método de las diluciones seriadas y el conteo visual del número de unidades formadoras de colonias (UFC) en placas con agar nutriente según Pelczar y Reid (1966). El biopreparado se envasó en frascos estériles de 1 L con tapa de goma y se conservaron a 4 °C hasta su utilización.

El medio de cultivo para el crecimiento de *Bacillus subtilis* E-44 (MCBs) se preparó como sigue: se añaden 1000 mL de agua destilada, 100 g de miel final, 500 mL de hidrolizado de levadura, 30 g de peptona bacteriológica y 1 g de CaCl₂. Se agita hasta disolver. El pH debe de estar entre los 7,5 y 8. Se esterilizó en autoclave durante 15 min a 121°C y 0,1 atm (Milián, 2009).

Tabla 5. Técnicas desarrolladas para la caracterización morfológica y bioquímica de las cepas patógenas aisladas.

| Técnica | Medio de cultivo, reactivos para revelado | Caracterización |
|--|--|--|
| Caracterización morfológica | | |
| Tinción de Gram | violeta cristal lugol alcohol-acetona safranina | Se define si la bacteria es Gram positiva (+) o Gram negativa (-). Se caracteriza la forma de las células. |
| Colonia gigante | Crecimiento de la colonia en agar nutriente | Permite caracterizar a la colonia en cuanto a color, borde, tamaño, consistencia. |
| Caracterización bioquímica | | |
| Prueba de la catalasa | Agar nutriente Peróxido de hidrógeno al 3 %. | Define si se produce la enzima catalasa. Se observa un burbujeo cuando se adiciona el peróxido de hidrógeno |
| Hidrólisis de la urea | caldo urea | Cambio de color a rojo ladrillo |
| Producción de indol | Caldo triptona Reactivo de Kovacs | Formación de un anillo de color rojo en la superficie del medio |
| Reducción de nitratos | Caldo nitrato N,N- α - Dimetil naftilamina y ácido sulfanílico | Aparición de un complejo de color rojo |
| Fermentación de azúcares: lactosa, sacarosa, glucosa, maltosa. | caldo triptona para fermentación y azúcares bromocresol púrpura | Cambio de coloración a amarillo y formación de gas en tubo de fermentación (Durham) |
| Hidrólisis de la caseína | Agar leche | Formación de un halo de hidrólisis alrededor de la colonia. |
| Relación con el oxígeno | Crecimiento en medio tioglicolato | Se observará la zona donde crece la bacteria en el medio y se clasificará en aerobio, anaerobio y anaerobio facultativo. |
| Citrato de Simmons | Medio citrato de Simmons | Se reconoce como positivo si el medio cambia de color verde a azul. |
| Hidrólisis del almidón | Agar almidón y lugol | Se considera positiva cuando se observa el halo de hidrólisis al añadir el lugol |
| Hidrólisis de la gelatina | Agar gelatina | Se observa la gelatina licuada. |

II.3 Evaluación *in vivo* del efecto de la aplicación del aditivo zootécnico SULTILPROBIO® en la prevención y control de mastitis bovina

La fase de campo se realizó en la vaquería 65 de la Empresa Pecuaria Genética de Matanzas (EPGM), en el municipio Limonar, provincia de Matanzas. Esta zona se caracteriza por una temperatura media anual de $23,8 \pm 2$ °C en el mes de marzo, encontrándose los valores más elevados en los meses de julio y agosto (26,3 °C) y los más bajos en febrero y enero (20,6 °C). La humedad relativa alcanza valores elevados durante todo el año, con un promedio anual de 79%.

La vaquería 65 es típica para 120 vacas. Los animales se alojan en tres naves de sombra, donde disponen de bebederos y comederos de concreto para el consumo de agua a voluntad y forraje King Grass troceado (*Pennisetum purpureum* L.). La unidad cuenta con un suelo pardo con carbonato en el que crecen especies de pasto natural, dentro de las que se destacan gramíneas y leguminosas como *Dichanthium spp.* y *Aliscarpus vaginalis*. Los animales pastan en 45 cuartones en el horario de la mañana (6:00 h-10:00 h) y en la tarde (17:00 h-2:00 h), de ellos 23 contienen King Grass y los otros 22 pasto natural.

A las vacas en ordeño se les suministra concentrado de factura nacional a base de maíz, soya y afrecho (en dependencia de la materia prima que exista en la fábrica) a razón de 0,5 kg.L⁻¹ de leche que produzcan. Se les proporciona además 150 g de urea, 0,10 g de sal mineral y 1 kg de soya diariamente.

El ordeño de la mañana se realiza en el horario de 3.00 h a 6.00 h y el de la tarde de 14.00 a 16.00 h, con el empleo de un equipo mecanizado marca EuroLatte de cuatro plazas. La rutina del ordeño comprende las siguientes actividades: despunte, lavado, ordeño y antisepsia final del pezón. Durante el desarrollo de esta actividad se garantiza el suministro de concentrado a los animales de acuerdo a su producción láctea.

El experimento se realizó con un diseño completamente aleatorizado, donde se seleccionaron 45 vacas en ordeño de la raza Mambí y se formaron 3 grupos de 15 animales, para aplicar en la antisepsia final del pezón, tres tratamientos:

- **Tratamiento 1 (control):** Empleo de agua hervida.
- **Tratamiento 2:** Uso de solución de propolina (10%) (tratamiento habitual como sellante).
- **Tratamiento 3:** Aplicación de SULTILPROBIO®.

En la figura 6 se muestra la secuencia experimental realizada durante la evaluación del aditivo zootécnico como sellante en vacas en ordeño.

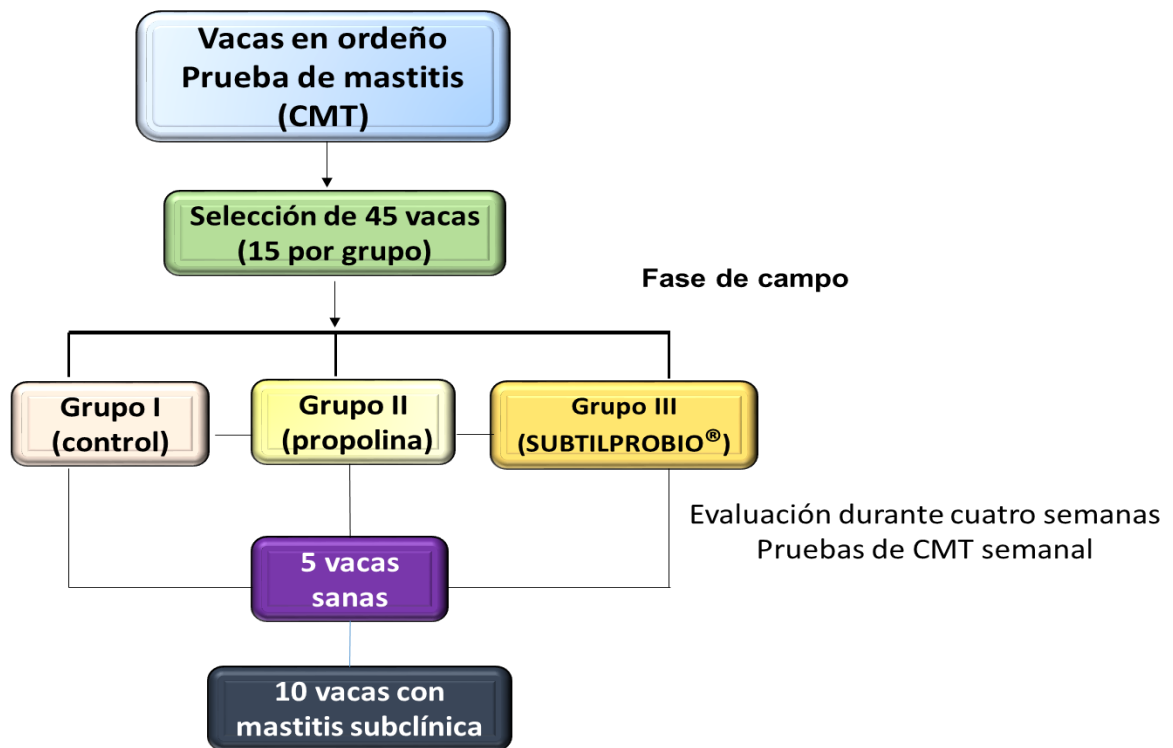


Figura 6. Secuencia experimental de la evaluación *in vivo* del efecto del SULTILPROBIO® en la prevención y control de mastitis bovina.

La aplicación de las soluciones empleadas para la antisepsia final del pezón se realizó con la utilización de recipientes estériles que contenían 10 mL de cada líquido donde se introducían los pezones. El experimento tuvo una duración de 35 días, donde se efectuaba la antisepsia final en los dos ordeños. Para el control de la efectividad de los tratamientos, se realizó la prueba CMT al inicio del tratamiento y posteriormente cada siete días durante 5 semanas. Finalmente se clasificaron los cuartos de acuerdo a la evolución de la mastitis. Se consideraron: Cuartos afectados: todos los cuartos que resultaron positivos al CMT.

Cuartos recuperados totalmente: los cuartos en los que no resultó positiva la prueba del CMT después del tratamiento.

Cuartos recuperados parcialmente: los cuartos en los que se apreció una disminución de las cruces de mastitis después del tratamiento.

Nuevos cuartos afectados: los cuartos que inicialmente se encontraban sanos y al final del experimento se diagnosticaron como positivos a la enfermedad.

Previamente a la realización del ordeño se realizaron inspecciones a todos los animales que participaron en el experimento. En esta actividad se valoraron la presencia de irritaciones, reacciones inflamatorias y la integridad de la piel de los pezones de cada uno de los cuartos estudiados. También se comprobó la conservación de las propiedades organolépticas de la leche de los animales tratados.

II.4 Comparación de la factibilidad económica del uso del SULTILPROBIO® y la propolina como sellantes del pezón de vacas en ordeño

Se realizó la búsqueda de la información económica necesaria para realizar un análisis del costo de la introducción del SUBTILPROBIO® en el control y prevención de la mastitis. Este estudio se desarrolló en comparación con los resultados que se obtienen con el uso de la propolina, sustancia que se utiliza como sellante habitual de las ubres bovinas.

II. 5 Procesamiento estadístico

Para procesar los resultados de la actividad antibacteriana se utilizó un análisis de varianza simple. El paquete estadístico que se utilizó fue INFOSTAT, Versión 2012 (Di Rienzo *et al.*, 2012). Para verificar las diferencias se empleó la dócima de comparación de Duncan (1955).

Para el análisis estadístico del experimento *in vivo* se utilizó el paquete estadístico CompaPro versión 1 (2007) con un 95 % de confianza para establecer las diferencias entre proporciones.

Resultados y discusión

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1 Aislamiento de bacterias potencialmente patógenas de vacas con mastitis subclínica y evaluación de la actividad antibacteriana de SUBTILPROBIO® frente a ellas.

Se obtuvieron 20 aislamientos de las placas que contenían los medios selectivos empleados.

En la tabla 6 se presentan los resultados del efecto del SUBTILPROBIO® en los 20 aislados que se realizaron. Se aprecia que los aislados 4, 14 y 17 mostraron mayor halo de inhibición.

Tabla 6. Mediciones de la acción antimicrobiana del SUBTILPROBIO® frente a cepas indicadoras.

| Cepas indicadoras | Halo de inhibición del SUBTILPROBIO® frente a cepas indicadoras (mm) | EE | P |
|-------------------|--|------|--------|
| 1 | NI | 1,14 | 0,0001 |
| 2 | NI | | |
| 3 | NI | | |
| 4 | 16,33^e | | |
| 5 | 4,00 ^a | | |
| 6 | NI | | |
| 7 | NI | | |
| 8 | 8,67 ^b | | |
| 9 | NI | | |
| 10 | 12,33 ^{cd} | | |
| 11 | NI | | |
| 12 | 9,67 ^{bc} | | |
| 13 | 12,33 ^{cd} | | |
| 14 | 16,67^e | | |
| 15 | 9,33 ^{bc} | | |
| 16 | 11,33 ^{bcd} | | |
| 17 | 13,67^{de} | | |
| 18 | NI | | |
| 19 | NI | | |
| 20 | 12,00 ^{bcd} | | |

NI. No inhibición. a, b, c, d, e Medias con letras distintas difieren para P < 0,05 (Duncan, 1955).

De acuerdo con el diámetro de la zona de inhibición, la actividad anti-patógena es clasificada como fuerte (el diámetro = 20 mm), moderada (20 mm > de diámetro 10 mm) y débil (el diámetro = 10 mm) (Lim, 2010). En el presente trabajo los halos que produjo el aditivo zootécnico SUBTILPROBIO® se pueden clasificar entonces como moderados, ya que exhiben valores de hasta 16 mm. En la figura 7 se evidencian los halos de inhibición producidos por este aditivo frente a los aislados 4, 14 y 17, los cuales fueron los de mayor dimensión.



A. SUBTILPROBIO® frente a aislado 4.



B. SUBTILPROBIO® frente a aislado 14.



C. SUBTILPROBIO® frente a aislado 17.

Figura 7. Halos de inhibición producidos por SUBTILPROBIO® frente a microorganismos potencialmente patógenos.

En la tabla 7 se observan los resultados de la caracterización morfológica y bioquímica de los tres aislados que presentaron mayor inhibición frente a SUBTILPROBIO®. De acuerdo con estos resultados y los descrito en *el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Garrity *et al.*, 2004), se considera que el aislado 4 pertenece a la especie *Staphylococcus aureus* y los aislados 14 y 17 a *Escherichia coli*.

Tabla 7. Caracterización morfológica y bioquímica de los tres aislados de vacas enfermas.

| Prueba | 4 | 14 | 17 |
|--|--|---|---|
| Medio de aislamiento | Agar manitol sal | Agar MacConkey | Agar MacConkey |
| Tinción de Gram | Gram positivo | Gram negativo | Gram negativo |
| Forma de la célula y manera de agruparse | Forma circular estafilococos | cocobacilo, simples | cocobacilos simples |
| Morfología de las colonias | Colonias de color amarillo, elevación convoca convexa, borde entero, estructura interna lisa | Colonias de color Rojas con halo turbio, elevación convoca convexa, borde entero, estructura interna lisa | Colonias de color Rojas con halo turbio, elevación convoca convexa, borde entero, estructura interna lisa |
| Prueba de la catalasa | + | + | + |
| Hidrólisis de la urea | + | + | + |
| Producción de indol | - | - | - |
| Reducción de nitratos | + | + | + |
| Hidrólisis de la caseína | + | + | + |
| Fermentación de azúcares: | | | |
| Lactosa | + | + | + |
| Sacarosa | + | + | + |
| Glucosa | + | + | + |
| Maltosa | + | + | + |
| Hidrólisis de la caseína | + | + | + |
| Relación con el oxígeno | Anaerobio facultativo | Anaerobio facultativo | Anaerobio facultativo |
| Citrato de Simmons | - | + | + |
| Hidrólisis del almidón | - | + | + |
| Hidrólisis de la gelatina | + | + | + |

De acuerdo a los resultados de las pruebas morfológicas y bioquímicas realizadas a través de métodos tradicionales, todo parece indicar que se corresponden con estos microorganismos. En la figura 8 se aprecian las características del crecimiento de estas tres bacterias en sus medios de cultivo selectivos.



Figura 8. Crecimiento de los aislados 4, 14 y 17 en los medios de cultivos selectivos.

Estos dos microorganismos aparecen como patógenos causantes de mastitis, específicamente *Staphylococcus aureus* produce mastitis contagiosa, y en el caso de *E. coli* se le considera patógeno ambiental, procedente de las heces y promotor de esta enfermedad (Ruíz, 2018).

El principal microorganismo causante de la mastitis bovina es precisamente *Staphylococcus aureus*. Para su control se recurre con frecuencia al uso de antibióticos, lo cual provoca la selección de estafilococos resistentes (Ochoa *et al.*, 2008). Ante esta problemática se requiere de estrategias alternativas de control de la mastitis bovina. En este sentido, las bacteriocinas representan una herramienta de control atractiva para este patógeno. Por ello Alva *et al.* (2016) evaluaron el efecto antimicrobiano de bacteriocinas de *Bacillus spp.* frente a aislamientos de *S. aureus* colectados de casos de mastitis bovina y observaron que la mayor actividad inhibitoria se presentaba con las bacteriocinas morricina 269 y kurstacina 287, seguidas por kenyacina 404, entomocina 420 y tolworthcina 524.

Gálvez *et al.* (2011) y Nguyen *et al.* (2016) refieren que los representantes del género *Bacillus* producen bacteriocinas. Dentro de las bacteriocinas y “bacteriocinas semejantes a péptidos” (BLIS=bacteriocin-like inhibitory substance, por sus siglas en Inglés) producidos por *B. subtilis* se destacan: Mersacidin, Sublancin 168, Subtilosin, Subtilosin B, Betacin, Ericin S, Erisin A, MJP1, Bac 14B y LFB 112.

Diferentes autores refieren el uso de microorganismos probióticos que inhiben el desarrollo de microorganismos patógenos causantes de la mastitis bovina (Jurado y Fajardo, 2017). Estudios realizados por Vondruskova *et al.* (2010) y Ansari *et al.* (2012) demuestran que diferentes cepas de *Bacillus subtilis* son capaces de generar sustancias como la bacitracina, polimixina, difficidina, subtilina y mycobacillina, antibióticos que inhiben el crecimiento de los microorganismos patógenos de los animales.

Los resultados expuestos en el presente estudio corroboran lo que plantean otros autores, quienes refieren que el empleo de cultivos de *Bacillus* spp. y sus endosporas presenta posibilidades reales para usarse en la producción animal, pues son una prometedora alternativa al empleo de antibióticos como promotores del crecimiento. Además, estos productos ganan un gran espacio como mejoradores del balance microbiano y de las respuestas inmunológicas, fisiológicas y productivas (Milián *et al.*, 2013 y Zhenget *al.*, 2015).

Neder *et al.* (2016) realizó un estudio para evaluar la resistencia de *Staphylococcus aureus* a los siguientes antimicrobianos: penicilina G, eritromicina, amoxicilina + ac clavulínico, ceftiofur, cefalexina + kanamicina, cefquinoma, cefalexina, framisetina + penicilina G. Estos autores encontraron los mayores niveles de resistencia frente a penicilina (28%), cefalexina + kanamicina (14%) y framisetina + penicilina (18%). El 7% de las cepas presentaron resistencia a más de un antibiótico; el 3% a eritromicina y penicilina y el 2% a amoxicilina+ ácido clavulínico y penicilina. No se observaron cepas resistentes a oxacilina y la mayoría de los aislados fueron sensibles a las cefalosporinas

cefalexina, ceftiofur y cefquinoma. Este estudio, además de brindar información de utilidad para la selección de los antibióticos, también revela cómo evoluciona la resistencia de este organismo patógeno causante de disímiles enfermedades.

De la información anterior se desprende que probablemente en microorganismos como *Staphylococcus aureus* se generaron genes de resistencia a los antibióticos, de ahí la necesidad de buscar otras alternativas más naturales que no provoquen estas dificultades. De acuerdo con Blajman *et al.* (2015), las tendencias actuales en los sistemas intensivos de producción postulan a los probióticos como una buena alternativa para el reemplazo de los antibióticos como promotores de crecimiento y en la prevención de enfermedades.

III.2 Evaluación del efecto antibacteriano de SUBTILPROBIO, utilizado como sellante en vacas en ordeño

Los resultados de la tabla 8 muestran que no existen diferencias entre los cuartos afectados diagnosticados al inicio del experimento en cada uno de los grupos formados. La mayor proporción de cuartos recuperados totalmente se encontró en el grupo III, seguido del grupo II y I. En este caso se encontraron diferencias entre el grupo III y el resto de los tratamientos, que a la vez resultaron semejantes. En cuanto a los cuartos recuperados parcialmente (cuartos que no se han recuperado totalmente, pero han disminuido las cruces de mastitis) la mayor proporción se encontró en el grupo III y la menor correspondió al grupo I. Se apreciaron diferencias entre el tratamiento III y el resto. No existieron diferencias al comparar el grupo I y II.

En cuanto a los nuevos cuartos afectados resultó favorecido el tratamiento III que mostró la menor proporción. Se apreciaron diferencias entre este grupo y el resto. No se apreciaron diferencias al comparar los grupos I y II.

Ninguno de los animales tratados evolucionó hacia la forma clínica de la enfermedad.

Tabla 8. Análisis de las proporciones del efecto de los tratamientos en la evolución de los cuartos afectados con mastitis subclínica.

| Tratamientos | Cuartos afectados | Cuartos recuperados totalmente | Cuartos recuperados parcialmente | Nuevos cuartos afectados |
|--------------|-------------------|--------------------------------|----------------------------------|--------------------------|
| Grupo I | 0,70 | 0 ^b | 0,08 ^b | 0,23 ^b |
| Grupo II | 0,62 | 0,05 ^b | 0,13 ^b | 0,28 ^b |
| Grupo III | 0,82 | 0,18 ^a | 0,43 ^a | 0,08 ^a |
| P | 0,08 | 0,001 | 0,001 | 0,04 |
| EE | 0,06 | 0,05 | 0,05 | 0,05 |

Grupo I. Control; Grupo II. Propolina; Grupo III. SUBTILPROBIO®.

Los resultados alcanzados en este experimento corroboran los criterios de Arroyo *et. al.* (2010), al plantear que la administración de cepas probióticas cuidadosamente seleccionadas podría ser una estrategia alternativa y/o complementaria a la antibiòticoterapia utilizada en el tratamiento de la mastitis. Aunque en este caso el SUBTILPROBIO® se aplicó en animales afectados por el curso subclínico de la enfermedad, se logró obtener una mayor proporción de cuartos recuperados totalmente y parcialmente en comparación con los demás tratamientos. En este grupo también se encontró la menor proporción de cuartos que contrajeron la enfermedad durante el desarrollo del ensayo.

La mejora lograda en cuanto a recuperación total y parcial de los cuartos afectados por la enfermedad y el hecho de que ninguno de los casos tratados haya evolucionado a la forma clínica de la mastitis no coincide con los planteamientos de Scaramelli *et al.* (2005). Quienes consideran que los tratamientos alternativos al uso de antibiòticos, incluidos los probióticos, revelan poca o ninguna efectividad.

Por otra parte, Jurado- Gámez *et al.* (2015) recomendaron evaluar *in vivo* la efectividad de una cepa de *Lactobacillus lactis* en la prevención de la mastitis, luego de realizar ensayos *in vitro*, en los que se logró reducir la población patògena obtenida de vacas con mastitis subclínica. En la presente investigación

se comprobó inicialmente el efecto antibacteriano *in vitro* del probiótico frente a cepas potencialmente patógenas aisladas de animales que padecían este tipo de mastitis y se produjo la inhibición fundamentalmente de *Staphylococcus aureus* y *E. coli*.

El tratamiento II resultó menos efectivo al compararlo con el III. Aunque los productos elaborados a base de propóleo pueden ser empleados como antibacterianos, antifúngicos, antivirales y antiinflamatorios (Padro *et al.*, 2014). Este resultado debe estar relacionado con la dilución que se realiza en la unidad para la aplicación de la propolina o los gérmenes que se presentan crearon resistencia o adaptación a este sellante.

En la literatura consultada se recomienda realizar el sellado del pezón como un procedimiento simple, económico y efectivo para prevenir la mastitis. Esta operación evita la entrada de microorganismos patógenos a la ubre y reduce significativamente el recuento de células somáticas en leche proveniente de vacas con mastitis (Moraleda, 2005 y Yasothai, 2017). Por lo que el biopreparado evaluado pudiera utilizarse como sellante en vacas para prevenir la entrada de microorganismos patógenos.

En este sentido Prieto *et al.* (2016) formularon un sellador post ordeño con dos concentraciones de bacteriocinas (0.1 y 0.5%), producidas por *Bacillus thuringiensis*. Los resultados revelaron la eficacia del sellador contra agentes causales de la mastitis como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae* en ambas concentraciones. El probiótico propuesto para utilizarse en la antisepsia final del pezón en este ensayo se elaboró a partir de una cepa de *Bacillus*. Género bacteriano productor de bacteriocinas (Gálvez *et al.*, 2011 y Nguyen *et al.*, 2015).

En la literatura consultada se recomienda el uso varios compuestos en la antisepsia final del pezón dentro de los que se encuentran: cloro ácido o clorheximida (Scaramelli *et al.*, 2005), miel al 30% (Moraleda, 2005), iodo e hipoclorito (Miguel Angel *et al.*, 2014) y KMnO₄ (Yasothai, 2017). Sin embargo,

una de las limitaciones que presentan algunos de estos productos para usarse en esta operación está relacionada con la producción de irritaciones en la piel y mcosas debido a sus principios activos y pH (Molina *et al.*, 2014). Por ejemplo, la aplicación de hipoclorito de sodio a una concentración superior a las 200 ppm de cloro, posibilitó la disminución de la carga de gérmenes en la piel de los pezones, pero generó deterioro en la misma debido a su agresividad y alto pH (Izack y Nicolás, 2010).

Las soluciones de yodo que se aplican para controlar la mastitis deben tener un pH ácido para garantizar su estabilidad. Sin embargo, la acidez potencia la irritación de la piel del pezón, así como la introducción de detergentes para formar complejos de yodo (Callejo, 2010).

En las inspecciones realizadas a todos los animales que participaron en el experimento, no se apreciaron signos clínicos de irritación o inflamación y en todos los casos se mantuvo la integridad de la piel de los pezones. Tampoco se encontraron cambios en las propiedades organolépticas de la leche. El probiótico utilizado no contiene sustancias irritantes y posee pH 7,5-8 compatible con su aplicación tópica.

Entre las ventajas que pueden derivarse de la aplicación de probióticos en la prevención de la mastitis puede incluirse la disminución de la aplicación de antibióticos en el tratamiento de los casos clínicos. Sánchez y Peña (2016), consideran que el uso de bacterias ácido lácticas y *Bacillus* spp. puede resultar una alternativa para evitar la utilización de estos fármacos que generan residuos en la leche y afectan la calidad de los subproductos lácteos destinados a la alimentación de la población. En este sentido, Vargas (2012) consideró importante que los productos naturales que se apliquen para controlar esta enfermedad permitan preservar la calidad bacteriológica, composición de la leche y eviten la presencia de residuos no deseados en este producto.

Varmuzova *et al.* (2016) refieren que, las bacterias desarrollan diferentes mecanismos para la inhibición de los microorganismos patógenos, entre los

cuales se encuentran la competencia por los sitios de colonización y nutrientes, la producción de compuestos tóxicos y la estimulación del sistema inmune. Estos procesos no son mutuamente exclusivos y la inhibición puede comprender uno, varios, o todos estos mecanismos a la vez.

Se conoce que las endosporas de *Bacillus subtilis* provocan la estimulación del sistema inmune, ya que actúan como antígenos que activan la producción de linfocitos B, inducen los procesos de inmunomodulación con un adecuado tamaño de los órganos inmunes (timo, bazo) y un estado fisiológico favorable en el animal (Pérez *et al.*, 2016).

La estimulación de la inmunidad a través de probióticos se puede detectar en la glándula mamaria por el aumento de los leucocitos polimorfonucleares, los linfocitos y los macrófagos (principal tipo celular en la leche). El paso rápido de los leucocitos sanguíneos a la luz alveolar es de los mecanismos naturales más importantes de defensa contra la mastitis. En el caso de una glándula mamaria sana se puede observar un contenido menor de 100,000 leucocitos.mL⁻¹ en la leche; en cambio, el contenido de leucocitos aumenta como una respuesta a los microorganismos invasores. En el caso de la mastitis aguda, los conteos pueden llegar hasta millones de células somáticas.mL⁻¹ (Bezkorovainy, 2001). Es por ello que se hace necesario realizar estas pruebas para el diagnóstico de la inmunidad cuando se aplican estos biopreparados probióticos.

III.3 Análisis de los costos de la aplicación de SUBTILPROBIO® y propolina durante el experimento

En la tabla 9 se presentan los costos en que se incurrieron en cada uno de los tratamientos desarrollados durante el experimento. Se constata que el costo del SUBTILPROBIO® fue inferior (40,5 CUP menos) al de la propolina, lo que demuestra que la aplicación del aditivo zootécnico como sellante pudiera representar un ahorro económico por este concepto.

Por otra parte se debe tener en cuenta que la efectividad del probiótico fue superior a la alcanzada por la propolina, ya que en este último tratamiento la recuperación de los cuartos afectados fue menor, por lo tanto se puede inferir que con la aplicación del aditivo probiótico se logra la disminución del nivel de infección, por lo tanto se necesitarían menores gastos en antibióticos para contrarrestar la enfermedad.

Tabla 9. Análisis comparativo del costo de los tratamientos con propolina y SUBTILPROBIO®.

| Semanas | Solución de propolina (120 mL en 1,5 L de agua) | Costo de propolina (120mL=9,25 CUP) | SUBTILPROBIO® (mL) | Costo de SUBTILPROBIO® (1000 mL= 2,31 CUP) |
|--------------|---|-------------------------------------|--------------------|--|
| 1 | 168 | 12,95 | 2100 | 4,85 |
| 2 | 168 | 12,95 | 2100 | 4,85 |
| 3 | 168 | 12,95 | 2100 | 4,85 |
| 4 | 168 | 12,95 | 2100 | 4,85 |
| 5 | 168 | 12,95 | 2100 | 4,85 |
| Total | 840 | 64,75 | 10500 | 24,25 |

Conclusiones

IV. CONCLUSIONES

1. El aislamiento de bacterias de vacas en ordeño con mastitis subclínica de la vaquería 65 de la EPGM permitió contar con un banco de aislados potencialmente patógenos, causantes de esta enfermedad.
- El aditivo zotécnico SULTILPROBIO® mostró efecto antibacteriano *in vitro*, debido a que provocó la inhibición de 10 de los microorganismos patógenos aislados de animales con mastitis subclínica.
 - Las cepas identificadas como *Staphylococcus aureus* (aislado 4) y *Escherichia coli* (aislados 14 y 17) fueron las más sensibles a la presencia de sustancias antimicrobianas producidas por *Bacillus subtilis*.
 - El aditivo zotécnico SULTILPROBIO® disminuyó la proporción total y parcial de los cuartos infectados en vacas con mastitis subclínica, por lo que se considera que este biopreparado pudiera utilizarse como sellante para la prevención y el control de mastitis bovina.
 - La aplicación de SULTILPROBIO® como sellante de vacas en ordeño disminuyó los costos y el grado de infección de la enfermedad.

Recomendaciones

V. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios con mayor número de animales y extender el período de aplicación del producto.
2. Realizar un estudio de factibilidad económica de la aplicación del SUBTILPROBIO que tenga en cuenta indicadores como la producción y calidad de la leche.
3. Utilizar los resultados de esta investigación en estudios de pregrado y posgrado.
4. Evaluar el efecto de otros aditivos zootécnicos obtenidos por el CEBIO en el control y prevención de la mastitis bovina.

Referencias bibliográficas

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acuña, V; Rivadeneira, A. 2007. Aislamiento, identificación y antibiograma de patógenos presentes en leche con mastitis en ganaderías bovinas de la provincia de Pichincha. Escuela Politécnica Del Ejército. Departamento De Ciencias De La Vida. Carrera De Ciencias Agropecuarias-I.A.S.A. I. Gral. Carlo Magno Andrade Paredes. Sangolquí
- Aguilar, A.; Bañuelos, P.; Pimienta, B.; Aguilar, F.; Torres, M. 2014. Prevalencia de mastitis subclínica en la Región Ciénega del Estado de Jalisco. *Abanico Veterinario* 4 (1) 24-31.
- Almeida, D. 2015. Prevalencia de mastitis bovina mediante Prueba de California Mastitis Test e identificación del agente etiológico, en el centro de acopio de leche de la comunidad San Pablo Urco, Cayambe, Ecuador. Tesis presentada para optar por el título de Ingeniero Agropecuario. Universidad Politécnica Salesiana. Sede Quito. Ecuador.
- Alonso S. 2016. Diagnóstico de prevalencia en mastitis subclínica en dos hatos lecheros de Antioquia. Trabajo de grado para optar por el título de Médico Veterinario. Facultad Ciencias Administrativas y Agropecuarias Caldas – Antioquia.
- ALTA. 2012. ¿Cómo se desarrolla la mastitis en la ubre? *Básicos Lecheros*. Disponible en internet: http://web.altagenetics.com/espanol/DairyBasics/Details/3015_Como-se-desarrolla-la-mastitis-en-la-ubre.html. Consultado: 02 de mayo de 2018.
- Alva N.; Loeza H.; Barboza, J.E.; Ochoa, A. y López, J. 2016. Actividad antimicrobiana de bacteriocinas de *Bacillus thuringiensis* hacia aislamientos de *Staphylococcus aureus* asociados a mastitis bovina. Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. VII Simposio Internacional de producción de alcoholes y levaduras.

- Amores, R.; Calvo, A.; Maestre, J. R.; Martínez, D. 2004. Probióticos. Rev. Española de Quimioterapia 17(2):131-139.
- Ansari, A.; Aman, A.; Siddiqui, N.; Iqbal, S.; Ali, ul.; Qader, S. 2012. Bacteriocin (BACIB17): screening, isolation and production from *Bacillus subtilis* KIBGE IB-17. The Karachi Institute of Biotechnology & Genetic. 25(1):195-208.
- Armenteros, M.; Ponce, P.; Capdevila, J.; Zaldívar, V.; Hernández, R. 2006. Prevalencia de mastitis en vacas lecheras de primer parto y patrón de sensibilidad de las bacterias aisladas en una lechería especializada. Rev. Salud Anim. 28 (1): 8 - 12.
- Arroyo, R.; Martín, V.; Maldonado, A.; Jiménez, E.; Fernández, M.; Rodríguez, J. 2010. Treatment of Infectious Mastitis during Lactation: Antibiotics versus Oral Administration of Lactobacilli Isolated from Breast Milk. Clinical Infectious Diseases, 50(12):1551–1558.
- Asli, A.; Brouillette, E.; Ster, C.; Ghinet, M. G.; Brzezinski, R.; Lacasse, P.; Malouin, F. 2017. Antibiofilm and antibacterial effects of specific chitosan molecules on *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis. PloSone, 12(5), p. e0176988. Disponible en internet: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176988>. Consultado: 2 de mayo de 2018.
- Ávila, T.S; Gutiérrez, C.A. 2014. Mastitis. Universidad Nacional Autónoma (en línea). México. Disponible en: <http://academicos.cualtos.udg.mx/DiplomadoCalidadLeche/doctos/24jul04/Mastitis%20en%20Ganado%20Bovino.doc>. Consultado: septiembre 8, 2016.
- Barbosa, S.; Monardes, H.; Cue, R. 2007. Evaluation of test-day somatic cell count of first lactating Holstein Cows. Rev. Bras. Zoot. 36:94-102.

- Barrios, V.; Carvajal, A.; Rubio, P. 2012. Los probióticos en la ganadería porcina. Importancia de su utilización eficiente. Disponible en: http://www.axoncomunicacion.net/criaysalud/revistas/46/cys_46_probioticos.pdf. Consultado en junio 2018.
- Beltrán, D.A.; Vaquero, A.; Crespo, T.; Rodríguez, C.; García, A. 2015. Mastitis infecciosa: nueva solución para un viejo problema. *NutrHosp.* 2015;31(Supl. 1):89-95.
- Biristain-Bausa, S.; Palou, E.; López-Malo, A. 2012. Bacteriocinas: antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos.* 6(2): 64-78.
- Blajman J.; Zbruna M.; Astesana D.; Berisvil P.; Romero A.; Fusari L.; Soto P.; Signorini, B.; Rosmini R.; Frizzo, S. 2015. Probiotics in broilers' rearing: A strategy for intensive production models. *Rev Arg Microbiol* 47(4):360-367.
- Bouchard, D. S.; Seridan, B.; Saraoui, T.; Rault, I.; Germon, P.; González-Moreno, C.; Chain, F. 2015. Lactic acid bacteria isolated from bovine mammary microbiota: potential allies against bovine mastitis. *PloSone*, 10(12), e0144831.
- Bradley, A.; Green, M. 2015. Clinical mastitis in dairy cows after "blitz" therapy. *Veterinary Record.* 141(80): 179-182.
- Breen J. 2014. The responsible use of antimicrobial therapy in the control of bovine mastitis in dairy herds. *Livestock* 19(2):83-90.
- Britanialab. 2015. Medios de cultivo para Microbiología. (en línea) Disponible en: www.britanialab.com.ar/esp/productos.html. Consultado en: mayo 2018.
- Calderón, A.; Rodríguez, C. 2008. Prevalencia de mastitis bovina y su etiología infecciosa en sistemas especializados en producción de leche

en el altiplano Cundiboyacense. Colombia (en línea). Ciencias pecuarias. Disponible en: <file:///C:/Users/User/Downloads/Dialnet/prevalenciaDeMastitisBovinaYSuEtiologiaInfecciosaE-2897973>. Consultado mayo, 2018.

Callejo, A. 2010. Desinfectantes de pezones. Frisona española. 178: 94-100.

Carrión, R. 2013. Mastitis subclínica y conteo de células somáticas. Lechería. Disponible en: <https://www.engormix.com/ganaderia-leche/articulos/mastitis-subclinica-conteo-celulas-t30499.htm>. Consultado: 16 de junio de 2018.

Casals, S. 2017. Evaluación de la actividad antimicrobiana de cepas de *Lactobacillus* spp. frente a bacterias patógenas causantes de mastitis en vacas lecheras. Trabajo de diploma. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Matanzas.

Castanon, J.I.R. 2007. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. *Poult. Sci.* 86:2466-2471

Castañeda, V.; Jäger, S.; Wolter, W.; Zschock, M.; Castañeda VMA.; El Sayed, A .2013. El aislamiento y la identificación de los principales patógenos de mastitis en México. *Archivo Brasileño de Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 65 (2): 377-382

Cho, J.H.; Zhao, P.Y.; Kim, I.H. 2011. Probiotics as a Dietary Additive for Pigs. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 10 (16):2127-2134.

Corzo, B.; García, L.; Silva, J.; Pérez, E. 2009. *Zootecnia General con un enfoque ecológico*. Ed. Félix Varela. La Habana, Cuba.

Cotter, P.; Hill, C.; Ross, R. 2005. Bacteriocins developing innate immunity for food, *Nat. Rev. Microbiol*, 3:377-788.

- Crespo, E. 2014. Evaluación de una mezcla probiótica en aves de inicio de Líneas Puras Pesadas B4 en la Unidad Genética Granma. Trabajo de Diploma de Culminación de Estudios SUM "Jesús Herrera" Pedro Betancourt.
- Delgado, R. 2017. Probióticos: evolución del concepto en más de 60 años. Acta Médica del centro. Revista del hospital Clínico Quirúrgico Armando Milián Castro Volumen 11, Número 3.
- Di Rienzo, J.A.; Casanoves, F.; Balzarini, M.G.; González, L.; Tablada, M.; Robledo, C.W. 2012. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. (En línea). Disponible en: <http://www.infostat.com.ar>. Consultado en junio de 2018.
- Díaz, M.; Martín, R.; Sierra, S.; Lara, F.; Rodríguez, J.; Xaus, J.; Olivares, M. 2007. Two *Lactobacillus* strains, isolated from breast milk, differently modulate the immune response. *J Appl Microbiol.* 102: 337-343.
- Dingwell, R.T.; Timms, L.L.; Sargeant, J.M.; Kelton, D.F.; Schukken, Y.H.; Leslie, K.E. 2003. The association of teat canal closure and other risk factors for new dry period intramammary infections. Proceedings of the 42nd Annual Meeting of the National Mastitis Council. Forth Worth, TX. 298–299.
- dos Santos, J.; Fagundes, C.; de Paiva, A.; dos Santos K.; do Carmo, M. 2005. Production of bacteriocins by coagulase negative staphylococci involved in bovine mastitis. *Vet Microbiol.* 106(1-2):61-71.
- Duncan, B. 1955. Multiple ranges and multiple F. Test *Biometrics* 11:1.
- Escamilla, A.; Varela, M.; Sánchez, P.; Álvarez, H.; Gómez, R. Ortiz, R. 2007. Estudio comparado de dos selladores (Yodo y solución electrolizada pH neutro) para prevenir mastitis en ganado Holstein. *Revista de Ciencias Veterinarias.* 23(4): 28.32.

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization). 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. April 30 and May 1. London Ontario, Canadá. Disponible en: http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf. Consultado: 25 de mayo de 2018.

FAO/WHO. 2001. Report on joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria.

Fernández M.; Ramírez, J.; Chaves, C.; Arias, M. 2008. Disminución en la incidencia de mastitis en ganado vacuno con la aplicación de un sellador de barrera experimental. *Agronomía Costarricense* 32(1): 107-112. ISSN: 0377-9424.

Fernández, G.; Barreal, M. L.; Pombo, B.; Ginzo J.; González W.; Prieto A. 2013. Comparison of the epidemiological behaviour of mastitis pathogens by applying time-series analysis in results of milk samples submitted for microbiological examination. *Vet Res Commun. Dec.* 37(4):259-67.

Fernández, O. F.; Trujillo, J. E.; Peña J.; Cerquera, J. y Granja, T. 2012. Mastitis bovina: generalidades y métodos de diagnóstico. *Revista electrónica de Veterinaria, REDVET.* 3(11): 2-8.

Fetrow, J. 2013. Aspectos Económicos de la Mastitis. *Entorno Ganadero* 9 (57): 38–47.

Fonseca, S. 2015. Prevalencia de mastitis bovina mediante la prueba de california mastitis test con identificación de agente etiológico, en el centro de acopio de la leche de la comunidad el Chaupi, Cachambe. Tesis previa a la obtención del título de Ingeniería Agropecuario. Universidad Politécnica Salesiana. Quito. Ecuador.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2014. Milk and Milk Products. Food outlook. Biannual report on global food markets. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/019/i3473e/i3473e.pdf>. Consultado 15 junio de 2018.

Fuentes, G.; Ruiz, R.; Sánchez, J.; Ávila, D.; Escutia, J. 2013. Análisis microbiológico de leche de origen orgánico atributos deseables para su transformación. Agricultura Sociedad y Desarrollo. 10: 419-432.

Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animal. J. Appl. Bacteriol. 66(5):365-378.

Gálvez, A.; Abriouel, H.; Franz, C.; Ben, N. 2011. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. FEMS. Microbiology Reviews. 35(1): 201-232.

García, F.; Sánchez, T.; López, O.; y Benítez, M. A. 2018. Prevalencia de mastitis subclínica y microorganismos asociados a esta. Revista Pastos y Forrajes. 41(1): 35-40.

García, Y. 2011. Obtención de microorganismos con actividad probiótica a partir excretas de pollos de ceba fermentadas. Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencia. Instituto de Ciencia Animal. Mayabeque Cuba.

Garrity, G.; Bell, J.; Lilburn, T. 2004. Taxonomic outline of the prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second Edition. Release 5. P.190-195.

Gasque, R. 2008. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), *Enciclopedia Bovina*. Recuperado de http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/e_bovina/04MastitisBovina.pdf

Gasque, R. 2015. Mastitis bovina. Sitio argentino de Producción Animal. (En línea) Disponible en: <http://www.produccion-animal.com.ar>. Consultado el 2 de mayo del 2018.

- Giannechini, R.; Concha, C.; Delucci, I.; Gil, J.; Salvarrey, L.; Rivero, R. 2014. Mastitis bovina, reconocimiento de los patógenos y su resistencia antimicrobiana en la Cuenca Lechera del Sur de Uruguay. *Revista Veterinaria*. 50(193): 21-32.
- Green, M. J.; Bradley, A. J.; Newton, H. y Browne, W. J. 2014. Seasonal variation of bulk milk somatic cellcounts in UK dairy herds: Investigations of the summer rise. *Prev. Vet. Med.* 74 (4):293-308.
- Harrigan, W.; McCance, M. 1968. *Métodos de laboratorio de Microbiología*. Editorial Academia. León, España.
- Hernández, A.; Coronel, C.; Monge, M.; Quintana, C. 2015. Microbiota, Probióticos, Prebióticos y Simbióticos. *Pediatr Integral* XIX (5): 337-354.
- Huijps, K.; Lam, T.J; Hogeveen, H. 2008. Costs of mastitis: facts and perception. *J Dairy Res.* 75(1):113-120.
- Izak, E.; Nicolás, J. 2010. Predipping: clave en el manejo de los tambos modernos. *Producir XXI*, Bs. As., 18(221):12-18.
- Jiménez, A. 2013. Patología de la ubre. P.14-22 (en línea) Disponible en: <http://www.google.com.cu> Consultado el 2de mayo 2018.
- Jiménez, E.; Fernández, L.; Maldonado, A.; Martín, R.; Olivares, M.; Xaus, J.; Rodríguez, JM. 2008. Oral administration of *Lactobacillus* strains isolated from breast milk as an alternative for the treatment of infectious mastitis during lactation. *Appl Environ Microbiol.* 74: 4650-4655.
- Jurado, H. Fajardo, C. 2017. Determinación del efecto probiótico in vitro de *Lactobacillus gasseri* sobre una cepa de *Staphylococcus epidermidis*. Colombia. *Revista Biosalud*. 16 (2): 53-69.
- Jurado, H.; Gúzman, M.; Jarrín, V. 2015. Determinación de la cinética, pruebas de crecimiento y efecto de inhibición in vitro de *Lactobacillus*

lactis, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*. RevMedVetZoot. 62(2), mayo - agosto 2015: 40-56.

Kadai, G.; González, I. 2007. Probióticos y prebióticos en la práctica clínica. Nutr. Hosp. 22(2):26-34.

Kadaikunnan, S.; Rejiniemon, T. S.; Khaled, J. M.; Alharbi, N. S.; Mothana, R. 2015. "In-vitro antibacterial, antifungal, antioxidant and functional properties of *Bacillus amyloliquefaciens*". Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 14: 9, ISSN: 1476-0711, DOI: 10.1186/s12941-015-0069-1.

Kizerwetter, M.; Binek, M. 2016. "Assessment of potentially probiotic properties of Lactobacillus strains isolated from chickens". Polish Journal of Veterinary Sciences, 19(1): 15–20, ISSN: 2300-2557, DOI: 10.1515/pjvs-2016-0003.

Lata, J.; Jurankova, J.; Doubek, J.; Pribramska, V.; Fric, P.; Dite, P.; Kolar, M.; Scheer, P.; Kosakova, D. 2006. Labelling and content evaluation of commercial veterinary probiotics. Acta Veterinaria. BRNO, 75: 139-144.

Laurencio, M.; Arteaga, F.; Rondón, A.J.; Ormazá, J.; Pinto, J.; Pazmiño, D.; Macías, I. 2017. In vitro probiotic potential of *Lactobacillus* spp. strains from the vagina of dairy cows. Pastos y Forrajes 40 (3): 206-215.

León, L.; San Andrés, L.; Numberg, M. 2005. Prevención de mamarias bovinas, panorama actual del medicamento. 29(287): 988-992.

Lilley, D.M.; Stillwell, R.H. 1965. Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. Sci. 147:747-748

López, J. 2014. Mamitis bovina: definición, etiología y epidemiología de la enfermedad. Ciencia Veterinaria. Disponible en internet:

<http://cienciaveterinaria.com/mamitis-definicion-etilogia-y-epidemiologia/>. Consultado: 2 de mayo de 2018.

Martínez, D.; Cruz, A.; Millan, A.; Moreno, G. 2015. Evaluación del estado de resistencia de agentes etiológicos de mastitis clínica y subclínica frente a algunos antimicrobianos utilizados en hembras bovinas del Municipio de Sotaquirá (Boyacá-Colombia). *Revista Científica*. 25(3).

Martínez, D.; Cruz, A.; Moreno, G. 2013. Resistencia de las bacterias causantes de mastitis bovina frente a los microbianos más frecuentes: Revisión. *Conexión Agropecuaria JDC*. 3: p.53-73 (en línea) Disponible en: <http://www.revistasjdc.com/main/index.php/>. Consultado en junio 2017.

Mellenberger, R.; Roth, C. 2000. Dpto. de Ciencia Animal, Universidad del Estado de Michigan y Universidad de Wisconsin-Madison. (En línea). Disponible en: <http://www.uwex.edu/milkquality/PDF/CMT%20spanish.pdf>. Consultado en junio 2018.

Metchnikoff, E. 1907. The prolongation of life. En: *Optimistic studies*. Heinemann, William (ed). G. P. Putnam & Sons, London, UK: 1-100.

Miguel Ángel, R.; Giraldo, J.; Durango, J.C.; Molina, D.; Abreu, A.M.; Moncada, M. Ramón, J.N. 2014. Efecto protector de un sellador de barrera artificial en el post-sellado de pezones de 50 vacas en ordeño mecánico en el Norte de Antioquia. *Journal of Agriculture and Animal Science*.3(1): 22-29.

Milián, G. 2009. Obtención de cultivos de *Bacillus* spp. y sus endosporas. Evaluación de su actividad probiótica en pollos (*Gallus gallus domesticus*). Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. Instituto de Ciencia Animal. La Habana. Cuba

- Milián, G., Rondón, A.J., Pérez, M., Boucourt, R., Rodríguez, Z., Ranilla, M.J., Rodríguez, M.; Carro, M.D. 2013. Evaluación de biopreparados de *Bacillus subtilis* como promotores del crecimiento en pollos. Revista Cubana de Ciencia Agrícola 47(1):61-66.
- Milián, G.; Rondón, A.J.; Pérez, M.; Arteaga, F.; Boucourt, R.; Portilla Y.; Rodríguez; M., Pérez, Y.; Laurencio, M.E. 2017. Effect of zootechnical additives on productive and health indicators in broilers. Pastos y Forrajes 40 (4): 315-322.
- Ministerio de la Agricultura. 2017. Balance Anual del Grupo Ganadero. La Habana. Cuba. p.10.
- Moraleda, P. 2005. Efectividad de la Aplicación de Solución de Miel como coadyuvante en el control de la mastitis bovina. Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al grado de licenciado en Ciencias de los Alimentos. Valdivia, Chile.
- Neder, V.E.; Araujo, L.; Gianre, V.R.; Calvino, L.F. 2016. Antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in dairy farms from the central Argentina. Revista Veterinaria REDVET 17 (9).
- Nguyen, A. T.; Nguyen, D. V.; Tran, M. T.; Nguyen, L. T.; Nguyen, A. H.; Phan, T. N. 2015. Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* CH16 strain from chicken gastrointestinal tracts for use as a feed supplement to promote weight gain in broilers. Lett. Appl. Microbiol. 60(6):580-588.
- Nocek, B.; Tikhonov, A.; Babnigg, G.; Gu, M.; Zhou, M.; Makarova, KS.; Vondenhoff, G.; Van, A.; Kwon, K.; Anderson, WF.; Severinov, K.; Joachimiak, A. 2012. Structural and functional characterization of microcin resistance peptidase MccF from *Bacillus anthracis*. J Mol Biol. 420(4-5):366-83.

- Ochoa, A.; Loeza, H.; Sagrero, E.; Villagómez, E.; Lara, L.; López, J.E. 2008. Antibacterial activity of thioninThi2. 1 from *Arabidopsis thaliana* expressed by bovine endothelial cells against isolates from bovine mastitis. *Vet Microbiol.* 127(3):425-430.
- Ochoa, A.; Loeza, P.; Torres, F.; Loeza, H.; Mascot, N.; Sánchez, S.; López, J.E. 2008. Antimicrobial susceptibility and invasive ability of *Staphylococcus aureus* isolates from mastitis from dairy backyard systems. *Antonie van Leeuwenhoek* 94: 199–206.
- Olivares, M. Díaz, MP.; Martín, R.; Rodríguez, JM.; Xaus, J. 2006. Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. *J Appl Microbiol.* 101:72-79.
- Oliveira, L.; Langoni, H.; Hulland, C. y Ruegg, P. L. 2012. Minimum inhibitory concentrations of *Staphylococcus aureus* recovered from clinical and subclinical cases of bovine mastitis. *Journal of dairy science*, 95(4), 1913-1920.
- Parker, R.B. 1974. Probiotics, the other half of the antibiotics story. *Anim. Nutr. Health* 29:4-8.
- Padro, L.; Chil, I. 2014. Caracterización preliminar de la jalea de propóleos al 10 % para uso estomatológico. *Revista Cubana de Química* 26(2):147-156.
- Parker, R. 1974. Probiotics, the other half of the antibiotics story. *Animal Nutrition and Health*. No 29:4-8.
- Pelczar, M.; Reid, D. 1966. *Microbiología*. Ed. Castilla. España.
- Pereyra, E.; Dallard, B.; Calvino, L. 2014. Aspectos de la respuesta inmune innata en las infecciones intramamarias causadas por *Staphylococcus aureus* en bovinos. *Revista argentina de Microbiología*, 46(4), p. 363-375.
- Pérez, M.; Milián, G.; Boucourt, R.; Alemán, R. 2016. Evaluación in vitro de prebióticos en hidrolizados de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*).

- Pérez, M.; Milián, G.; Rondón, A.J.; Bocourt-Salabarría, R.; Torres, V. 2015. Efecto de endosporas de *Bacillus subtilis* E-44 con actividad probiótica sobre indicadores fermentativos en órganos digestivos e inmunológicos de pollos de engorde. Rev. Soc. Ven. Microbiol. 35 (2):89-94.
- Pérez-Cano, F.J.; Dong, H.; Yaqoob, P. 2010. *In vitro* immunomodulatory activity of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 and *Lactobacillus salivarius* CECT5713: two probiotic strains isolated from human breast milk. Immunobiology 12:996-1004
- Pino, A.; Dihigo L. E. 2007. Ensayo sobre el efecto de los probióticos en la fisiología animal. Instituto de Ciencia Animal. La Habana. (En línea) Disponible en: <http://www.monografías.com>. Consultado el 5 de abril 2018.
- Ponce, P.; Ribot, A.; Capdevila, J. Z.; Villoch, A. 2010. Manual aprendiendo de la leche PROCAL. San José de las Lajas. Mayabeque. Cuba: CENSA, MINAG.
- Preeti, Y.; Chun, Z.; Jing, S.; Hughes, J. A. 2006. Antimicrobial activities of human β -defensins against *Bacillus* species. J. 28 (2): 132-137.
- Rahmani, H.R.; Speer, W. 2005. Natural additives influence the performance and humoral immunity of broilers. J. Poultry Science 4 (9): 713-717.
- Ramírez, N.; Gaviria, G.; Arroyave, O.; Sierra, B.; Benjumea, J. 2016. Prevalencia de mastitis en vacas lecheras lactantes en el municipio de San Pedro de los Milagros, Antioquia. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, 14(1): 76-87.
- Ramírez, N.; Gaviria, G.; Arroyave, O.; Sierra, B.; Benjumea, J. 2016. Prevalencia de Mastitis en Vacas Lecheras Lactantes en el Municipio de San Pedro de los Milagros, Antioquia. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. 14(1): 76-87.

- Raspanti, C.; Bonetto, C.; Vissio, C.; Pellegrino, M.; Reinoso, E.; Dieser, S.; Bogni, C.; Larriestra, A.; Odierno, L. 2016. Prevalencia y susceptibilidad a los antibióticos de coagulasa negativa *Staphylococcus* especies de mastitis subclínica bovina en ganado vacuno lechero en la región central de Argentina. *Revista argentina de Microbiología* 48(1): 50 - 56.
- Revolledo, L.A.; Ferreira, J.P.; Mead, G.C. 2006. Prospects in *Salmonella* Control: competitive exclusion, probiotics, and enhancement of avian intestinal immunity. *J. Appl. Poult. Res.* 15: 341-351.
- Rodríguez, J. Remón, D.; Ruiz, A. 2010. Mastitis Bovina: Nuevos aspectos de diagnóstico, tratamiento y control. *Revista Producción Animal*. 14(3):34-42.
- Rodríguez, M. 2017. Evaluación de la capacidad antibacteriana de PROBIOLEV® frente a bacterias patógenas. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Veterinarias.
- Rodríguez, Y. 2015. Evaluación del efecto probiótico de los aditivos zootécnicos PROBIOLACTIL® Y SUBTILPROBIO® en cerdos. Tesis presentada en opción al Título Académico de Ingeniero Agrónomo.
- Romero, N.V. 2016. Análisis de la calidad higiénica de la leche de ganaderías pequeñas y grandes pertenecientes al área 5 de Zipaquirá, Cundinamarca. Trabajo presentado para optar por el título de zootecnista. Universidad de la Salle. Bogotá. Colombia.
- Ruíz, A.; Peña, J.; González, D. 2012. Situación de la mastitis bovina en Cuba. *Revista electrónica de Veterinaria* 13 (12): 1-12.
- Ruíz, A.; Peña, J.; Remón, D. 2016. Mastitis bovina en Cuba. Artículo de revisión. *Rev. prod. anim.* 28 (2-3): 39-50.
- Ruíz, R. 2018. Mastitis bacteriana en ganado bovino: etiología y técnicas de diagnóstico en el laboratorio. Disponible en:

http://www.ammveb.net/articulos/Mastitis_bacteriana.pdf. Consultado en junio de 2018.

Ryan, M.; Meaney, W.; Ross, R.; Hill C. 1998. Evaluation of lacticin 3147 and a teat seal containing this bacteriocin for inhibition of mastitis pathogens. *Appl Environ Microbiol.* 64(6):2287-2290.

Sánchez, L.; Peña, J. 2016. Actividad antimicrobiana de cepas de *Lactobacillus* spp. contra patógenos causantes de mastitis bovina. *Rev. Salud Anim.* Vol. 38 No. 2): 85-92.

Sanders, M. 2011. Impact of probiotics on colonizing microbiota of the gut. *J Clin Gastroenterol.* Suppl: S115-9. Doi:10.1097/MCG.0b013e318227414a.

Sanz, Y.; Collado, M.; Dalmau, J. 2003. Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo. *Acta Pediátrica Española.* 61:476-482.

Sartori, L.; Santos, R.; Marín, J. 2014. La identificación de las especies de *Candida* aisladas de vacas que padecen mastitis en cuatro estados de Brasil. *Arq. Bras. Medicina Veterinaria y Zootec.* 66 (5): pp.1615-1617.

Scaramelli, A.; González, Z. 2005. Prevención y control de la mastitis bovina. *Manual de Ganadería Doble Propósito:* 335-339.

Schillinger, U.; Lucke, F. 1989. Antibacterial Activity of *Lactobacillus sake* Isolated from Meat. *Appl. Environm. Microbiol.* 55(8):1901-1906.

Schroeder, J. 2012. Mastitis Control Programs. *REV CLÍN MED FAM.* 5 (1): 25-29.

Silva, Y. 2013. Efecto probiótico de un biopreparado de *Bacillus subtilis* C-31 en terneros lactantes. Trabajo de Diploma de Culminación de Estudios Centro de Estudios Biotecnológicos.

- Stoyanova, L.; Ustyugova, E.; Netrov, A. 2012. Antibacterial metabolites of Lactis acid bacteria: Their diversity and properties. Applied Biotechnology and Microbiology. 48(3):229-243.
- Suárez, V. H.; Martínez, G. M.; Gianre, V.; Calvino, L.; Rachoski, A.; Chávez, M.; Bertoni, E. 2014. Relaciones entre el recuento de células somáticas, test de mastitis California, conductividad eléctrica y el diagnóstico de mastitis subclínicas en cabras lecheras. RIA. Revista de investigaciones agropecuarias. 40(2), 145-153.
- Svetoch, E.; Eruslanov, B.; Levchuk, V.; Pereygin, V.; Mitsevich, E.; Mitsevich, I.; Stepanshin, J.; Dyatlov, I.; Seal, B.; Stern, N. 2011. Isolation of *Lactobacillus salivarius* 1077 (NRRL B-50053) and Characterization of Its Bacteriocin, Including the Antimicrobial Activity Spectrum. Appl. Environ Microbiol. 77: 2749.
- Trujillo, C. M.; Gallego, A. F.; Ramírez, N.; Palacio, G. 2011. Prevalencia de mastitis en siete hatos lecheros del oriente antioqueño. Rev. Colomb. Cienc. Pecuaria. 24(1):11-18.
- Twomey, D.; Wheelock, A.; Flynn, J.; Meaney, W.; Hill, C.; Ross, R. 2000 Protection against *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cows using a bismuth-based teat seal containing the bacteriocin, lacticin 3147. J DairySci. 83(9):1981-1988.
- Uchuari, I.A. 2018. Evaluación de la lidocaína clorhidrato como tratamiento alternativo de la mastitis subclínica bovina en animales de mediana producción láctea. Trabajo de Titulación. Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias. Universidad Técnica de Machala. Ecuador.
- Vargas, E. N. 2012. Control de mastitis bovina utilizando dos productos naturales para Dipping. Tesis presentada para optar al título de Ingeniero en Alimentos. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile.

- Varmuzova, K.; Kubasova, T.; Davidova-Gerzova, L.; Sisak, F.; Havlickova, H.; Sebkova, A. 2016. Composition of gut microbiota influences resistance of newly hatched chickens to *Salmonella enteritidis* infection. *Frontiers in Microbiol.* 7: 1-9
- Villarreal, J.; Díaz, M.; Torres, J.; Valencia, C.; Linaje, M.; Barboza, J.; De La Fuente, N. 2016. Pruebas *in vitro* de un sellador post-ordeño con bacteriocinas de *Bacillus thuringiensis* para prevenir la mastitis. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos* 1 (1) 303-309
- Vissio, C.; Agüero, D.; Raspanti, C.; Odierno, L.; Larriestra, A. (2015). Pérdidas productivas y económicas diarias ocasionadas por la mastitis y erogaciones derivadas de su control en establecimientos lecheros de Córdoba, Argentina. *Archivos de medicina veterinaria* 47(1): 7-14
- Vondruskova, H.; Slamova, R.; Trckova, M.; Zraly, Z.; Pavlik, I. 2010. Alternatives to antibiotic growth promoters in prevention of diarrhea in weaned piglets: a review. *Veterinari Medicina.* 55(5): 199-224.
- Yasothei, R. 2017. Effect of premilking and postmilking teat dipping in control of subclinical mastitis in dairy cattle. *International Journal of Science, Environment and Technology*, Vol. 6, No 2, 2017 1413 – 1417
- Zhang, R.; Huo, W.; Zhu, W.; Mao, S. 2015. Characterization of bacterial community of raw milk from dairy cows during subacute ruminal acidosis challenge by high-throughput sequencing. *J. Sci. Food Agric.* 95 (5):1072-1079.
- Zheng, L.; Donovan, W.; Fitz, P.; Losick, R. 2015. Gene encoding a morphogenic protein required in the assembly of the outer coat of the *Bacillus subtilis* endospore. *Genes & development* 2:1047-1054.