

[ESTRATEGIAS FRENTE A LA MAMITIS]

Presente y futuro en el control de la mamitis del ganado vacuno

Ana Rodríguez

Beatriz Martínez

Pilar García

Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC)

La mamitis es la enfermedad del ganado vacuno con mayor repercusión económica debido al descenso en la producción y la calidad de la leche y a los costes del tratamiento que ocasiona, a lo que hay que añadir la necesidad de recambio del animal cuando éste sufre procesos infecciosos recurrentes. Este artículo constituye un resumen de las diferentes estrategias empleadas para prevenir y combatir esta enfermedad en el ganado vacuno, así como de aquéllas en vías de desarrollo.



En algunos casos, la disminución del margen económico neto por vaca provocado por la mamitis puede llegar al 40-50%, habiéndose estimado que el coste medio puede alcanzar los 275 € por vaca y año (Hasala y col., 2007).

La Federación Internacional de Lechería (FIL) describe dos tipos de mamitis: mamitis clínica, que provoca síntomas visibles en la ubre del animal (hinchazón, calor, etc) y en la leche (coágulos), y la mamitis subclínica, que no presenta síntomas externos, pero provoca un aumento de células somáticas (RCS) como respuesta del sistema inmune. Además, atendiendo a su etiología, se distinguen dos tipos: mamitis contagiosa y mamitis ambiental.

[Mamitis contagiosa

Es producida por microorganismos que se sitúan en el canal del pezón y/o en el exterior del mismo, entre los que cabe destacar *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* (coagulasa positivo), *Staphylococcus epidermidis* (coagulasa negativo) y *Corynebacterium bovis*. Estos mi-

croorganismos están adaptados a sobrevivir en el interior de la ubre. Los contagios se producen fundamentalmente durante el ordeño.

[Mamitis ambiental

Este tipo de mamitis es causada por microorganismos del entorno del animal, tales como bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella* sp. *Serratia* sp. y *Proteus* sp.), estreptococos (*Streptococcus uberis*, *Str. dysagalactiae*) y *Enterococcus faecalis*. Estos microorganismos son patógenos oportunistas, que invaden la glándula mamaria, se multiplican en ella, provocan la respuesta inmune del animal y se eliminan rápidamente. El contagio se produce fundamentalmente durante el período entre ordeños. En este tipo de mamitis se incluye la denominada mamitis de verano, que en el

caso del Principado de Asturias, afecta fundamentalmente al ganado vacuno de montaña, siendo los microorganismos responsables *Arcanobacterium pyogenes* y *Str. dysagalactiae* fundamentalmente (García-Paloma y col., 2005).

[Incidencia de la mastitis

La prevalencia de las distintas especies bacterianas causantes de mastitis muestra variaciones geográficas y temporales, y también se ve influenciada por las medidas de control adoptadas. A modo de ejemplo, cabe señalar que *S. aureus* provocó el 17,5% de los casos de mastitis detectados en el Reino Unido en 1982 y sólo el 5,3% en 1998 (Bradley, 2002), mientras que este microorganismo ha sido el responsable del 13,62% y del 10,91% de los casos de mastitis registrados en 2004 y 2005 en el Principado del Asturias (LILA, Laboratorio Interprofesional Lechero y Agroalimentario de Asturias) (**Figura 1**).

[Medidas de control de la enfermedad

Las estrategias para reducir los casos de mastitis pasan necesariamente por mejorar la higiene del ambiente de las granjas, prestando especial atención a la salud y limpieza de la ubre. Se trata de impedir la propagación de la infección al rebaño en el caso de mastitis infecciosa y de pre-

La prevalencia de las distintas especies bacterianas causantes de mastitis muestra variaciones geográficas y temporales, y también se ve influenciada por las medidas de control adoptadas

venir la de origen ambiental. Esto se ha logrado en buena medida en el caso de mastitis contagiosa mediante la implantación generalizada de un plan de control de 5 puntos que tiene por objeto la reducción de la exposición del animal al agente causante de la infección, así como la reducción de la transmisión y duración de la infección intramamaria. Sin embargo, el sistema de control ha resultado menos efectivo para disminuir la incidencia de la mastitis ambiental dado que en este caso, el reservorio del agente causante es el ambiente y no la glándula mamaria.

En todo caso, las estrategias de control más efectivas se basan en la detección temprana de la infección y en el conocimiento del fenotipo de susceptibilidad de cada animal. El desarrollo de sistemas de muestreo automático junto con el avance en la tecnología de biosensores permite realizar en la granja el análisis en tiempo real de indicadores de infección en

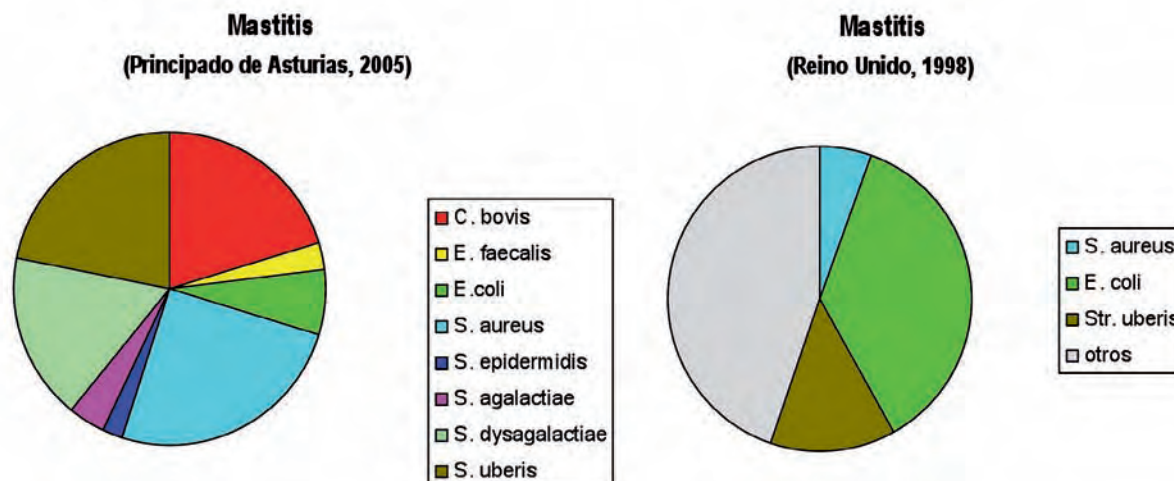
cada vaca y determinar así el riesgo de contraer la infección en cada individuo del rebaño. De este modo es posible medir varios biomarcadores indicativos de la mastitis, entre los que cabe destacar: conductividad eléctrica, que aumenta en animales con mastitis como consecuencia del aumento de la concentración de iones Ca^{2+} y Cl^{-} (Detilleux, 2009), y enzimas tales como la N-acetil-beta-D-glucosaminidasa, enzima intracelular liberado a la leche por los neutrófilos y por las células epiteliales dañadas (Pyorala, 2003), o la lactato deshidrogenasa, liberada por las células somáticas y por las células epiteliales dañadas (Babaei y col., 2007), o proteínas de fase aguda como la haptoglobina o el amiloide A sérico que se producen como consecuencia de procesos inflamatorios (Ekersall y col., 2006).

Uso de antibióticos

Una vez detectado el proceso infeccioso, la terapia con antibióticos de uso intramamario es la opción más utilizada. Asimismo, el tratamiento con antibióticos se utiliza como medida preventiva durante el período seco. El uso extensivo de antibióticos puede tener implicaciones negativas para la salud pública, debido al riesgo de aparición de cepas bacterianas resistentes a dichos compuestos que pueden alcanzar la cadena alimentaria, lo que aconseja limitar el uso de

Figura 1:

Etiología e incidencia de la mastitis en el Principado de Asturias durante el año 2005 (Fuente: Laboratorio Interprofesional Lechero y Agroalimentario de Asturias, LILA) y en el Reino Unido en 1998 (Bradley, 2002).





los mismos. En este contexto, se han desarrollado interesantes alternativas. Tal es el caso de la aplicación intramamaria de bacteriocinas, las cuales son péptidos con actividad antimicrobiana producidos por numerosas bacterias. Los productos basados en bacteriocinas han sido desarrollados para ser aplicados en el período seco. Así, la bacteriocina denominada lacticina 3147, producida por una bacteria láctica, es capaz de reducir la incidencia de mamitis provocada por *Str. agalactiae* durante el período seco (Ryan y col., 1999). Esta bacteriocina forma parte del producto Teat Seal, comercializado por Cross Vetpharm Group, Ltd, (Irlanda), que también ha sido ensayado en animales en período de lactación, comprobándose una disminución en el número de bacterias en los animales deliberadamente infectados con *S. aureus* respecto a los que no habían sido tratados con el producto antimicrobiano (Twomey y col., 2000). La nisina, conservante alimentario autorizado por la UE (E-234), también se comercializa en forma de infusión intramamaria (Mast Out®) para tratar la mamitis subclínica durante el período de lactación. La nisina también está presente en las toallitas Wipe Out® Dairy Wipes, utilizadas para la limpieza exterior de la ubre (ImmunoCell Corporation, Maine, EEUU).

Las bacteriocinas no son los únicos péptidos con actividad antimicrobiana frente a microorganismos causantes de mamitis, dado que la lisostafina, proteína con actividad enzimática

Las estrategias para reducir los casos de mamitis pasan necesariamente por mejorar la higiene del ambiente de las granjas, prestando especial atención a la salud y limpieza de la ubre

capaz de hidrolizar la pared celular de *S. aureus*, se ha ensayado como agente terapéutico y profiláctico para combatir las mamitis estafilocócicas. Los ensayos realizados por Oldham y Daley (1991) con lisostafina recombinante aplicada como infusión intramamaria en animales infectados con *S. aureus*, mostraron tasas de curación del 20% frente al 57% obtenida con un antibiótico comercial. La eficacia de la lisostafina es mayor cuando se combina con una proteína (endolisina) producida por un bacteriófago (virus que infecta exclusivamente a bacterias) (Becker y col. 2008).

Ácidos grasos y monoglicéridos

Además de los productos basados en péptidos, ciertos ácidos grasos y monoglicéridos ejercen actividad antimicrobiana frente a numerosos microorganismos causantes de mamitis. Como ejemplo, cabe destacar el ácido caprílico y el monoglicérido monocaprilina, capaces de inactivar microorganismos tales como *St. agalactiae*, *Str. dysgalactiae*, *Str. uberis*, *S. au-*

reus, y *E. coli*. Se han obtenido reducciones de hasta 5 unidades logarítmicas en 24 h en mezclas de patógenos añadidas a leche conteniendo 50-100 mM de ácido caprílico y 25-50 mM de caprilina, siendo las especies de *Streptococcus* las más sensibles. Por lo tanto, estos compuestos podrían ser una alternativa o utilizarse conjuntamente con antibióticos en infusiones intramamarias para el tratamiento de mamitis (Nair y col., 2005).

Vacunas

Como medida de control frente a la mamitis se utilizan también vacunas, herramientas inmunológicas encargadas de prevenir y/o reducir la severidad de los casos de infección cuando éstos se producen. El diseño de las mismas es particularmente complejo debido a las especiales características inmunológicas de la glándula mamaria y a la variabilidad de la infección.

Cabe señalar el trabajo realizado para diseñar vacunas frente a *Str. uberis*, microorganismo que produce mamitis ambiental, particularmente resistente a los factores antimicrobianos innatos presentes en la leche tales como la lactoferrina, y a la fagocitosis por neutrófilos que aparecen como respuesta a la infección de la ubre. Ensayos realizados con vacunas constituidas por *Str. uberis* tratados térmicamente y administrados localmente en la glándula mamaria (inmunización activa) proporcionan cierto aumento de la resistencia frente a la misma cepa, mientras que la inyección de *Str. uberis* vivo, seguida de aplicación intramamaria, protege frente a posteriores infecciones por distintas cepas. También se ha estudiado la capacidad de anticuerpos específicos frente a *Str. uberis* para prevenir la infección (inmunización pasiva), sin que se haya establecido el mecanismo de acción de estos anticuerpos. En todo caso, un obstáculo importante para diseñar vacunas efectivas frente a este microorganismo es la variabilidad genética de las diferentes cepas, que podrían implicar diferencias en las estructuras antigénicas. Todo ello, dificulta la comercialización de vacunas frente a este microorganismo (Denis y col., 2009).

El diseño de vacunas frente a *S. aureus* ha sido más eficiente. En principio se diseñaron bacterinas, vacunas constituidas por la bacteria inactivada por calor o formalina junto con un adyuvante y, ocasionalmente, con un factor de virulencia inactivado. Estas vacunas proporcionaron resultados de inmunización contradictorios, dependiendo de la exposición natural o deliberada del animal al agente infeccioso. Otras vacunas incluían toxoides (toxinas estafilocócicas inactivadas), de modo que se indujese inmunidad frente a la bacteria y sus factores de virulencia, observándose que la inmunización era superior cuando se utiliza la bacteria viva que cuando se utiliza inactivada por calor o muerte. Actualmente, se comercializa la vacuna Lysigin (Boehringer Ingelheim Vetmedica) que contiene un cultivo lisado de cinco cepas de *S. aureus*, con eficacia relativa en ensayos experimentales (Middelton y col., 2006). Recientemente, se ha aprobado el uso en la UE de una nueva vacuna, Startvac[®], producida por Laboratorios Hipra S.A. (Girona, España) que contiene cepas inactivadas de *S. aureus* y de *E. coli* (EMEA/V/C/130).

Un paso más allá para aumentar los mecanismos de defensa del ganado vacuno frente a la mastitis estafilocócica lo constituye la expresión en vacas del gen de la lisostafina. Las vacas transgénicas son capaces de secretar lisostafina a la leche (0,9-14 mg/ml) y de resistir la infección estafilocócica (Wall y col., 2005).

Bacteriófagos

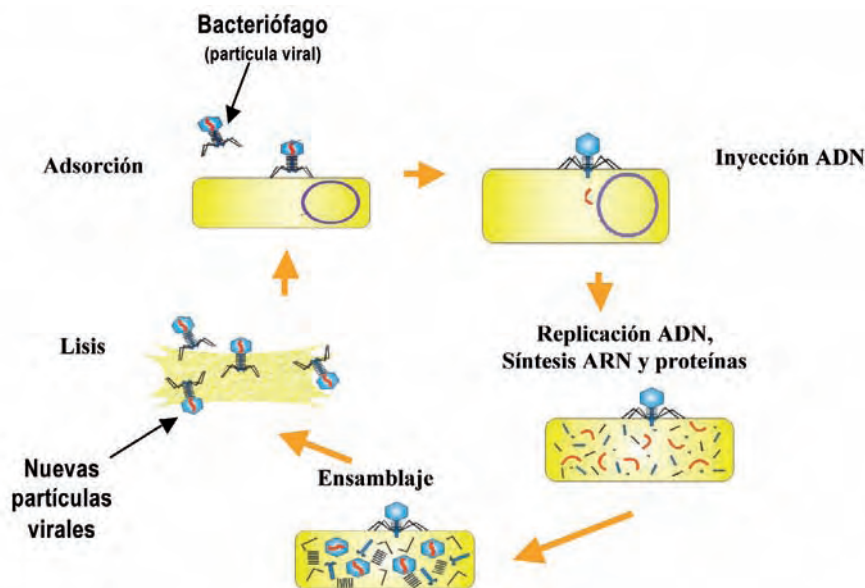
Por último, deseamos comentar el potencial uso de bacteriófagos (virus de las bacterias) en el control de la mastitis. Cabe señalar que los bacteriófagos son agentes antibacterianos naturales que infectan las bacterias, provocando no sólo la muerte de las mismas, sino también su lisis, mediante la cual se liberan nuevas partículas fágicas (viriones) al exterior (Figura 2). La utilización de bacteriófagos (terapia fágica) como alternativa a los antibióticos, habitual en los países del Este de Europa, está adquiriendo un gran auge debido al aumento de la resistencia bacteriana a los antibióticos.

Una de las características de los bacteriófagos que los diferencian claramente de los antibióticos de uso clínico es su especificidad. Solamente son activos frente a la especie bacteriana frente a la que han sido aislados, por lo que la microbiota natural del animal permanecería inalterada. La eficacia de los bacteriófagos frente a distintos microorganismos causantes de mastitis ha sido comprobada *in vitro*. Sin embargo aún son escasos los ensayos realizados en vacas infectadas. Uno de los pocos ejemplos se ha llevado a cabo en vacas con infección intramamaria subclínica causada por *S. aureus*, a las que se les aplicaron infusiones intramamarias del bacteriófago K durante 5 días. Los resultados no fueron espectaculares porque sólo el 17% de los cuarterones infectados se curaron (Gill y col., 2006). No obstante, es necesario profundizar en este tipo de estudios, aislando nuevos bacteriófagos en las ubres de vacas con síntomas de mastitis. En este contexto, nuestro grupo de investigación ha aislado dos bacteriófagos, phiIPLA35 y phiIPLA88 (García y col., 2009) que son capaces de infectar numerosas cepas de *S. aureus* aisladas en el Principado de Asturias de

leche procedente de vacas con síntomas de mastitis. La eficacia de estos bacteriófagos frente a cepas de *S. aureus* ha sido comprobada en leche contaminada con este microorganismo. La potencial eficacia de los mismos como agentes terapéuticos frente a la mastitis deberá ser comprobada con ensayos *in vivo*. Además de los bacteriófagos es conveniente profundizar en el estudio de endolisinas (proteínas de origen bacteriofágico) como posibles agentes antimicrobianos frente de la mastitis. Estas proteínas son sintetizadas por los bacteriófagos durante su ciclo de multiplicación, siendo encargadas de lisar la bacteria para permitir la liberación de la progenie viral. Este particular modo de acción abre la posibilidad de que sean utilizadas, no sólo como agentes terapéuticos, sino también como profilácticos capaces de minimizar la presencia de patógenos en la ubre y en el entorno del animal. En este momento disponemos del sistema de producción en una bacteria huésped de la endolisina sintetizada por uno de nuestros bacteriófagos, paso previo para disponer de la cantidad suficiente para llevar a cabo ensayos de actividad frente a *S. au-*

Figura 2:

Ciclo de multiplicación de un bacteriófago. La partícula viral se adhiere a la superficie de la bacteria sensible (adsorción), inyecta su material genético en la bacteria, se forman nuevas copias del material genético del bacteriófago y se sintetizan las proteínas que formarán parte de la cabeza y cola de las nuevas partículas virales. Estas destruyen la cubierta de la bacteria y se liberan al exterior.





reus in vivo, una vez comprobada su eficacia frente a este microorganismo *in vitro* (Obeso y col. 2008).

[Bibliografía

Babaei, H., L.Mansouri-Najand, M.M.Molaei, A.Kheradmand and M.Sharifan. (2007). Assessment of Lactate Dehydrogenase, Alkaline Phosphatase and Aspartate Amino-transferase Activities in Cow's Milk as an Indicator of Subclinical Mammitis. *Veterinary research Communications* 31: 419-425.

Becker, S.C., J. Foster-Frey, and D.M. Donovan. (2008). The phage K lytic enzyme LysK and lysostaphin act synergistically to kill MRSA. *FEMS Microbiol. Let.* 287: 185-191.

Denis, M., D. S. Wedlock, S. J. Lacy-Hulbert, J. E. Hillerton and B. M. Buddle. (2009). Vaccines against bovine mammitis in the New Zealand context: what is the best way forward?. *New Zealand Veterinary J.* 57: 132-140.

Detilleux, J.C. (2009). Genetic factors affecting susceptibility to udder pathogens *Veterinary Microbiol.* 134: 157-164.

Eckersall, P.D., F. J. Young, A. M. Nolan, C. H. Knight, C. McComb, M. M. Waterston, C. J. Hogarth, E. M. Scott, and J. L. Fitzpatrick. (2006). Acute Phase Proteins in Bovine Milk in an Experimental Model of *Staphylococcus aureus* Subclinical Mammitis. *J. Dairy Sci.* 89:1488-1501.

García, P, C. Madera, B. Martínez,

A. Rodríguez and J. E. Suárez. (2009). Prevalence of bacteriophages infecting *Staphylococcus aureus* in dairy samples and their potential as biocontrol agents. *J. Dairy Sci.* 92: 3019-3026.

García-Paloma, J.A., J. Suárez de la Fuente, F. Nieto, V. Lombardía, F. Suárez, y M. Martínez. (2005). La mammitis de verano, una enfermedad que reduce de forma permanente la capacidad maternal y el valor comercial de las vacas de cría. *Tecnología Agroalimentaria* 2ª época, 2: 36-38.

Gill, J.J., J.C. Pacan, M.E. Carson, K.E. Leslie, M.W. Griffiths, and P.M. Sabour. (2006). Efficacy and Pharmacokinetics of Bacteriophage Therapy in Treatment of Subclinical *Staphylococcus aureus* Mammitis in Lactating Dairy Cattle. *Antimicrob. Agents and Chem.* 50: 2912-2918.

Halasa, T., K. Huijps, O. Østerås, and H. Hogeveen. (2007). Economic effects of bovine mammitis and mammitis management: A review. *Veterinary Q.* 29:18-31.

Leigh, J.A. (1999). *Streptococcus uberis*: a permanent barrier to the control of bovine mammitis? *Veterinary J.* 157:225-38

Middelton, J.R., J. Ma, C.L. Rinchart, V.N. Taylor, C.D. Lucy, and B. J., Steevens. (2006). Efficacy of different Lysin formulations in the prevention of *Staphylococcus aureus* intramammary infection in dairy heifers. *J. Dairy Res.* 73: 10-19.

Nair, M.K., J. Joy, P. Vasudevan, L. Hinckley, T.A. Hoagland, K. S.

(2005). Antibacterial effect of caprylic acid and monocaprylin on major bacterial mammitis pathogens. *J. Dairy Sci.* 88:3488-3495.

Obeso, J.M., B. Martínez, B., A. Rodríguez, A. and P. García. 2008. Lytic activity of the recombinant staphylococcal bacteriophage ϕ H5 endolysin active against *Staphylococcus aureus* in milk. *Int. J. Food Microbiol.* 128: 212-218.

Oldham, E.R., and R.J. Daley (1991). Lysostaphin: use of a recombinant bactericidal enzyme as a mammitis therapeutic *J Dairy Sci.* 74: 4175-4182.

Pyorala, S. (2003). Indicators of inflammation in the diagnosis of mammitis. *Veterinary Res.* 34: 565-78.

Ryan, MP; Flynn, J; Hill, C, et al. (1999). The natural food grade inhibitor, lactacin 3147, reduced the incidence of mammitis after experimental challenge with *Streptococcus dysgalactiae* in nonlactating dairy cows *J. Dairy Sci.*: 2108-2114.

Twomey D.P., A. I. Wheelock, J., Flynn, W. J. Meaney, C. Hill C, and R. P. Ross. (2000) Protection against *Staphylococcus aureus* mammitis in dairy cows using a bismuth-based teat seal containing the bacteriocin, lactacin 3147. *J. Dairy Sci.* 83: 1981-1988.

Wall, R.J., A.M. Powell, M.J. Paa-pe, D.E. Kerr, D.D. Bannerman, V. G. Pursel, K.D. Wells, N. Talbot and H.W. Haw. (2005). Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection *Nature Biotechnology* 23, 445 - 451. •