



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS PUEBLA

POSTGRADO EN ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

DESARROLLO DE UN INMUNOESTIMULANTE INTRAMAMARIO COMO ESTRATEGIA PARA REDUCIR MASTITIS EN GANADO LECHERO DEL ESTADO DE PUEBLA

LIZ SARAHY PEREZ MARTELL

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PUEBLA, PUEBLA

2016



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS
CAMPECHE-CÓRDOBA-MONTECILLO-PUEBLA-SAN LUIS POTOSÍ-TABASCO-VERACRUZ

SUBDIRECCIÓN DE EDUCACIÓN
CAMPUS PUEBLA

CAMPUE-43-2-03

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe **Liz Sarahy Pérez Martell**, alumna de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta Institución, bajo la dirección del Profesor **Dr. José Víctor Rodríguez Hernández**, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis **Desarrollo de un inmunoestimulante intramamario como estrategia para reducir mastitis en ganado lechero del estado de Puebla**, y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, el Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Puebla, Puebla, 4 de marzo del 2016

Liz Sarahy Pérez Martell

Nombre completo y Firma

Dr. José Víctor Rodríguez Hernández

Vo. Bo. Profesor Consejero o Director de Tesis

Nombre completo y Firma

La presente tesis, titulada: **Desarrollo de un inmunoestimulante intramamario como estrategia para reducir mastitis en ganado lechero del Estado de Puebla**, realizada por la alumna: **Liz Sarahy Pérez Martell**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de.

MAESTRO EN CIENCIAS
ESTRATEGIA PARA EL DESARROLLO AGRICOLA REGIONAL

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO: 
DR. JOSÉ VÍCTOR RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ

ASESOR: 
DR. PABLO HERNÁNDEZ JÁUREGUI Y ÁLVAREZ

ASESOR: 
DR. ANTONIO MACÍAS LÓPEZ

ASESOR: 
DR. JOSÉ GUADALUPE HERRERA HARO

Puebla, Puebla, México, a 4 de marzo de 2016

**DESARROLLO DE UN INMUNOESTIMULANTE INTRAMAMARIO COMO
ESTRATEGIA PARA REDUCIR MASTITIS EN GANADO LECHERO DEL ESTADO
DE PUEBLA**

**Liz Sarahy Pérez Martell
Colegio de Postgraduados 2016**

Los factores de riesgo para la adquisición de infecciones en la glándula mamaria son multifactoriales, producen pérdidas millonarias por la baja producción de leche y/o el descarte de la vaca. La incorrecta aplicación de los antibióticos y los mecanismos genéticos bacterianos de creación de resistencia dan como resultado la limitación en su uso. El propósito del presente trabajo fue el de investigar los efectos de productos antisépticos sobre la mucosa en la glándula mamaria, en un modelo de ratona lactante y en la glándula mamaria de bovinos durante la etapa del secado, para analizar la calidad de leche en el post parto inmediato. Las Isotiazolinonas (Iso), el digluconato de clorhexidina (Clorh) y los soluciones super óxido (SSO) compuestos químicos con actividad microbicida de amplio espectro, fueron aplicados en forma individual en las ratonas y las Iso en las vacas al secado. En las ratonas, Iso y SSO indujeron vacuolación citoplásmica del epitelio acinar. Clorh indujo inflamación, edema y hemorragia. Las Iso como tratamiento intraductal en las vacas al secado resultó en leche posparto libre de bacterias contaminantes. Se analizan los factores de resistencia a los biosidas y se proponen como alternativas al uso de antibióticos.

Nueve vacas con gestación de siete meses recibieron por vía de los conductos galactóforos formulación con antígenos inactivados de proteína de adhesión a la fibronectina de *Staphylococcus aureus*, células completas e inactivadas de *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*. El análisis de las inmunoglobulinas G por ELISA indirecto contra los antígenos aplicados mostró; cinco de nueve vacas estimuladas con *Escherichia coli*, con valores de significancia estadística de $p < 0.0002$. El estímulo antigénico para *Streptococcus agalactiae* resultó en que ocho de nueve vacas respondieron con buenos títulos ante este antígeno con índices de significancia de $p < 0.0002$. El estímulo con las proteínas de virulencia de *Staphylococcus aureus* de adhesión a la fibronectina y factor de clonación, reveló respuesta en todas las vacas con índices de significancia de $p < 0.0002$. La respuesta intraductal con antígenos promete ser una vía para la inmunización a las vacas en etapa del secado.

Palabras clave; Antisépticos intraductal, bovinos al secado, ELISA, *Escherichia coli*, glándula mamaria, inmunización intraductal secado, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*,.

IMMUNOSTIMULANT DEVELOPING A STRATEGY FOR REDUCING INTRAMAMMARY AS DAIRY CATTLE MASTITIS IN PUEBLA STATE

Liz Sarahy Pérez Martell

Colegio de Postgraduados 2016

Risk factors for acquiring infection in the mammary gland are multifactorial, produce millions in losses due to low milk production and / or dismissal of the cow. Misapplication of antibiotics and bacterial genetic mechanisms of creating resistance result in limitations on their use. The purpose of this study was to investigate the effects of antiseptics on the mucosa in the mammary gland, in a model of infant ratona and bovine mammary gland during the drying stage, to analyze the quality of milk in the post partum. The isotiazolinones (Iso), chlorhexidine digluconate (Clorh) and super oxide solutions (SSO) chemical compounds with broad-spectrum antimicrobial activity, were applied individually in Iso in mice and cows drying. In mice, Iso and SSO induced cytoplasmic vacuolation of acinar epithelium. Clorh induced inflammation, edema and hemorrhage. The Iso as intraductal treatment in cows at drying postpartum milk was free of contaminating bacteria. factors resistance biosidas are analyzed and proposed as alternatives to antibiotics. Nine cows seven months gestation received via the milk ducts formulation inactivated antigen protein adhesion to fibronectin of *Staphylococcus aureus*, complete and *inactivated Streptococcus agalactiae* and *Escherichia coli* cells. The analysis of immunoglobulin G by indirect ELISA against antigens showed applied; five of the nine cows stimulated with *Escherichia coli*, with values of statistical significance of $p < 0.0002$. The antigenic stimulus for *Streptococcus agalactiae* resulted in eight of nine cows responded with good titers to this antigen with indices of significance of $p < 0.0002$. The stimulus virulence proteins of *Staphylococcus aureus* adhesion to fibronectin and factor cloning revealed answer all cows with indexes of significance of $p < 0.0002$. Intraductal response to antigens promises to be a way to immunize cows drying stage.

Keywords; Bovine drying, drying intraductal immunization, ELISA, *Escherichia coli*, intraductal antiseptics, mammary gland, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*.

Dedicatoria

A mi tía Josefina, mi compañera de vida en las buenas y en las malas

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por ser mi compañero en cada instante de mi vida, por ser fortaleza, paciencia, luz y perseverancia.

A mi familia y amigos por estar conmigo compartiendo cada logro y ser parte de mi vida.

Al Dr José Víctor Rodríguez Hernández por apoyarme durante todo el proceso que se llevó a cabo en esta investigación, por su disposición, tiempo, orientación, asesoría y amistad.

Al Dr. Pablo Hernández Jáuregui por tenerme toda la paciencia y dedicación para lograr que este proyecto saliera adelante, por no dejarme sola ante la adversidad, por motivarme y regalarme enseñanzas de vida y profesionales, por compartir conmigo sus conocimientos.

A Beatriz Petlacalco por ser mi apoyo incondicional en este proyecto.

Al MVZ EPA Antonio Flores Pérez por apoyarme en la toma de muestras y enseñarme el maravilloso y apasionante mundo de la medicina veterinaria.

Al MVZ Víctor Reyes e Ing. Ramón Minutti por abrirme las puertas para realizar este proyecto.

Al Colegio de Postgraduados, *Campus* Puebla, por abrirme las puertas y darme la atención en todo momento para obtener el grado de Maestría en Ciencias en Estrategias para el Desarrollo Agrícola Regional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo para realizar el proyecto de investigación.

A la Línea Prioritaria de Investigación 5, Biotecnología Microbiana Vegetal y Animal, por el apoyo para la realización de este trabajo de investigación.

A los integrantes del Consejo Particular, Dr. Antonio Macías López, Dr. José Guadalupe Herrera Haro, por el apoyo durante cada cuatrimestre.

A la Dra. Mercedes Sobal Cruz, por apoyarme tanto para avanzar en mi proyecto y concluir.

CONTENIDO

	Página
CAPÍTULO I	
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO II	
REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 Anatomía, Fisiología e Histopatología de la Glándula mamaria.....	3
2.1.1 Desarrollo de la Glándula mamaria.....	5
2.1.2. Estructura externa de la ubre.....	10
2.1.3. Estructura interna de la ubre.....	10
2.1.4 Conductos y sistema secretor de la leche.....	16
2.2. Mastitis.....	18
2.2.1. Riesgos por infección por bacterias.....	18
2.2.2. Invasión por microorganismos del canal del pezón por distintas vías...	19
2.2.3. Clasificación de la mastitis.....	20
2.2.4. Mastitis inducida por <i>Streptococcus</i>.....	21
2.2.5. Mastitis inducida por <i>Staphylococcus</i>.....	22
2.2.6. Mastitis inducida por bacterias coliformes.....	24
2.2.7. Identificación en el laboratorio.....	26
2.2.8. Prácticas relacionadas con la mastitis.....	27
2.2.9. Condiciones externas que pueden ocasionar mastitis.....	28
2.2.10. Toma de muestras de leche para análisis bacteriológico.....	36
2.3. Sistema Inmune.....	37
2.3.1. Calostro.....	37
2.3.2. Sistemas de defensa de la glándula mamaria.....	38
2.3.3. Mecanismos no inmunológicos.....	39
2.3.4. Mecanismos inmunológicos.....	40
2.3.5. Mecanismos No – inmunológicos.....	43
2.3.6. Mecanismos inmunológicos solubles.....	44
2.3.7. Mecanismo inmunológicos celulares.....	45

2.4. Estudio regional.....	46
2.5. Programas de vacunación.....	50
2.6. Identificación de productos bactericidas.....	55
CAPÍTULO 3	
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	64
3.1. Hipótesis.....	64
3.2. Objetivos.....	64
3.2.1. Objetivo general.....	64
3.2.2. Objetivos particulares.....	64
3.2.2.1. Identificación y aislamiento de los patógenos menores y mayores del estado de Puebla.....	64
3.2.2.2. Caracterizar el o los patógenos menores, multiplicarlos y preservarlos.....	64
3.2.2.3. Demostrar la capacidad bactericida <i>in vitro</i> contra bacterias Gram positivas y negativas de referencia.....	65
3.2.2.3.1. Prueba de potencia de los microorganismos.....	65
3.2.2.3.2. Prueba de potencia de antisépticos.....	65
3.2.2.4. Demostrar la efectividad del antiséptico en ratona lactante.....	65
3.2.2.5. Evaluar el comportamiento del o los productos desarrollados en vacas al secado y al abrir lactancia.....	65
3.2.2.6. Medir la respuesta inmune contra los antígenos bacterianos de la formulación.....	65
CAPÍTULO 4	
MATERIALES Y MÉTODOS.....	66
4.1. Descripción.....	66
4.2. Propiedades.....	67
4.3. Desarrollo del producto.....	67
4.4. Prueba de potencia de microorganismos.....	68
4.5. Preparación de la muestra problema.....	69
4.6. Prueba de potencia de antisépticos.....	70
4.6.1. Isotiazolinonas.....	70

4.6.2. Clorhexidina.....	70
4.6.3. Radicales súper óxido.....	71
4.7. Formulaci3n del producto.....	72
4.8. Fraccionamiento de inmunoglobulinas mediante precipitaci3n.....	72
4.9. Cuantificaci3n de prote3nas por m3todo Bradford.....	74
4.10. Prueba de ELISA.....	75
4.11. Evaluaci3n de Secavac en vacas al secado y al abrir lactancia.....	77
CAPÍTULO 5	
ARTÍCULOS CIENTÍFICOS.....	78
“Alternativas para la sustituci3n de antibi3ticos por antis3pticos en la aplicaci3n por v3a intraductal para vacas en la etapa del secado”.....	78
“Inmunizaci3n intraductal contra Fibronectina y c3lulas completas de <i>Staphylococcus aureus E coli Streptococcus agalactie</i> en vacas al secado.....	90
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	103
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS GENERALES.....	104

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

La leche de vaca en la dieta del mexicano mantiene en nuestros días una estima muy por encima de otros productos. La industria lechera tiene preferencia mayor por aquellas razas que, aparte de su adaptabilidad a las condiciones climatológicas, ofrece altos contenidos de grasa y mayores volúmenes en su producción diaria. En promedio se considera un rendimiento de 60 litros diarios de producción de leche por vaca en los animales de la lechería especializada, el rendimiento promedio de la no especializada disminuye drásticamente en un 80 %, obteniéndose una producción de 12 litros diarios por vaca.

La mastitis o inflamación de la glándula mamaria, puede tener su origen en traumatismos o por la colonización de microorganismos de menor o mayor patogenicidad que afectan la calidad de la leche. El resultado es la disminución de la producción de leche por las lesiones a las células de producción en los acinos glandulares. En los sistemas de producción para bovinos, regularmente se recurre al uso de antibióticos como tratamiento. Un aspecto importante relacionado con la mastitis, en la salud para el hombre, por las implicaciones que tiene para su bienestar, el consumo de leche contaminada con residuos de antibióticos. (Sumano, 2007)

La mastitis bovina es considerada la enfermedad infecciosa más costosa de las vacas lecheras independientemente del sistema de producción del que se trate, debido a que induce a una disminución en la producción del 4% al 30% de leche y baja su calidad, además de incrementar los costos del cuidado de la salud del hato y un desecho prematuro de animales. En general, las mastitis causan entre un 40 a 50% de disminución en los márgenes económicos netos por vaca. La Mastitis Bovina es el problema de salud más frecuente en las granjas lecheras debido al grado de exposición y al número de factores de predisposición y etiología que se introduzcan al sistema mamario de la vaca relacionado con la práctica del ordeño propiamente. En términos generales, entre el 15% y 40% de las vacas en ordeño presentan uno o más cuartos mamarios con mastitis subclínica; mientras que entre el 1% al 8 % pueden estar pasando por el estadio de la mastitis clínica. Es evidente que estas cifras son altamente variables y dependen de las condiciones de manejo y de los controles de salud en la finca lechera; así como también por los factores de las

vacas; tales como: edad, raza, partos, estado lactacional, producción de leche y condiciones del equipo de ordeño. (Ídem)

En México y el mundo, las enfermedades que afectan a la ubre del ganado bovino producen pérdidas millonarias, siendo la mastitis la más costosa del ganado lechero. Para la prevención de la mastitis se han usado vacunas con resultados muy variables. La diversidad de los agentes responsables de mastitis, junto a la existencia de distintas serovariedades dentro de una misma especie entre las que no existe protección cruzada podría explicar el que las vacunas comerciales frente a mastitis no hayan cubierto las expectativas de eficacia que de ellas se esperaba. A este respecto las autovacunas presentan la ventaja de adaptarse a la diversidad antigénica de cada explotación, pudiendo suponer una alternativa interesante a las vacunas comerciales.

En este sentido, las autovacunas han mostrado un efecto preventivo respecto a las mastitis clínicas, una menor incidencia de casos de mastitis subclínicas, un menor porcentaje de infecciones persistentes al final de la lactación y un aumento de la producción láctea en hatos.

Cuando se intente tratar un caso de mastitis se deben tener en cuenta tres aspectos fundamentales:

Eficiencia

Costo – beneficio

Residuos de fármacos en leche (Sumano, 2007)

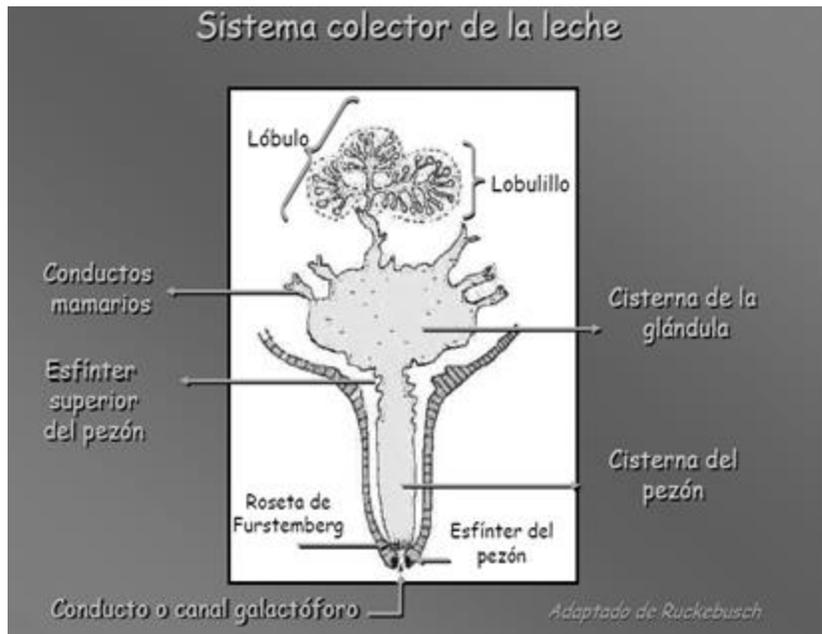
CAPÍTULO 2

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 ANATOMÍA, FISIOLOGÍA E HISTOLOGÍA PATOLÓGICA DE LA GLÁNDULA MAMARIA

La glándula mamaria de la hembra bovina ha sido genéticamente modificada a lo largo del tiempo por el humano con el único fin de lograr grandes lactancias en términos de kg de leche, de tal manera que en ganaderías de leche modernas, las vacas (*Bos taurus-indicus*) poseen demandas nutritivas mucho más altas comparadas con las de sus ancestros, que no fueron seleccionadas para producir grandes volúmenes de leche y por lo tanto, generaban leche sólo para sus terneros (2 – 12 L/día), en contraste con la realidad actual donde no es difícil encontrar vacas que produzcan 60 L/día, traduciéndose en mucha leche desde el punto de vista evolutivo. (Rosenber, 2006)

Figura 1. Esquema de un corte sagital de parte de la glándula mamaria que muestra las estructuras externas e internas.

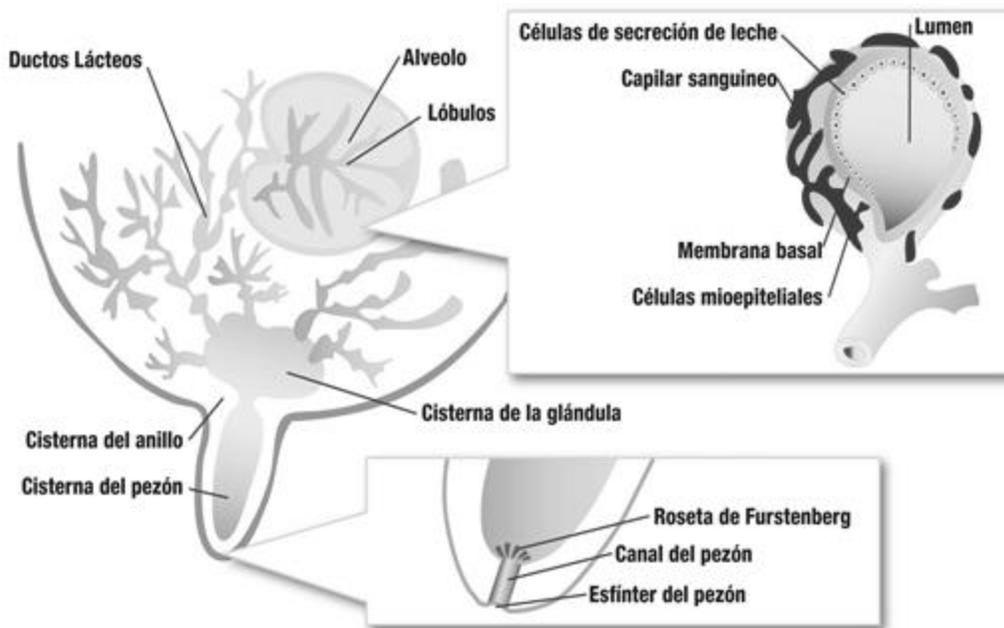


Tomado de (Regueiro, 2009) de adaptación original de (Ruckebusch, Dunlop, & Philippe Phaneuf, 1994)

La ubre de la vaca está diseñada para producir y ofrecer al ternero recién nacido un fácil acceso a la leche. Se encuentra suspendida por fuera de la pared del abdomen posterior y no se encuentra fijada, soportada o protegida por ninguna estructura ósea.

La ubre de la vaca está constituida por cuatro glándulas mamarias o "cuartos". Cada cuarto es una unidad funcional en sí misma que opera independientemente y drena la leche por único conducto galactóforo. Los cuartos posteriores son ligeramente más desarrollados y producen más leche (60%) que los cuartos anteriores (40%). Los principales componentes de la ubre se listan en la Figura 2 con una corta explicación de su importancia y función.

Figura 2. Principales componentes de la ubre de la vaca.



Tomado de (Tsua, 2008)

Ductos lácteos.- canales de drenaje de número variado que comienza en los alveolos y termina en la cisterna de la ubre

Alveolo.- células especializadas encargadas de la producción y secreción de la leche

Lóbulos.- conjunto de alveolos que forman un racimo

Cisterna del anillo.- almacena leche entre la cisterna de la glándula y la cisterna de pezón

Cisterna del pezón.- está recubierta de vasos sanguíneos, constituyéndose en un órgano delicado para almacenar leche

Cisterna de la glándula.- cavidad elástica que tiene por función recibir y almacenar la leche después de producirla por los tejidos secretores

Lumen.- cavidad central rodeada por células epiteliales

Membrana basal.- membrana que recubre el lumen

Células mioepiteliales.- responsables de la eyección de la leche al contraerse por la acción de la hormona oxitocina

Roseta de Furstenberg.- evita la salida pasiva de la leche y la entrada de microorganismos

Canal del pezón.- junto con la Roseta de Furstenberg evita la salida de leche

Esfínter del pezón.- canal estirado y recubierto de células que forman una serie de pliegues que cierran el canal e impiden la salida de la leche entre ordeños

Capilar sanguíneo.- proporcionan sangre al alveolo y retiran la no utilizada

La ubre representa un conjunto de cuatro glándulas de origen dérmico, considerada como una glándula sudorípara modificada y cubierta externamente por una piel suave al tacto, provista de vellos finos excepto en los pezones.

Su apariencia es sacular redondeada, se encuentra fuera de la cavidad del cuerpo, adosándose a la pared abdominal por medio del aparato suspensorio.

2.1.1. Desarrollo de la Glándula mamaria

El desarrollo de la glándula mamaria en la hembra se realiza durante 5 fases del desarrollo animal: prenatal, antes de la pubertad, después de la pubertad, gestación e inicio de la lactación.

Se describirán brevemente los estadios más importantes del desarrollo de la glándula en estas 5 épocas de la hembra. (Ávila, 2010)

a) El desarrollo fetal de la glándula mamaria:

Puede identificarse desde las primeras etapas del desarrollo embrionario después de los 30 días de concepción cuando se aprecia un estrato de células cuboidales ectodérmicas que forman la banda mamaria en la región inguinal. A los 35 días aproximadamente aparecen las líneas mamarias formadas por varias capas de células que se desarrollan del estrato

germinativo o de Malpighi, las cuales dan lugar a los senos lactíferos mamarios que a los dos meses de vida fetal forman 2 botones mamarios en cada línea mamaria, dando lugar a las glándulas anteriores y posteriores de cada mitad de la ubre. Hasta este punto los embriones de machos y hembras tienen un desarrollo de la glándula parecido, pero aquí empiezan a diferenciarse debido al desarrollo de los pezones. La formación del seno lactífero del pezón y de la glándula empieza a los 3 meses de vida fetal, estando el seno lactífero de la glándula bien diferenciado a los 4 meses de edad del feto, donde encontramos un epitelio de 2 o 3 estratos que cubre la cara interna del lumen del seno lactífero, el cual tiene más bien la apariencia de un conducto. El conducto que forma el seno lactífero del pezón se hace más estrecho en su porción distal para formar el conducto estriado. También se empiezan a formar vasos sanguíneos que corren perpendicularmente a la base de la ubre. Al nacimiento, las glándulas son independientes, el conducto estriado tiene epitelio estratificado y el seno lactífero del pezón está recubierto de epitelio de 2 niveles, tal como en la hembra adulta; sin embargo, las fibras circulares a manera de meato alrededor del conducto estriado no están bien desarrolladas, aunque las zonas vasculares del pezón sí lo están. Realmente, el mayor desarrollo de la glándula en la vida fetal se efectúa durante los primeros 6 meses. (Ídem)

b) Desarrollo de la glándula desde el nacimiento a la pubertad:

El desarrollo de la glándula en esta etapa del crecimiento animal se debe a un aumento de tejido conjuntivo con deposición de grasa, sin sistema de conductos en desarrollo. Se ve poca correlación entre el desarrollo glandular hasta este punto y la producción láctea que tendrá el animal; es por esto que este parámetro no proporciona información para seleccionar becerras antes de la pubertad. (Ídem)

c) Desarrollo de la glándula después de la pubertad:

Por la influencia de las hormonas ováricas, estrógenos, progesterona, hormona del crecimiento (HST), prolactina e insulina, con cada estro existe un ligero brote o desarrollo de tejido glandular. Los estrógenos son responsables del crecimiento de los conductos, y la progesterona del desarrollo lóbulo-alveolar. Se puede detectar el desarrollo del sistema de conductos un poco antes y durante cada estro, sin embargo, al final se observa la regresión

parcial de este crecimiento. También antes y durante el estro, la luz alveolar muestra secreción, y las células epiteliales del alvéolo adquieren forma cuboidal por la presión existente, durante el diestro son columnares, ya que disminuye la luz por no haber secreción, por lo que disminuye la presión intraluminal. (Ídem)

d) Cambios durante la preñez:

La mayor parte del crecimiento glandular sucede durante la gestación. Se inicia el desarrollo del sistema de conductos durante los primeros meses de gestación; pero al quinto mes los lóbulos ya están formados organizados en conjuntos. Existe un gran crecimiento lóbulo alveolar al final del sexto mes. También durante los meses quinto y sexto, hay marcado crecimiento del seno lactífero glandular. Los conductos colectores mayores aparecen con una doble capa de epitelio, y los pequeños conductos y alvéolos aparecen con una capa simple de epitelio cuboidal, teniendo capacidad potencial para secretar leche. El tejido secretor reemplaza al tejido conjuntivo adiposo para formar lóbulos definitivos. Se llega a observar ligera secreción al final del séptimo mes de gestación. (Ídem)

e) Cambios durante la lactación:

Al inicio de la lactación existe desarrollo adicional de la glándula al inicio de la lactación, con limitada proliferación celular. Aparentemente las células que se destruyen y eliminan en la leche durante la lactación no son reemplazadas durante las últimas fases de ella. (Ídem)

f) Calostrogénesis:

Los anticuerpos maternos, no pueden traspasar la barrera de la placenta por lo que los recién nacidos de los herbívoros y otras especies nacen agamaglobulémicos. Por esta razón es importante que los recién nacidos consuman suficiente cantidad de calostro de alta calidad. Los cabritos, corderos y terneros nacen sin tener su sistema de inmunidad totalmente desarrollado. Durante los meses que tardan en desarrollar sus sistemas de inmunidad dependen completamente de los anticuerpos del calostro.

El calostro es la primera secreción láctea de los mamíferos después del parto. El calostro es una fuente rica de proteínas no específicas tal como la timosina, alfa 1 y B4,

lactoferrina, insulina, factor de crecimiento de insulina, factores anti-estafilocociales y otros. Estas proteínas son importantes para la resistencia a enfermedades infecciosas así como también para otras funciones de estimulación y crecimiento de los tejidos. Es también la fuente de las proteínas específicas (Inmunoglobulinas) conocidas por ser capaces de ser transferidas pasivamente a través del alimento al recién nacido. También tiene efectos laxativos que actúan en el colon y que ayuda a expulsar el meconio y facilita el establecimiento de los movimientos normales del intestino.

Un calostro de alta calidad debe contener 50 miligramos o más de inmunoglobulinas del tipo – G (IgA, IgG, IgM) por mililitro (ml) cuando se mide con un calostrómetro. Esto es el equivalente a 26 gramos de IgG por, (454 cc) de calostro.

La Calostrogénesis cesa en o cerca del momento del parto. Esto quiere decir que no hay más producción de proteínas específicas – no –específicas después del parto. También en este momento empiezan a surgir los cambios hormonales en la nueva madre reabsorción y degradación de las proteínas específicas – no-específicas así como también de otros componentes de esta secreción. Por esta razón el calostro debe ser retirado lo antes posible después del parto. Se cree que al finalizar el parto hay un periodo de dos a cuatro horas en el cual el calostro retenido en las ubres aún conserva una buena calidad. En las vacas adultas de la raza Holstein el primer ordeño contiene aproximadamente el 80% del valor de todos los componentes que la vaca producirá en el calostro y en los seis siguientes. No es posible retirar todo el calostro en un solo ordeño, por lo tanto aproximadamente un 20% de los componentes quedan para los ordeños subsiguientes, una porción de los cuales pueden ser degradados por la interacción hormonal. (Goats, 2000)

Figura 3. Transición del calostro a leche normal.

Transición del Calostro a Leche normal							
Horas Después del Parto	Total Proteína (%)	Caseína %	Albumina %	Grasa %	Lactosa %	Cenizas %	Total Sólidos %
0	17.57	5.08	11.34	5.18	2.19	1.01	25.99
6	10.0	3.51	6.30	6.85	2.71	0.91	20.46
12	6.05	3.00	2.96	3.00	3.71	0.89	14.53
24	4.52	2.76	1.48	3.40	3.98	0.86	12.77
30	4.01	2.56	1.20	4.90	4.27	0.83	13.03
36	3.98	2.77	1.03	3.55	3.97	0.84	12.22
48	3.74	2.63	0.99	2.80	3.97	0.83	11.46
72	3.86	2.70	0.97	3.10	4.37	0.84	11.86
96	3.75	2.68	0.82	2.88	4.72	0.83	11.85
120	3.86	2.68	0.87	3.75	4.76	0.85	12.67
168	3.31	2.42	0.69	3.45	4.96	0.84	12.13

Tomada de (Goats, 2000)

G) Periodo de secado:

En el manejo de la vaca lechera, existe un periodo dentro del ciclo productivo que es de vital importancia en la producción de leche, conocido como *periodo seco o de Vaca seca*. Su importancia radica en el impacto que ejerce sobre la producción de leche y el desempeño reproductivo en la siguiente lactancia, lo cual se refleja de manera positiva o negativa en la rentabilidad del negocio dependiendo de cómo se actúe ante este momento. La duración del período seco dentro del ciclo productivo oscila entre 45 y 70 días. En ese tiempo resultan gran número de modificaciones en la glándula mamaria como el proceso de involución y regeneración. Es decir, en 60 días el tejido alveolar secretor involuciona para que posteriormente ocurra la formación de nuevo tejido secretor, para la óptima producción láctea en la próxima lactancia.

El secado de las vacas debe formar parte de todo programa de medicina preventiva en ganado lechero, ya que descuidos en el mismo acarrear graves consecuencias a la salud de la ubre. Durante el período seco la persistencia de bacterias en la glándula y/o defectos en la anatomía del esfínter del pezón como la hiperqueratosis la ubre es susceptible a

desarrollar mastitis. Aproximadamente el 60% de los casos de mastitis que se presentan al inicio de la lactancia son originados por deficiencia en el manejo y tratamiento durante el período seco previo. (Ávila, 2010)

2.1.2. Estructura externa de la ubre

La ubre está compuesta de cuatro glándulas mamarias individuales las cuales están separadas por tejido conectivo que dividen las glándulas anteriores de las posteriores; sin embargo, cada glándula contiene su propio conjunto de ductos que conducen a la leche hasta el seno lactífero glandular. Sólo en muy raras ocasiones se encuentran ubres que muestran una división notable entre las glándulas anteriores y posteriores.

Las cuatro glándulas drenan su contenido al exterior a través de un conducto que finaliza en un pezón por glándula, sin embargo, suele haber pezones supernumerarios (politetia) en casi el 40 % de las vacas, ya sea asociados con una pequeña glándula, con una glándula normal o un área no secretor (H.). Es más frecuente que aparezcan uno o dos pezones supernumerarios que tres o cuatro; éstos se encuentran orientados en forma similar a los pezones normales, pudiendo encontrarse entre éstos, fusionados, o como en la mayoría de las veces, por detrás de las glándulas posteriores o entre glándulas anteriores y posteriores a ubre de la vaca comprende las siguientes estructuras anatómicas: una estructura externa formada por un aparato suspensorio y una estructura interna que consta de un estroma (armazón de tejido conectivo), parénquima (parte epitelial y secretora) que cuando está en reposo presenta un color gris amarillento o ámbar, en producción tiene un color rosado pálido, además contiene ductos, vasos y nervios.

En la parte dorsal de las glándulas entre éstas y la pared abdominal existen abundantes células adiposas formando el llamado cuerpo adiposo supra mamario parénquima (parte epitelial y secretora) que cuando está en reposo presenta un color gris amarillento o ámbar, en producción tiene un color rosado pálido, además contiene ductos, vasos y nervios. (Ídem)

2.1.3. Estructura interna de la ubre

El parénquima de la glándula mamaria está dividido en pequeños lóbulos por septos íter lobulares, septos que son derivados de las láminas suspensorias respectivas y que se constituyen de tejido conjuntivo infiltrado en grasa, tejido rico en colágeno y fibras elásticas. Los septos íterlobulares

son muy ricos en vasos sanguíneos, linfáticos y nervios, por los cuales llega al parénquima gran cantidad de sangre, drenaje linfático y sensorialidad especial.

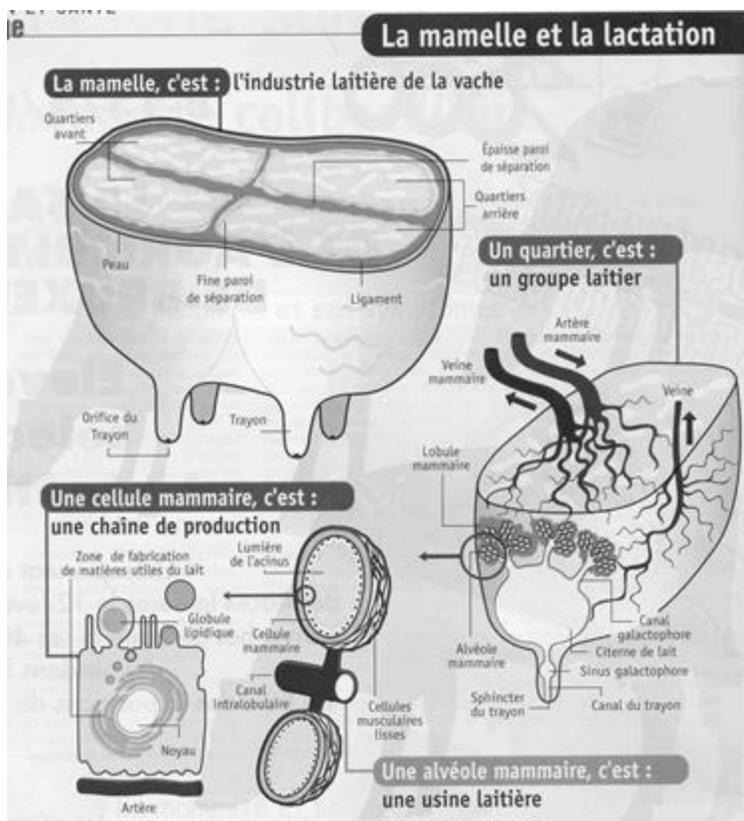
Cada lóbulo glandular está integrado por una serie de lobulillos divididos entre sí por septos como los descritos con anterioridad. El lobulillo está formado por un grupo aproximado de 150 a 220 alvéolos dispuestos en racimos sostenidos por un delicado estroma, alvéolos que se separan entre sí por las arterias, venas y lámina propia. Los alvéolos que forman el lobulillo se vacían en pequeños ductos dentro del mismo, llamados ductos intralobulillares, los que desembocan en un espacio colector central, del cual emergen los ductos interlobulillares. Dentro del lóbulo los ductos interlobulillares se unen para formar un solo ducto intralobular, que al salir del lóbulo se llama ínterlobular. (Ídem)

Estos conductos pueden unirse directamente al seno lactífero glandular (seno de la glándula) o unirse a otros ductos lactíferos colectores antes de entrar al seno. Muchos de los ductos presentan en su inicio y al final un estrechamiento de su luz mientras que en su parte media se ensanchan.

Esto permite, además de almacenar leche, que ésta no caiga al seno lactífero de la glándula y del pezón, por gravedad. El seno lactífero glandular y los ductos lactíferos colectores también sirven entre ordeños como órganos colectores de leche. Algunas veces los ductos grandes se ramifican con el mismo diámetro, lo que permite presentar un área colectora más extensa. En estos casos, el ducto presenta una constricción en el punto de su ramificación, lo que evita que la leche acumulada fluya hacia el seno lactífero. El seno lactífero glandular es una cavidad situada encima de la base del pezón, de tamaño variable. En algunos casos es de forma circular y en otros aparece como cavidades de diferentes tamaños formadas por las terminaciones de ductos mayores. Su capacidad va de 100 a 400 g de leche. Se considera que no existe relación alguna entre la producción de cada glándula y el tamaño del seno lactífero. Las fibras de tejido conjuntivo distribuidas a través de la glándula que sirven como medio de sostén, en ocasiones están en cantidad excesiva y dan lugar a una glándula llamada dura, con parénquima pobre y, por consiguiente, con escasa capacidad de producción. Esta característica puede ser de tipo hereditario o el resultado de un proceso inflamatorio de la glándula. El alveolo en el lobulillo glandular se presenta en forma de tubo dilatado irregular, rodeado por un epitelio simple y cúbico que descansa sobre una membrana basal (membrana propia). Entre el epitelio y la membrana basal está una red capilar arterial y venosa, así como una capa discontinua de mioepiteliocitos estrellados que encierra al alveolo y que se contraen durante el proceso de vaciado de esta unidad funcional. Las células secretoras que forman

al epitelio alveolar reciben el nombre de lactocitos o exocrinocitos lácteos, que cuando la glándula mamaria está en reposo se muestran como un epitelio cuboideo bajo, con escaso citoplasma y un núcleo central; en tanto que cuando la glándula está produciendo leche, el epitelio cuboideo es alto, con abundante citoplasma, mostrando el ápice celular hacia la luz alveolar y bien definido el retículo endoplásmico glandular. La célula epitelial o lactocito es un sistema membranoso abierto de moléculas orgánicas e inorgánicas altamente organizado, que se autorregula y autoduplica, promoviendo reacciones para la transformación de energía y la síntesis de compuestos. (Ídem)

Figura 4. Estructura anatómica y secretora de la ubre de vaca



Tomada de (Ramos, 1998)

Toda célula epitelial del alveolo está cubierta por una membrana que la rodea totalmente, membrana con espesor de 100 a 600 Å, correspondiendo el mayor grosor al área de la porción basal de la célula y la menor a la porción que mira al lumen alveolar, parte que presenta gran número de microvellosidades. (Schmidt G. H., 1971)

La membrana está formada por partículas repetidas y unidas de macromoléculas de lipoproteína, membrana que se integra en dos partes, una que es la basal y que comprende la porción de recubrimiento continuo; la segunda constituye las proyecciones al interior celular y a los organelos. La membrana forma una barrera impermeable entre la porción acuosa del citoplasma y la solución acuosa que rodea a la célula, barrera que es modificada por: poros, acarreadores y bombas, de tal manera que la membrana distingue entre los iones de sodio y potasio permitiendo el paso del potasio al interior celular y oponiendo resistencia al sodio, lo que resulta en un transporte activo.

El núcleo de la célula está rodeado por una doble membrana, que consiente la comunicación del núcleo con el citoplasma por un sistema de poros que miden de 400 a 800 Å, y que ocupan aproximadamente el 10 % del área, poros que permiten el paso de proteínas. (Ídem)

La membrana exterior establece una red en forma de canales creando el "Endoplasma reticular", que admite el paso de sustancias de la membrana exterior al interior del núcleo. Los gránulos que aparecen en la membrana del endoplasma reticular, son ricos en ácido ribonucleico y son llamados "Ribosomas". Una continuación de esta membrana, pero más delgada, da forma al "Aparato de Golgi", que entre sus funciones está la remoción de agua, síntesis de proteína y exportación de ésta desde los ribosomas, por vesículas rodeadas de una fina membrana llegando al ápice de la célula, las vesículas unen su pared a la membrana basal del lactocito y liberan su contenido, siendo un modo merócrino de secreción. (Ídem)

Por el contrario los constituyentes lipídicos son elaborados junto a las mitocondrias con forma de gotitas adiposas que aumentan rápido de volumen y migran hacia la superficie, siendo eliminadas a través de la membrana celular, arrastrando una pequeña película de citoplasma granular, este tipo de secreción es apócrino. (Ídem)

La lactosa se ubica en las vacuolas secretoras, liberándose al alvéolo junto con la proteína. El núcleo contiene el material genético, compuesto por ADN que es un complejo de proteínas e histonas, responsables de la actividad del citoplasma y síntesis de ARN. En la célula hay tres clases de ARN: ácido ribonucleico mensajero (ARN m), encargado de llevar la información del DNA a los ribosomas sirviendo como base para síntesis de proteínas y enzimas a partir de aminoácidos; ácido ribonucleico ribosomal (ARN r), que es parte del ribosoma que cubre al retículo endoplásmico; y el ácido ribonucleico transferible o soluble (ARN t), que reconoce los aminoácidos específicos en el citoplasma. A medida que la leche va ocupando la luz alveolar, éste se distiende y las células se hacen más bajas y reducen su actividad lactógena. (Ídem)

Pezones. El seno lactífero papilar (seno del pezón) es una cavidad dentro del mismo que se localiza justamente abajo del seno lactífero glandular. El seno lactífero glandular y el seno lactífero papilar son continuos; sin embargo, entre estos hay una constricción circular definida, el pliegue anular o escotadura cricoidea, que se localiza entre las dos cavidades, existiendo en este reborde circular una red de vasos venosos y linfáticos que drenan los vasos longitudinales de la pared de la papila del pezón, así como algunas fibras musculares; se compone de tejido conjuntivo denso y tiene de 2 a 6 mm de ancho (Ávila, 2010)

En casos excepcionales, se forma un septo horizontal de aspecto blanco perlado en el pliegue anular que impide el flujo de leche, resultando por ello una glándula improductiva, lo que se llega a apreciar al iniciar la vaca su primera lactación. (Ídem)

La pared del pezón está formada de las siguientes capas de afuera hacia adentro: epidermis (epitelio estratificado escamoso), dermis, músculo, tejido conjuntivo y mucosa. El seno lactífero del pezón tiene en la mucosa numerosos pliegues longitudinales y circulares. Estos pliegues tienden a traslaparse unos con otros para formar tabicaciones que se esparcen dividiendo el seno, cuya mucosa es de color rosa- amarillento. (Ídem)

El seno lactífero se abre al exterior por un orificio angosto llamado "conducto estriado", "ducto papilar" o "meato del pezón", el cual tiene una longitud de 4 a 8 mm, variando su circunferencia entre 2 a 3 mm, su mucosa es blanquecina con pliegues longitudinales. Este conducto estriado se abre cuando se aplica presión al pezón durante el ordeño y al mismo tiempo el seno tiende a dilatarse por la presión de la ubre. (Schmidt G. H., 1971)

En cada lactación adicional el conducto estriado está propenso a alargarse y dilatarse. (Donald, 1975)

El paso del conducto estriado normalmente suele estar interrumpido por 5 a 7 repliegues epiteliales que se proyectan, para dejar sólo un orificio estrellado de apertura potencial.

Las proyecciones se mantienen cerradas por un meato de fibras musculares lisas circulares. El conducto estriado retiene la leche en la ubre en contra de la presión ejercida por el acumulo de la misma. Aunado a esto, puede retener desechos orgánicos, suciedad y bacterias acumulados fuera de la ubre entre ordeños. Se ha demostrado que en las vacas difíciles de ordeñar, este meato se halla demasiado rígido, en tanto que en las que dejan escapar la leche, el meato no lo es bastante. Los primeros pueden corregirse quirúrgicamente aunque la mastitis es una secuela muy posible de las operaciones en esta región. Esta parece ser una condición hereditaria.

En la unión del seno lactífero del pezón y el canal estriado, el revestimiento de la primera como antes se indicó, presenta una serie de 5 a 7 pliegues que radian en todas direcciones. Esto se conoce como "Roseta de Furstenberg". Los pliegues principales se acompañan de pliegues accesorios pequeños; todos desaparecen por expansión durante el ordeño al ejercer presión la leche sobre la pared del seno lactífero papilar. La punta del pezón constituye una barrera (contra bacterias invasoras) que opera en forma mecánica por queratinización y en forma bioquímica por acción bactericida de la queratina y también por la proliferación de células subepiteliales en la pared del pezón, la cual es más gruesa cerca del conducto estriado y es uno de los mecanismos de defensa de la glándula. (Schulz, 1984; Weber, 1970)

El factor fisiológico más importante que determina la celeridad de flujo de leche es el orificio del pezón. Esto involucra al diámetro del conducto estriado y a la tensión de los músculos que rodean al meato. El tamaño del orificio determina la velocidad del paso de la leche a través de él y el tono de las paredes del conducto afecta el tamaño de la abertura.

El tono de los músculos del meato está más estrechamente relacionado a la celeridad de flujo de leche que al tamaño del orificio, por lo tanto, dicen que la característica más importante que determina la velocidad de ordeño es el tono de la musculatura del conducto del pezón.

Numerosos estudios han indicado que hay una relación negativa entre el largo del pezón y la máxima velocidad de flujo de leche. No se conoce la razón fisiológica de esto; pero se sabe que existe una alta correlación entre la producción diaria de leche y la rapidez y promedio de flujo de leche. Vacas con altas producciones de leche tiene una velocidad elevada de flujo de la misma, comparada con vacas de baja producción. (Ávila, 2010)

Sistema de soporte

Un grupo de ligamentos y tejido conectivo mantienen a la ubre cerca de la pared corporal. Fuertes ligamentos son deseables debido a que ayudan a prevenir la ocurrencia de una ubre pendiente, minimizar el riesgo de lesiones, y evitan dificultades cuando se utiliza el equipo de ordeño.

En las vacas lecheras actuales, la ubre puede llegar a pesar más de 50 kg debido a la gran cantidad de tejido secretor y de leche que se acumula entre los ordeños.

Las principales estructuras que soportan a la ubre son el ligamento suspensorio medio y el ligamento suspensorio lateral

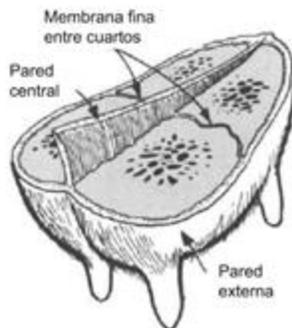
El ligamento suspensorio medio es un tejido elástico que fija la ubre a la pared abdominal. Cuando la vaca se observa desde atrás, un surco medial distintivo, marca la posición del ligamento suspensorio medio.

La elasticidad del ligamento medio le permite actuar como un amortiguador cuando la vaca se mueve y también adaptarse a los cambios de tamaño y peso de la ubre con la producción de leche y la edad.

Los daños o debilidades en el ligamento suspensorio pueden causar el descenso de la ubre, esto hace difícil el ordeño y expone a los pezones a ser dañados. La selección genética para un ligamento suspensorio fuerte es efectiva para minimizar estos problemas.

En contraste con el ligamento suspensorio medio, el ligamento suspensorio lateral es un tejido fibroso poco flexible. Alcanza los lados de la ubre desde los tendones alrededor de los huesos púbicos para formar una estructura de soporte. (García, 2011)

Figura 5. Esquema de soporte de la ubre de vaca



Tomada de (García, 2011)

2.1.4. Conductos y sistema secretor de leche

La ubre es una glándula exocrina debido a que la leche es sintetizada en células especializadas agrupadas en alvéolos, excretada por medio de un sistema de conductos. (García, 2011)

El alvéolo es la unidad funcional de producción en la que una sola capa de células secretoras de leche, se encuentran agrupadas en una esfera con una depresión en el centro. Los capilares sanguíneos y células mioepiteliales (similares a las musculares) rodean el alvéolo y la leche secretada se encuentra en la cavidad interna (lumen). (Ídem)

Las funciones del alvéolo son:

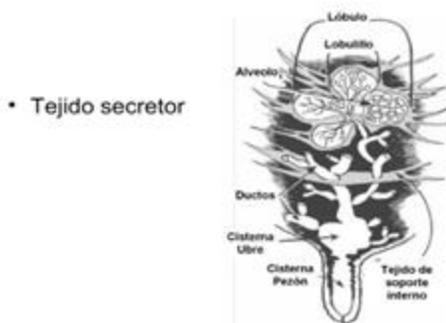
Remover los nutrientes de la sangre.
Transformar estos nutrientes en leche.
Descargar la leche dentro del lumen.

La leche deja el lumen por medio de un tubo colector. Un lóbulo es un grupo de 10 a 100 alvéolos que drenan por medio de un conducto en común. Los lóbulos en sí se encuentran organizados en unidades de mayor tamaño, que descargan la leche dentro de un conducto colector de mayor tamaño que conduce a la cisterna de la glándula, que descansa directamente encima del pezón de la glándula. (Ídem)

En la ubre se encuentran numerosos alvéolos donde se produce y secreta la leche. Los conductos forman canales de drenaje en los que la leche se acumula entre los ordeños. Aun así, es solamente cuando las células mioepiteliales que recubren el alvéolo y que los pequeños conductos se contraen en respuesta a la hormona oxitocina (reflejo de bajada de leche) que la leche fluye dentro de los tubos galactóforos y hacia la cisterna de la glándula (Ídem)

El pezón forma un pasadizo por medio del cual la leche puede ser extraída de la glándula. Posee una piel suave que lo recubre y un sistema muy rico de inervación e irrigación sanguínea. La punta de la teta se cierra con un anillo de músculo liso o esfínter llamado canal del pezón. (Ídem)

Figura 6. Tejido secretor



Tomado de (García, 2011)

En su extremo superior, el pezón se encuentra separado de la cisterna de la glándula por solamente una serie de delicados pliegues de células sensitivas particularmente sensibles al daño. Estos

pliegues de tejido se encuentran también en el otro extremo del pezón directamente por encima del canal del pezón (Roseta de Furstenberg).

El pezón está entonces diseñado como una barrera para las células invasoras. La preservación de las estructuras normales del pezón es esencial para mantener los mecanismos de defensa normales contra las bacterias productoras de mastitis.

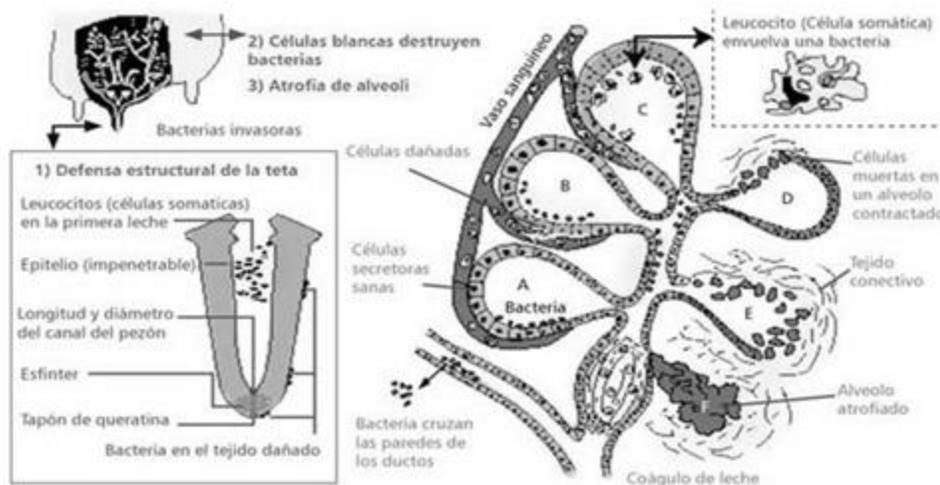
Las diferencias en la estructura del pezón, particularmente el diámetro y el largo, se encuentran relacionados con la susceptibilidad de la infección. (Agrobit, 2008)

2.2. MASTITIS

2.2.1. Riesgos por infección por bacterias

La inflamación de la glándula mamaria es una afección de gran importancia económica para los productores, por que como consecuencia del proceso inflamatorio, se producen cambios patológicos de diversa intensidad que alteran profundamente la calidad y cantidad de leche producida. Ciertas mastitis afectan sistémicamente a la vaca provocando la muerte y por consiguiente ocasionando pérdidas económicas.

Figura 7. Desarrollo de la mastitis y los mecanismos de defensa de la glándula mamaria.



Tomado de (Ergomix, 2006)

2.2.2. Invasión por microorganismos del canal del pezón por distintas vías

Entre ordeños las bacterias pueden avanzar por el canal del pezón por multiplicación;

Pueden ingresar por la presión física ejercida sobre la punta del pezón cuando la vaca se mueve;

Durante el ordeño mecánico pueden ser impulsados hacia el canal del pezón o desde el mismo hacia el interior de la cisterna del pezón, por los impactos que causan las fluctuaciones de vacío contra el orificio del pezón y;

Durante la aplicación de un antibiótico pueden ser empujados físicamente a través del canal del pezón por la inserción completa de la cánula. (Philpot, 2000)

Al primer parto y cuando se incluye a la vaca en el manejo habitual de las vacas en producción, pueden ingresar a la ubre diferentes patógenos capaces de producir la infección. Los microorganismos penetran a través del esfínter del pezón, ascienden por el canal y pueden llegar a la cisterna de la ubre e invadir el tejido glandular. Si los microorganismos vencen las defensas naturales de la ubre, se multiplican, invaden y colonizan la glándula mamaria.

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

Etapas de invasión.- es aquella en la que el microorganismo pasa del exterior de la ubre a la leche que se encuentra en el interior de la cisterna del pezón;

Etapas de infección.- este es el momento en que los microorganismos se multiplican rápidamente e invaden el tejido mamario; se establece una población bacteriana que se disemina por toda la glándula, dependiendo de la patogenicidad del microorganismo;

Etapas de inflamación.- todo lo anterior deriva en una inflamación (mastitis) y aumenta notablemente la cuenta leucocitaria en la leche ordeñada. (Reza, 2000)

Los factores predisponentes que aumentan la posibilidad de que ocurra infección pueden resumirse de la siguiente manera:

La naturaleza del microorganismo, cepa y número transferido al pezón;

Grado y frecuencia de exposición de las vacas a los agentes infecciosos;
 Grado de resistencia heredada;
 Mecanismos fisiológicos del esfínter y del canal de pezón para impedir el paso de microorganismos y para combatirlos;
 Edad de las vacas;
 Ordeño prolongado y/o incompleto o mal manejo del ordeño mecánico;
 Calidad de la alimentación;
 Transmisión por contacto directo con terneros infectados;
 Condiciones ambientales. (Mateus, 1983)

2.2.3. Clasificación de la mastitis.

La mastitis bovina normalmente se da como resultado de la infección intramamaria por bacterias que pueden producir la enfermedad de manera clínica o subclínica. (Dos Santos, 2002) Es decir, puede ser acompañada de signos clínicos o no.

Figura 8. Clasificación de Mastitis en vacas

Formas de mastitis	Vaca	Ubre	Leche
Clínica hiperaguda	Muy enferma. Puede morir. No tiene coordinación muscular	Endurecimiento mamario. Puede agravarse por choque endotóxico	Frecuentemente acuosa y con rastros de sangre
Clínica aguda	No hay cambios observables	El cuarto afectado se muestra duro, rojo e inflamado	Purulenta, coagulos y/o suero y acuosa
Clínica subaguda	No hay cambios observables	El cuarto afectado puede estar inflamado	No se ven cambios pero la producción puede ser menor
Subclínica	No hay cambios observables	No hay cambios observables	No hay cambios observables. La producción puede ser menor

Adaptado de (Bedolla & Ponce de León, 2008)

Las mastitis de origen infeccioso son inducidas por varios agentes patógenos, entre los principales encontramos bacterias Gram positivas y Gram negativas:

- a) *Streptococcus*; .*S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *S. zooepidemicus*
 - b) *Staphylococcus*;- *S. aureus*, *S. hycus* *S. epidermidis*
 - c) *Bacterias Coliformes*.- *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*
 - d) *Microorganismos que causan enfermedades específicas*.- *Listeria*, *Brucella*, *Leptospira*, *Ricketttias*, *Salmonellas*
 - e) *Otros agentes infecciosos*.- *Mycoplasmas*, *Nocardia*, *Clostridium*, *Spherophorus*
- (Dos Santos, 2002)

2.2.4. Mastitis inducida por *Streptococcus*.

En los esquemas taxonómicos tradicionales la “familia *Streptococcaceae*” incluye cocos Gram-positivos, catalasa-negativos que tienden a crecer en pares o en cadenas, los cuales se diferencian de la familia *Micrococcaceae* (*Staphylococcus* y *Micrococcus*) por cuantos estos últimos son catalasa-positivos. Sin embargo, estudios filogenéticos recientes cuestionan la posición taxonómica real de la “familia *Streptococcaceae*” y han aumentado considerablemente los géneros y las especies relacionadas a *Streptococcus*. La mayoría de los géneros relacionados a *Streptococcus* tienen un metabolismo anaeróbico facultativo, en donde los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* son importantes patógenos para el ser humano y animales. Algunos otros géneros muestran metabolismo anaeróbico estricto, de los cuales, únicamente los géneros *Peptococcus* y *Peptostreptococcus* se encuentran en infecciones en el ser humano. (Norman Rojas, 2006)

Algunas especies pueden ser patógenas y otras comensales avirulentos que forman parte de la flora normal del tracto respiratorio y tracto genital, colonizando además piel y membranas mucosas. Las especies del género *Streptococcus* son bacterias anaerobias facultativas esféricas u ovals que miden menos de 2 µm de diámetro. Mediante tinción de Gram se pueden observar como cocos Gram-positivos que se encuentran frecuentemente formando parejas o cadenas. Entre otras características destacan su no-movilidad, carecen de flagelos y no forman esporas, además de que todas las especies reaccionan negativamente a la catalasa. Las especies del género *Streptococcus* son bacterias relativamente fastidiosas con requerimientos nutricionales que varían según la

especie. La mayoría de las especies crecen adecuadamente en medios nutritivos enriquecidos con sangre o suero. Algunas cepas requieren de atmósferas elevadas en CO₂ (5-10%), lo cual incrementa el crecimiento y la actividad hemolítica. Luego de 18-24 horas de incubación a 35-37 °C, las colonias aisladas miden de 0.3 a 2 mm de diámetro, son opacas, blanquecinas, circulares, de bordes definidos y presentan hemólisis variable. (Ídem)

Este es el único microorganismo que requiere de la glándula mamaria para su subsistencia y perpetuación. El medio de transmisión más común es por el paso de leche infectada de un pezón a otro por las manos del ordeñador o máquina ordeñadora infectadas. La producción de leche se reduce considerable y progresivamente. Cuando la leche infectada la maman terneras (os) un bajo porcentaje puede resultar infectados, sin embargo, al momento del primer parto, la bacteria puede reactivarse y causar la enfermedad; por este mecanismo puede perpetuarse la infección en un hato.

Figura 9. Ejemplos de especies asignados a los diferentes grupos del género *Streptococcus* basados en el análisis del ARNr 16S.

Grupo	Designación	Especies	Grupo de Lancefield
I	Grupo piogénico	<i>S. pyogenes</i> <i>S. agalactiae</i> <i>S. equi</i> <i>S. dysgalactiae</i> Varias especies <i>S. canis</i> <i>S. porcinus</i>	A B C C G L,M E,P,U,V
II	Grupo <i>S. bovis</i>	<i>S. bovis</i> , <i>S. equinus</i>	D,D
III	Grupo <i>S. mitis</i>	<i>S. mitis</i> , <i>S. gordonii</i> , <i>S. pneumoniae</i>	No aplicable
IV	Grupo <i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i> , <i>S. sobrinus</i>	No aplicable
V	Grupo <i>S. salivarius</i>	<i>S. salivarius</i>	No aplicable
VI	Grupo <i>S. milleri</i>	<i>S. anginosus</i> , <i>S. constellatus</i>	No aplicable
VII	Otras especies	<i>S. acidominimus</i> , <i>S. suis</i>	No aplicable R, RS,S,T

Tomada de (Norman Rojas, 2006)

2.2.5. Mastitis inducida por *Staphylococcus*.

En el género *Staphylococcus* se incluyen bacterias Gram-positivas que tienen una gran importancia en la medicina, tanto humana como veterinaria, por cuanto tienen la capacidad de causar una gran diversidad de infecciones en el ser humano y en los animales. *S. aureus* es el prototipo del género y es reconocido desde hace decenas de años como un patógeno importante. Sin embargo,

recientemente se ha involucrado el grupo de *Staphylococcus* coagulasa-negativa en numerosas infecciones en seres humanos, tanto intra como extra hospitalarias, así como también en animales domésticos y salvajes. (Norman Rojas, 2006)

El diámetro de una célula individual de *Staphylococcus* es de 0.7 a 1.2 μm . Típicamente, los *Staphylococcus* muestran una reacción positiva a la tinción de Gram. Sin embargo, células en cultivos viejos o ingeridos por fagocitos pueden mostrarse como Gram-negativos. La clásica morfología de racimos de uva es más evidente en cultivos sobre medios sólidos. Esta morfología se debe a que los *Staphylococcus* se dividen en tres planos perpendiculares sucesivos y a que las células hijas no se separan completamente. En medios líquidos es posible observar cadenas cortas, a diferencia de los *Streptococcus*, los *Staphylococcus* raramente forman cadenas conteniendo más de cuatro células. Los *Staphylococcus*, son no móviles, carecen de flagelos y no forman esporas. Ciertas cepas tienen la capacidad de producir una cápsula extracelular de polisacáridos.

La mayoría de las especies del género *Staphylococcus* son bacterias no fastidiosas que crecen relativamente bien en medios de cultivo sencillos como agar sangre, agar nutritivo, agar tripticaseína soya y otros. Las colonias individuales de *Staphylococcus* crecidas sobre agar nutritivo son opacas, con bordes definidos, circulares, convexas y de 1 a 4 mm en diámetro. El clásico color amarillo oro de las colonias de *S. aureus* es debido a la presencia de carotenoides (*aureus* en latín significa oro). La pigmentación es usualmente aparente luego de 18-24 horas de incubación a 37°C, pero es más pronunciada cuando los cultivos son mantenidos a temperatura ambiente por 24-48 horas adicionales. Esta característica es pronunciada también por la presencia de monofosfato o monoacetato de glicerol en el medio de cultivo. La pigmentación no es producida durante el cultivo anaerobio o en cultivos líquidos. Por otra parte, existe una gran variación en cuanto a la pigmentación de las colonias, de un anaranjado profundo a blanco, entre las diferentes cepas de *S. aureus* o incluso entre colonias individuales de una misma cepa. Es importante destacar, sin embargo, que la pigmentación colonial no es una propiedad exclusiva de *S. aureus*, sino que está también presente en otras especies del género incluyendo a *S. arlettae*, *S. chromogenes*, *S. haemolyticus* y otras. (Ídem)

Las especies de *Staphylococcus* son metabólicamente muy activas, por lo que generalmente no requieren la adición de nutrientes específicos. Su temperatura óptima de crecimiento es de aproximadamente 35-37°C aunque crecen también a temperatura ambiente. Los *Staphylococcus* son anaerobios facultativos y usualmente son productores de catalasa. Excepto por *S. aureus* subsp.

anaerobius y *S. saccharolyticus*, el crecimiento de los *Staphylococcus* es rápido y abundante bajo condiciones aeróbicas. Estos dos miembros del género *Staphylococcus* no son productores de catalasa y crecen mejor en condiciones anaerobias.

La cadena respiratoria de los *Staphylococcus* y de los *Micrococcus* difiere en la composición de citocromos y menaquinona. La mayoría de los *Staphylococcus* contienen citocromos tipos a y b, mientras que los *Micrococcus* tienen los tipos c y d. Las especies *S. caseolyticus*, *S. lentus* y *S. sciuri* contienen citocromos tipos a, b además de dos citocromos tipo c.

En el género *Staphylococcus* se incluyen actualmente 32 especies. Algunas especies están constituidas por dos o más subespecies. (Ídem)

Figura 10. Especies que constituyen el género *Staphylococcus*

<i>S. aureus</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. cohnii</i>	<i>S. carnosus</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>S. hominis</i>	<i>S. xylosus</i>	<i>S. piscifermentans</i>
<i>S. capitis</i>	<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. kloosii</i>	<i>S. felis</i>
<i>S. caprae</i>	<i>S. schleiferi</i>	<i>S. equorum</i>	<i>S. intermedius</i>
<i>S. saccharolyticus</i>	<i>S. muscae</i>	<i>S. arlettae</i>	<i>S. delphini</i>
<i>S. warneri</i>	<i>S. auricularis</i>	<i>S. gallinarum</i>	<i>S. hyicus</i>
<i>S. pasteurii</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. simulans</i>	<i>S. chromogenes</i>
<i>S. caseolyticus</i>	<i>S. sciuri</i>	<i>S. lentus</i>	<i>S. vitulus</i>

Tomado de (Norman Rojas, 2006)

El medio de transmisión es similar al anterior, pero por acción de la bacteria, el tejido normal de la ubre es reemplazado progresivamente por tejido fibrótico y la producción de leche es cada vez menor. La importancia de infección por *Staphylococcus* radica en que las bacterias se encuentran distribuidas ampliamente en el ambiente y muchas de las cepas aisladas son resistentes a los antibióticos como las penicilinas.

2.2.6. Mastitis por bacterias coliformes

Principalmente entre las bacterias coliformes se encuentran *E. coli*, la cual se encuentra en mayor grado en el ambiente. (Mateus, 1983)

La mastitis por coliformes es también de origen ambiental, algunas de las realidades relacionadas con la enfermedad son: 50 % de las infecciones tendrán una duración de 10 días, 70 % persistirán

menos de 30 días, solo el 2 % persistirá por más de 100 días, el 90 % de las infecciones se volverán clínicas, y el 10 % causaran una mastitis hiperaguda. Las infecciones con *Escherichia coli* raras veces se vuelven crónicas. (Medina, 2002)

Los factores de riesgo más importantes de la mastitis severa por *Escherichia coli* son, migración lenta de la sangre en la glándula mamaria y su actividad oxidativa deteriorada. La función del linfocito tal como proliferación y respuesta al anticuerpo, también se ha encontrado que puede ser deteriorada durante la lactancia temprana, pero una relación con la severidad de la mastitis coliforme no se ha establecido claramente. (Hilde, 2001)

La Mastitis causada por este patógeno es sobre todo la principal enfermedad en las vacas lecheras (Correa, 2002). Gaytan (1992), reporta en México una frecuencia de mastitis causada por coliformes del 14%, lo que representa en esos animales una considerable disminución de la producción de leche, frecuentemente pérdida glandular y no es muy rara la muerte de la vaca.

La *E. coli* son bacilos cortos facultativos, móviles y Gram-negativos. Se distinguen varios serotipos de *Escherichia coli*; en base a la presencia de antígenos somáticos (O), capsulares (K) y flagelares (F). Este patógeno habita el tracto intestinal de los animales y el hombre (Velasco, 1995)

La *E. coli* se conoce por inducir la mastitis clínica, que es caracterizada por una intensa concentración de neutrófilos, que lleva al retiro de las bacterias; ha sido clasificada como un agente patógeno medioambiental que ocasiona la mastitis. (Bradley, 2000)

La razón para la importancia de la mastitis por esta bacteria es su creciente incidencia y los síntomas severos. La terapia de la vaca seca, es eficaz contra los organismos contagiosos Gram-positivos, pero no contra *E. coli*. La infección de la ubre por este patógeno, probablemente es resultado de contaminación fecal.

Entre el 80% y el 90% de las infecciones causadas por *E. coli* produce grados distintos de mastitis clínica en las vacas en lactación; aproximadamente, entre 8 y el 10% de las infecciones por este patógeno produce mastitis fulminante, normalmente unos días después del parto.

Los signos en la forma aguda son: hinchazón de las glándulas mamarias, leche acuosa con copos pequeños, respuesta sistémica leve, recuperación en pocos días. (Radostits, 2002)

Los signos en la forma fulminante son: aparición repentina de toxemia grave, fiebre, taquicardia, choque inminente; las vacas afectadas pueden permanecer en decúbito. Los cuartos pueden estar o no hinchados y calientes, las secreciones son líquidas y serosas, contienen copos pequeños. Las vacas pueden morir en pocos días.

La puerta de entrada para la *E. coli* es el canal de la teta. La manera por la cual este patógeno atraviesa el canal es desconocida pero probablemente envuelve una entrada oportunista donde al menos la porción del canal es traspasado. El canal de la teta de bovinos no es susceptible a la colonización por la bacteria, el canal parece proveer un área de restricción física por altas concentraciones de sistemas antibacteriales en la leche. Los factores de virulencia permiten el crecimiento y multiplicación puede ser debido a evasión de las defensas del hospedador. (Hogan, 2003)

2.2.7. Identificación en el Laboratorio

Los medios más frecuentemente utilizados para el aislamiento de *E.coli* son:

Agar MacConkey con lactosa y el medio de eosina con azul de metileno (EMB o LEVINE); en el segundo las colonias presentan un característico verde con brillo metálico que lo distingue como fermentador rápido de la lactosa, característica que comparte con dos géneros más de enterobacterias: *Enterobacter* y *Klebsiella*. (Velasco, 1995)

Agar sangre

El agar sangre se recomienda para el aislamiento primario de coliformes de la leche de cuartos mamarios infectados. Las bacterias coliformes aparecen en el medio agar como colonias grises que se clasifican según su tamaño de 3 a 5mm de diámetro. Un olor fecal característico de colonias producidas por estas especies.

Menos del 15% de la *E. coli* son hemolíticas y ambas *spp de Klebsiella* y *spp de Enterobacter* es no hemolítica. (Hogan, 2003)

En cuanto al tratamiento de las mastitis, el clínico debe mantener presente los siguientes puntos:

No hay conocimientos absolutos y debe estar preparado para el cambio que inducen nuevos hallazgos;

El uso indiscriminado de antimicrobianos puede ser la causa de que la explotación pierda su rentabilidad;

Un buen manejo reduce drásticamente el uso de antimicrobianos;

La percepción empírica de eficacia debe ser comprobada experimentalmente con método científico (Sumano, 2007)

2.2.8. Prácticas relacionadas con la mastitis

Amamantamiento

El ternero al mamar utiliza vacío para extraer la leche desde la glándula y el canal del pezón. La leche sale cuando la presión interna en la ubre es menor a la presión extrema del pezón. El becerro al mamar envuelve la lengua y el paladar alrededor del pezón creando un vacío; es en la punta del pezón cuando las mandíbulas se abren y la lengua se retrae hacia atrás, ello hace que la leche se acumule en su boca. Cuando el ternero deglute la leche, el flujo desde el pezón se detiene debido a que la presión dentro de la boca regresa a su estado normal.

Ordeño manual

Ordeñar manualmente es extraer la leche contenida en la cisterna del pezón con las manos; el ordeñador presiona el pezón, sin lesionarlo, para la extracción de la leche.

Formas de ordeño manual. El ordeño manual se puede realizar a mano llena si el pezón es de tamaño normal, o con dos dedos si el pezón es de tamaño pequeño.

Una mala utilización de la técnica de ordeño puede causar estrés en la vaca, lesión en pezones e infección en la glándula mamaria (García G O., 1987.)

Casos especiales de ordeño

Vacas recién paridas. El ordeño debe iniciarse entre los cinco y siete días después del parto (cuando la leche esté libre de calostro, ya que este no debe mezclarse con la leche). Para ordeñar una vaca recién parida, el escurrido de los cuartos se debe hacer suavemente, porque la ubre se encuentra aumentada de volumen por la congestión. Cuando la ubre está demasiado hinchada o hay mucho calostro es mejor ordeñar cuatro o cinco veces al día, pero sin escurriarla para evitar el maltrato de pezones.

Vacas “duras”. En estas el canal del pezón está muy cerrado y es bastante resistente a la salida de la leche, lo que dificulta enormemente el trabajo al ordeñador. El ordeño se facilita al tomar el pezón bastante bajo, por la punta, y presionar con fuerza.

Vacas demasiado blandas. En estas vacas el canal del pezón está flojo, lo que permite a la leche salir antes del ordeño. Para reducir este problema es mejor ordeñar estas vacas al principio, con poca fuerza, tomando los pezones bien arriba.

Vacas con pezones muy largos. Ordeñar vacas con pezones muy largos es una tarea difícil; para facilitar un poco el ordeño, el pezón se toma por la parte baja.

Vacas con pezones muy cortos. El ordeño es más fácil con dos dedos, pero hay que tratar de ordeñar a mano llena y coger el pezón bien alto, con una porción de ubre.

Vacas con tres pezones funcionales y un “ciego”. Algunas vacas solamente tienen tres pezones que dan leche; el cuarto se ha perdido a causa de enfermedades como la mastitis.

Cuartos con diferentes cantidades de leche. Normalmente en los cuartos posteriores se produce más leche (60%) que en los anteriores (40%); por ello, hay que ordeñar anteriores o posteriores al mismo tiempo para terminar igual. No es aconsejable el ordeño cruzado.

Leche residual. La leche residual es aquella que se queda en los alveolos, es decir, que no baja a la cisterna (García G O., 1987.)

2.2.9. Condiciones externas que pueden ocasionar mastitis

Instalaciones

Sala de ordeño. Constituye una instalación especializada que tiene las siguientes ventajas: flexibilidad para aumentar el hato, adaptabilidad para la automatización del proceso de ordeño y mecanización del manejo de la leche. (Laval, 2008)

Factores a considerar para seleccionar la sala de ordeño. Para seleccionar un modelo de sala de ordeño hay que considerar los siguientes factores: número de cabezas del hato, inversión económica, tecnificación de la explotación y tipo de ganado, preferencias personales del propietario, disponibilidad de terreno y planes de expansión. La eficiencia o rapidez del ordeño, tráfico de animales, el acceso a la sala y el acomodo de los animales en su plaza deben facilitarse para reducir tiempos de movimiento.

Cuando son pocos los animales a ordeñar se puede utilizar una máquina de ordeño portátil. Sin embargo, se recomienda evitar el uso de máquinas portátiles con pistones en las que no son posibles regular las pulsaciones y el vacío porque lesionan los pezones.

Tipos de salas de ordeño

Sala tipo parada convencional. Esta sala es de un solo nivel. Los animales se colocan paralelos uno al lado de otro y quedan inmobilizados por pescueceras de candado, las cuales pueden ser de ajuste individual o colectivo según se desee. El manejo de animales se realiza en forma individual y la sala está concebida para manejar las máquinas ordeñadoras en forma de péndulo.

Figura 11. Ejemplo de sala tipo convencional



Toma propia de traspatio de vacas estudiadas Nuevo México Libres

Hay dos modelos de sala tipo parada convencional:

- a) de una sola hilera de plazas y
- b) de dos hileras.

En esta última existen dos opciones en cuanto a la disposición de plazas: en doble hilera, con los animales colocados cola a cola y separados por un pasillo central de circulación, o frente a frente con pesebres interpuestos y con pasillos de circulación laterales.

En instalaciones pequeñas y medianas es común la sala de una sola hilera de plazas.

Ventajas: fácil identificación y observación de los animales, construcción sencilla y económica, fácil tránsito y colocación de los animales, el tiempo de permanencia de los animales es igual al tiempo de ordeño.

Desventajas: los ordeñadores realizan mayor esfuerzo físico en virtud de que tienen que inclinarse para colocar y retirar la unidad de ordeño, así como para realizar la limpieza de las ubres; los ordeñadores corren mayor riesgo de ser lastimados por las vacas pateadoras o nerviosas; con poca aceptación a la automatización.

Sala tipo tándem. Permite el manejo de los animales de manera individual, los cuales quedan inmovilizados. Cada jaula cuenta con una puerta de entrada y otra de salida, y las vacas se colocan

una tras otra en forma lineal (tándem) o ligeramente diagonal. Esta sala está concebida para equiparla con una máquina por jaula para lograr mayor eficiencia. Figura (12 y 13)

Figuras 12 y 13. Salas de Ordeño tipo Tándem



Tomas propias de rancho en Tenex-tepec Atlixco (izquierda) y en Atlixco Puebla (derecha)

Ventajas: fácil observación y reconocimiento de las vacas; por el manejo individual, las vacas de ordeño lento no constituyen problema; el tiempo de permanencia de las vacas en sus plazas se ajusta al tiempo de ordeño; permite la lotificación menos estricta del ganado.

Desventajas: se requiere casi del doble de espacio longitudinal en comparación con la sala tipo espina de pescado, y la eficiencia en el ordeño es menor; en virtud de que el ordeñador tiene que recorrer mayores distancias entre ubres, y además tiene que abrir y cerrar dos puertas por jaula, se requiere mayor inversión en obra civil y equipo; se reduce el número de máquinas que un ordeñador puede manejar con eficiencia.

Sala tipo espina de pescado. Es una sala de dos niveles: en el elevado se acomodan las vacas, y en el bajo fosa de 75 a 80 cm de profundidad se ubican los ordeñadores.

Los animales quedan inmovilizados con un espacio limitado por dos puertas, una de entrada y otra de salida, ubicadas en los extremos de cada fila por una estructura metálica a lo largo del borde del pasillo de las vacas, que por lo general tiene la forma de zigzag, y por la estructura donde se colocan los comederos para el suministro de concentrado, cuyo llenado puede ser en forma manual o automática. (Laval, 2008)

Figura 14. Sala tipo espina de pescado



Tomada de (Laval, 2008)

Ventajas: se ahorra espacio en virtud de la posición de las vacas y la proximidad de las ubres, se logra una mayor eficiencia de ordeño puesto que el ordeñador tiene que recorrer menores distancias, se facilita la vigilancia del ordeño, tiene líneas cortas de vacío que permiten obtener un vacío más estable, medianos costos de inversión.

Desventajas: se dificulta observar el arete o identificación de los animales; como los animales se manejan en grupo, las vacas de ordeño lento retienen a las demás, por lo que se requiere un mejor manejo y lotificación del ganado; pobre observación de la glándula mamaria durante el ordeño.

Un plan de control de mastitis debe contener, por lo menos, lo siguiente:

Selladores de tetas con antisépticos.

Secado de la vaca.

Tratamiento oportuno de mastitis clínica.

Uso adecuado de equipo de ordeño.

Desecho de vacas infectadas crónicamente.

Selección de vacas genéticamente resistentes a las mastitis más comunes.

Control de vectores, particularmente moscas (verano).

Buen manejo nutricional y de prácticas de higiene.

Mejoramiento de la nutrición; por ejemplo, se sabe que suplementando la dieta con vitamina E y selenio se aumenta la fagocitosis y la muerte de leucocitos polimorfonucleares y de macrófagos.

Reducción de estrés. (Sumano, 2007)

Gracias a la diversidad de los antimicrobianos sus vías de administración, espectro antibacteriano y propiedades farmacológicas se pueden tener tratamientos específicos para un tipo de agente infectante o para atacar una gran diversidad de agentes de manera empírica. Empero, es precisamente en esta fortaleza que los antibacterianos muestran su debilidad. Su uso indiscriminado ha generado la aparición de un número creciente de resistencias bacterianas. Es común entonces que los antimicrobianos (β -lactámicos, aminoglicósidos, tetraciclinas, macrólidos, sulfonamidas, fluoroquinolonas, etc.) demuestren una eficacia elevada o aceptable, al momento de su introducción comercial a las granjas, pero debido a la presión selectiva que ejercen sobre los microorganismos inducen, con mayor o menor rapidez, la aparición de cepas resistentes, provocando el desuso del antimicrobiano recién introducido y forzando la utilización de nuevas opciones o combinaciones. (Ídem)

Por tal motivo, lo mejor es evitar el uso de antibióticos como tratamiento de la mastitis, además de ocasionar una pérdida económica para el productor por los residuos que quedan en la leche y el periodo de retiro que se establece para evitar esto, la salud del consumidor está de por medio.

La tendencia en el mundo es buscar alternativas para evitar el uso de estas sustancias, ya sean inmunoestimulantes o diversos remedios.

En la década de los 60's y 70's el énfasis en el tratamiento de las mastitis fue mediante el uso de preparados intramamarios vs. Gram positivos. La eficacia global esperada superaba el 75% de los casos al primer tratamiento. Sin embargo, si se consideran las pruebas bacteriológicas y los residuos, la eficacia es mucho menor, sobretodo porque a menudo no se aplican antimicrobianos en la dosis y durante el tiempo necesario, sobre todo para microorganismos que generan más resistencias y son más invasivos como los Gram negativos, y Gram positivos como *Streptococcus agalactiae* y el *Staphylococcus aureus*, para lograr máxima eficacia, en virtud de la exigencia del mercado de regresar lo más pronto posible la vaca a la línea de ordeña. (Ídem)

Las pérdidas causadas por mastitis clínica se clasifican como sigue:

Pérdida por baja producción del animal enfermo.

Pérdida de producción de leche por desecho de la misma, durante la eliminación del medicamento.

Frecuentemente hay un perjuicio duradero en el rendimiento lechero de la vaca, por el uso de medicamentos o la presencia de la enfermedad.

Costos de medicamentos y del Médico Veterinario.

Aumento en los costos de la mano de obra. (Wolter, 2004)

El control más efectivo para la mastitis se logra mediante medidas preventivas. El tratamiento no es un sustituto. Para controlar una infección durante la lactancia, el tratamiento debe de ir acompañado de una identificación de la causa de la infección, entre las pruebas que deben de realizarse están: Prueba de fondo oscuro, La prueba de California, Prueba Draminski y el cultivo de muestras de leche.

Prueba de fondo oscuro

Permite detectar grumos en la leche (tolondrón) dirigiendo los primeros chorros a través de una malla negra, o bien utilizando un recipiente especialmente diseñado para ello. Es recomendable realizar este procedimiento en todos los ordeños, ya que además de detectar leche anormal, se eliminan bacterias que normalmente se encuentran en el canal del pezón y además se estimula la “bajada de la leche”. (Bedolla & Ponce de León, 2008)

Prueba de California

La prueba de California es uno de los métodos más específicos para la detección de mastitis subclínica y clínica en su caso. Se fundamenta en la reacción de un detergente no-iónico (arilalkilsulfonato de sodio) con las células presentes en la leche que desintegra el DNA nuclear, por lo que se forma un conglomerado gelatinoso cuya densidad está directamente relacionada con la celularidad desintegrada. Mientras mayor sea el número de células somáticas (polimorfonucleares neutrófilos en su mayoría y células mononucleares) más aparente será la gelatina. La prueba se califica en lo general en escala de 3 cruces sin embargo otros usan 4 (Figura 15). Esta es una prueba subjetiva que se realiza al lado de la vaca durante el ordeño. (Ávila, 2010)

Figura 15. Paleta para Prueba de California



Toma propia en trabajo de campo

El muestreo se realiza durante el ordeño.

Se utiliza una paleta especial CMT que cuenta con cuatro compartimentos.

En cada uno se depositan 2-3 ml del reactivo de California,

Se agregan 2-3 ml de leche recién ordeñada y se mezclan agitando.

Las muestras de leche se toman en condiciones asépticas y los pezones estar perfectamente limpios.

Agitar con movimientos circulares y de arriba-abajo durante 10-20 segundos para interpretar la lectura a la reacción.

Interpretación de resultados: escala y recuento celular.

Reacción negativa < 200,000

Traza > 150,000-500,000

1 400,000-1'500,000

2 800,000-5'000,000

3 > 5'000,000

Estos resultados son subjetivos y reflejan la severidad de los casos.

(Gießen., 2000)

Prueba Draminski

Figura 16. DRAMINSKI Detector de Mastitis 1Q



Tomada de (Draminski Ultrasound Scanner, 1987)

El equipo portátil es un lector de conductividad eléctrica por la concentración de iones de sodio y cloro en la leche como signos tempranos de la inflamación.

Permite detectar el estado temprano de la enfermedad que aún no tiene síntomas visibles (Mastitis Subclínica) y el estado de salud/enfermedad por separado en cada cuarto. (Draminski Ultrasound Scanner, 1987)

Regla del funcionamiento

El detector mide los cambios de la resistencia eléctrica de la leche, debido que el desarrollo de la inflamación subclínica de la ubre (la fase sin síntomas) está acompañado por el aumento de la sal en la leche lo que influye en el cambio de su resistencia. Esta regla se considera como la prueba indirecta más segura en el diagnóstico de Mastitis Subclínica. (Ídem)

Realización de la prueba:

Tomar los primeros flujos de la leche directamente de la ubre en el cubito de medición.

Pulsar el botón y leer el resultado.

Tirar la leche y repetir la actividad para el resto de los cuartos. (Ídem)

El sistema maneja un punto de corte entre lo sano por arriba de 300 y lo enfermo por debajo de 300 más menos un rango intermedio de 50. Algunas vacas tienen leche ligeramente ácida por lo que la lectura de otros cuartos ayuda a definir su estado. (Ídem)

2.2.10. Toma de muestras de leche para análisis bacteriológico

Para obtener muestras de leche hay que seguir procedimientos muy estrictos de asepsia con el propósito de evitar la contaminación con microorganismos presentes en el pelo o piel de la vaca, o en el lugar donde se tomen las muestras (Hernández, 1999)

Material. Se utilizan viales desechables estériles o tubos de ensayo con tapón de rosca, de 15 ml de capacidad, etiquetados.

Colección de muestra. La muestra se puede tomar antes o durante la ordeña. Si se toma antes de la ordeña es garantía para obtener un mayor número de microorganismos.

Preparación de los pezones. Los pezones se lavan con solución desinfectante, se secan perfectamente con toallas desechables, después se eliminan los primeros chorros de la leche con el propósito de evitar residuos contaminantes.

Control de mastitis. La solución en parte radica en establecer medidas profilácticas y/o de higiene en el método de ordeño. Existen bacterias diferentes involucradas y algunas de estas se encuentran presentes continuamente. (Carrión, 2002)

El concepto principal de un plan de control de la mastitis es que la infección puede ser controlada ya sea, reduciendo la posibilidad de que patógenos lleguen a entrar por el esfínter del pezón o aumentando el poder de resistencia contra infecciones de cada vaca. (Smith K. L., 2008)

En años recientes, se ha logrado un progreso significativo en el desarrollo de vacunas contra algunos microorganismos causantes de mastitis. Quizás las más conocidas y más ampliamente usadas son las bacterinas mutantes contra *Escherichia coli*. También se ha progresado en el desarrollo de la vacuna contra *Streptococcus uberis*. Asimismo, se han realizado numerosos intentos para desarrollar vacunas efectivas contra *Staphylococcus aureus*. (Ídem)

El uso preventivo de biológicos contra los patógenos principales que provocan mastitis como inmunoestimulantes, sería de gran ayuda para los productores, representaría un ahorro considerable al evitar tratamientos costosos con antibióticos además de garantizar una producción de leche de calidad y cantidad con beneficios económicos para el productor y de salud para el consumidor.

2.3. SISTEMA INMUNE

La glándula mamaria de las vacas lecheras se puede considerar como el elemento más importante de las empresas productoras de leche, ya que dependiendo de los cuidados que se le otorguen la glándula mamaria desarrollará todo su potencial de producción de leche. Se busca evitar las infecciones intramamarias en sus diferentes formas; subclínica, clínica o crónica.

Con el avance genético las producciones de leche se han incrementado enormemente, desde la cuestión natural para generar leche solamente para el becerro hasta las producciones actuales que alcanzan las vacas durante sus picos de producción y que no es extraño observar que se superen niveles de producción en algunos animales por arriba de los 70 litros o más por día.

La glándula mamaria cumple 2 importantes funciones de defensa una es la producción de calostro para transferir inmunidad al becerro y la otra es la de mantener su propia protección. (Barragán, 2004)

2.3.1. Calostro

Mediante el calostro, se transfiere inmunidad al becerro además de los nutrientes necesarios para la primera etapa de vida. La protección se da mediante la producción de proteínas específicas y proteínas no específicas. En el grupo de las proteínas no específicas se tienen timosina, proteína alfa 1, lactoferrina, insulina y factores antiestafilococociales estas últimas tienen la función de estimulación y crecimiento de tejidos y le otorgan resistencia a enfermedades infecciosas. Las inmunoglobulinas son las proteínas específicas pre formadas en el sistema inmune producidas en los linfocitos B y células plasmáticas. Son los mediadores de la respuesta humoral por el estímulo antigénico espontaneo o vacunal que por mecanismos de opsonización facilitan la fagocitosis de

las bacterias Gram positivas y/o negativas y también neutralizan a los agentes virales. Sus principales funciones biológicas son:

Activación del complemento

Aglutinación

Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos

Neutralización

Opsonización

Protección de mucosas. (Barragán, 2004)

Las características de un buen calostro es que este provenga de vacas sanas y que la primera secreción tenga los componentes proteicos que le transfieran inmunidad al recién nacido. Por lo tanto es de mucha importancia realizar un programa para la vaca en periodo de seca que garantice este punto. La medición de la salud al momento del parto es lo que define el éxito o no del programa para la vaca en periodo de seca. Se recomienda reunir la información del estado salud de cada ubre de las vacas recién paridas en donde se tenga la presencia de anormalidades en el calostro, coágulos, cortado, mastitis clínica dentro de los 3-5 días postparto y la valoración del conteo celular somático a partir del quinto día. Cuando menos el 96% de las vacas no deben de tener ninguno de los puntos tratados anteriormente, si es lo contrario se debe de replantear el método de secado, uso de antibióticos, vacunas y lo que es de actualidad lo referente al uso de inmunomoduladores celulares. (Ídem)

2.3.2. Sistemas de defensa de la glándula mamaria

En lo que respecta específicamente a los sistemas de defensa de la glándula mamaria, esta posee 2 mecanismos uno no inmunológico y el otro inmunológico, en el primero se tienen las defensas anatómicas y solubles y en el segundo la respuesta humoral y la respuesta celular

Figura 17. Sistemas de defensa de la glándula mamaria

Sistemas de defensa de la glándula mamaria	
Mecanismos no inmunológicos	Mecanismos inmunológicos
1. Anatómicos	1. Humoral
2. Celular	2. Celular

Tomado de (Barragán, 2004)

Los programas preventivos de vacunación, programa de vaca seca, calibración de equipos de ordeña, uso de desinfectantes, utensilios y rutinas de ordeño con limpieza son apoyos externos que previenen casos futuros de mastitis.

Los antimicrobianos, antibióticos, desinflamatorios y terapias de sostén son aplicados para la resolución de mastitis clínica. (Barragán, 2004)

2.3.3. Mecanismos no inmunológicos

Anatómicos o barreras físicas

Las alteraciones que se dan en la punta del pezón (hiperqueratosis) son consecuencia en de la acción de las máquinas de ordeño sobre los pezones debido a vacíos de ordeña muy altos o tiempos largos de ordeña. También puede ser causada por un sobre ordeño intenso o fallas en el sistema de los retiradores automáticos. (Ídem)

El canal del pezón se mantiene cerrado mediante la acción de un musculo elástico que limita la entrada de las bacterias, la queratina presente contiene elementos bacteriostáticos. La roseta de Fürstenberg estructura ubicada en la entrada del canal, además de proporcionar fuente de células inmunocompetentes, tiene la presencia de leucocitos productores de proteínas bactericidas. De suma importancia es el mantener la integridad del canal del pezón y evitar al máximo la presencia de cuarteaduras o heridas en la superficie la cual puede ser colonizada por bacterias patógenas.

Dentro del programa rutinario de control de mastitis se debe de tener la valoración periódica de la condición de la punta del pezón en donde el número de animales con pezones dañados debe de ser mínimo así como la consistencia de la piel de pezón, dependiendo de estas evaluaciones se debe de trabajar en los tiempos de estímulo de las vacas, tranquilidad en la ordeña y uso de productos desinfectantes con emolientes y suavizantes. (Ídem)

Elementos solubles

Esto es considerado como la segunda barrera de defensa de la glándula mamaria son elementos contenidos en la leche con acción sobre las bacterias, se tiene cierto tipo de complemento, lisozima, el sistema Lactoperoxidasa-tiocianato, y la lactoferrina. El complemento es una proteína presente en la leche y que es capaz de incrementar la fagocitosis, su concentración es alta en el calostro y en las vacas que presentan infecciones clínicas de mastitis, la lactoferrina es una glicoproteína fijadora de hierro (Fe) producida por los fagocitos y las células epiteliales, al fijar hierro inhibe el crecimiento de bacterias que lo requieren (Estafilococos y bacterias coliformes) está presente en grandes concentraciones en el periodo seco y se reduce durante los picos de lactancia y aumenta nuevamente al final de esta, la lisozima es igualmente una proteína con capacidad bactericida, capaz de lisar los péptidos glucanos de los microorganismos Gram positivos y la membrana externa de los Gram negativos. El sistema Lactoperoxidasa-tiocianato junto con el peróxido de hidrogeno son bacteriostáticos contra ambos grupos de bacteria, tienen una acción antimicrobiana al formar hipotiocinato, y realizan un efecto oxidativo sobre las enzimas bacterianas. La formación de estos elementos requiere de elementos en la dieta en forma adecuada en donde los glúcidos tienen una gran influencia. (Ídem)

2.3.4. Mecanismos inmunológicos

Inmunidad mediada por anticuerpos o humoral

La inmunidad adquirida o específica constituye un sistema de defensa que no solo reconoce y destruye a los antígenos invasores sino que también elaboran la memoria del episodio. Ante nueva exposición del antígeno el sistema inmunitario reacciona con mayor prontitud y eficiencia. Los anticuerpos o inmunoglobulina (Ig) son proteínas que ejercen funciones inmunológicas diversas, son secretadas por las células plasmáticas y son producidas por los linfocitos B. Existen cuatro

clases de Ig en los bovinos; **IgG**, IgM, **IgA**, IgE y 3 subclases de IgG; IgG1, IgG2a e IgG2b, estas Ig pueden ser producida por los tejidos locales de la glándula (IgA, IgM) o en un proceso de inflamación migran desde el torrente sanguíneo (IgG1, IgG2). Las Ig son agentes opsonizadores, previniendo la adherencia de los microorganismos a los tejidos y por lo tanto la colonización, también son agentes neutralizadores y ejercen acción sobre las toxinas bacterianas y activan la fagocitosis de los macrófagos y neutrófilos.

Las vacunas que se han desarrollado y comercializan algunos laboratorios tienen la finalidad de aumentar la defensa inmune contra un antígeno específico. Una vacuna debe de ser capaz de eliminar infecciones crónicas, prevenir nuevas además de reducir la gravedad y frecuencia de los casos clínicos. Se tienen en el mercado la disponibilidad de vacunas contra *Staphylococcus aureus* y el complejo Coliforme que son los principales microorganismos involucrados en el desarrollo de infecciones intramamarias. Algunos estudios revelan que aumenta la cura natural, reduce las infecciones intramamarias, disminuye el conteo celular somático y baja la gravedad de la presentación, la inmunización con vacunas produce una elevada concentración de Ig1 e Ig2 que sirven de opsoninas para la fagocitosis y neutralización de las toxinas (Barragán, 2004)

Defensa celular

Las células de defensa o células somáticas (CS), son células de origen sanguíneo que migran a la glándula mamaria en respuesta a señales antigénicas, para contrarrestar la infección y eliminarla. En vacas “no infectadas” con patógenos mayores pero con respuesta a agentes infecciosos menores, las células somáticas se encuentran en números que no rebasan las 100,000 por mililitro. Esta celularidad se estima es necesaria como elementos *in situ* para combatir cualquier patógeno invasor. Durante una infección bacteriana de la glándula las CS se incrementan considerablemente en un periodo de 12 a 24 horas siendo los polimorfonucleares neutrófilos (PMN) el principal componente. La principal función de los PMN es la de fagocitosis y destrucción de microorganismos siendo considerados la primera línea de defensa celular, además los PMN además de fagocitar generan agentes oxidantes con capacidad bactericida. En el proceso de fagocitosis los PMN envejecen y pierden capacidad en sus funciones, estos son eliminados en el ordeño frecuente y son reemplazados por células nuevas. Los PMN poseen receptores que reconocen el complemento e inmunoglobulinas. Los PMN se complementan con los basófilos que

son las células liberadoras de mediadores inflamatorios y tiene factores quimiotácticos para atraer a los neutrófilos y eosinófilos.

Otras células de gran importancia son los macrófagos o monocitos que migran de los capilares al interior de la glándula para iniciar el proceso de la inflamación. Fagocitan no solamente a los agentes bacterianos sino también a células envejecidas o muertas como los neutrófilos, intervienen en el sistema de homeostasia y son los encargados de presentar los antígenos bacterianos a los linfocitos T que a su vez activan a los linfocitos B.

Los linfocitos son los encargados de construir y regular la respuesta inmune en donde intervienen los diferentes tipos de ellos:

Linfocitos T

Linfocitos B

Células Natural Killer (NK)

Los linfocitos T son los responsables de la producción de citoquinas y la activación de la respuesta inmune tanto humoral como celular. Se asocian a la protección de mucosas y superficies epiteliales, a la secreción de interferón y actividades citotóxicas. La principal función de los linfocitos B es la de producir anticuerpos contra los microorganismos invasores, cuentan con receptores de membrana para reconocer antígenos específicos. Las células NK tienen gran actividad citotóxica sobre células tumorales o infectadas y también inducen apoptosis de células alteradas por medio de la secreción de factor de necrosis tumoral.

El buen funcionamiento de la respuesta celular tiene como consecuencia la detención o eliminación de las infecciones intramamarias, en los estudios recientes sobre elementos inmunomoduladores de las defensas del organismo animal se tienen trabajos de elementos inducibles sobre las células que actúan sobre las diferentes células del sistema inmunitario y sobre los elementos que se tienen de forma natural para el primer grupo actúan sobre las células (Macrófagos, neutrófilos, células NK Linfocitos y células dendríticas) y en el segundo punto tienen acción sobre el complemento, lisozima lactoperoxidasa y la lactoferrina. Dentro de este grupo son de especial interés la Vitamina E y el Selenio que estimula la inmunidad celular y humoral. (Barragán, 2004)

La inmunoterapia comprende los métodos que utilizan principios inmunológicos para prevenir la enfermedad. Los inmunoestimulantes aumentan la resistencia a la enfermedad mediante el incremento en los mecanismos de defensa específicos e inespecíficos, convirtiéndose en agentes profilácticos primarios, no curativos. Las limitaciones de la inmunoestimulación dependen del estado de desarrollo del sistema inmune, organismo blanco, tipo de inmunoestimulantes y los procedimientos de administración.

Muchos inmunoestimulantes son nutrientes habituales de la dieta como polisacáridos, lípidos o proteínas que suministrados en concentraciones superiores a las normales producirán efecto estimulante. Las vitaminas y minerales pertenecen al grupo de inmunomoduladores. Los inmunoestimulantes de mayor uso son los de origen bacteriano. (Ídem)

2.3.5. Mecanismos No – Inmunológicos

Anatómicos

El canal del pezón junto con la piel es considerado como la primera barrera de defensa contra los patógenos. La condición de la piel de la glándula es de vital importancia. Cuando la piel se encuentra íntegra, la mayoría de los patógenos tiene limitadas oportunidades de sobrevivir (King, 1981)

El canal del pezón es la principal puerta de entrada a la ubre de numerosos microorganismos causantes de mastitis (Sandholm & Korhonen, 1995). El músculo liso y la elasticidad de los tejidos alrededor del conducto del pezón, hacen que este se mantenga cerrado limitando así el ingreso bacteriano (Sordillo, 1995)

El diámetro del pezón y en menor medida la longitud del mismo, tienen una relación directa con la incidencia de enfermedades intramamarias. A mayor diámetro, mayor tasa de nuevas infecciones. Estudios morfométricos indican que el diámetro del canal del pezón cambia considerablemente durante el periodo seco y la lactancia del animal (National Mastitis Council, 1996).

Este diámetro fue mucho mayor a los 7 días del secado comparado con los días 1, 16 y 30, hallándose una relación positiva entre diámetro e incidencia de enfermedades intramamarias (Nickerson, 1989). De lo anterior se deduce que los cuidados al pezón durante los primeros 10 días

del secado son indispensables. El uso de productos selladores de barreras impermeables y durables puede ser el apoyo necesario para reducir el riesgo de infecciones por migración de microorganismos ambientales. Asimismo, a medida que el proceso involutivo progresa, la glándula se torna más resistente. Dicha resistencia, entre otras causas, es atribuida a la formación del tapón de queratina en el conducto del pezón, el cual previene el ascenso y multiplicación bacteriana en la glándula.

Entre los mecanismos no-inmunológicos solubles que forman parte de la defensa de la glándula mamaria cabe mencionar a la lactoferrina y la lactoperoxidasa como los más relevantes de este tipo de compartimiento.

La lactoferrina es una proteína con capacidad para fijar el hierro (Fe), siendo producida por las células epiteliales y fagocitos de la glándula mamaria (Persson, 1992) (Sandholm & Korhonen, 1995).

Debido a su capacidad de fijar Fe en presencia de bicarbonato, la lactoferrina inhibe el crecimiento de bacterias dependientes de este mineral (Craven & Williams, 1985), limitando significativamente el crecimiento de bacterias productoras de mastitis tales como, Estafilococos y Coliformes, mientras que su efecto es menor en bacterias de escasas necesidades de Fe, como los Estreptococos (Sandholm & Korhonen, 1995)

2.3.6. Mecanismos Inmunológicos solubles

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

El complemento consiste en una serie de proteínas que, una vez activadas, ejercen funciones inmunológicas diversas, tales como opsonización de microorganismos, quimiotaxis de neutrófilos, lisis de bacterias (Craven & Williams, 1985)

Cuatro clases de inmunoglobulinas (Ig) han sido descritas en la glándula mamaria, IgA, IgE, IgG (IgG1, IgG2) e IgM (Butler, 1986), las cuales pueden ser producidas en la misma glándula o derivar del torrente sanguíneo.

Las principales funciones de las Igs son las de prevenir la adherencia a las superficies mucosas o actividad antiadhesiva (IgA), activar el complemento (IgM) y actividades opsonizantes, favoreciendo la fagocitosis (IgG) (Craven y Williams, 1985). La concentración de Igs en la glándula varía de acuerdo al momento de la lactancia y al grado de salud de la misma.

Figura 18. Comparativo en mg/ml de inmunoglobulinas presentes en las vacas

Ciencia Veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLPam-2001

Concentración promedio de Igs en los diferentes estadios del ciclo productivo de la vaca lechera (mg/ml).

Ig	Lactancia	Seca *	Calostro
IgA	0,08	3,14	5,36
IgG ₁	0,58	10,27	46,4
IgG ₂	0,06	1,95	2,87
IgM	0,09	4,13	6,77

** Valores determinados a los 7 días post-secado*

Tomado de (Craven & Williams, 1985)

2.3.7. Mecanismos inmunológicos celulares

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

Durante una infección bacteriana de la glándula las CS se incrementan considerablemente en un periodo de 12 – 24 horas, siendo los PMN el principal componente de este incremento (Craven & Williams, 1985)

La principal función de los PMN es de fagocitosis y destrucción de microorganismos, siendo considerados como la primera barrera de defensa celular de la glándula mamaria contra los patógenos (Paape *et al*, 1991)

Los macrófagos de los tejidos, entre ellos la glándula mamaria, derivan de los monocitos presentes en la sangre (Ziegler & Haitbrock, 1989). Tienen capacidad fagocítica e inician el proceso inflamatorio (Adams & Hamilton, 1988).

Debido a que son las células más abundantes en la glándula mamaria sana, a los M ϕ se los considera como las células responsables, luego de la invasión bacteriana, de la producción de citosinas y de iniciar la respuesta inmunitaria (Politis, *et al*, 1992)

Los linfocitos son los encargados de construir y regular la respuesta inmunitaria. Existen tres tipos de linfocitos, los cuales difieren en funciones y en componentes proteicos producidos, llamados linfocitos B, T y asesinas naturales Natural Killer (NK) de sus siglas en inglés (Tizard, 1996)

2.4. ESTUDIO REGIONAL

Puebla es uno de los estados productores de leche con producción intermedia a baja, respecto a otros estados del país. Los hatos lecheros se encuentran distribuidos en regiones con ganado estabulado la mayoría entre 50 a 200 animales por establo. **La vacunación al ganado en cuanto a la prevención de la mastitis es muy baja o nula.** La cultura del ganadero nacional con esos rangos de propiedad es muy pobre respecto al uso de vacunas, tanto para mastitis como para otras patologías. Sin embargo prácticamente la mayoría, usa las jeringas con antibióticos para protección de la glándula mamaria en el momento parto comúnmente conocido como “secado”. El ganadero de cuencas de baja producción, comercializa buena parte de su leche en la preparación de queso, muchas de las veces sin control de residuos de antibióticos. (Lactodata, 2013)

Figura 19. Principales estados de la República Mexicana en producción de leche

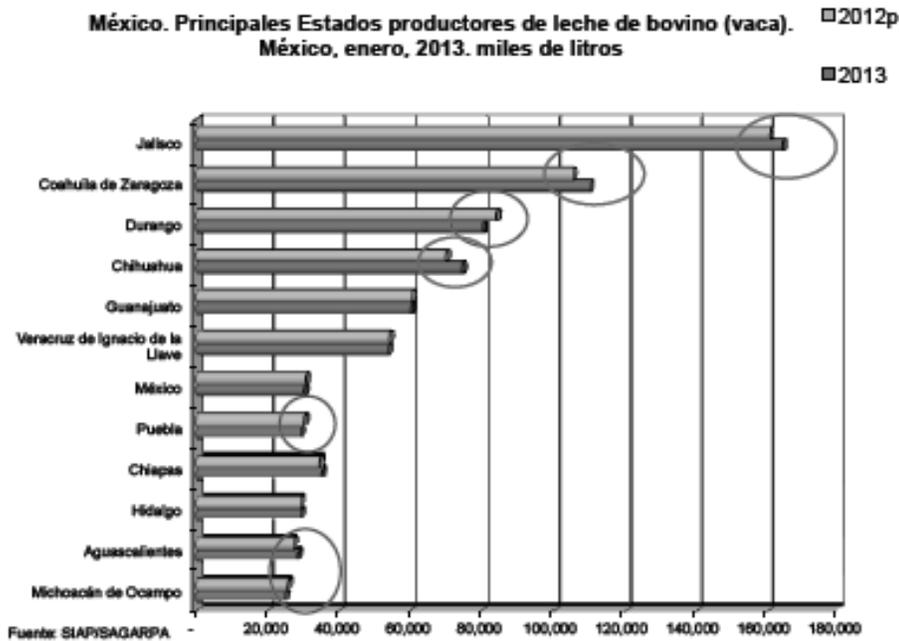
México: Entidades federativas más importantes en producción de leche

Clave	Entidad importantes	Participación (%)	Avance al mes de: enero 2012, 2013.		
		en la producción	Volumen de producción, miles de litros		
		2010-2012	2012p	2013	Variación (%)
14	Jalisco	18.5%	160,939	164,578	2.3%
05	Coahuila de Zaragoza	11.8%	105,598	110,652	4.8%
10	Durango	9.4%	84,538	80,604	-4.5%
08	Chihuahua	8.8%	70,438	75,016	6.5%
11	Guanajuato	7.3%	60,884	60,461	-0.7%
30	Veracruz de Ignacio de la Llave	6.7%	54,616	54,303	-0.6%
15	México	4.4%	31,029	30,656	-1.2%
21	Puebla	3.8%	30,624	29,640	-3.2%
07	Chiapas	3.7%	34,993	35,460	1.3%
13	Hidalgo	3.7%	29,586	29,603	0.4%
01	Aguascalientes	3.4%	27,584	28,724	4.1%
16	Michoacán de Ocampo	3.2%	26,060	25,371	-2.6%
	Región Lagunera	19.9%	182,281	183,358	0.6%
	Entidades importantes		716,889	725,248	1.2%
	Nacional		846,897	852,659	0.7%
	Total anual		10,946,015	10,942,034	-0.04%

Fuente: SIAP/SAGARPA Información preliminar, oportuna Pronóstico 2013 Elaboró: Lactodata

(Lactodata, 2013)

Figura 20. Gráfica de los estados productores de leche de la República Mexicana



(Lactodata, 2013)

Regiones específicas.- En el estado de Puebla se confinan 6 micro cuencas lecheras que son: Cholula-Chipilo, Atlixco, Texmelucan, Libres; Tecamachalco y Tehuacan. Las cuencas que se estudiaron fueron 2 de las que se detallan a continuación sus características geográficas en el cuadro 1, 2, 3 y 4.

Ambas regiones son de clima templado, con lluvias en verano, sequía en primavera e invierno lo que afecta las condiciones generales del ganado. La lluvia es un factor predisponente a desarrollar mastitis. El tiempo de sequía afecta en la alimentación y bajan las defensas de los animales. Ambas condiciones deben prevenirse para que la producción de leche no se vea afectada.

Cuadro 1. Características geográficas de Atlixco Puebla

UBICACIÓN GEOGRÁFICA

COORDENADAS GEOGRÁFICAS EXTREMAS	AL NORTE 19°00', AL SUR 18°48' DE LATITUD NORTE; AL ESTE 98°18', AL OESTE 98°36' DE LONGITUD OESTE.
PORCENTAJE TERRITORIAL	EL MUNICIPIO DE ATLIXCO REPRESENTA EL 0.82% DE LA SUPERFICIE DEL ESTADO.
COLINDANCIAS	EL MUNICIPIO DE ATLIXCO COLINDA AL NORTE CON LOS MUNICIPIOS DE TOCHIMILCO, TIANGUISMANALCO Y SANTA ISABEL CHOLULA; AL ESTE CON LOS MUNICIPIOS DE SANTA ISABEL CHOLULA, OCOYUCAN, TEOPATLÁN Y SAN DIEGO LA MESA TOCHIMILTZINGO; AL SUR CON LOS MUNICIPIOS DE SAN DIEGO LA MESA TOCHIMILTZINGO, HUAQUECHULA Y ATZIZIHUACÁN; AL OESTE CON LOS MUNICIPIOS DE ATZIZIHUACÁN Y TOCHIMILCO.

FUENTE: **INEGI.** *Marco Geoestadístico, 2000.*
INEGI. Conjunto de Datos Vectoriales de la Carta Topográfica 1:250 000. (INEGI, 2000)

Cuadro 2. Clima de la región de Atlixco Puebla

CLIMAS

TIPO O SUBTIPO	SÍMBOLO	% DE LA SUPERFICIE MUNICIPAL
SEMICÁLIDO SUBHÚMEDO CON LLUVIAS EN VERANO DE HUMEDAD MEDIA	A(C)w1	41.13
SEMICÁLIDO SUBHÚMEDO CON LLUVIAS EN VERANO DE HUMEDAD BAJA	A(C)w0	41.13
TEMPLADO SUBHÚMEDO CON LLUVIAS EN VERANO DE MAYOR HUMEDAD	C(w2)	34.68
TEMPLADO SUBHÚMEDO CON LLUVIAS EN VERANO DE HUMEDAD MEDIA	C(w1)	23.13
SEMIFRÍO SUBHÚMEDO CON LLUVIAS EN VERANO DE MAYOR HUMEDAD	C(E)(w2)	1.06

FUENTE: **INEGI**. Conjunto de Datos Geográficos de la Carta de Climas, 1:1 000 000. (INEGI, 2000)

Cuadro 3. Características geográficas de Libres Puebla

UBICACIÓN GEOGRÁFICA

COORDENADAS GEOGRÁFICAS EXTREMAS	AL NORTE 19°33', AL SUR 19°22' DE LATITUD NORTE; AL ESTE 97°32', AL OESTE 97°49' DE LONGITUD OESTE.
PORCENTAJE TERRITORIAL	EL MUNICIPIO DE LIBRES REPRESENTA EL 0.85% DE LA SUPERFICIE DEL ESTADO.
COLINDANCIAS	EL MUNICIPIO DE LIBRES COLINDA AL NORTE CON LOS MUNICIPIOS DE IXTACAMAXITLÁN, OCOTEPEC Y CUYOACO; AL ESTE CON LOS MUNICIPIOS DE CUYOACO Y TEPEYAHUALCO; AL SUR CON LOS MUNICIPIOS DE TEPEYAHUALCO, ORIENTAL Y EL ESTADO DE TLAXCALA; AL OESTE CON EL ESTADO DE TLAXCALA Y EL MUNICIPIO DE IXTACAMAXITLÁN.

FUENTE: **INEGI**. *Marco Geoestadístico, 2000.*

INEGI. Conjunto de Datos Geográficos de la Carta Topográfica 1:250 000. (INEGI, 2000)

Cuadro 4. Clima de la región de Libre Puebla

CLIMAS

TIPO O SUBTIPO	SÍMBOLO	% DE LA SUPERFICIE MUNICIPAL
TEMPLADO SUBHÚMEDO CON LLUVIAS EN VERANO, DE MAYOR HUMEDAD	C(w2)	4.89
TEMPLADO SUBHÚMEDO CON LLUVIAS EN VERANO, DE HUMEDAD MEDIA	C(w1)	17.12
TEMPLADO SUBHÚMEDO CON LLUVIAS EN VERANO, DE MENOR HUMEDAD	C(w0)	66.75
SEMIFRIO SUBHÚMEDO CON LLUVIAS EN VERANO, DE MAYOR HUMEDAD	C(E)(w2)	6.36
SEMISECO TEMPLADO	BS1k	4.88

FUENTE: INEGI. Conjunto de Datos Geográficos de la Carta de Climas, 1:1 000 000. (INEGI, 2000)

2.5 PROGRAMAS DE VACUNACIÓN

El periodo del secado pre parto, es un buen momento para vacunar al ganado y así protegerlo de enfermedades infecciosas comunes. Se recomienda el uso de vacunas durante el periodo de vaca seca a los fines de proteger a la vaca durante este periodo tan vulnerable. Las vacunas también se emplean para estimular la formación de anticuerpos que estarán presentes en el calostro y que protegerán a la cría. Las vacunas para proteger a las terneras contra *E. coli*, rotavirus y coronavirus son más eficientes cuando se administran a las vacas durante el final de la gestación (asumiendo que existe un buen manejo del calostro y de la alimentación). El periodo de vaca seca es también adecuado para administrar los refuerzos correspondientes de las vacunas contra enfermedades vírales comunes (BVD, IBR, PI-3). (Smith K. , 1982)

El uso de vacunas antagónicas contra microorganismos Gram negativos es, prácticamente necesario para todas las lecherías, justificable desde el punto de vista económico. Con el uso de estas vacunas se reduce significativamente la severidad de las mastitis provocadas por bacterias coliformes. Estas

vacunas han probado ser efectivas desde el punto de vista económico aun en hatos con relativamente pocas mastitis coliformes.

El ambiente desfavorable de la presencia de patógenos residentes en los mismos organismos animales y en su entorno ambiental favorece el desarrollo de la enfermedad.

El conocimiento de la existencia de sustancias capaces de inducir la actividad de las células inmunes y sus productos data ya de algunos años y forma parte de los complejos adyuvantes empleados en las vacunas. La mayoría de las vacunas emplea productos que derivan de bacterias como es el caso de los subproductos de *Bacillus tuberculoso*, muramil dipéptidos o la pared de bacilos Gram negativos.

Otros emplean inmunopotencializadores que incrementan la respuesta de antígenos débiles, estimulan la inmunidad celular y humoral. El resultado en la inmunogenicidad de un biológico encontrará en el campo, variables que pueden provenir desde los compuestos mismos usados como adyuvantes, el estado nutricional del hato e individual, la presencia de patógenos y condiciones externas en el manejo que condicionen “estrés”. (Smith K. L., 2008)

Como ya se mencionó anteriormente, en la glándula mamaria de la vaca, existen varios tipos celulares en la secreción láctea: los leucocitos polimorfonucleares (lpn), las células mononucleares entre las que destacan los macrófagos (mac) los linfocitos (linf) y las células epiteliales que descaman de los acinos glandulares. El número y proporciones de estas células varía en relación a los diferentes estadios de la lactancia, del período de no lactancia, mejor conocido como período seco. Por razones obvias, estos tipos celulares se incrementan durante la lactancia por la presencia de factores inflamatorios físicos, químicos o infecciosos. (Smith K. , 1982)

Para el productor de bovinos de leche el conjunto de células es conocido como “**células somáticas**”. Esta terminología proviene de las células que componen el cuerpo para diferenciarlas de las germinales que derivan de los ovarios y testículos como ovocitos y espermatozoides respectivamente. Las células somáticas de la inflamación de la glándula mamaria derivan principalmente de la sangre y del tejido linfoide. Este conjunto de células tienen la función especializada de reconocimiento, fagocitosis (ingestión y degradación en el citoplasma celular) y eliminación de todo aquello que el

organismo reconoce como extraño. De acuerdo con lo establecido años atrás, el período de lactancia se divide en dos; (Smith, 1982)

1.-El período de lactancia que se inicia inmediatamente terminado el calostro hasta el momento del secado.

Durante el período de lactancia en condiciones fisiológicas, el número promedio de células somáticas es de 200,000 por mililitro. Entre ellas, el 12 % corresponden a leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (lpn), el 60 % a macrófagos (mac) y el 28 % a linfocitos (linf).

En la glándula mamaria sin otros elementos de atracción de células inflamatorias, (somáticas) la presencia de células especializadas en fagocitosis como los polimorfonucleares neutrófilos y los macrófagos, encuentra su explicación fisiológica en los siguientes argumentos;

- a. Las células epiteliales de los acinos glandulares producen gránulos de caseína y lípidos, componentes proteicos y grasos de la leche respectivamente. Estos elementos *per se* son productos estimulantes de la confluencia de lpn por quimiotaxis en las luces de los acinos glandulares. Los lpn en los acinos glandulares, se encuentran continuamente fagocitando caseína y grasa y se especula que su capacidad de fagocitosis contra agentes bacterianos se encuentra en decrecimiento por el desgaste o actividad fagocítica de estos elementos constitutivos de la leche en formación
- b. Como toda célula del organismo el recambio de nuevos elementos celulares obedece al código genético pre establecido en el ADN en relación al tiempo de viabilidad celular. De algunas células se conoce su tiempo de permanencia entre los tejidos pero todas son reguladas por el mecanismo de muerte celular programada (apoptosis). En los acinos glandulares de una vaca en etapa de lactancia es posible observar los signos morfológicos de apoptosis, como la condensación de la cromatina nuclear y fragmentación de la misma. La célula muerta se reduce a fragmentos que tienden a ser eliminados hacia las luces

glandulares donde por su tamaño son reclutadas las células con capacidad fagocítica como los macrófagos lo que explica la presencia “fisiológica de estos elementos celulares de la inflamación”. (Shultze & M.J., 1977)

En el período tardío de lactancia se modifica el porcentaje de 200,000 a 600,000 células somáticas por mililitro entre las cuales, 40 % son lpn, 30 % mac y 30 % linf. (Shultze & M.J., 1977) (Paape *et al*, 1991; Paape, 1981; Blackburn, 1966)

Es importante tomar en consideración las variaciones fisiológicas entre los períodos de lactancia, particularmente para no mal interpretar la existencia de factores inflamatorios específicos o inespecíficos inductores de aumento en el conteo individual de las células somáticas.

2.-El período de secado terminado con el calostro.

Durante el período seco se reconoce “el temprano” con activa involución de la glándula y con duración de aproximadamente 28 días.

La concentración de células durante los primeros siete días del secado se incrementa notablemente encontrando hasta 1,800,000 células por mililitro disminuyendo progresivamente hasta presentar 250,000 células/ml. El período de calostro se inicia 15 días antes del parto y finaliza tres días después. El conteo celular en el período calostrado post parto es entre 10,000 a 280,000 células/ml. Relación entre el conteo de células somáticas y las infecciones en la ubre.

Los programas de control de células somáticas en tanque de enfriamiento son hoy en día bien aceptados por los productores de leche y promocionados por las instituciones de comercialización de los productores. Este binomio productor y comercializador da por sentado que es conveniente establecer los límites inferiores y superiores sobre el conteo de células somáticas en tanque. Las razones son varias y destacan para los productores la relación entre el mencionado conteo celular y el posible número de vacas con potencial infección. Para los comercializadores el colocar excelente calidad de leche en sus mercados. Muchos investigadores y médicos veterinarios concuerdan en que es “normal” encontrar conteos en tanque en rangos de 200,000 células /ml. Dos estudios realizados en las universidades de Cornell y Pensilvania en USA, relacionan el conteo de células somáticas en

tanque con el número de vacas infectada. Con porcentajes de 100,000 a 199,000 son 15 % las vacas enfermas, entre 200,000 a 299,000 son 32 %, de 300,000 a 399,000 son 42 %, de 400,000 a 499,000 son 55 %, de 500,000 a 599,000 son 58 %. (Paape, Guidry, Jain, & Miller, 1991)

El desafío constante a la glándula mamaria por bacterias coliformes en donde predomina la *E. coli*. Las bacterias ambientales residentes en la piel del pezón y en las manos del operador del equipo y en el propio equipo, establecen que en conjunto, la leche aún diluida en el tanque de enfriamiento, manifieste esas proporciones de células somáticas.

Las mastitis sub clínicas pasan desapercibidas porque no manifiestan los signos de una mastitis aguda, sin embargo son las responsables de las proporciones de células somáticas que se encuentran en la leche en el tanque, asumiendo que la leche de vacas con mastitis clínica ha sido descartada. La mastitis sub clínica por coliformes y ambientales, se ha manejado con las medidas de limpieza y recambio de las camas en los echaderos, el uso de pre – selladores que desinfectan los pezones antes de la ordeña y el de selladores después de la misma. (Paape, Guidry, Jain, & Miller, 1991)

La vacunación contra *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, durante el período del secado contribuye también como medida preventiva al incrementar la eficiencia de la fagocitosis de bacterias oportunistas en las luces glandulares.

Para el control y o erradicación de patógenos ambientales y/o oportunistas en la glándula mamaria, el productor usa productos intramamarios. La aplicación es realizada una vez suspendida la lactancia dos meses antes del parto. Las jeringas intramamarias están constituidas por formulaciones con antibióticos cuya permanencia en la cisterna de la glándula conductos y conductillos así como alveolos cercanos permanece por tiempo variable. Es de importancia que el tiempo de permanencia no sobrepase el tiempo de formación del calostro por la presencia indeseable de metabolitos/residuos de las sales de antibióticos. Los residuos de antibióticos podrían estar presentes en la leche de los primeros días de lactancia posparto, condición que genera descalificación y desecho.

La mastitis aguda al abrir la lactancia, etapa que en la jerga de productores de leche se denominan “frescas”, es frecuente la presencia de patógenos menores. La infección se dio con probabilidad

durante el tiempo de involución glandular y la mayoría de los casos las bacterias coliformes son las oportunistas presentes. Las múltiples variables en cada establo como limpieza y desinfección de corrales, la imperfección de cierre del esfínter del pezón y suficiente cantidad de queratina para ocluir el conducto galactóforo, la persistencia de patógenos menores en el interior de la glándula, la iatrogenia al aplicar las jeringas intramamarias, son entre otras, las principales causas de las infecciones de la glándula mamaria en la etapa de secado preparto y pos parto inmediato. (Gonzalez, 1989)

Presentación de antígenos en el interior de la glándula mamaria, vacunas intracisternales y calostrogénesis

La relación del tipo de placentación y las barreras que se presentan en algunos mamíferos, hace que la concentración de inmunoglobulinas secretadas por la madre pasen al recién nacido por la leche de los primeros días o calostrales. Es así que la previa experiencia inmune de la madre dará al recién nacido la protección que proporcionan inmunoglobulinas que circularán en pocas horas en el plasma de los recién nacidos. La aumentada proporción de macrófagos como células presentadoras de antígenos en la etapa del preparto, puede ser interpretada como la actividad fisiológica de oportunidad de presentación de antígenos al sistema inmune. La consecuencia también fisiológica será la formación de inmunoglobulinas específicas. (Max J. Paape, 2003)

2.6. IDENTIFICACION DE PRODUCTOS BACTERICIDAS

La diferencia entre los antisépticos y los desinfectantes es que los primeros son biocidas que, aplicados tópicamente sobre tejidos vivos, tienen el objeto de destruir o inhibir el crecimiento de los microorganismos, mientras que los desinfectantes se emplean para matar a los microorganismos o impedir su crecimiento, pero ejercen su acción sobre una superficie inerte u objeto inanimado.

Según el espectro antimicrobiano de antisépticos y desinfectantes se consideran:

De alto nivel: cuando elimina los cuatro tipos de microorganismos: bacterias, hongos, virus e incluso esporas.

De nivel intermedio: cuando no se afectan las formas esporuladas de algunos hongos o virus.

De bajo nivel: cuando solamente afectan a las formas vegetativas de las bacterias (no ácido-alcohol resistente) y a algunos hongos y virus. (Vives, 2004)

Figura 21. Farmacología de antisépticos y desinfectantes

CLASIFICACIÓN			MECANISMO DE ACCIÓN
INORGÁNICOS	HALOGENADOS	• Yoduros	Oxidación de componentes bacterianos y precipitación de proteínas.
		• Cloruros	IDEM Yoduros.
		• Hipoclorito de sodio (agua lavandina)	Desnaturalización proteica.
	GASES	• Óxido de Etileno	Inhibición irreversible de enzimas celulares.
	METALES PESADOS	Compuestos de Mercurio: <ul style="list-style-type: none"> • <i>Inorgánicos:</i> Cloruro de Mercurio Óxido amarillo • <i>Orgánicos:</i> Timerosal (Merthiolate®) 	Reacción con los grupos SH de las proteínas microbianas, inhibiendo la actividad de los sistemas enzimáticos.
Compuestos de Plata: <ul style="list-style-type: none"> • Nitrato de Plata 			
OXIDANTES	<ul style="list-style-type: none"> • Peróxido de hidrógeno • Permanganato de potasio 	Producción de oxígeno molecular por la acción de catalasas tisulares.	
ORGÁNICOS	ALCOHOLES	• Etanol	Desnaturalización proteica.
	FENOLES	<ul style="list-style-type: none"> • Fenol • Cresoles 	Precipitación de proteínas bacterianas.
	BIGUANIDAS	• Clorhexidina	
	DETERGENTES	• Aniónicos: Jabones	Alteración de la integridad de la membrana, y facilitación del arrastre mecánico del material contaminado.
		• Catiónicos	
		• Anfóteros	
• Enzimáticos			
ALDEHÍDOS	• Glutaraldehído	Alquilación de proteínas a pH alcalino.	
	• Formaldehído	Desnaturalización proteica a pH alcalino.	

Tomada de (Vives, 2004)

Ácidos yodados

Son los germicidas más activos in vivo. Su amplio espectro abarca bacterias de todos los grupos, hongos, virus e incluso esporas.

Su efecto se debe a la yodación de proteínas vitales para los microorganismos (altera su estructura proteica y los ácidos nucleicos). Su acción está limitada por la inactivación por sangre y otros materiales biológicos. Generalmente han sido utilizados tanto para desinfectar piel intacta como para descontaminar heridas pequeñas. Que si bien son altamente efectivas presentan los siguientes inconvenientes:

Reacciones de hipersensibilidad.

Irritación del área tratada por el componente de alcohol.

Quemaduras en caso de que la solución tenga yodo concentrado a más del 2%.

Eosinofilia (rara). (Vives, 2004)

Iodóforos

Un iodóforo es un agente solubilizante o portador del yodo con el que se combina en forma reversible. El complejo resultante provee un reservorio de liberación sostenida de yodo libre en solución acuosa (libera yodo lentamente). Son de mayor sustentividad que las soluciones yodo-ioduradas. Los más empleados son:

Iodopovidona (polivinilpirrolidona yodada): es la droga de elección para la antisepsis quirúrgica incluyendo inyecciones y cateterizaciones. Debe emplearse en soluciones al 10% para asegurar una concentración en yodo libre igual o superior al 1%. En soluciones jabonosas o como jabón sólido es útil para limpieza de manos y para limpieza prequirúrgica de la piel.

Iodoformo: químicamente es el equivalente yodado del cloroformo; muy utilizado en odontología

Cadexómero yodado: yodo incorporado a un polisacárido reticular.

Las principales indicaciones de los ácidos yodados son:

Antisepsia de piel: previa a inyección intramuscular o subcutánea, venopunturas, intervenciones quirúrgicas, punciones biopsias, piel pericatóter, etc.

Antisepsia de la mucosa bucal previa intervención odontológica.

Curación oclusiva de heridas y úlceras.

Desinfección del tapón de los frascos-ampolla.

Debe esperarse un mínimo de 30 minutos en mucosas o 2 horas en piel, entre la aplicación del antiséptico iodado y la iniciación de la práctica quirúrgica (incisión, inyección, etc.). No son recomendables como desinfectantes, excepto en el caso del tapón de los frascos-ampolla. (Ídem)

Hipoclorito de sodio

Es uno de los desinfectantes más antiguos. Se lo conoce popularmente como **agua lavandina**. El principio activo es el ácido hipocloroso no dissociado; el cuál es bactericida para bacterias Gram(+) y Gram(-), fungistático (especialmente para *Cándida albicans*) y viricida (incluyendo al virus de la HBV y HIV-1). Se lo clasifica como un desinfectante de nivel intermedio. La mínima disociación se obtiene entre pH 6 y 8. La materia orgánica (pero no las aguas duras) reducen su efectividad, pues se cree que su acción se basa en la desnaturalización proteica. Es corrosivo para metales.

Su efecto es rápido, requiriéndose solamente unos pocos minutos de exposición, con excepción de su utilización en la desinfección de agua destinada al consumo humano, en la que se recomienda una exposición relativamente prolongada debido a que se utiliza en bajas concentraciones.

Es inestable y su actividad disminuye por efecto de la luz y la temperatura.

Una grave falencia de las regulaciones orgánicas, es permitir la venta de hipoclorito de sodio sin fecha de vencimiento y/o en envases transparentes. Debe recomendarse a los pacientes:

Utilizar solamente agua lavandina comercializada en envases opacos y con fecha de elaboración.

Controlar la fecha de elaboración en el envase original y taparlo inmediatamente cada vez que se lo utiliza.

Conservar en sitio fresco.

Se lo utiliza generalmente como desinfectante. En endodoncia, se lo emplea para el lavado de los conductos.

Sus concentraciones se expresan como cantidad de cloro por litro de solución. (Ídem)

Alcohol etílico

Es el antiséptico más antiguo de todos, el más popular y económico. Actúa por desnaturalización de proteínas y debe emplearse en solución acuosa al 70% v/v. Concentraciones mayores deshidratan a los microorganismos conservándolos en lugar de destruirlos.

Concentraciones menores son menos eficaces.

Es bactericida y moderadamente fungicida. Es poco o nada eficaz contra esporos, microbacterias y varios tipos de virus. Su efectividad es rápida pero de corta duración porque tiende a evaporarse. Su eficacia para el tratamiento de heridas superficiales es limitada. Para el lavado de manos tiene una eficacia similar a la de los jabones. Puede potenciar la acción de otros antisépticos para los que se utiliza como solvente. Su volatilidad le otorga escasa sustentividad y se hace difícil obtener un tiempo de contacto adecuado.

El etanol ha sido usado para desinfectar termómetros y pequeñas superficies tales como la superficie externa de tapones de goma y de los frascos-ampolla que contienen múltiples dosis de medicamentos. También se utiliza para desinfectar superficies externas de estetoscopios y equipos para la asistencia respiratoria o áreas de preparación de medicamentos. La desventaja de los alcoholes como desinfectantes de equipos es que su uso prolongado daña los materiales de montaje de las lentes, disuelve las gomas y ciertas tubuladuras plásticas. Además son inflamables, por lo que deben ser conservados en áreas frescas y ventiladas.

Deben dejarse transcurrir 30 minutos (en mucosas) o 2 a 5 minutos (en piel), entre la aplicación de alcohol y el comienzo del procedimiento quirúrgico (incisión, inyección, etc.). Generalmente se lo comercializa al 96% v/v debiendo ser diluido si se desea un efecto antiséptico eficaz.

Efectos adversos.- El etanol puede causar xerodermia, heridas o úlceras. Debe controlarse la posible absorción abdominal transcutánea en niños, en quienes se ha observado intoxicación por administración sobre superficies extensas o por aplicación de compresas con etanol (remedio popular para dolores abdominales). (Ídem)

Timerosal

Es el más utilizado de los antisépticos mercuriales. Su actividad es del tipo bacteriostática, más marcada sobre bacterias Gram(+), con nula o escasa actividad sobre otros microorganismos. Su efecto se debe a una inhibición enzimática con grupos sulfhidrilos y es una droga de baja actividad. Su eficacia aún no ha demostrado ser superior a la del solvente hidroalcohólico en que se encuentra diluido. Es muy utilizado como conservador de soluciones tópicas (por ejemplo: colirios). Debe ser conservado al abrigo de la luz y el tiempo que debe dejarse transcurrir después de su aplicación es de 30 minutos en mucosas o 5 minutos en piel.

Efectos adversos.- Puede ocasionar irritación y dermatitis de contacto y forma compuestos cáusticos con el yodo, por lo que nunca deben asociarse. (Ídem)

Detergentes

Un detergente es una sustancia que disminuye la tensión superficial permitiendo la emulsión de sus lípidos solubilizándolos en agua, lo que facilita su remoción.

Los **detergentes aniónicos** se denominan **jabones** y se utilizan fundamentalmente para limpieza de la piel y superficies de los ámbitos en que se desarrolla la atención clínica o quirúrgica de pacientes.

Los **detergentes catiónicos** son un grupo numeroso de fármacos de actividad variable, cuyo uso más importante es en la limpieza de la piel antes de la aplicación de otros antisépticos. Actúan alterando la permeabilidad de la membrana plásmicas y son activos contra bacterias vegetativas, hongos, pero **no** contra micobacterias, esporos ni virus. No está establecido cual es el tiempo de exposición a los detergentes catiónicos cuando se los aplica como antisépticos en mucosa. En piel se requieren 7 minutos al utilizarlo como antiséptico, y como desinfectante en intervenciones quirúrgicas, 3 horas. No son efectivos como desinfectantes de equipos.

Los **detergentes anfóteros** poseen actividad *contra bacterias, hongos y virus*.

No se inactivan frente a la suciedad, grasas ni proteínas. Se los utiliza para limpieza o desinfección.

Un ejemplo es el conocido con el nombre comercial de *Tego 510* (carece de nombre genérico)

Los **detergentes enzimáticos** son limpiadores a base de enzimas, proteasas, etc.; que disuelven sangre, mucosidades, etcétera. Son *bacteriostáticos* y son 100% biodegradables. (Ídem)

Clorhexidina

Es un antiséptico antimicrobiano activo contra bacterias Gram(+) y Gram(-), bacterias aerobias, y anaerobias facultativas. Se lo utiliza como alternativa en pacientes en quienes el yodo está contraindicado y es de aplicación tópica como desinfectante.

El área a desinfectar debe ser lavada durante por lo menos 2 o 3 minutos y más tarde secada con una toalla estéril. Luego debe repetirse el proceso por otros 2 o 3 minutos. Si se utiliza en mucosa oral deben hacerse buches durante 30 segundos, después del lavado dental.

La clorhexidina es pobremente absorbida a través de la piel intacta, no se acumula en el organismo y es mínimamente metabolizada.

Efectos adversos.- El efecto adverso principal es la irritación de la piel y; a nivel bucal; la pigmentación dentaria. Este último es un problema estético solamente y puede ser solucionado con un lavado dental profesional. También se han reportado alteraciones en el gusto y sordera en aquellos casos en que fue utilizado a nivel del oído medio, por afectación del tímpano. (Ídem)

Glutaraldehído

Es un desinfectante de alto nivel, esterilizante y esporicida. Su actividad depende del pH: las soluciones alcalinas son más efectivas que las ácidas. No se inactivan por la presencia de materia orgánica. Sus efectos se producirían debido a la reacción con los grupos amino de las proteínas. Los compuestos a base de Glutaraldehído son de uso común como desinfectantes de alto nivel para equipos médicos tales como endoscopios, respiradores, citoscopios, hemostatos y equipos de anestesia y hemodiálisis, por no ser corrosivos ni dañar instrumentos ópticos; pero es muy irritante para piel y mucosas. Esto condiciona la utilización de antiparras, barbijo, guantes y delantales para la protección del personal. Debe emplearse solamente en locales bien ventilados.

Para obtener esterilización se debe mantener sumergido el material durante 20 a 30 minutos cuidando que la solución de glutaraldehído penetre por todo el sistema (poros, canales, etc.). Luego debe enjuagarse con agua estéril. Los preparados comerciales traen un activador para alcanzar un pH alcalino. La solución debe mantenerse tapada para evitar la propagación de vapores irritantes y permanece activa durante 14 a 28 días, siendo conveniente controlar la activación con monitoreos especiales. (Vives *et al*, 2004)

Formaldehído

Se usa tanto en fase gaseosa como en fase líquida. La solución acuosa (formol o formalina) contiene del 34 al 38% de principio activo. El formaldehído es *bactericida, tuberculicida y esporicida*, pero de acción más lenta que el Glutaraldehído. Se combina rápidamente con las proteínas y por lo tanto es menos efectivo en presencia de materia orgánica. Su uso como esterilizante y desinfectante está limitado por ser potencialmente carcinogénico. (Ídem)

Óxido de etileno

Es un gas soluble en agua con acción esporicida. Su actividad es por alquilación de ácidos nucleicos. Para utilizar este gas como esterilizante se debe contar con autoclaves y utilizar una

temperatura de 58°C durante 4 horas. Es un gas muy difusible y penetra papeles, celofán, cartón, fibras textiles y algunos plásticos; excepto el polietileno al que penetra muy poco. No atraviesa materiales cristalinos. Un factor que influye en la actividad del óxido de etileno es la humedad: se recomienda el uso de una humedad relativa del 30 al 40%.

El Oxido de Etileno es muy inflamable, por lo que se lo utiliza diluido en CO₂ u otro gas inerte. Otra dificultad que plantea su uso es la eliminación de residuos del gas que pudieran quedar retenidos en los elementos esterilizados. Estos residuos son altamente irritantes al contacto con la piel y se ha demostrado que es un carcinógeno potencial. Es de suma importancia realizar una correcta evaluación y estandarización de las condiciones a emplear, como por ejemplo: las autoclaves son especiales y dedicadas exclusivamente a este fin. Una esterilización “casera” en cajas metálicas en la que se rompe una ampolla de vidrio que contiene gas, es una mala práctica porque no permite controlar la concentración del gas ni las condiciones de temperatura o humedad y además expone a quien la efectúa a pérdidas de gas que pueden causar lesiones de córnea, dermatitis o efectos cancerígenos.

Se esteriliza con Oxido de Etileno el material termosensible que no soporta las temperaturas del autoclave convencional (vapor de agua) o de esterilización en seco, pero que puede soportar una temperatura de unos 50°C. Luego de esterilizar el material; éste debe permanecer “en cuarentena” durante un tiempo para asegurar la total eliminación del gas. La esterilización con Oxido de etileno no es útil cuando el material debe ser utilizado con relativa urgencia pues no se puede acortar el tiempo de cuarentena. **Es criminal utilizar óxido de etileno para la reesterilización de material descartable.** (Ídem)

Peroxígenos

Los más importantes son el peróxido de hidrógeno (agua oxigenada) y el ácido peracético. La actividad del **Peróxido de hidrógeno** depende de la concentración: al 6% se comporta como esporicida y al 3% es bactericida pero sólo ligeramente esporicida. Otro factor que influye en su actividad es su baja estabilidad, ya que se descompone en presencia de metales, sales metálicas, calor y agitación; es relativamente estable en presencia de exceso de ácidos. El agua oxigenada disponible comercialmente (peróxido de hidrógeno al 3%) es un desinfectante estable y efectivo. Las concentraciones del 3 al 6% se utilizan como desinfectantes para lentes de contacto blandas.

En el comercio el **Acido Paracético** se vende al 40%. Se considera más potente como esporicida con respecto al peróxido de hidrógeno.

El Peróxido de hidrógeno es útil para la limpieza de cierto tipo de úlceras o heridas y para el tratamiento de la gingivitis úlcero necrotizante no complicada. Efectos adversos Irritación de la piel o mucosas e hipertrofia de las papilas linguales en caso de uso prolongado como enjuague bucal. También se ha propuesto la producción de émbolos de oxígeno en el tratamiento perioperatorio. (Ídem)

Otros antisépticos

El **Nitrato de plata**, el **Permanganato de potasio**, los **Fenoles** y **Cresoles** y los **antisépticos mercuriales (distintos al Timerosal)** son drogas de medio o bajo nivel, de muy escaso uso o que se utilizan solamente para ciertas indicaciones especiales. (Ídem)

CAPÍTULO 3

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. HIPOTESIS

La leche de las vacas que reciban el producto a desarrollar contendrá inmunoglobulinas específicas contra los antígenos de la fórmula.

La leche de las vacas que reciban el producto desarrollado presentará menor frecuencia de casos de mastitis aguda pos parto.

Con la aplicación del producto desarrollado, se disminuirá la incidencia de mastitis a la apertura de lactancia al mismo tiempo que se inmunoestimulará a los becerros mediante la secreción de inmunoglobulinas presentes en la leche calostrual. Los ganaderos obtendrán una mejor calidad de leche y ahorro tanto en leche de descarte como en tratamientos para la infección.

3.2. OBJETIVOS

3.2.1. Objetivo general

Evaluar la capacidad bactericida y la respuesta inmune del producto por desarrollar en vacas al posparto y al abrir lactancia.

3.2.2. Objetivos particulares

3.2.2.1. Identificación y aislamiento de los patógenos menores y mayores de la cuenca lechera de Puebla

3.2.2.2. Caracterizar el o los patógenos menores, multiplicarlos y preservarlos.

Ya que crecieron los microorganismos patógenos se preservarán y multiplicarán para su atenuación y poder ocuparlos en el producto a desarrollar.

3.2.2.3. Demostrar la capacidad bactericida *in vitro* contra bacterias Gram positivas y negativas de referencia.

Demostración del efecto bactericida *in vitro* contra bacterias Gram positivas y negativas de referencia en la formulación del producto desarrollado

3.2.2.4. Demostrar la irritabilidad del antiséptico en un modelo de ratona lactante

Se inocularán ratonas lactantes con los antisépticos elegidos para observar el comportamiento micro y macroscópico de la glándula mamaria, antes de aplicarlo en las vacas. Las ratonas que se utilizarán serán cepa CD1 utilizada para hacer investigación en: Cáncer, fármacos, toxicología, anticuerpos, vacunas; la elección será al abrir lactancia y poder experimentar el producto adecuadamente.

3.2.2.5. Evaluar el comportamiento del o los productos a desarrollados en vacas al secado y al abrir lactancia.

Se desarrollará el producto final una vez probado el antiséptico elegido por sus características en combinación con los antígenos correspondientes a los microorganismos estudiados. Observar signos en las vacas inmunoestimuladas.

3.2.2.6. Medir la respuesta inmune contra los antígenos bacterianos de la formulación.

Se tomará muestra de sangre antes del secado de la vaca y al abrir lactancia para hacer un comparativo de la inmunoestimulación. La toma de muestra se hace con tubos vacutainer sin coagulante para extraer el suero por medio de una centrifuga

CAPÍTULO 4

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Descripción

El producto inmunoestimulante SecaVac por desarrollar, será una Suspensión intra mamaria para el control de la mastitis por gérmenes Gram positivos y negativos durante el periodo de secado. Será una jeringa de aplicación intramamaria para el periodo de secado. Su formulación contendrá ácidos pirimídicos que son aminopolisacáridos con enlaces peptídicos y azúcares. Su base de compuestos con actividad bactericida de amplio espectro.

La acción bactericida es por contacto con la pared celular de la bacteria en donde induce perforaciones y produce la muerte de bacterias oportunistas.

El vehículo es un hidrogel que permite la estabilidad y permanencia del producto en la cisterna de la glándula. Como innovación, incluye en su formulación los antígenos de bacterias causantes de mastitis *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. (ecoestaph, 2005) La presentación de antígenos por vía glandular pretende demostrar la inmunogenicidad de inmunoglobulinas G y A. El calostro de las vacas vacunadas con SecaVac®, contendrá concentraciones de las inmunoglobulinas preformadas y enriquecidas.

Composición de la vacuna EcoStaph.

La bacterina EcoStaph PM+3 es un biológico preparado con cuatro variables de *Escherichia coli* que expresan adhesinas y dos proteínas de *Staphylococcus aureus* como factores de adhesión, (*Lactococcus cb* y *Lactococcus fn*); la proteína de agregación y la de adhesión a la fibronectina. Será un producto inactivado con aldehídos (muerto) por lo que los microorganismos no se pueden multiplicar en el receptor de la vacuna. Se puede aplicar en cualquier etapa de la producción a vacas adultas. Si es aplicado en la etapa de lactancia se espera reducción de la producción de leche entre 7 al 10%. No tendrá reacciones colaterales locales ni sistémicas graves, dado el control de esterilidad y de concentración de endotoxinas. Contendrá el adyuvante PM+3, compuesto constituido por dos tipos de glucósidos inmunoestimulantes formulación desarrollada por Laboratorio de Ciencia y Tecnología Aplicada (Cytalabs)

4.2. Propiedades

La presentación de antígenos por vía glandular pretende demostrar la inmunogenicidad de inmunoglobulinas G y A

La protección bactericida de amplio espectro que ofrecerá la formulación, eliminará a gérmenes Gram negativos y positivos, presentes en la cisterna de la leche después de su aplicación intramamaria. La presentación de antígenos de células bacterianas activará los macrófagos durante la etapa temprana del secado, dará como resultado la inmunoestimulación y secreción de inmunoglobulinas que estarán presentes en la leche calostrada.

Los recién nacidos serán protegidos con inmunoglobulinas calostrales lo que redundará en índices superiores de sobrevivencia.

4.3. Desarrollo del producto

Método de análisis; determinación de la actividad anti microbiana para productos germicidas. Preparación y acondicionamiento de la muestra antes de realizar la prueba, efectuar dos resiembras de cada uno de los microorganismos de prueba, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli* e incubar 24 horas a 35°C. Las cepas referidas son de colección y empleadas como representantes de familias de Gram positivos y negativos. Consideramos se puede analizar cualquier bacteria. A partir de estos cultivos resembrar en tubos que contengan 12 ml de Agar Soya Trypticaseína, incubar 24 horas a 35°C.

Remover el crecimiento de cada tubo con 3ml de solución salina estéril, transferir el sobrenadante a un tubo de ensayo estéril y continuar diluyendo con la misma solución hasta obtener una suspensión que contenga de 75 a 125 x 10⁸ UFC/ ml.

Determinación de cuenta viable inicial. A un tubo con 9 ml de solución salina transferir 100µl de la suspensión de los microorganismos prueba obteniendo así una dilución 1/100 como lo marca la norma.

Efectuar las diluciones decimales necesarias para obtener placas que contengan entre 25 y 250 colonias. Tomar 1 ml de cada dilución y transferir a cajas de Petri estériles, agregar a cada placa 15 ml de Agar Soya Trypticaseína, homogenizar, permitir que solidifique, invertir las placas e incubar 24-48 horas.

Resultados: La dilución 10^{-8} , proporciona el número de colonias en el margen entre 25 a 250 colonias.
Dilución 10^{-8} de *Staphylococcus aureus* 78 colonias.

Numero de UFC/ml = Número de colonias X Factor de dilución
(# mínimo de células separables) $\frac{\quad}{\quad}$ ml sembrados en la placa

Número de UFC/ ml = $\frac{78 \times 10^{-8}}{1 \text{ ml}}$

Número de UFC/ ml = 78×10^8 de *Staphylococcus aureus*

Dilución 10^{-8} de *Escherichia coli* 138 colonias.

Número de UFC/ml = $\frac{138 \times 10^{-8}}{1 \text{ ml}}$

Número de UFC/ml = 138×10^8 de *Escherichia coli*
(Adaptación a la norma NMX – BB – 040 – SCFI – 1999)

4.4. Prueba de potencia de microorganismos

Desafío contra *Staphylococcus aureus*. Incubación 12 horas a 32° Centígrados

Parte superior de la caj Petri; producto libre 100µl. El cultivo de *Staphylococcus aureus*, fue destruido practicamente en toda su extensión, lo que sucedería en contacto con gérmenes en la cisterna de la glándula mamaria.

La parte inferior de la placa, aplicación de 100µl dentro de cilindro de plástico. Se debe notar el halo de inhibición en el crecimiento de *Staphylococcus aureus*

Se demuestran resultados semejantes ante el desafío con *Escherichia coli*. La menor capacidad bactericida está relacionada con la presencia de lípidos en la pared celular por ser del grupo Gram

negativos. No obstante se debe observar el efecto bactericida con amplios halos de inhibición. Tanto los *Staphylococcus* como los coliformes como *Escherichia coli*, son patógenos frecuentes en las ubres en el período de secado y responsables de mastitis en los primeros días de lactancia.

4.5. Preparación de la muestra problema

Para cada uno de los microorganismos de prueba; medir 9 ml del producto a probar y transferir a los tubos. Agitar en forma suave para re suspender e inocular a cada tubo, con 100 µl de la suspensión bacteriana a evaluar. Exactamente 30 segundos después de la inoculación, tomar 1 ml y transferir a cajas de Petri estériles y contar el número de colonias. Puede ocurrir que el efecto bactericida del producto en prueba sea muy eficiente y no de crecimiento de colonias bacterianas. En caso de que el número de bacterias fuera incontable, entonces se requiere de ajustar la concentración de bacterias.

Diluir hasta obtener placas que contengan 25 a 250 colonias, conforme lo establece la norma NMX-BB-040-SCFI-1999.

Preparar cada placa con 15 ml de Agar Soya Trypticaseina siguiendo la instrucción de la norma NOM-092-SSA1-1994, homogenizar, permitir la solidificación, invertir e incubar de 24-48 horas a 35-37° C

Resultados

Determinación del % de reducción. Promediar los resultados de las placas de la cuenta viable inicial y de las células sobrevivientes y calcular el % de reducción.

$$\% \text{ de reducción} = \frac{100 - S}{C.V.} \times 100$$

C.V.

S= Células sobre vivientes UFC/ml

C.V. Cuenta viable inicial

Referencias NMX-BB-040-SCFI-1999, NOM-092-SSA1-1994

4.6. Prueba de potencia de antisépticos

4.6.1. Isotiazolinonas

El nivel de empleo máximo recomendado como preservador, de acuerdo a la escala Kathon CG, es de 0.1% del peso del producto que corresponden a 15 partes por millón del ingrediente activo, para los productos de lavado. Para los productos donde la permanencia es mayor, la concentración aceptada es la de 0.05% equivalente a 7.5 partes por millón. La concentración empleada es crítica para con la interacción y estabilidad de los preservadores.

Propiedades microbiológicas.- Las Isotiazolinonas son compuestos químicos heterocíclicos con actividad microbiciada de amplio espectro. Algunas de las combinaciones de estos compuestos han sido empleados como ingredientes en productos de higiene y cosmetología en el hombre. Las combinaciones de cloro metil isotiazolinona y la 2 metil 4 isotiazolinona en proporciones 3:1 conocidas como Kathon son las de empleo más frecuente (Burnett, 2010). No obstante su aprobación en los Estado Unidos de Norte América y en Europa por las autoridades correspondientes, se ha informado de riesgos de inducción de dermatitis alérgica (Rastogi, 1990). Las Isotiazolinonas carecen de efectos mutagénicos y/o carcinogénicos, poseen actividad microbiciada de amplio espectro además inducen lisis a hongos y levaduras. La concentración de Isotiazolinonas empleada es crítica para con la interacción con los microorganismos y la estabilidad en suspensiones. La concentración recomendada como preservador es de 0.05% equivalente a 7.5 partes por millón donde la permanencia es mayor a 24 horas (Rastogi, 1990). Se desconoce el grado de irritabilidad en las mucosas.

4.6.2. Clorhexidina

La clorhexidina fue desarrollada en Inglaterra en 1954. Es un compuesto de bisbiguanida catiónica, la forma en sal el digluconato es soluble en agua. Al ser una molécula catiónica, su actividad puede ser reducida por jabones naturales, compuestos aniones inorgánicos, surfactantes no iónicos. La actividad antimicrobiana está relacionada a la alteración del equilibrio osmótico y precipitación de la membrana citoplásmica. La clorhexidina es ampliamente activa contra bacterias Gram positivas y negativas, anaerobias facultativas y aerobias, en menor medida contra hongos y levaduras. (Batra y Cooper usaron gluconato de clorhexidina al 1 % en las fosas nasales en pacientes con infección

por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina. El protocolo con el antiséptico se asoció con la reducción del 70% en la adquisición de las cepas (Batra R *et al.*, 2010). Entre características sobresalientes está la actividad *in vitro* contra virus encapsulados, como el herpes simple, el VIH, el citomegalovirus, el de la influenza, el virus sincitial respiratorio.

La clorhexidina es pobremente absorbida a través de la piel intacta, no se acumula en el organismo y es mínimamente metabolizada. La clorhexidina no es mutagénica ni carcinogénica. Es un desinfectante de uso frecuente en Estomatología sobre la mucosa de la cavidad oral (Russell, *et al.*, 1999) La clorhexidina tiene una larga historia como un producto seguro y efectivo, con una amplia actividad antiséptica. En diferentes estudios se han presentado datos sobre el uso de productos a base de clorhexidina para la antisepsia y la desinfección en diferentes áreas. En la mayoría se ha encontrado superioridad de este compuesto al compararlo con otros antisépticos, en la prevención y control de infecciones asociadas a la atención en salud (May, *et al.*, 2011). Se desconoce el grado de irritabilidad sobre otras mucosas como las de la glándula mamaria.

4.6.3. Radicales súper óxido

Las Soluciones de Super-Oxidación (SSO) existen en diversos grados de potenciales de hidrógeno; ácido, neutro o alcalinas. La concentración de cloro y el potencial de oxidación-reducción, son determinantes de la actividad germicida, la vida en anaquel así del potencial de corrosión. Las SSO entre pH de 2 a 4 tienen propiedades microbicidas altos como resultado de la cantidad de cloro libre activo, mismo que es superior a las 650 ppm. Sin embargo estas SSO son altamente corrosivas, inestables y de corta vida en anaquel. Las SSO alcalinas también tienen propiedades antimicrobianas aunque también son inestables y de menor eficacia que las SSO ácidas. La SSO Microdacyn 60MR de pH neutro es una solución estable, no inflamable y no corrosiva. Es bactericida contra microorganismos Gram positivos y negativos, virus y levaduras. Su vida media en anaquel es de 24 meses. En las bacterias, Microdacyn 60MR desestabiliza la pared celular como consecuencia de choque osmótico en la célula y desnaturaliza las proteínas. Los radicales súper óxidos no son mutagénicos o carcinogénicos (Leafar *et al.*, 2004.)

Cada producto se probará en ratona lactante

4.7. Formulación del producto

Agua destilada, *Lactococcus cb*, *Lactococcus fn*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulasa negativa*, *Streptococcus galctie*, *E coli 17*, *E coli 19*, *E coli min*, *E coli qro*, Isotiazolinona, Cloruro de bencetanio, PM+3, Glicerina, Goma xantana, APS, Aceite de ricino, Aceite de coco, Spam.

Elaboración: esterilizar el agua destilada; agregar todos los antígenos al agua con agitación constante; incorporar PM+3; agregar la isotiazolinona y cloruro de bencetanio; incorporar APS y dejar agitando; incorporar la goma xantana disuelta en la glicerina; calentar los aceites por separado hasta fusión, agregar Spam obteniendo así la sustancia oleosa; agregar sustancia oleosa a la acuosa.

4.8. Fraccionamiento de inmunoglobulinas mediante precipitación

Las fracciones crudas de inmunoglobulinas, luego de dializarlas con una solución tampón adecuada, pueden ser utilizadas directamente. En otras situaciones, las fracciones crudas constituyen el primer paso en la producción de preparaciones altamente purificadas de inmunoglobulinas.

El objetivo de la práctica es obtener la fracción de inmunoglobulinas totales (g-globulinas) del suero de vacas al pre y post parto inmunizados empleando la técnica de precipitación de proteínas por sulfato de amonio al 40%.

Procedimiento:

Preparación de la solución saturada de sulfato de amonio:

Prepare con anticipación la solución de sulfato de amonio ya que requiere varias horas para que la solución se sature completamente.

1. Diluya 500g de sulfato de amonio (grado para análisis) en 500 ml. de agua destilada.
2. Caliente la mezcla a 50°C con agitación continua, hasta que la sal se disuelva completamente y filtre rápidamente mientras la solución está aún caliente. Deje enfriar la solución durante varias horas o durante la noche a temperatura ambiente mientras el sobrenadante se satura. En este proceso se formaran cristales y estarán presentes en el envase mientras esté saturada la solución. El contenido de sulfato de amonio en la solución saturada depende de la temperatura ($d=1.2450$ a 25°C).

3. El pH de esta solución es aproximadamente 5 y debe ser ajustado a pH 7.2 añadiendo amonio para evitar la adición de iones extraños.

Método de precipitación de inmunoglobulinas totales del suero

1. Determine el volumen del suero a procesar (X ml).

2. Diluya el suero 1:2 en PBS para obtener un volumen final de 2X ml.

3. Transfiera el suero diluido (2X ml) a un vaso de precipitación sobre un baño de hielo.

Añada la barra de agitación y colóquelo sobre un agitador magnético. Con una bureta deje caer lentamente y con agitación continua 2X ml de una solución saturada de sulfato de amonio a pH 7.8 (ajustado justo antes de usarla), para obtener una concentración final de sal de 50% de saturación. El sulfato de amonio debe ser añadido lentamente para asegurar que la concentración local en el sitio donde cae la gota no exceda la concentración de la sal deseada, evitando así la precipitación instantánea de la albúmina junto con la fracción de g globulinas precipitada. Agite continuamente la solución evitando la formación de burbujas y espuma.

4. Mantenga la muestra precipitada durante 30 minutos a 4°C.

5. Resuspenda la fracción de g globulinas precipitada agitando moderadamente durante 5 minutos.

6. Centrifugue la mezcla a 10.000 g durante 15 minutos a 4°C.

7. Descarte cuidadosamente el sobrenadante que contiene la fracción de albúmina y resuspenda la fracción de g globulinas precipitada en un volumen de PBS igual al de la muestra original (X ml). Si existe algún material insoluble centrifugue para eliminarlo.

8. En el baño de hielo y con agitación continua reprecipite la fracción de g globulinas añadiendo lentamente un volumen equivalente a dos terceras partes del volumen de la muestra ($2/3 X$ ml) de solución saturada de sulfato de amonio para obtener una saturación final de la sal al 40%.

9. Mantenga la fracción de g globulinas precipitada a 4°C durante 30 minutos o más.

10. Centrifugue a 10.000 g durante 15 minutos a 4°C.

11. Repita los pasos del 7 al 11 de reprecipitación en solución saturada de sulfato de amonio al 40%, dos veces más.

12. Descarte el sobrenadante (fracción de pseudoglobulina) y resuspenda la fracción de g globulinas precipitada en PBS, $1/10 X$ ml. del volumen original.

13. Transfiera la fracción de g globulinas a una bolsa de diálisis previamente lavada con agua destilada.

14. Dialice contra solución salina 0.85% realizando 6 cambios de la misma durante 24a 36 horas a 4°C, hasta que el sulfato de amonio no sea detectable.
15. Examine el dializante para verificar la presencia de sulfato de amonio de 2 a 3 horas después de cambiar la solución salina
16. Después de completar la diálisis retire la solución de g -globulinas del tubo de diálisis y centrifugue para remover cualquier partícula insoluble, a 1400 g durante 10 minutos.
17. Determine la concentración de las proteínas de una dilución 1/10 de la fracción de g globulinas utilizando el método de Lowry o mida su absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro equipado con luz U.V. Nota para el cálculo de proteínas: a 280 nm una D.O.=1 tiene una concentración de 0.74 mg/ml g globulinas.
18. Almacene la fracción de g -globulinas concentrada en presencia de azida de sodio al 0.02%.

Ya purificadas las proteínas se mide la densidad de proteínas por medio de un Refractómetro. Se coloca una gota de suero en el refractómetro y medirá la densidad de inmunoglobulinas

Se cuantificarán proteínas para sacar un promedio de variación en porcentajes de inmunoglobulinas obtenidas antes de después de la inmuoestimulación.

4.9. Cuantificación de proteínas por método Bradford

Se basa en la unión de un colorante, Comassie Blue G-250 (también Serva Blue) y la proteína albúmina a las proteínas. El colorante, en solución ácida, existe en dos formas una azul y otra naranja. Las proteínas se unen a la forma azul para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre. Este método es sensible (1-15 µg), simple, rápido, barato y pocas sustancias interfieren en su determinación. Entre las sustancias que interfieren están los detergentes y las soluciones básicas.

Equipo necesario proporcionado por CIBIOR

Procedimiento:

1. Purificadas las proteínas de los sueros obtenidos se vuelve a centrifugar el cultivo a 5000 rpm/10 min.
2. Desechar sobrenadante

3. Lavar 2 veces con PBS. Por cada muestra se medirán por triplicado para evitar errores en el momento de pipetear o al hacer diluciones, se toman los resultados similares.
4. Resuspender 1 ml en PBS y medir densidad óptica para leer absorbancia a 595 nm en Espectrofotómetro Jenway G105 UY/Vis
5. Para la prueba de Bradford, es necesario mezclar albúmina, la muestra, PBS y finalmente el reactivo Bradford. Ya que se mezcló todo, se deja reposar de 5 – 10 min y se lee.
6. Se determina la cantidad de proteína necesaria mediante una curva de calibración (Absorbancia 595 nm & µg de albúmina), para utilizar finalmente en la prueba ELISA

4.10. Prueba de ELISA

La técnica **ELISA** (acrónimo del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*: ‘ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas’) es una técnica de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable, como cambio de color o algún otro tipo; en ocasiones, con el fin de reducir los costos del ensayo, nos encontramos con que existe un anticuerpo primario que reconoce al antígeno y que a su vez es reconocido por un anticuerpo secundario que lleva enlazado la enzima anteriormente mencionada. La aparición de colorantes permite medir indirectamente mediante espectrofotometría el antígeno en la muestra.

Se usa en muchos laboratorios para determinar si un anticuerpo particular está presente en la muestra de sangre de un paciente.

ELISA indirecto por anticuerpo

1. Agregar en los pozos necesarios de la placa 100 µl de solución de adhesión ya con el antígeno correspondiente, incubar 1 hora.
2. Añadir 300 µl de BSA e incubar por 15 min con agitación moderada.
3. Añadir 100 µl del primer anticuerpo, incubar 1 hora con agitación moderada y hacer 3 lavados con solución de lavado, entre cada lavado es necesario incubar 5 minutos con agitación moderada.
4. Se añade el segundo anticuerpo 100 µl, se incuba 1 hora y se vuelven a hacer 3 lavados
5. Se agrega solución sustrato, se incuba de 5 – 10 minutos hasta esperar reacción de color, si es necesario se añade solución de paro.

Se realizará un ELISA como resultado final para comprobar si hubo inmunoestimulación

Preparación De Reactivos

Mezclar todas las soluciones el día de uso. Los volúmenes dados son suficientes para una placa de 96 pozos. Los volúmenes más grandes se pueden preparar para la detección de placa múltiple mediante el aumento de los volúmenes se indica a continuación en consecuencia, (es decir, los volúmenes se multiplican por 2 para dos placas, de 3 platos, etc.)

1. 1X solución de recubrimiento: Diluir la solución de revestimiento concentrado 1/10 con una calidad de reactivo agua (es decir, mezcla de 1 ml de solución de recubrimiento Concentrado + 9 ml de reactivo de la calidad del agua). Nota: Si los cristales aparecen en 10X concentrado, se calienta a temperatura ambiente o 37°C con mezcla de redisuelve.

2. Diluyente 1X BSA / disolución de bloqueo: Para hibridoma Screening: Diluir BSA diluyente / Bloqueo Concentrado Solución 1/5 con agua de calidad reactivo (es decir, para el bloqueo, mezclar 3 ml de BSA diluyente / solución de bloqueo Concentrado + 12 ml de agua de calidad reactivo; para diluyente de anticuerpo, mezclar 0,5 ml de BSA Diluyente / solución de bloqueo Concentrado + 4,5 ml de reactivo de agua de calidad). Para otros ensayos: Diluir BSA Diluyente / Concentrado de solución de bloqueo 1/10 con el reactivo la calidad del agua (es decir, mezcla de 5 ml de BSA diluyente / Bloqueo Concentrado Solución + 45 ml reactivo de la calidad del agua). Nota: Si los cristales aparecen en 10X concentrado, calido a la habitación temperatura o 37°C con mezclado para redisolver.

3. lavado 1X Solución: Solución de lavado Diluir el concentrado 1/20 con agua de calidad reactivo (es decir, mezclar 15 ml de solución de lavado Concentrado + 285 de agua de calidad reactivo ml).

Lavado diluido La solución es estable durante al menos 6 meses a temperatura ambiente. Un mínimo de 87 ml de la Se requiere solución 1X por placa para la detección directa y hibridoma. 173 ml de la 1X Se requiere solución para los ensayos indirectos o de captura.

4. 50% Solución de glicerol: Listo para usar.

5. secundaria solución de anticuerpo: Rehidratar anticuerpo marcado con fosfatasa con 1 ml de 50% de glicerol. La solución de conjugado resultante 0,1 mg / ml puede ser almacenado a 2-8 ° C o - 20 ° C durante al menos 1 año. Diluir a la concentración deseada con 1X BSA Diluyente /

Bloqueo Solución (a partir del paso 2). Para la mayoría de los ensayos de una concentración de 0,1 a 2 ug / ml es suficiente. 6. sustrato en: Preparar inmediatamente antes de su uso. Mezclar 5 ml de solución A BluePhos y 5 ml de la solución B. BluePhos

7. fosfatasa Solución de parada: Diluir BluePhos solución de parada Concentrado décimo con el reactivo la calidad del agua (es decir, mezcla de 1 ml de solución de parada BluePhos concentrado + 9 ml calidad del reactivo agua).

8. Las muestras: Diluir las muestras en 1X Tampón de Recubrimiento de fondo para mantener a un mínimo.

4.11. Evaluación de Secovac en vacas al secado y al abrir lactancia.

Criterios de selección:

9 vacas de la raza Holstein Friesian estabuladas en cuenca lechera de Puebla, específicamente en la región de Atlixco Puebla.

Resultados esperados

Se examinarán las glándulas mamarias así como las propiedades físicas de la leche por cuarto de cada vaca después de terminado el calostro y la células somáticas mediante prueba de California o electro conductividad por cuarto. En caso de abrir lactancia con inflamación e infección, se procederá a la toma de muestra de leche resguardo en refrigeración y envío a CyTALabs en un solo grupo con identificación de tratamiento.

Las muestras de leche que detecten alteraciones físicas, serán evaluadas desde el punto de vista microbiológico en CyTALabs. y el Centro de Investigación Biomédica de Oriente (CIBIOR) por convenio interinstitucional con el Colegio de Postgraduados Campus Puebla (COLPOS)

Con la aplicación del producto desarrollado, se disminuirá la incidencia de mastitis a la apertura de lactancia al mismo tiempo que se inmunoestimulará a los becerros mediante la secreción de inmunoglobulinas presentes en la leche calostrada. Los ganaderos obtendrán una mejor calidad de leche y ahorro tanto en leche de descarte como en tratamientos para la infección.

Sistema estadístico utilizado: SAS y Distribución t de Student

CAPÍTULO 5

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

ALTERNATIVAS PARA SUSTITUCIÓN DE ANTIBIÓTICOS POR ANTISÉPTICOS EN LA APLICACIÓN POR VÍA INTRADUCTAL PARA VACAS EN LA ETAPA DEL SECADO

Liz Sarahy Pérez Martell ¹, Beatriz Petlacalco Sánchez ², Víctor Rodríguez Hernández ¹, Antonio Macías López¹, José Guadalupe Herrera Haro³
Pablo Hernández Jáuregui ^{2*}

1.- Colegio de Posgraduados *campus* Puebla Km. 125.5 carretera federal México-Puebla (actualmente Boulevard Forjadores de Puebla), C.P. 72760, Puebla, Puebla, México. Teléfonos: (222) 285 07 38, 285 14 42, 285 14 43, 285 14 45, Correos electrónicos: edar@colpos.mx

2.- CyTA Labs Blv Hermanos Serdán 627 A Col Francisco I Madero, C.P. 72130, Puebla, Puebla, México Teléfono (222) 379 67 89

3.- Colegio de Postgraduados *campus* Montecillo Carretera Mexico-Texcoco KM. 36.5, Montecillo, 56230 Montecillo, MEX Teléfono:01 55 5804 5980

*** Autor para correspondencia pablo@cytalabs.com www.cytalabs.com**

RESUMEN

Los factores de riesgo para la adquisición de infecciones en la glándula mamaria son multifactoriales, producen pérdidas millonarias por la baja producción de leche y/o el descarte de la vaca. La incorrecta aplicación de los antibióticos y los mecanismos genéticos bacterianos de creación de resistencia dan como resultado la limitación en su uso. El propósito del presente trabajo fue el de investigar los efectos de productos antisépticos sobre la mucosa en la glándula mamaria, en un modelo de ratona lactante y en la glándula mamaria de bovinos durante la etapa del secado, para analizar la calidad de leche en el post parto inmediato. Las Isotiazolinonas (Iso), el digluconato de clorhexidina (Clorh) y los soluciones super óxido (SSO) compuestos químicos con actividad microbicida de amplio espectro, fueron aplicados en forma individual en las ratonas y las Iso en las vacas al secado. En las

ratonas, Iso y SSO indujeron vacuolación citoplásmica del epitelio acinar. Clorh indujo inflamación, edema y hemorragia. Las Iso como tratamiento intraductal en las vacas al secado resultó en leche pos parto libre de bacterias contaminantes. Se analizan los factores de resistencia a los biosidas y se proponen como alternativas al uso de antibióticos.

Palabras clave; Antisépticos intraductal, glándula mamaria, bovinos al secado

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades que afectan a la ubre del ganado bovino producen pérdidas millonarias por la baja producción y en ocasiones el descarte de la vaca cuando su costo de mantenimiento resulta inoperable. La mastitis infecciosa es la más costosa del ganado tanto de doble propósito como el especializado lechero. En el caso de los bovinos los factores de riesgo para la adquisición de infecciones en la glándula mamaria son multifactoriales. Factores de deficiencia de elementos minerales como el Zinc el Magnesio y el Selenio en las dietas nutricionales. Infestación por parásitos y desnutrición relacionada. Estrés ambiental como el choque calórico. El sobre ordeño con lesiones en la piel del pezón que generan deficiencias en el cierre del esfínter. Contagio manual de bacterias de hábitat de la piel por los operadores en sala de ordeño por deficiente higiene y por Veterinarios y/o técnicos en la aplicación de tratamiento intraductal (García y Ochoa, 1987).

El empleo de los antibióticos ha permitido que mediante su aplicación ordenada se controlen y eliminen cuadros de infección por bacterias de alto índice de patogenicidad y virulencia tanto en el hombre como en los animales domésticos. En forma lamentable el desorden en la aplicación y los mecanismos genéticos bacterianos de creación de resistencia, limitan su tiempo de vida como eficiente y reducen la capacidad clínica de obtención de resultados en favor de los pacientes (Sumano *et al.*, 2007).

Los antisépticos son biosidas que están diseñados para ser aplicados en forma tópica sobre los tejidos vivos en forma principal sobre la epidermis (Russell, *et al.*, 1999). Para seleccionar antisépticos que pudieran ser empleados en la cisterna de la glándula mamaria, se buscaron productos que tuvieran datos de ser aplicados sobre las mucosas y que los productos no fueran mutagénicos y/o carcinogénicos.

El propósito del presente trabajo fue el de investigar los efectos de productos antisépticos al ser aplicados sobre la mucosa en la glándula mamaria en un modelo de ratona lactante. Una vez definido que el o los productos son de baja o nula capacidad de irritación, los antisépticos fueron aplicados en la glándula mamaria de bovinos durante la etapa del secado para analizar en el post parto inmediato, la presencia de microorganismos y calidad de leche.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de antisépticos

Isotiazolinonas

Las Isotiazolinonas son compuestos químicos heterocíclicos con actividad microbiciada de amplio espectro. Algunas de las combinaciones de estos compuestos han sido empleados como ingredientes en productos de higiene y cosmetología en el hombre. Las combinaciones de cloro metil isotiazolinona y la 2 metil 4 isotiazolinona en proporciones 3:1 conocidas como Kathon son las de empleo más frecuente (Burnett y Bergfeld, 2010). No obstante su aprobación en los Estados Unidos de Norte América y en Europa por las autoridades correspondientes, se ha informado de riesgos de inducción de dermatitis alérgica (Rastogi, 1990).

Las Isotiazolinonas carecen de efectos mutagénicos y/o carcinogénicos, poseen actividad microbiciada de amplio espectro además inducen lisis a hongos y levaduras. La concentración de Isotiazolinonas empleada es crítica para con la interacción con los microorganismos y la estabilidad en suspensiones. La concentración recomendada como preservador es de 0.05% equivalente a 7.5 partes por millón donde la permanencia es mayor a 24 horas (Rastogi, 1990). Se desconoce el grado de irritabilidad en las mucosas.

Clorhexidina

La clorhexidina fue desarrollada en Inglaterra en 1954. Es un compuesto de bisbiguanida catiónica, la forma en sal el digluconato es soluble en agua. Al ser una molécula catiónica, su actividad puede ser reducida por jabones naturales, compuestos aniones inorgánicos, surfactantes no iónicos. La actividad antimicrobiana está relacionada a la alteración del equilibrio osmótico y precipitación de la membrana citoplásmica. La clorhexidina es ampliamente activa contra bacterias Gram positivas y negativas, anaerobias facultativas y aerobias, en menor medida contra hongos y

levaduras. Batra y col. usaron gluconato de clorhexidina al 1 % en las fosas nasales en pacientes con infección por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina. El protocolo con el antiséptico se asoció con la reducción del 70% en la adquisición de las cepas (Batra R *et al.*, 2010). Entre características sobresalientes está la actividad *in vitro* contra virus encapsulados, como el herpes simple, el VIH, el citomegalovirus, el de la influenza, el virus sincitial respiratorio.

La clorhexidina es pobremente absorbida a través de la piel intacta, no se acumula en el organismo y es mínimamente metabolizada. La clorhexidina no es mutagénica ni carcinogénica. Es un desinfectante de uso frecuente en Estomatología sobre la mucosa de la cavidad oral (Russell, *et al.*, 1999) La clorhexidina tiene una larga historia como un producto seguro y efectivo, con una amplia actividad antiséptica. En diferentes estudios se han presentado datos sobre el uso de productos a base de clorhexidina para la antisepsia y la desinfección en diferentes áreas. En la mayoría se ha encontrado superioridad de este compuesto al compararlo con otros antisépticos, en la prevención y control de infecciones asociadas a la atención en salud (May, *et al.*, 2011). Se desconoce el grado de irritabilidad sobre otras mucosas como las de la glándula mamaria.

Radicales súper óxido

Las Soluciones de Super-Oxidación (SSO) existen en diversos grados de potenciales de hidrógeno; ácido, neutro o alcalinas. La concentración de cloro y el potencial de oxidación-reducción, son determinantes de la actividad germicida, la vida en anaquel así del potencial de corrosión. Las SSO entre pH de 2 a 4 tienen propiedades microbicidas altos como resultado de la cantidad de cloro libre activo, mismo que es superior a las 650 ppm. Sin embargo estas SSO son altamente corrosivas, inestables y de corta vida en anaquel. Las SSO alcalinas también tienen propiedades antimicrobianas aunque también son inestables y de menor eficacia que las SSO ácidas. La SSO Microdacyn 60MR de pH neutro es una solución estable, no inflamable y no corrosiva. Es bactericida contra microorganismos Gram positivos y negativos, virus y levaduras. Su vida media en anaquel es de 24 meses. En las bacterias, Microdacyn 60MR desestabiliza la pared celular como consecuencia de choque osmótico en la célula y desnaturaliza las proteínas. Los radicales súper óxidos no son mutagénicos o carcinogénicos (Leafar *et al.*, 2004.)

Modelo para definir el grado de irritación mucosal

Entre los animales de laboratorio que semejan tener datos anatómicos de pezones similares a los bovinos, se encuentra la hembra del ratón de laboratorio, *Mus musculus*. La aplicación de productos vía el conducto galactóforo ha sido empleada desde los años 70as para múltiples estudios (Chandler, 1970. Anderson, 1974). En el presente trabajo se emplearon siete ratonas de la cepa CD1 provenientes de su producción controlada libre de patógenos específicos, Bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por cada producto a ensayar. Las ratonas de primera lactancia fueron anestesiadas con una mezcla de Ketamina al 10%, Xilacina al 2% en solución salina estéril, la piel abdominal rasurada y desinfectada para que con el apoyo de un microscopio estereoscópico e instrumental de microcirugía, se introdujera en cada glándula cuarta izquierda 100 µl de cada producto a ensayar. La glándula contralateral cuarta derecha recibió como placebo la misma cantidad en volumen de solución salina isotónica estéril. Los gazapos fueron retirados para su ulterior sacrificio mediante exposición a cloroformo e hipotermia. A las 24 horas pos aplicación, se procedió al sacrificio de las ratonas previa exposición al cloroformo, por dislocación cráneo cervical. Se realizó la disección, peso y fotografía de las dos glándulas cuartas de cada ratona y se fijaron en solución de formaldehído al 10% amortiguado por 48 horas. Las glándulas se analizaron en forma macroscópica y en secciones obteniendo una de ellas en sitios similares para el proceso histológico de rutina e inclusión en parafina. Las secciones de entre 4 a 5 micras fueron teñidas con Hematoxilina y Eosina y observadas en 10 campos diferentes con objetivo 40 X para el conteo de células presentes en la luz alveolar y la obtención de datos generales de cambios y/o alteraciones.

Criterios de selección de las vacas en fase de pre parto y aplicación intramamaria

Se seleccionaron nueve vacas próximas a secar de Atlixco Puebla con diagnóstico de gestación por palpación de 7 meses. Las vacas fueron elegidas por el productor por la baja producción de leche en lactancias anteriores por haber padecido mastitis en el posparto inmediato.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los antisépticos son considerados como productos con la capacidad de destruir o inhibir a los microorganismos cuando son aplicados en tejidos vivos como la piel y en ocasiones sobre superficies de la piel desprovista de la epidermis. Algunos de ellos como el Iodo/iodóforos así como otros

derivados de Iodo y la clorhexidina se han empleados en la desinfección local sobre las mucosas como la oral y la faríngea. El tiempo de exposición sobre las mucosas, las diluciones y pH de las mismas, son determinantes para reducir el efecto de irritación sobre las mucosas. Entre los productos desinfectantes, el pH y el grado de ionización de la disociación de los productos, facilitan su efecto bactericida al permeabilizar las membranas celulares, así que los compuestos aniónicos son de mayor eficiencia en soluciones de pH ácido mientras que los catiónicos lo realizan en concentraciones de pH alcalinas (Bosquet, 2006). Estas particularidades deben ser tomadas en consideración para emplear antisépticos en la glándula mamaria dado que en forma obligada habrá contacto entre los compuestos desinfectantes con la leche residual y *detritus* celulares lo que en cada caso en particular de tratamiento se presentarán variables individuales en el pH local.

Ha sido de uso ancestral la aplicación de radicales super óxido como el “agua oxigenada” sobre heridas expuestas proporcionan desinfección y coagulación. En soluciones diluidas se aplica en mucosas bucofaríngeas. El peróxido de hidrógeno es eficaz en su efecto biosida para con partículas virales, bacterias y sus esporas, levaduras. Entre las bacterias Gram positivas el efecto bactericida del peróxido de hidrógeno es mayor que con las bacterias Gram negativas. El mecanismo de acción de la solución de peróxido de hidrógeno está relacionada con la interacción de radicales libres OH y los lípidos, ya sean constituyentes de la pared celular de bacterias o de células eucariotas del huésped. Al romper la barrera de la envoltura celular, los radicales libres desintegran proteínas del citoplasma y del núcleo (Bosquet, 2006). La presencia de catalasa entre las bacterias de ambos grupos y las bajas concentraciones empleadas como biosida puede ser la causa de tolerancia a estos compuestos (Russell *et al.*, 1999). Los radicales libres son también un mecanismo natural de desintegración de proteínas en el interior de fagosomas y lisosomas citoplásmicos de las células inflamatorias. El mecanismo de acción bactericida no tiene hasta el actual conocimiento resistencia de los microorganismos hacia los compuestos oxidativos por lo que los postula como productos de gran potencialidad para uso continuo como bactericidas en el manejo y tratamiento de la glándula mamaria de los bovinos, ovinos y caprinos.

El gluconato de clorhexidina es un producto de amplia acción bactericida, sin embargo nulo efecto esporicida. Se emplea en soluciones entre 0,1 al 0,5 % en solución acuosa en la clínica de Estomatología y Ginecología en el humano. El gluconato de clorhexidina se absorbe y difunde a

través de las membranas y da lugar a la precipitación de las proteínas. La irritación a la piel intacta es baja en donde su absorción es también limitada cuando la epidermis es íntegra. En ocasiones se ha informado de irritación a mucosas como la conjuntival y corneal. Su uso está prescrito en o para tratamientos de oído medio (Bosquet, 2006) (Russell *et al*, 1999)

Los productos tenso activos catiónicos como las Isotiazolinonas son derivados de las sales Biguanidinas. Su buena solubilidad en agua les permite su difusión y contacto con las membranas de las células bacterinas, hongos y algunos virus con envoltura lipídica, en donde induce alteraciones y precipitación de las proteínas (Russell *et al*, 1999). Su capacidad microbicida se limita por inactivación al contacto con jabones y materia orgánica. Algunas Isotiazolinonas recibieron su aprobación como uso microbicida por la “Food and Drug Administration FDA de los United States of America USA.

Los tres productos del presente ensayo; Clorhexidina, Radicales super óxido e Isotiazolinona dieron halos de inhibición ante el reto del crecimiento de *Staphylococcus aureus* y de *Escherichia coli*. Sin embargo la clorhexidina supera en 13 milímetros el halo que inducen los radicales oxido y la Isotiazolinona supera los 15 milímetros. (Cuadro 1).

Cuadro 1. Relación de halos de inhibición en milímetros ante el desafío de los desinfectantes contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*

Producto	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
Clorhexidina 0.12%	20mm	22mm
Soluciones super óxido	7mm	7mm
Isotiazolinona	24mm	22mm

Resultado expresado en medición del halo de inhibición del crecimiento en contacto por difusión de 100 µl del biosida en cilindros por 24 horas a 30 C° microorganismo. *Staphylococcus aureus* =

70 x 10⁸ UFC/ml *Escherichia coli* = 89 x10⁸ UFC/ml siembra masiva sobre el Agar con aplicación de hisopo previo a colocación del cilindro y su contenido con biosida.

En la prueba de contacto en suspensión por 30 segundos entre bacterias y el biosida regulado por la secretaría de Salud NOM-BB-040-SCFI-1999, los tres productos mostraron inhibición del crecimiento al 100%, lo que les califica como excelentes productos biosidas. La norma oficial referida es el método para evaluar la eficiencia de un desinfectante y/o antiséptico (Cuadro 2).

Cuadro 2. Prueba de potencia inhibición de crecimiento en suspensión

Producto	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
Clorhexidina 0.12%	100%	100%
Radic. super óxido	100%	100%
Isotiazolinona	100%	100%

Resultado expresado en % de reducción en 30 segundos de contacto del antiséptico con el microorganismo. *Staphylococcus aureus* = 70 x 10⁸ UFC/ml *Escherichia coli* = 89 x10⁸ UFC/ml NOM-BB-040-SCFI-1999

Isotiazolinona

Después de la aplicación intraductal de 10 µl de Isotiazolinona por 24 horas en la glándula N4 izquierda y como testigo la aplicación de la misma cantidad y tiempo de solución salina isotónica estéril en la glándula derecha, no se observaron cambios significativos respecto al tamaño color y textura entre el grupo tratado con el biosida y el grupo testigo con solución salina por lo que se deduce que la Isotiazolinona aplicada no indujo cambios significativos. (Figura 1a).

La isotiazolinona es un desinfectante aprobado por la FDA de los Estados Unidos de Norte América para desinfección de materiales en contacto con frutas por su inocuidad respecto a mutagénesis y carcinogénesis. En el ensayo realizado como desinfectante en la glándula mamaria

de ratona se observaron flujo de polimorfonucleares neutrófilos a las luces alveolares en relación a concentración de la isotiazolinona (datos no mostrados). La dilución y ajuste del producto biosida de baja irritabilidad podría ser un candidato a ser empleado como sustituto de sales antibióticas en la glándula mamaria.

El estudio al microscopio de luz de una sección de glándula mamaria de ratona tratada con 100 µl de Isotiazolinona vía el conducto galactóforo por 24 horas, los acinos glandulares se encuentran limpios de reducto de leche y ausencia de células inflamatorias. El epitelio de revestimiento muestra vacuolación intra citoplásmica generalizada que sugiere ser respuesta a la presencia de la Isotiazolinona. Este cambio aparentemente no es destructivo y podría ser reversible. En el intersticio se advierte congestión vascular y cambios de involución glandular relacionados a la suspensión de lactancia por 24 horas (Figura 2a).

Clorhexidina

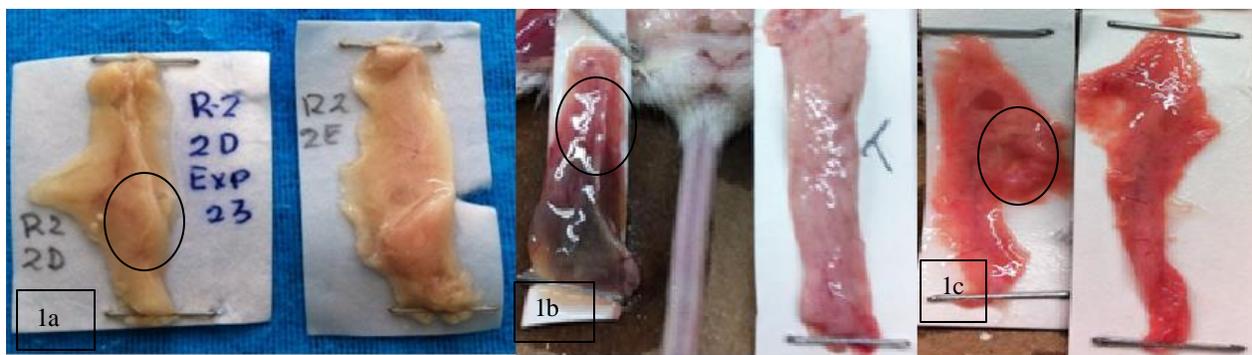
Después de la aplicación intraductal de 100 µl de Clorhexidina al 0.12 % en la glándula N 4 izquierda y como testigo la aplicación de la misma cantidad de solución salina isotónica estéril en la glándula derecha por 24 horas, se observaron cambios significativos respecto al tamaño color y textura entre el grupo tratado con el biosida. La glándula izquierda que recibió clorhexidina muestra disminución del tamaño congestión, hemorragia y edema. Se ha descrito descamación de la mucosa bucal y tumefacción ocasional de la glándula parótida. A concentraciones altas se han descrito problemas a nivel corneal. A concentraciones superiores al 2% la clorhexidina es claramente tóxica, tanto para la córnea como para la conjuntiva ocular. Instilada en el oído medio puede producir sordera a causa de su ototoxicidad.

La Clorhexidina aplicada por la vía intraductal a las glándulas mamarias de las ratonas induce cambios inflamatorios agudos con edema intersticial, exudado inflamatorio agudo de ubicación intersticial, congestión vascular y hemorragia en la misma ubicación anatómica. En las luces alveolares no se encontraron células inflamatorias ni cambios de vacuolación en el citoplasma del epitelio de revestimiento acinar (Figura 1b). La concentración de clorhexidina empleada en este trabajo, no se recomienda para ser aplicada en mucosas como la glándula mamaria, sin embargo otros estudios por realizar podrían determinar si diluciones con potencial bactericida resultan en menor efecto colateral como la inflamación.

Radicales súper óxido (Microdacyn)

Las glándulas 4 izquierda que recibieron 100 μ l de radicales super óxido preservaron su tamaño color y textura comparadas con sus testigos en las glándulas 4 derechas que recibieron 100 μ l de solución salina isotónica estéril. El análisis de las glándulas 4 izquierdas que recibieron 100 μ l de la suspensión de radicales super óxido mostró un patrón de preservación de la arquitectura histológica en los acinos glandulares con cambios en el citoplasma epitelial de revestimiento que consisten en la formación de vacuolas. En la luz alveolar se encontraron espacios limpios de células y restos de proteína de leche. Las glándulas testigo 4 derechas que recibieron 100 μ l de solución salina isotónica estéril preservan desde el punto de vista histológico su arquitectura y se encuentran áreas de involución glandular por la suspensión de la lactancia. Los radicales super óxidos inducen cambios de formación de vacuolas intra citoplásmicas, no inducen flujo de células inflamatorias a las luces alveolares por lo que pudieran ser considerados como futuros compuestos de aplicación intra ductal en la glándula mamaria (Figura 2b).

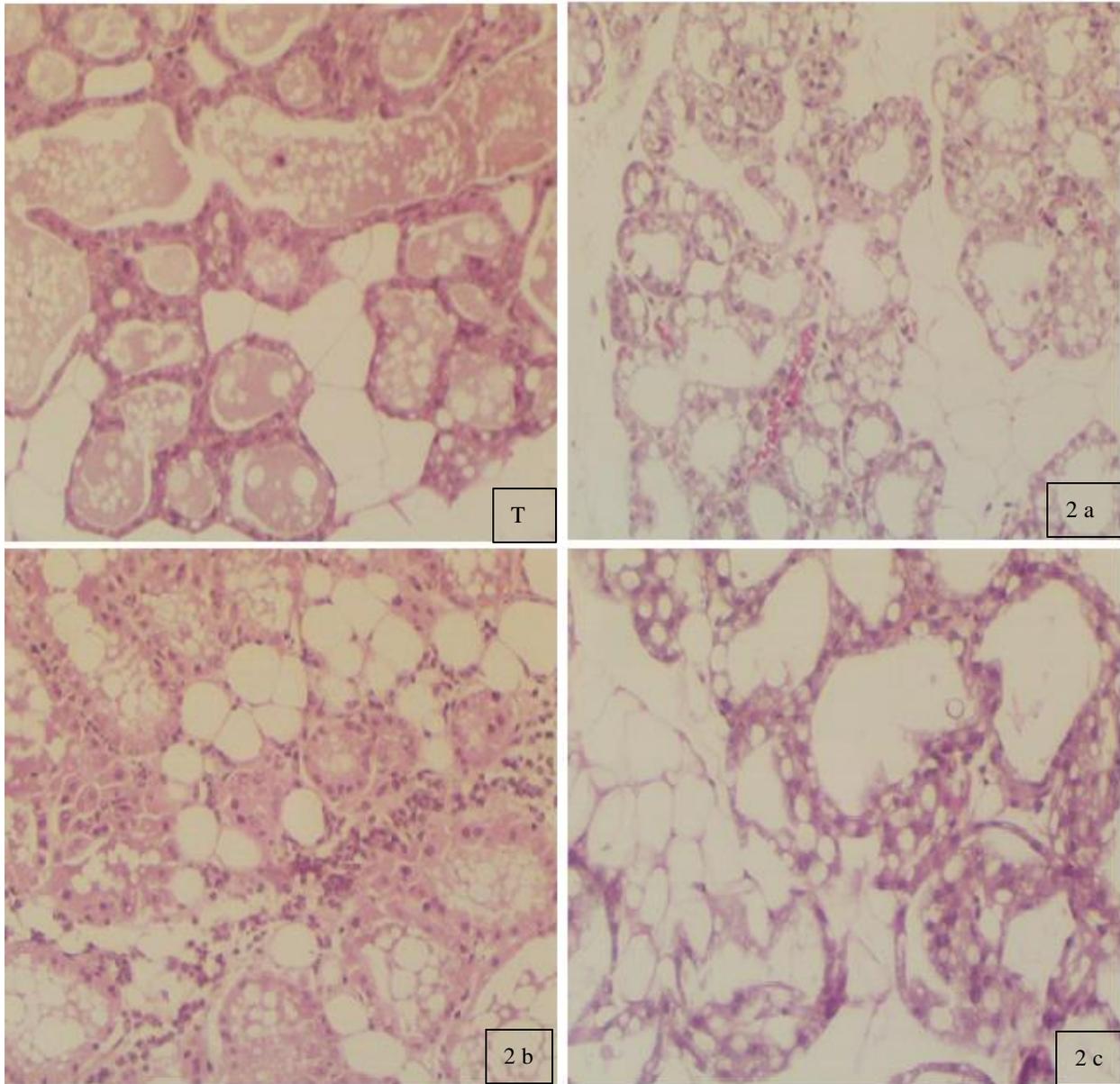
Figura 1. Vista macroscópica de glándulas mamarias de ratona lactante que recibieron vía intraductal los diferentes antisépticos



Composición fotográfica de las imágenes macroscópicas de un ejemplar de cada producto biosida evaluado. Las glándulas tratadas con los biosidas se colocan del lado izquierdo y las glándulas testigo a la derecha. En el círculo se delimita el área de penetración del producto biosida y la zona de donde se obtuvieron secciones representativas para histología.

La fotografía 1a del grupo Isotiazolinona fue tomada después de la fijación en formaldehído y no se observan cambios. La glándula izquierda del grupo clorhexidina 1b, mostró cambios macroscópicos que muestran edema y hemorragia. En 1c con Microdacyn se observa discreto aumento de volumen en el área de penetración del biosida.

Figura 2. Vista al microscopio de luz de una sección de glándula mamaria de ratona lactante que recibieron los diferentes antisépticos



Microfotografías al microscopio de luz con tinción de Hematoxilina y Eosina. Las secciones ilustradas en microfotografía 2 muestra una glándula testigo (T) con reductos de leche en la luz acinar y sin cambios en el epitelio de revestimiento. 2a y 2c Isotiazolinona y solución super óxido se muestran la formación de vesículas en el citoplasma del epitelio acinar y cambios de involución glándulas con sustitución de tejido glandular por areolar laxo. En 2b clorhexidina el epitelio alveolar sin cambios y en el espacio intersticial abundante exudado inflamatorio crónico y edema.

Resultados clínicos de la salud de la glándula mamaria en las vacas en pos parto inmediato.

Las nueve vacas que recibieron la formulación experimental de antisépticos en el secado se observaron macroscópicamente sin ninguna alteración. La evaluación de la conductividad eléctrica de la leche de cada cuarto resultó con mediciones por arriba del punto de corte que refiere el equipo Draminski como leche sin acidificación, lo que las coloca como leche sin alteraciones de conductividad. Así mismo las características físicas de leche de cada cuarto no mostraron cambios. El estudio microbiológico de cada muestra de leche resultó sin crecimiento de bacterias hasta por 72 horas post siembra en los medios respectivos.

La resistencia adquirida por los desinfectantes y/o antisépticos es mediada como ocurre para con los antimicrobianos, por la adquisición de plásmidos o mutación puntual. La resistencia ha sido detectada con mayor frecuencia para con sales metálicas y compuestos mercuriales (Russell, 1985). La resistencia de los productos biosidas contra las bacterias Gram negativas ha sido informada en forma ocasional en *Pseudomona aureoginosa* sin embargo las conclusiones se encuentran en debate. Las bacterias Gram positivas y en forma particular *Staphylococcus aureus* ha demostrado resistencia a biosidas mediado por plásmidos (Sasatsu *et al.*, 1995).

**INMUNIZACIÓN INTRADUCTAL CONTRA FIBRONECTINA Y CÉLULAS
COMPLETAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* E *COLI* *STREPTOCOCCUS*
AGALACTIAE EN VACAS AL SECADO**

Liz Sarahy Pérez Martell ¹, Guadalupe Delgado López, Beatriz Petlacalco Sánchez ² Víctor
Rodríguez Hernández ¹ Francisco Romero Pastrana², Pablo Hernández Jáuregui ^{2*}

**1.- Colegio de Posgraduados *campus* Puebla Km. 125.5 carretera federal México-Puebla
(actualmente Boulevard Forjadores de Puebla), C.P. 72760, Puebla, Puebla, México.**

Teléfonos: (222) 285 07 38, 285 14 42, 285 14 43, 285 14 45, Correos electrónicos:

edar@colpos.mx

**2.- CyTA Labs Blv Hermanos Serdán 627 A Col Francisco I Madero, C.P. 72130, Puebla,
Puebla, México Teléfono (222) 379 67 89**

*** Autor para correspondencia pablo@cytalabs.com www.cytalabs.com**

RESUMEN

Nueve vacas con gestación de siete meses recibieron por vía de los conductos galactóforos formulación con antígenos inactivados de proteína de adhesión a la fibronectina de *Staphylococcus aureus*, células completas e inactivadas de *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*. El análisis de las inmunoglobulinas G por ELISA indirecto contra los antígenos aplicados mostró; cinco de nueve vacas estimuladas con *Escherichia coli*, con valores de significancia estadística de $p < 0.0002$. El estímulo antigénico para *Streptococcus agalactiae* resultó en que ocho de nueve vacas respondieron con buenos títulos ante este antígeno con índices de significancia de $p < 0.0002$. El estímulo con las proteínas de virulencia de *Staphylococcus aureus* de adhesión a la fibronectina, reveló respuesta en todas las vacas con índices de significancia de $p < 0.0002$. La respuesta intraductal con antígenos promete ser una vía para la inmunización a las vacas en etapa del secado.

Palabras clave; inmunización intraductal secado, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, ELISA.

INTRODUCCIÓN

Para que la glándula mamaria se infecte con alguna bacteria, es necesario que en el contacto físico entre el patógeno y el huésped se exhiban los receptores de reconocimiento entre ambos. El sistema inmune innato del huésped responde mediante la interacción de moléculas referidas como Patrones Moleculares Asociados a los Patógenos (PAMPs) (Ulevitch *et al.*, 2000). El reconocimiento mediado por receptores es diferente respecto a si el huésped está respondiendo ante un patógeno con características bioquímicas entre las bacterias. Las del grupo Gram negativas en donde en casos de mastitis por *E coli* predomina, contiene en su pared celular el Lipolisacárido (LPS) que es común para toda la familia. El peptidoglicano (PGN) y ácido lipoteicoico (LTA) de la pared celular representan el repertorio de compuestos de reconocimiento para el grupo de bacterias Gram positivas con efectos similares pero con otros mediadores de reconocimiento (Schroder *et al.*, 2003) (Yoshimura *et al.*, 1999). *Staphylococcus aureus* es una de las bacterias que coloniza a la glándula mamaria con efectos de destrucción tisular con alta respuesta inflamatoria y baja calidad de leche. Tiene como reservorios la piel escarificada del pezón y el epitelio estratificado de las mucosas nasales (Kluyman *et al.*, 1997). Las vacunas actuales para *Staphylococcus aureus* son formuladas con bacterias completas y contra el PGN (Baselga *et al.*, 1994; García *et al.*, 1996; Kerro-Dego *et al.*, 2006) y la respuesta inmune es limitada dado los numerosos factores de virulencia que esta bacteria exhibe (Anderson *et al.*, 2012).

No obstante el reconocimiento por PAMPs existen factores que facilitan la baja respuesta inmune ante la infección en otros; la persistencia de infecciones por virus inmunosupresores como Diarrea Viral Bovina BVD, Rhinotraqueitis Infecciosa Bovina IBR, Leucemia viral Bovina BVL. La persistencia de bacterias de alto riesgo en los acinos glandulares como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, (Wilson *et al.*, 1997; Barkema *et al.*, 1998). *Mycoplasma bovis* (Fox *et al.*, 2005) y algunas cepas de *Escherichia coli* adherentes e invasoras (Dopfer *et al.*, 2002). La inmunosupresión preparto mediada por el estrés y la cadena de hormonas producidas son en parte el resultado de la disfunción de la fagocitosis de los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos lo que conlleva a facilitación de la colonización de bacterias en las estructuras glandulares (Burvenich *et al.*, 2003).

Este numeroso grupo de factores de riesgo evitables en su mayoría mediante la inmunización específica y con las medidas de higiene en la ordeña, predisponen la inducción de mastitis en las vacas lecheras, razón entre otras respecto a que la mastitis en los bovinos representa la enfermedad

que genera la pérdida y mala calidad de la producción de leche, con alto impacto en la economía del productor.

El propósito del presente trabajo fue el de analizar la respuesta inmune generada por la aplicación intraductal de antígenos bacterianos con lo que se espera que la leche de las vacas que recibieron el producto biológico, contendrá inmunoglobulinas específicas contra los antígenos de la fórmula.

MATERIALES MÉTODOS

Antígenos bacterianos

Para cubrir el amplio margen de serotipos que afectan a la glándula mamaria por la contaminación de *E coli* ambiental se llevó a cabo la aplicación de *E coli* obtenida de casos de mastitis así como cuatro serotipos caracterizados en forma previa como productores de pilis K-99, 39 y 35 colección ATCC de baja y alta producción de toxinas termos lábiles y termo sensibles. Se incluyó una cepa de *E coli* aislada en campo de un caso de mastitis aguda con grave toxemia y evidente hemorragia. Para las bacterias cocoides Gram + como *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*, se obtuvieron de casos clínicos de mastitis aguda y su respectiva caracterización morfológica y bioquímica hasta encontrar casos con *S aureus* y casos con *Staphylococcus coagulasa* negativos. Se incorporó también la proteína recombinante de adhesión a la fibronectina (Fnb) de *Staphylococcus aureus* expresada en la pared de *Lactococcus lactis* obtenida en forma previa, como proteína de virulencia que participa para la adhesión a células y tejido del huésped.

Criterios de selección de las vacas en fase de pre parto y aplicación intramamaria

De la región de Atlixco Puebla, se seleccionaron nueve vacas próximas a secar con diagnóstico de gestación por palpación de aproximadamente 7 meses. Las vacas fueron elegidas por el productor de acuerdo al tiempo de gestación y la baja en la producción de leche en lactancias anteriores. El hato de 200 reproductoras recibe inmunización anual contra los virus del complejo respiratorio y reproductivo de los bovinos. No se aplican biológicos para el control de mastitis sin embargo la higiene y manejo de la ordeña se realizan en forma cotidiana.

Análisis de inmunoglobulinas

De cada vaca se obtuvieron muestras sanguíneas en tubos Vacutainer para obtención el suero antes y después de 30 días de la inmunización. El suero colectado después de la centrifugación por 10 minutos a 1000 rpm fue depositado en tubos Ependorff y congelados a menos 20 C° a la

brevedad. Una muestra de 2 cc fue evaluada respecto a la concentración de proteínas totales, con refractómetro ATAGO Master-M Brix 0.0 to 33% y otra similar para la purificación de inmunoglobulinas. En forma breve 0.5 ml del suero se diluyó 1:2 en solución de amortiguador de fosfatos (PBS), el suero se transfirió a un vaso de precipitado sobre hielo con agitación magnética continua, agregando 1.5 ml de sulfato de amonio pH 7.8 hasta saturación y análisis de la concentración total de proteínas, mediante el método de Bradford que se basa en la unión del colorante, Comassie Blue G-250 a las proteínas. El colorante en solución ácida se une para formar un complejo proteína-colorante con coeficiente de extinción mayor que el colorante libre. Este método es sensible entre 1-15 µg.

Para la precipitación de inmunoglobulinas totales del suero se utilizó el método clásico. En forma breve; a los 0.5 ml de suero de cada muestra de las nueve vacas se le incorporó sulfato de amonio en forma lenta y en agitación constante por 30 minutos a 4°C para la precipitación de las globulinas. El precipitado fue re suspendido por agitación suave por cinco minutos y centrifugado a 10,000 G por 15 minutos a 4°C el sobrenadante fue descartado y el botón re suspendido en 0.5 ml de PBS. En cuatro ocasiones se agregó lentamente un volumen equivalente a dos terceras partes del volumen de la muestra (2/3 X ml) de solución saturada de sulfato de amonio para obtener una saturación final de la sal al 40%. Después de re suspender se transfirió la fracción de γ globulinas a una bolsa de diálisis contra solución salina 0.85% realizando 6 cambios utilizando cloruro de bario en una relación 1 a 1 con el agua durante 24 a 36 horas a 4°C, hasta que el sulfato de amonio ya no era detectable.

Las globulinas fueron preservadas en congelación a 20 C° fue evaluado mediante pruebas de ELISA para la titulación de anticuerpos contra los antígenos aplicados.

Cuantificación de inmunoglobulinas en animales inmunizados por el método de ELISA

La técnica ELISA de sus siglas del inglés *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*: ensayo por inmuno absorción ligado a enzimas, es una técnica de inmuno ensayo en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable. Se desarrolló la prueba de ELISA indirecta para la determinación cuantitativa / cualitativa de anticuerpos en el suero en cada una de las vacas para diferentes antígenos. En forma breve el método consistió en aplicar 100 µl de una suspensión 10^8 de cada bacteria a probar, por triplicado en placas par ELISA de 96 pozos de alta adhesión (Costar). Se dejó a temperatura 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se hicieron los lavados con PBS y se aplicó 100 µl de las

inmunoglobulinas purificadas como primer anticuerpo, se incubó a temperatura ambiente con agitación moderada por 1 hora. Pasado ese tiempo se lavó tres veces con la misma solución amortiguador y se aplicó 100 µl de IgG anti bovino en cabra marcada con peroxidasa como segundo anticuerpo. Se leyó en espectrofotómetro para ELISA, Diagnostic Pasteur modelo LP 400.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El sistema inmune participa en forma importante en la resolución de las infecciones de origen viral o bacteriano. Algunos gérmenes son productores de compuestos que inhiben el sistema inmune, por lo que las oportunidades del germen (es) en colonizar e invadir al huésped se encuentran facilitados (Nakawa *et al.*, 1993). En el particular caso de la infección bacteriana en la glándula mamaria en el posparto inmediato, los polimorfonucleares neutrófilos están inhibidos en su función de fagocitosis, probablemente mediados por el estrés del parto (Lee *et al.*, 2003). Algunos grupos de antimicrobianos empleados en el tratamiento de la infección glandular mamaria, como Cloramphenicol (en des uso por regulación oficial nacional) y los aminoglycosidos, inhiben la capacidad de fagocitosis de los polimorfo nucleares neutrófilos.

Las ubres de las vacas que recibieron el producto experimental para el secado e inmunización se observaron macroscópicamente sin ninguna alteración. La evaluación de la conductividad eléctrica de la leche entre los días cuatro al cinco pos parto de cada cuarto, resultó con mediciones por arriba del punto de corte ($300 + _ 50$) que refiere el equipo Draminski, lo que las coloca como leche sin alteraciones de conductividad. Así mismo las características físicas fueron las de leche sin cambios. El estudio microbiológico de cada muestra resultó sin crecimiento bacteriano hasta por 72 horas post siembra en los medios respectivos.

Cinco de nueve vacas estimuladas con antígenos de E coli mostraron valores mayores en la concentración de anticuerpos con significancia estadística (Figura 1). Se especula que las vacas no respondedoras al antígeno pudieran haber recibido baja concentración del antígeno. E coli es uno de los patógenos frecuentes encontrados en la leche del posparto inmediato sobre todo en las vacas de segunda y tercera lactancia en donde las lesiones al esfínter del conducto del pezón son de mayor frecuencia y su pérdida de función predispone a la colonización de bacterias ambientales. El uso de productos antibióticos como tratamiento curativo y/o preventivo en la etapa del secado,

es una práctica común entre los productores de leche y existe poco control en su uso. También el control de resistencia a los antimicrobianos de bacterias que infectan a la glándula mamaria de los bovinos es nulo o limitado en México.

Las infecciones por *E coli* extra intestinales en el humano se producen con mayor frecuencia en menores y mayores de edad femeninos en el tracto génito urinario, mediados por fallas en la higiene pos defecación y en donde se induce colonización e infección. El tratamiento con antimicrobianos contra *E coli* logró el control de ese tipo de infecciones hasta que los genes de resistencia bacterianos contra las sales empleadas crearon la resistencia a esos antimicrobianos (Russol *et al.*, 2007). En forma similar las infecciones extra intestinales de *E coli* en los bovinos afectan mucosas de la glándula mamaria y son la causa efecto de numerosos casos de mastitis sub y clínica que compromete la salud glandular y con ello la calidad de leche con altas pérdidas económicas para los productores. En el caso de las infecciones genitourinarias de los humanos la producción de biológicos inactivados con carencia/deficiencia de antígenos de superficie y de pared celular mostraron ser eficientes en su aplicación mucosal nasal en un modelo experimental en ratones (Russol *et al.*, 2007).

La producción de inmunoglobulinas específicas contra epítopes de pilis y fimbrias de *E coli* mediados por la inmunización, son factores de apoyo interno para la facilitación de la opsonización, control y resolución ante desafíos de *E coli* ambiental en los bovinos de producción de leche (EcoStaph PM+3 2015) (Gonzalez *et al.*, 1989). No obstante que los serotipos de *E coli* entre los animales de producción pecuaria mantienen sus nichos de especie respecto a colonización, es necesario mencionar que productores artesanales de quesos frescos de leche de bovinos realizan el cuajado sin pasteurización previa lo que define como potencial zoonosis a esos contagios.

Streptococcus agalactiae es una bacteria del grupo de los estreptococos B y como otros de esa familia prevalece en el tracto intestinal de varios mamíferos el humano incluido. En los bovinos induce mastitis considerada dentro de los patógenos de importancia por la reducción de la producción de leche de donde deriva su apellido. Es un germen con alta sensibilidad a los antimicrobianos beta lactámicos, por lo que su tratamiento tanto en lactancia como en el periodo de secado elimina la infección (Rossitto *et al.*, 2002), sin embargo la resistencia a los antimicrobianos de lo que poco se conoce en México, es un factor que impulsa el mejorar la higiene y la aplicación de vacunas. Tiempo atrás fueron descritos los beneficios en la inducción de

inmunoglobulinas contra el polisacárido de la cápsula ante la inmunización de células completas inactivadas por las vías intra parenteral e intramamaria. Ambos grupos experimentales desarrollaron incremento significativo de IgG, 1 y 2, IgM e IgA en suero y en leche contra la cepa de *Streptococcus* vacunal (Yokomizo y Norcross, 1978). Por otro lado, dado el incremento de infecciones neonatales en el hombre en donde cepas bovinas de *Streptococcus agalactiae* participan, se han tomado en cuenta el desarrollo de vacunas incluyendo proteínas de virulencia ligadas a la cápsula como candidatos biológicos (Lindahl *et al.*, 2005).

En el presente trabajo encontramos que el estímulo antigénico para *Streptococcus agalactiae* por la vías intra cisterna, resultó en que ocho de nueve vacas respondieron con buenos títulos de anticuerpos ante este antígeno con índices de significancia de $p < 0.0002$ (Figura 2) lo que ratifica los trabajos previos por (Yokomizo y Norcross, 1978).

En los animales domésticos *S aureus* es la causa directa de infecciones en la glándula mamaria con importantes pérdidas económicas por la disfunción glandular (Bergonier, 2014). La mastitis por *S aureus* es frecuente en los rumiantes como; vacas, borregas, cabras y mono gástricos como; cerdas, perras, gatas, conejas. El hombre participa también en los procesos inflamatorios degenerativos necróticos en el tejido glandular de la glándula mamaria. En la vaca de producción lechera la mastitis es una de las enfermedades frecuentes y por ello el tratamiento con antimicrobianos también lo es. No obstante los controles direccionados al uso de limitados grupos de antimicrobianos para el tratamiento de la mastitis bovina y el descarte de la leche con posibles residuos de los antimicrobianos, en las zonas rurales la vigilancia de estas normas no se cumple en su totalidad.

Respecto a la respuesta de inmunoglobulinas contra *S aureus*, en lo general fue de menor intensidad y sin significancia estadística (Figura 3). Estos resultados están en acuerdo con previos estudios en donde la baja respuesta es la regla. Sin embargo el estímulo con la proteína de virulencia de adhesión a la fibronectina de *S aureus*, reveló respuesta en todas las vacas con índices de significancia entre $p < 0.0002$ (Figura 4). Por otro lado la inmuno estimulación vía el conducto galactóforo, resultó en producción de inmuno globulinas G específicas con valores de significancia en; *E coli*, *Streptococcus agalactiae*, Proteínas Fnb de *S aureus*, no así para *S aureus* completo. En el caso de los nueve bovinos estimulados todos mostraron respuesta lo que implica que además de la protección local en la glándula las concentraciones calostrales protegerán a los recién nacidos. Los antígenos aplicados y su respuesta, indica que la vía intra cisterna puede ser empleada para la

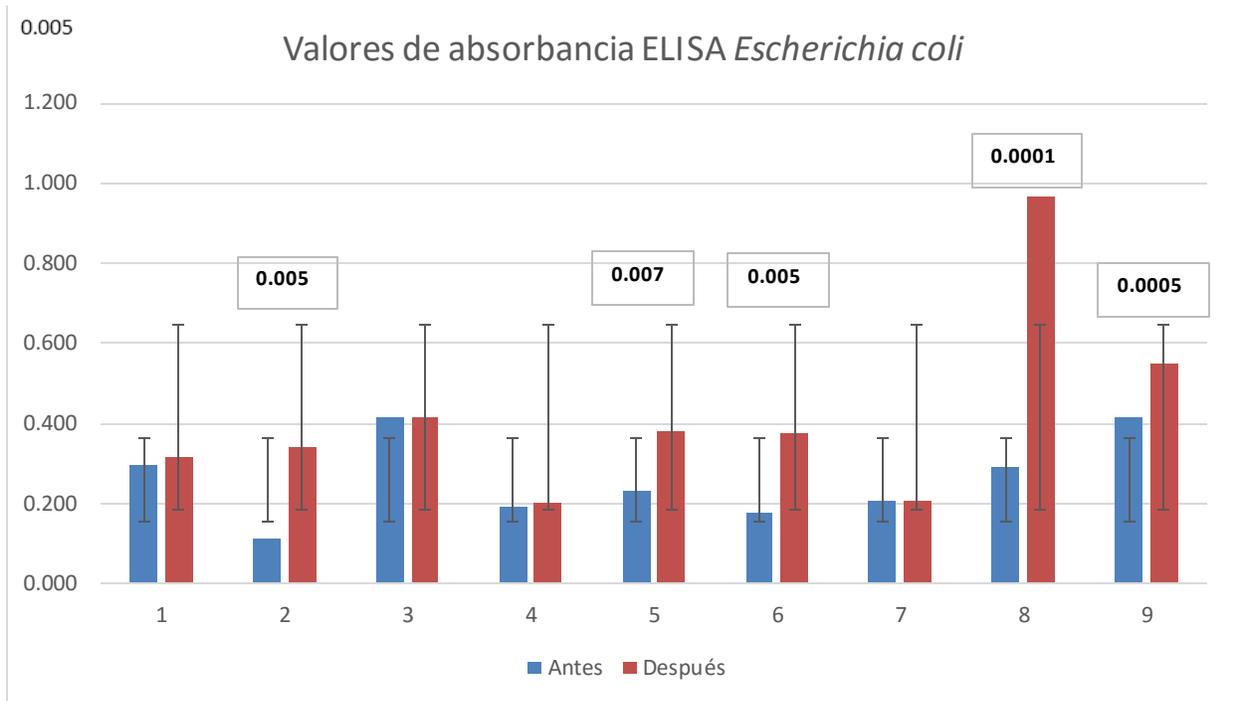
inducción de respuesta inmune en la etapa de secado. El tejido linfoide no capsulado ubicado en la roseta de Fürstenberg y la permeabilidad del epitelio de esa región sugieren sitios de presentación de antígenos a células inmunes. Queda por ser estudiada la producción de IgA por esta vía en donde la respuesta mucosal lo hace con síntesis de esta inmunoglobulina.

Cuadro 1. Medición de proteínas por refractómetro

Número de muestra	Grados Brix	
	Sueros Pre – parto	Sueros Post – parto
10	8	10
19	9	10
23	10	11
65	7	9
307	9	9
410	10	10
484	7	12
798	11	11
990	10	10

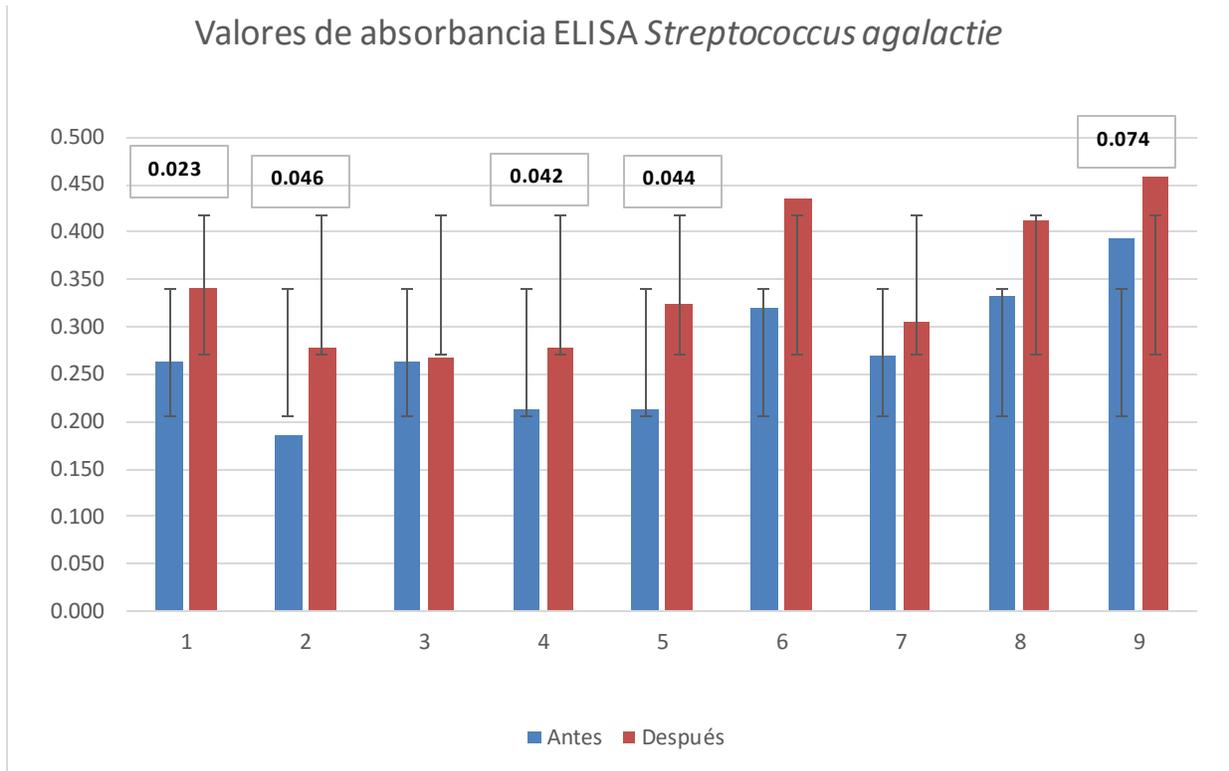
Los resultados descritos en el cuadro 1 reflejan que los sueros preparto fueron menores en 5 vacas respecto a los sueros obtenidos después del parto. El estudio por refractómetro es frecuentemente utilizado para evaluar las concentraciones de inmunoglobulinas en la leche calostrual, sin embargo sus límites de sensibilidad no son tan precisos como otros.

Figura 1



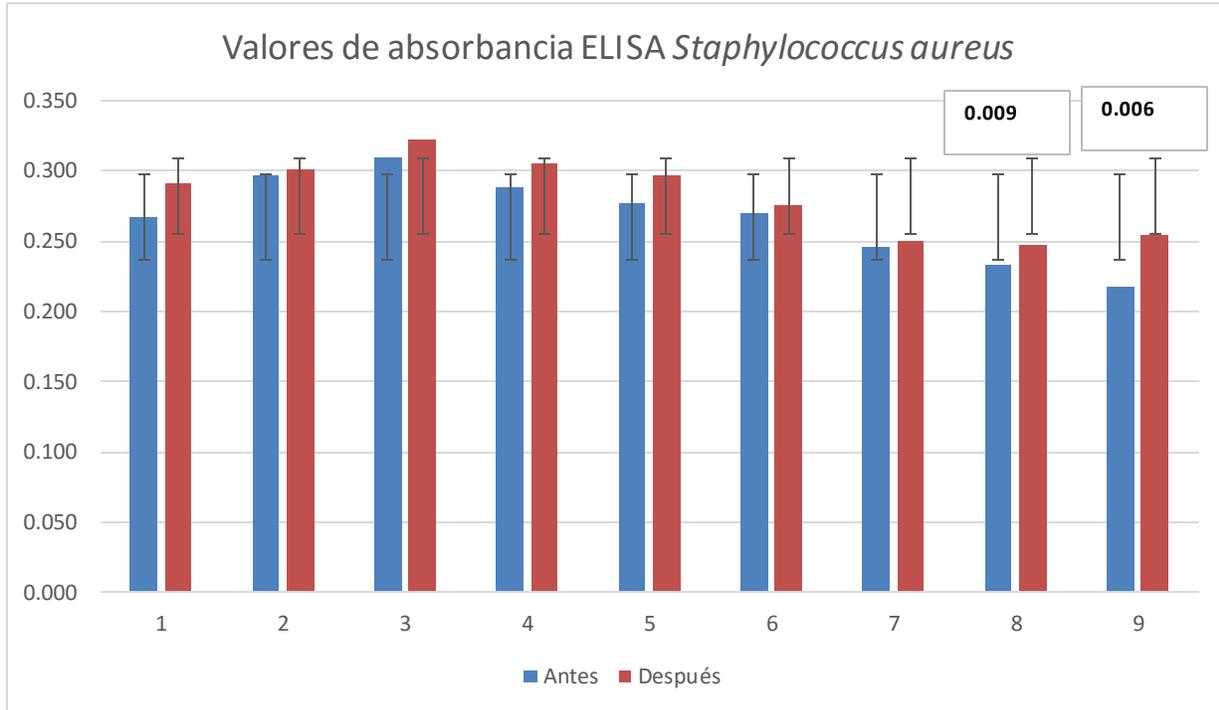
Los valores de absorbancia en la prueba de ELISA para *Escherichia coli* tuvieron valores de inmunoglobulinas con significancia estadística 5 de 9 bovinos. La respuesta para *Escherichia coli* como para otros microorganismos analizados en el presente estudio dieron una respuesta de menor intensidad y no significativa de concentración de inmunoglobulinas antes y después de la inmunización. Una probabilidad que explica esta respuesta puede ser la capacidad de la respuesta inmune de esos bovinos

Figura 2



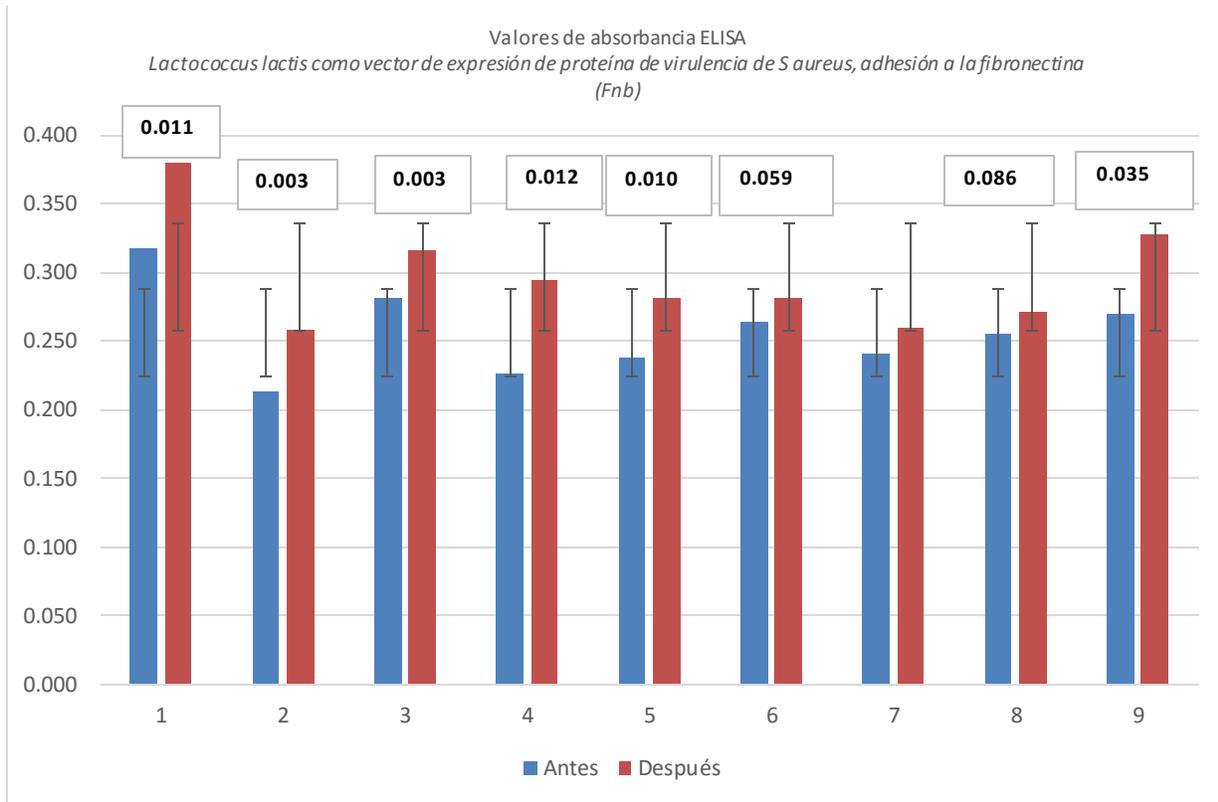
Los valores de absorbancia en la prueba de ELISA para *Streptococcus agalactiae* tuvieron valores de inmunoglobulinas con significancia estadística en 5 de 9 bovinos. La respuesta para *Streptococcus agalactiae* como para otros microorganismos analizados en el presente estudio dieron una respuesta de menor intensidad y no significativa de concentración de inmunoglobulinas antes y después de la inmuno estimulación. Una probabilidad que explica esta respuesta puede ser la capacidad de la respuesta inmune de esos bovinos por infecciones virales persistentes y por la inmunosupresión parto mediada por el estrés.

Figura 3



Los valores de absorbancia en la prueba de ELISA para *Staphylococcus aureus* tuvieron valores de inmunoglobulinas con cierta significancia estadística 2 de 9 bovinos. La respuesta para *Staphylococcus aureus* como para otros microorganismos analizados en el presente estudio dieron una respuesta de menor intensidad y no significativa de concentración de inmunoglobulinas antes y después de la inmuno estimulación. Una probabilidad que explica esta respuesta puede ser la capacidad de la respuesta inmune de esos bovinos

Figura 4



Staphylococcus aureus una bacteria del grupo de los Gram positivos y *E coli* de los Gram negativos, son dos de los patógenos encontrados con mayor frecuencia en los casos de mastitis bovina (Barkema *et al.*, 1998). Las infecciones cuyo origen fue *S aureus* cursan con infecciones sub clínicas o con clínicas crónicas que en lo general persisten por la vida del animal infectado.

La persistencia de infecciones por virus inmunosupresores como la Diarrea Viral Bovina BVD, Rhinotraqueitis Infecciosa Bovina IBR, Leucemia viral Bovina BVL (Wilson *et al.*, 1997; Barkema *et al.*, 1998). Pueden ser causa directa de inmunosupresión en las vacas no respondedoras así como la inmunosupresión preparto. Las inmunoglobulinas en sus diferentes formas e isotipos, son el resultado de la respuesta inmune “humoral” por la madre y sintetizados como respuesta específica a los antígenos adquiridos en forma natural o por la inmunización. La edad de la vaca, el estado nutricional, su medio ambiente y calendarios de vacunación, serán determinantes de la calidad y cantidad de inmunoglobulinas séricas presentes en el torrente sanguíneo. Durante el período pre parto, la vaca difundirá de sus capilares sanguíneos, las inmunoglobulinas hacia la luz de los acinos glandulares de la glándula mamaria, formando la secreción rica en proteínas, factores

hormonales, lípidos, conocida como calostro. En los bovinos, existen condiciones particulares de inmuno supresión por el “estrés” pre y pos parto, que propicia la invasión de patógenos oportunistas a diferentes órganos como útero, vagina y glándula mamaria (Lloyd, 1993).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Las vacas que recibieron el producto experimental para el secado e inmunización se observaron macroscópicamente sin ninguna alteración. La evaluación de la conductividad eléctrica de cada cuarto resultó con mediciones por arriba del punto de corte que refiere el equipo Draminski, lo que las coloca como leche sin alteraciones de conductividad. Así mismo las características físicas fueron las de leche sin cambios. El estudio microbiológico de cada muestra resultó sin crecimiento hasta por 72 horas post siembra en los medios respectivos.

Cinco de nueve vacas estimuladas con antígenos de *E coli* mostraron valores mayores en la concentración de anticuerpos con significancia estadística. Se especula que las vacas no respondedoras al antígeno pudieran haber recibido baja concentración del antígeno.

El estímulo antigénico para *Streptococcus agalactiae* resultó en que ocho de nueve vacas respondieron con buenos títulos ante este antígeno con índices de significancia entre $p < 0.0002$

Respecto a la respuesta de inmunoglobulinas contra *S aureus*, en lo general fue de menor intensidad y sin significancia estadística. Estos resultados están en acuerdo con previos estudios en donde la baja respuesta es la regla. Sin embargo el estímulo con la proteína de virulencia de adhesión a la fibronectina de *S aureus*, reveló respuesta en todas las vacas con índices de significancia entre $p < 0.0002$.

El uso de los antisépticos a base de Isotiazolinona y de radicales libres son de baja irritabilidad en la glándula mamaria tanto en el modelo de ratona lactante como en las vacas en el secado y pos parto inmediato. Estos productos podrían ser empleados como sustitutos de antibióticos en las jeringas de secado.

Por otro lado la inmuoestimulación vía el conducto galactóforo, resultó en producción de inmunoglobulinas G específicas con valores de significancia en; *E coli*, *Streptococcus agalactiae*, Proteína Fn de *S aureus*, no así para *S aureus* completo. Los antígenos aplicados y su respuesta, indica que la vía intra cisternal puede ser empleada para la inducción de respuesta inmune en la etapa de secado. En el caso de los nueve bovinos estimulados todos mostraron respuesta lo que implica que además de la protección local en la glándula las concentraciones calostrales protegerán a los recién nacidos. Queda por ser estudiada la producción de IgA por esta vía en donde la respuesta mucosal lo hace con síntesis de esta inmunoglobulina.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS GENERALES

- Adams, D., & Hamilton, T. (1988). Phagocytic cells. *Cytotoxic activities of macrophages. Inflammation: Basic principles and clinical correlates*. New York.
- Agrobit. (2008). http://www.agrobit.com.ar/Info_tecnica/Ganaderia/prod_lechera/GA000019pr.htm. Obtenido de Estructura de la glándula mamaria.
- Anderson A S, Miller A A, Donald R G K, Scully I L, Manura J S, Cooper D, Jansen K U. (2012). Development of a multicomponent *Staphylococcus aureus* vaccine designed to counter multiple bacterial virulence factors. *Human vaccines and immunotherapeutics*.
- Anderson J C. (1974). Experimental staphylococcus mastitis in the mouse: The effect of inoculating different strains into separated glands of the same mouse. *J. Comp. Pathol* Vol 84: 103-111.
- Ávila, T. S. (2010). *Anatomía y fisiología de la glándula mamaria*. Obtenido de http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_bovina_de_leche/produccion_bovina_leche/110-anatomia.pdf: http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_bovina_de_leche/produccion_bovina_leche/110-anatomia.pdf
- Barkema, H. W., Y. H. Schukken, T. J. Lam, M. L. Beiboer, H. Wilmink, G. Benedictus, and A. Brand. (1998). Incidence of clinical mastitis in dairy herds grouped in three categories by bulk: milk somatic cell counts. *J. Dairy Sci.* 81:411.
- Barragán, R. (2004). Inmunostimulantes en medicina veterinaria. *Orinoquia Vol. 8 núm. 2*, 56-75.
- Baselga R, Alvizu I, Amorena B,. (1994). *Staphylococcus aureus* capsule and slime as virulence factors in ruminant mastitis. A review. *Vet Microbiol* 39: 195-204.
- Batra R, Cooper BS, Whiteley C, Patel AK, Wyncoll D, Edgeworth JD. (2010). Efficacy and limitation of a chlorhexidine-based decolonization strategy in preventing transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an intensive care unit. *PubliMed*, 210(7).
- Bedolla, C., & Ponce de León, M. (2008). Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina en la industria lechera. *Redvet*, 7.
- Bergonier, D. D. (2014). *Staphylococcus aureus* from 152 cases of bovine, ovine and caprine mastitis investigated by Multiple-locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). *BioMed Central*, 97.
- Blackburn, P. S. (1966). The variation in the cell count of cows milk throughout lactation and from one lactation to the next. *Cambridge Journal of Dairy Research* Vol 33 pp 193-198.
- Bosquet, L. G. (2006). Antisépticos y desinfectantes. *Dossier Actividades de la Salud* 25: 86-92.
- Bradley, A. J. (2000). Study of the incidence and significance of intramammary Enterobacterial infections acquired during the dry period. *PubliMed US National Library of Medicine National Institutes of Health*, 1957-65.
- Burnett, C. L. (2010). Final Report of the Safety Assessment of Methylisothiazolinone. *International Journal of Toxicology*, Vol 29 no. 4 suppl 187S- 213S.
- Burvenich, C. V.-F. (2003). Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet. Res* 34:521.
- Butler, J. (1986). Biochemistry and biology of ruminant immunoglobulins. *Comprehensive Treatise*, Vol 3. Academic Press, New York pp 217-55.

- Carrión, G. (2002). *Principios básicos para el control de la mastitis y el mejoramiento de la calidad de la leche*. CIIDIR-IPN Unidad Michoacán. 2001.: Instituto Politécnico Nacional. Centro interdisciplinario de Investigación para el desarrollo integral regional de Michoacán.
- Chandler, R. L. (1970.). Experimental bacterial mastitis in the mouse. *J. of Medical Microbiology* 3: 273-282.
- Correa, M. G. (2002). O-serogroups, eae gene and EAF plasmid in *Escherichia coli* isolates from cases of bovine mastitis. *Brasil: Vet Microbiol* 125-32.
- Craven, N., & Williams, M. (1985). Defenses of bovine mammary gland against infection and prospects for their enhancements. *Vet. Immunol. Immunopathol* 71-127.
- Donald, M. (1975). Radiographic method for anatomic study of the teat canal. *American Journal of Veterinary Research*. University of Wisconsin-Madison, USA .
- Dopfer D R A, Almeida T J, Lam H, Nederbragt S P, Oliver W G,. (2002). Adhesion and invasion of *Escherichia coli* from single and recurrent clinical cases of bovine mastitis in vitro. *Vet Microbiol* 74: 331-343.
- Dos Santos, J. N. (2002). Phenotypic and genetic characterisation of bacteriocin - producing strains of *Staphylococcus aureus* involved in bovine mastitis. En *Veterinary Microbiology* (págs. 133 - 144).
- Draminski Ultrasound Scanner*. (1987). Obtenido de www.draminski.com
- Dukes. (2004). *Physiology of domestic animals*. Cornell University Press:: William O Reece 768.
- Ergomix. (2006). <http://www.engormix.com/MA-ganaderia-leche/sanidad/articulos/inmunizacion-ganado-vacuno-como-t885/165-p0.htm>.
- Fox, L. K., J. H. Kirk, and A. Britten. (2005). *Mycoplasma mastitis: a review of transmission and control*. *J. Vet. Med. B Infect Dis. Vet Public Health* 52:153.
- García G O., O. M. (1987.). *Derivados lácteos*. Obtenido de Academia: http://www.academia.edu/7881805/MANUAL_LECHE
- García V, Gomez M, Iglesias M, Sanjuan N, Gherardi M, Cerquetti MC, Sordeli D. (1996). Intramammary immunization with live-attenuated *Staphylococcus aureus*: microbiological and immunological studies in a mouse mastitis model. *FEMS Immunol Med Microbiol* 14: 45-51.
- García, A. (25 de Mayo de 2011). *Anatomía y fisiología de la Ubre*. Obtenido de <https://es.scribd.com/doc/56284934/2/Anatomia-de-la-ubre>
- Gaytan, G. G. (1992.). *Mastitis clínica, evaluación de la frecuencia, presentación y costos durante otoño en una explotación típica del Valle de México*. Torreon Coahuila, Mexico: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM.
- Gerald Russell, Mc Donnell and A Denver. (1999). Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(1), 147-179.
- Gießen. (2000). *Métodos de detección de la mastitis bovina*. Obtenido de DVG, Deutsche Veterinärmedizinische Gesell Leitlinien zur Bekämpfung der : <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090907/090702.pdf>
- Goats, J. L. (2000). http://www.reocities.com/raydelpino_2000/calostro.html. Obtenido de Colostrum Supplementing.
- Gonzalez, R. N. (1989). Prevention of Clinical Coliform Mastitis in Dairy Cows by a Mutant *Escherichia coli* Vaccine. *Can J Vet. Res* 53: 301-305.
- Guérin-Faubleé V., T. F. (2002). Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus* species isolated from clinical mastitis in dairy cows. *Int J Antimicrob Agents* 219-26.

- H., D. (s.f.). Physiology of domestic animals. Cornell University Press:: 9a. ed.
- Héctor Sumano López, Lilia Gutierrez Olvera, Luis Ocampo Camberos. (2007). *Bases Farmacológicas del tratamiento de la mastitis bovina*. Obtenido de http://www.buiatriaecuador.org/memorias/farmacologia/images/memorias/08_Mastitis.pdf
- Hernández L, V. G. (1999). Diagnóstico bacteriológico y recomendaciones para el control de la mastitis. México, DF: INIFAP.
- Hilde, D. F. (2001). Potential Mechanism of action of J5 vaccine in protection against severe bovine coliform mastitis. *INRA, EDP Sciences*, 1-12.
- Hogan, J. L. (2003). Coliform mastitis. Ohio, USA: Coliform mastitis. Department of Animal Sciences, Ohio Agricultural Research and Development Center 507-19.
- Hornet, M. W. (2002). Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* 3:1033.
- http://images.engormix.com/S_articles/TiradoAcota_mastitis2.jpg. (s.f.).
- INEGI. (2000). *Instituto Nacional de Estadística y Geografía*. Obtenido de INEGI: http://buscador.inegi.org.mx/search?tx=atlixco&q=atlixco&site=sitioINEGI_collection&client=INEGI_Default&proxystylesheet=INEGI_Default&getfields=* &entsp=a__inegi_politica&lr=lang_es%257Clang_en&lr=lang_es%257Clang_en&filter=1
- Juan José May, Sory Jamil Ruiz, Robinson Pacheco, Sandra Liliana Valderrama, María Virginia Villegas. (2011). Papel de la clorhexidina en la prevención de las infecciones asociadas a la atención en salud. *Infectio*, 15(2).
- Kehrli, M. E. (1994). Factors affecting milk somatic cells and their role in health of bovine mammary gland. *PubliMed US National Library of Medicine National Institutes of Health*, 619-27.
- Kerro-Dego O, Prysliak T, Potter AA, Pérez-Casal J. (2006). DNA-protein immunization against GapB and GapC proteins of mastitis isolate of *Staphylococcus aureus*. *Vet Immunol Immunopathol* 113: 125-38.
- King, J. (1981). *Streptococcus Uberis*: a review of its role as a causative organism of bovine mastitis. II. Control of infection. *PubMed*, 160-165.
- Kluytmans J, Velcum Van A, Verbrugh H. (1997). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*. Epidemiology underlying mechanisms and associated risk. *Clinical Microbiology Reviews* 505-520.
- Kremer, W. D.-S. (1993). Blood polymorphonuclear leukocyte chemotaxis during experimental *Escherichia coli* bovine mastitis. *J. Dairy Sci* 76:2613.
- Lactodata. (2013). *Lactodata información sobre el sector lechero*. Obtenido de <http://www.lactodata.info/indicadores/cuadros-y-graficos/>
- Las Heras, A. F.-G., & López Paredes, I. Y. (2010). *Empleo De Autovacunas Para El Control De Mastitis En Explotaciones Intensivas*. Leon Guanajuato: Nova Scientia.
- Laval, A. d. (2008). *Salas de ordeño*. Obtenido de DeLaval: <http://www.delaval.com.mx/-/Product-Information1/Milking/>
- Leafar Pérez-Romano, Diana González-Espinosa, Luis Núñez-Ochoa, Carlos Landa-Solís, Andrés A. Gutiérrez. (2004). Solución de Super-Oxidación Microdacyn 60. Una tecnología de vanguardia para tratar heridas. Mexico. Recuperado el Enero de 2015
- Lee, J. W., M. J. Paape, T. H. Elsasser and X. Zhao. (2003). Recombinant soluble CD14 reduces severity of intramammary infection by *Escherichia coli*. *Infect. Immun* 71:4034.

- Lindahl, G. M.-C. (2005). Surface Proteins of Streptococcus agalactiae and Related Proteins in Other Bacterial Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews* 102-127 vol. 18, no. 1.
- Lloyd, S. C. (1993). Effect of pregnancy and lactation upon infection. *Vet Imm and Immunopath* 4; 153-176.
- Mateus, G. (1983). *Mastitis en Bovinos*. Turrialba, Costa Rica: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, CATIE. Departamento de Producción Animal.
- Max J. Paape, D. D.-W. (2003). The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk . Review article. *Vet. Res* 597-627 597.
- May, J. j. (2011). Papel de la clorhexidina en la prevención de las infecciones asociadas a la atención en salud. *Infectio*, 15(2).
- Mc. Donald, J. S. (1975). Radiographic method for anatomic study of the teat canal. 1241-1242.
- Medina, R. J. (2002). Prevalencia e identificación de agentes etiológicos causantes de mastitis bovina. *REDVET*, Vol 9. num. 4.
- Nakawa J. S., Araki S., Kimura M. (1993). Effects of active egg white product on neutrophil function in calves. *J Vet Med Sci* 5:259-263.
- Nickerson, S. (June de 1989). Immunological aspects of mammary involution. Louisiana, USA: Mastitis Research Laboratory, Hill Farm Research Station, Louisiana Agricultural Experiment Station pp293-297.
- NMC, National Mastitis Council. (1996). *Current concept of bovine mastitis*. Florida USA: Journal of Dairy Science 1684-1689.
- Norman Rojas, E. C. (2006). Bacteriología diagnóstica. Costa Rica: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura 56p.
- Paape, M., Guidry, A., Jain, N., & Miller, R. (5 de May de 1991). Leukocytic defense mechanisms in the udder. *Flem Vet*. Oslo, Norway: Journal of Dairy Science pp 1276-1284.
- Persson, K. (1992). Studies on inflammation in the bovine teat. Sweden, University of Agricultural Sciences: Veterinary Immunology Elsevier Science Publishers 99-112.
- Philpot, W. N. (2000). Importancia económica de la mastitis. Ganando la lucha contra la mastitis. 1-13, 44-53.
- Podmore, P. (1998). An epidemic of isothiazolinone sensitization in a flax spinning mill. *PubMed*, 53-75.
- Politis, I., Zhao, X., McBride, B., & Burton, J. (1992). Function of bovine mammary macrophages as antigen-presenting cells. *Hindawi Publishing Corporation*, 31.
- R.L., Chandler. (1970.). Experimental bacterial mastitis in the mouse. *J. of Medical Microbiology* 3: 273-282.
- Radostits, O. M. (2002). Medicina Veterinaria; tratado de las enfermedades del Ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. *REDVET*, 50-52.
- Ramos, A. C. (1998). *Breve Introducción a la anatomía de la ubre y a la fisiología del ordeño*. Obtenido de OpenCourseWare: http://ocw.upm.es/produccion-animal/orde-no-mecanico/Tema_1._Anatomia_y_Fisiologia/breve-introduccion-a-la-anatomia-de-la-ubre-y-a-la-fisiologia-del-orden
- Rastogi, S. C. (1990). Kathon CG and cosmetic products. Contact Dermatitis. *PubMed*, 15-17.
- Regueiro, M. (2009). <http://cursoafa2009.webs.com/ANATOMIA%20DE%20LA%20GLANDULA%20MAMARIA.pdf>.
- Reza, G. L. (2000). Mastitis Bovina su reconocimiento clínico, programas de prevención y su terapia con antistaminicos a base de cefapirinas. *REDVET*, 1-13.

- Rosenber, J. (2006). *La vaca de leche. Control del ordeño. Buenas prácticas*. Obtenido de www.delaval.es/Dairy_Knowledge/Efficient-Milking/La_vaca_lechera.htm.
- Rossitto, P. V. (2002). Antibiotic Susceptibility Patterns for Environmental Streptococci Isolated from Bovine Mastitis in Central California Dairies. *Journal of Dairy Sci* Vol. 85 No. 1 132-138.
- Ruckebusch, Y., Dunlop, R., & Philippe Phaneuf, L. (1994). *Fisiología de pequeñas y grandes especies*. México, Mexico: México Manual Moderno.
- Russell, A. (1985). The roll of plasmids in bacterial resistance to antiseptics, disinfectans and preservatives. *J. Hosp. Infect.* 6:9+-19.
- Russol, T. A. (2007). A killed, Genetically Enginnered Derivative of a Wild-Type Extraintestinal Pathogenic E. coli strain is a Vaccine Candidate. 3859-3870.
- SAGARPA, I. (2011). Mejora continúa de la calidad higiénico-sanitaria de la leche de vaca.
- Sandholm, M., & Korhonen, H. (1995). Infeccion of the udder - Udder inflammation. En *The bovine udder and mastitis* (págs. 37-48).
- Sasatsu, M., Y. Shirai., M. Hase, N. Noguchi, M. Kono, H. Behr, J. Freney, and T. Arai. (1995). The origin of the antiseptic-resistance gene ebr in staphylococcus aureus. *Microbios* 84: 161+-169.
- Schmidt. (1971). *Biology of lactation*. San Francisco. USA:: W.H. Freeman &.
- Schmidt, G. H. (1971). *Biology of lactation*. San Francisco USA: Freeman & Company 317p.
- Schroder, N.W., S. Morath, C. Alexander, L. Hamann, T. Hartung. U. Zahringer. U. B. Gobel, J. R. Weber, and R. R. Schumann. (2003). Lipoteichoic acid (LTA) of Streptpcoccus pneumoniae and Staphylococcus aureus activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. *J.Biol. Chem* 278:15587.
- Schulz J, M. G. (1974). Defense function of the bovine teat. *PubMed*, 32. *Scribd.* (s.f). <http://es.scribd.com/doc/56284934/2/Anatomia-de-la-ubre>.
- Shultze, W., & M.J., P. (1977). Somatic cells in milk-physiological aspects and relationship to amount and composition of milk. *PubMed*, 27.
- Smith, K. (1982). The physiology of mammary glands during the dray period and the relationship to infection. *21 st Annual Meeting National Mastitis Council*. Louisville, Kentucky, USA.
- Smith, K. L. (2008). Environmental Mastitis: Know your opponent. *NMC Regional Meeting Proceedings*, 45-47.
- Sordillo, L. S. (1995). Alternative approaches for the prevention and treatment of mastitis. En *The bovine Prceeding* (págs. 54-60).
- Sumano, L. H. (2007). *Bases Farmacológicas del tratamiento de la mastitis bovina*. Obtenido de http://www.buiatriaecuador.org/memorias/farmacologia/images/memorias/08_Mastitis.pdf.
- Tizard, I. (1996). *Veterinary Immunology*. Saunders Company, 23-27.
- Tsua. (2008). <http://tsuagroalimentariamissionsucre.blogspot.mx/2011/06/glandulas-mamarias.html>.
- Ulevitch, Aderem A. and R.J. (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406:782.
- Velasco, M. E. (1995). Bacterias de Interés Veterinario. *DialNet*, 535-540.
- Vives, E. V. (2004). Antisépticos y Desinfectantes.
- Weber, A. (1970). *The bovine mammary gland: structure and function*. JAVMA.

- Wilson, D. J., R. N. Gonzalez, and H. h. Das. (1997). Bovinemasitis pathogens in New York and Pennsylvania: prevalence and effects on somatic cell count and milk production. *J. Dairy Sci* 80:2592.
- Wolter, W. C. (2004). Mastitis Bovina. Prevención, diagnóstico y tratamiento. Guadalajara, Jalisco: Universitaria.
- Yokomizo Y, and Norcross N L. (1978). Bovine antibody against *Streptococcus agalactiae*, type Ia, produced by preparturient intramammary and systemic vaccination. *Am JVet Res* 39. 511-516.
- Yoshimura, A. E. Lien R. R. Ingalls, E. Tuomanen, R. Dziarski, and D. Golenbock. (1999). Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *J. Immunol* 163:1.
- Ziegler, L., & Haitbrock. (1989). The biology of the monocyte system. *blood*, 74-78.