

Bovino

# *Mastitis bovina*

## EN LA ENCRUCIJADA DE NUEVO

El microbioma mamario, cuya existencia no se puede poner en duda por meras opiniones en favor o en contra, es una realidad y con mucha probabilidad está involucrado en la patología de la mastitis bovina.

---

VAHID SHOKOUHI  
DVM,MS



## RESUMEN

En el estudio se detallan los nichos ecológicos de humanos y de bovinos junto con referencias a la ecología ambiental, para situarse dentro del mundo real de los microorganismos, tal y como están organizados en la naturaleza, y no tratar la ubre afectada como una estructura inanimada y aislada que requiere reparación.

El microbioma mamario puede tener microorganismos que procedan desde otros órganos o del ambiente. Algunos miembros pueden llegar incluso de otros nichos ecológicos externos.

Después de una breve revisión y omitiendo temas ya muy discutidos o fáciles de consultar en la literatura, se abre un debate sobre cómo se puede cuidar y mejorar la homeostasis y evitar la disbiosis, especialmente a nivel de una granja o una población para el mejor control de la mastitis bovina.

## ABSTRACT

*The existence of a Bovine mammary gland microbiome, has been challenged by different authors, but it could not be denied merely by opinions, and with a high probability it could be implicated in bovine mastitis pathology.*

*In the present study the different bacterial ecological niches (man, cow, environment) have been discussed. This permits it to be inside the real bacterial world as it is made by nature and not to treat the affected udder as an inanimate structure which needs reparation.*

*The members of the mammary microbiome can proceed from other organs or from the environment. Even some could arrive from external ecological niches.*

*After a brief general revision, with exclusion of common items, easy to be consulted in literature, the different ways to care for homeostasis and avoid dysbiosis have been discussed, especially at farm level for a better control of bovine mastitis.*



## INTRODUCCIÓN

La base de un control eficaz y permanente de la mastitis bovina reposa sobre el conocimiento de factores predisponentes y causantes de la misma y en muchos casos, sobre estrategias de prevención antes que el tratamiento.

Hemos de aceptar que en una granja de vacas lecheras el objetivo ha de ser un control eficaz y no la erradicación.

El control de la mastitis es multifactorial y por tanto requiere tener información suficiente y amplia sobre la mayoría de los factores, no una información selecta, sino cierta noción básica y válida procedente de fuentes fidedignas.

Puesto que esta revisión no es un trabajo académico, sino que está destinada a la práctica de campo, se han recordado y revisado ciertos

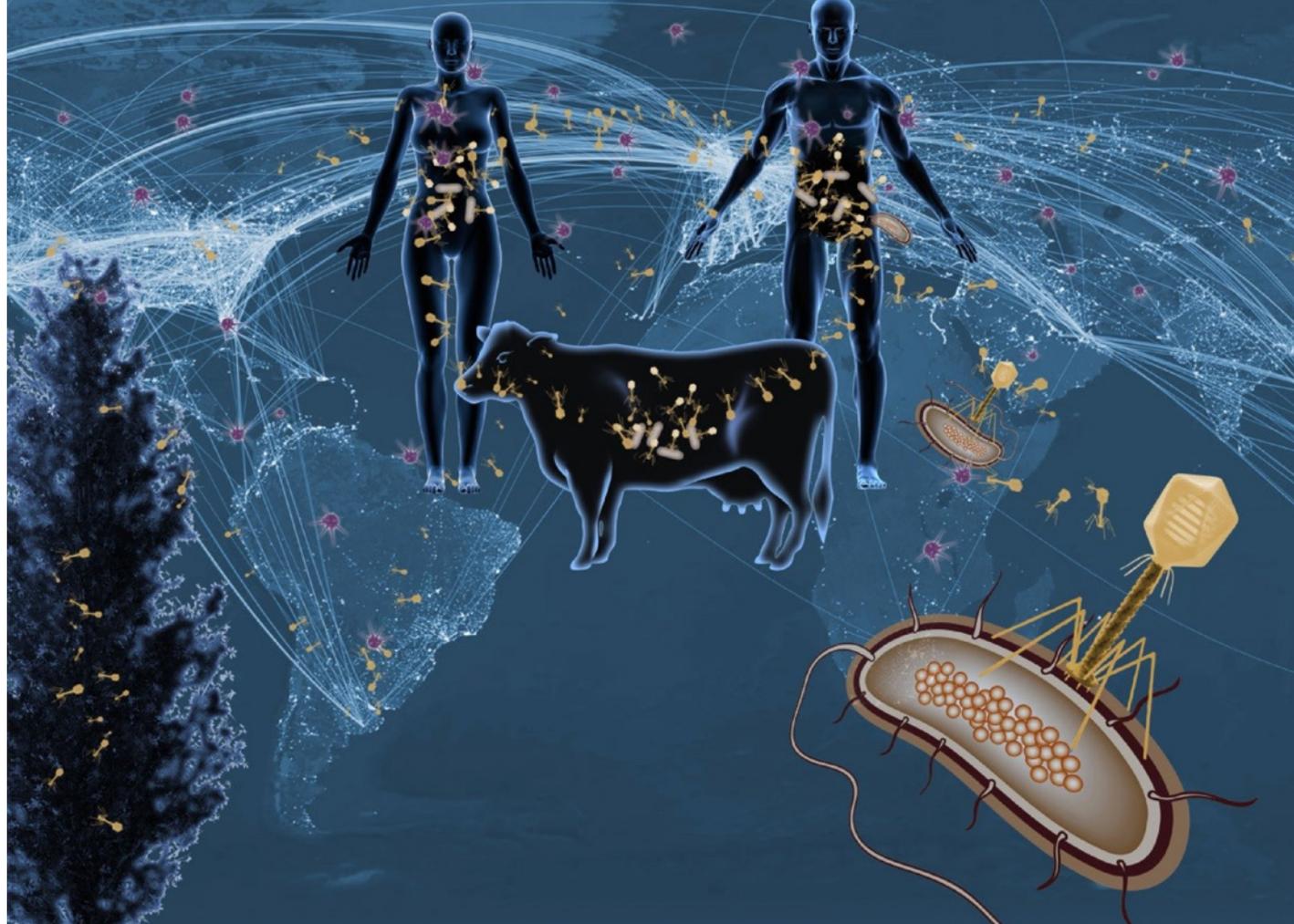
aspectos básicos para facilitar su uso y aplicación. Se ha optado por una información técnica sin fronteras, para no estar repitiendo los datos tradicionales que nos pueden impedir mirar más allá de nuestros conceptos.

Sin restar importancia a los agentes infecciosos, un planteamiento sencillo de causa y efecto no puede conducir al éxito en el control eficaz y duradero en una población de vacas lecheras.

Este principio parece que coincide con los conocimientos actuales del microbioma de las ubres, que está descartando las conclusiones clásicas basadas en cultivos bacteriológicos.

La presente revisión no busca repetir los detalles clásicos de la mastitis bovina, que están al alcance de todos, sino abrir las barreras impuestas por la metodología tradicional, demostrando el inmenso campo que





puede ser de ayuda para completar y actualizar nuestros conocimientos.

La realidad es que para prevenir la mastitis se ha de tener en cuenta, no solamente los factores infecciosos, sino a un grupo de factores que intervienen tanto a nivel del sistema inmune local perturbando su función, como en el desequilibrio de la homeostasis microbiana.

La implicación de la microbiota normal de la glándula mamaria en la interacción entre patógenos y huésped está siendo estudiada y cada vez salen a la luz informaciones más recientes. El problema que suele ocurrir es que, cada disciplina trata de filtrar las informaciones según la rama correspondiente, enfocándolas a la vieja costumbre de patología de causa y efecto, e intentando buscar modelos no dinámicos y más bien estáticos para hacer fácil su aplicación en la práctica.

## EL MICROBIOMA

La biosfera comprende aproximadamente desde 10 km por debajo hasta 10 km por encima de la superficie del planeta Tierra. En realidad, el 90 por ciento de los seres vivos viven en una zona que se localiza entre 1 km por debajo y 1 km por encima de la superficie terrestre.

La biosfera, el marco de la actividad ecológica, permanece siempre en un estado de equilibrio dinámico. Aquí están presentes muchos elementos biológicos y físicos en un estado de equilibrio<sup>33</sup>.

La ecología, según la definición<sup>34</sup>, es una rama de Biología que se ocupa de la relación o interacción de los organismos vivos con su ambiente y con otros organismos.

Cada organismo experimenta una compleja relación con otros organismos de su especie y con organismos de especies diferentes. Estas interacciones complejas, dirigen distintas presiones selectivas sobre los organismos y provocan la evolución de las poblaciones de especies. La ecología es el estudio de estas fuerzas y su ambiente inanimado.

La escala más grande de organización de seres vivos es el ecosistema. Un ecosistema es una red de comunidades biológicas interconectadas.

La biosfera engloba todos los ecosistemas. La ecología de ecosistema estudia los complejos patrones producidos por interacción entre los ecosistemas y factores abióticos de ambiente. Puede estudiar el agua, los nutrientes u otros elementos químicos que circulan por el ecosistema<sup>34</sup>.

Los microorganismos, por su omnipresencia, hacen impacto sobre la biosfera entera. La vida de los microorganismos juega un papel primario en la regulación de sistemas biogeoquímicos, en todos los ambientes del planeta virtualmente, constituyendo por su magnitud cuantitativa, un significativo, entre otros, sumidero de carbón<sup>31</sup>.

Los microorganismos representan los seres vivos mayoritarios del planeta Tierra, poblando un amplio rango de nichos en su superficie, subsuelo, en la atmósfera y en los seres multicelulares, tanto en su superficie como en su interior, el llamado microbioma.

El microbioma juega un papel claramente crítico cuando el hombre se esfuerza en enfrentarse a los desafíos más importantes de su sociedad: sanidad, agricultura, energía y medio ambiente.

Por ejemplo, el microbioma intestinal del hombre aporta el 36% de las pequeñas moléculas halladas en la sangre humana y también juega un papel importante en crear la susceptibilidad a ciertas enfermedades.

Los trabajos de proyectos de microbioma del hombre (HMP\*) y microbioma de la tierra (EMP\*), han caracterizado numerosas comunidades microbianas, pero el mapeo de estos innumerables microorganismos y el



análisis de la enorme cantidad de información que se están acumulando requiere un abordaje inimaginable enfocado en desvelar cómo funcionan los microorganismos y cómo están interrelacionados<sup>23</sup>.

La ecología microbiana o microbiología ambiental es la ecología de microorganismos, la relación de unos con otros y con su ambiente. Corresponde a los tres dominios mayores de la vida: Eucariota, Arquea y Bacteria, así como los virus<sup>31</sup>.

La ecología microbiana trata con la relación de los microorganismos entre sí y con su ambiente. Los microorganismos impactan sobre toda la biosfera. Están presentes prácticamente en todas las partes de planeta, incluso en condiciones extremas, como en lagos ácidos y océanos profundos y desde ambientes helados a fuentes hidrotermales<sup>32</sup>.

La microbiología ambiental abarca todos los procesos microbianos que tienen lugar en suelo, agua y aire.

Uno de los papeles destacados de los microorganismos en el ecosistema, es permitir a los herbívoros nutrirse de alimentos de baja calidad. En los rumiantes, los alimentos ingeridos, especialmente la celulosa y la lignina, no pueden digerirse por las enzimas digestivas del intestino, pero los microorganismos del rumen

llevan a cabo la digestión de estos carbohidratos complejos<sup>32</sup>.

Existen diversos sitios en los vertebrados (nichos) que facilitan un ecosistema estable y con abundantes nutrientes para el establecimiento y crecimiento de un rango diverso de microorganismos comensales, oportunistas y patógenos.

El genoma colectivo de estos simbioses microbianos (microbioma), proporciona a los animales huéspedes numerosas ventajas, incluyendo el metabolismo de carbohidratos indigestos, la biosíntesis de vitaminas y la modulación de los sistemas inmunes innato y adaptativo.

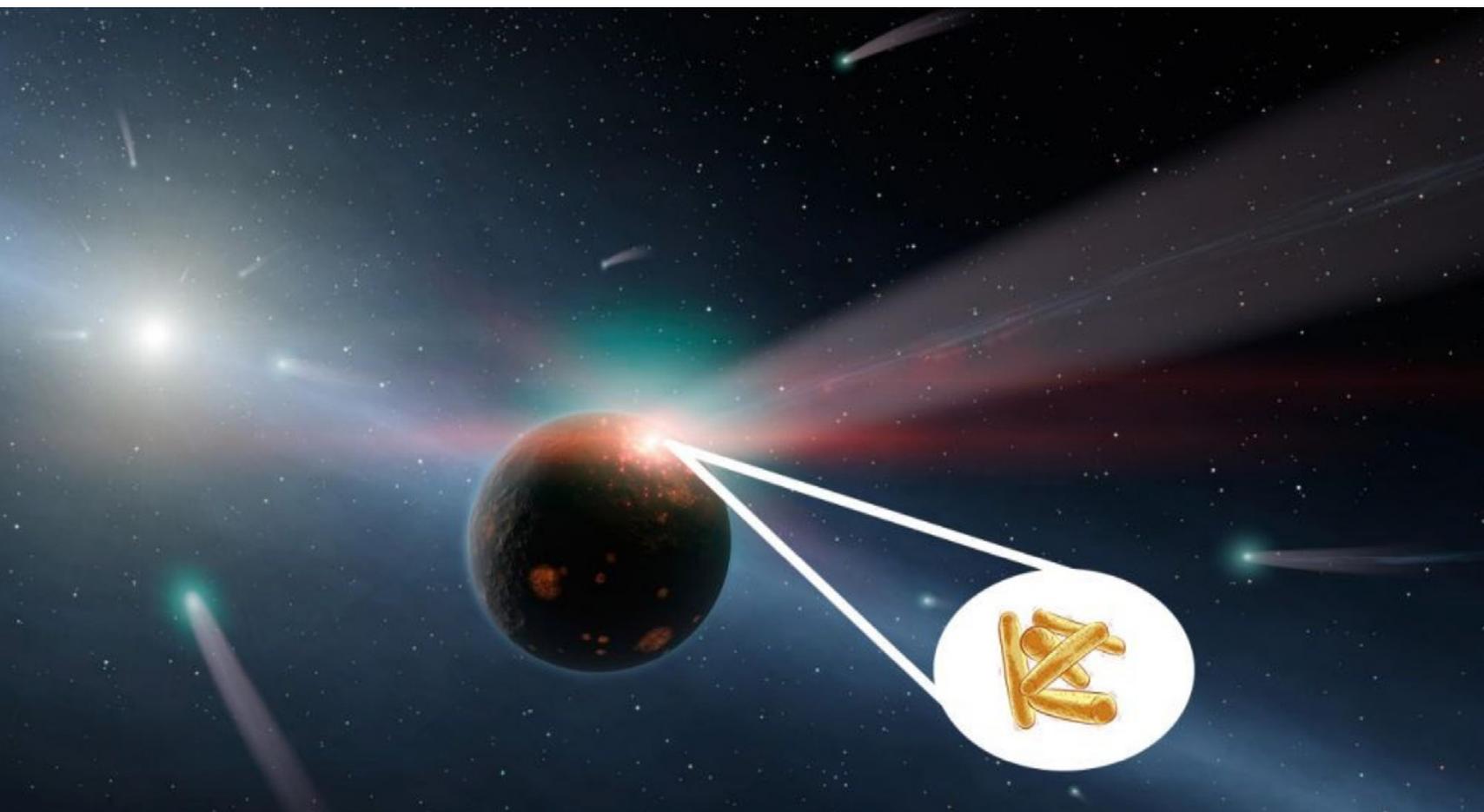
Las plantas también dependen de la interacción benéfica entre la raíz y los microorganismos en cuanto a la disponibilidad de nutrientes, la promoción del crecimiento y la supresión de la enfermedad. Las técnicas recientes han aportado ideas nuevas sobre los microbiomas de la raíz de las plantas. Aunque este tema está fuera del enfoque de nuestra revisión, sirve para ver la omnipresencia de los microorganismos en el ambiente donde transcurre la ganadería<sup>24,30,22</sup>.

La producción de productos lácteos y carne por los rumiantes depende de procesos biológicos que tienen lugar en el suelo, las plantas forrajeras y el rumen de los animales.

Cada uno de estos componentes tiene un microbioma asociado que, tradicionalmente, se consideraba ecosistemas distintos. De todas formas, estos microbiomas operan bajo los mismos principios ecológicos y están conectados por medio del agua, los flujos de energía y los ciclos de nutrientes, del carbono y el nitrógeno.

Puede costar mucho considerar que los microbiomas de la tierra, las plantas y los animales sean una continuidad (continuum), pero se empieza ya a referir a este enfoque holístico<sup>30</sup>.

En biología, el continuum se hace evidente desde Darwin mediante su teoría de la evolución de las múltiples especies y la adaptación a sus respectivos entornos durante millones de años; los seres vivos somos un continuo de transformación<sup>9</sup>.



## MIRANDO A LA MASTITIS BOVINA A TRAVÉS DEL MICROBIOMA

Los recientes estudios metagenómicos, indican que las secreciones mamarias de cuarterones clínicamente sanos, pueden albergar marcadores genéticos de diversos grupos bacterianos que en su amplia mayoría, no han sido asociados con mastitis.

Estas observaciones han dado lugar al concepto de Microbiota Comensal Mamaria, cuyas propiedades ecológicas pueden tener importantes implicaciones para la mejor comprensión de la patogénesis, el desarrollo de nuevos productos profilácticos y terapéuticos, así como ser una alternativa a los medicamentos antimicrobianos.

Los estudios realizados hasta hoy suponen que la diversidad óptima de microbiota mamaria está asociada con la homeostasis inmune, mientras que la microbiota de cuartero-

nes con mastitis (o con un historial de mastitis), es considerablemente menos diversa.

No se sabe todavía si la disrupción de la diversidad de microbiota de la ubre (disbiosis) tiene cierto papel en la determinación de la susceptibilidad a la mastitis.

Además, poco se sabe de las contribuciones de varios factores bióticos y abióticos en la formación de microbiota de ubres en su conjunto (Derakhshani et al.2018)<sup>8</sup>.

Para tener una visión amplia y real del papel que juegan los elementos microbianos en la génesis de las infecciones, hemos de partir desde un enfoque general hacia un análisis restringido y así evitar una visión estrecha de un determinado sistema microecológico. Los diferentes nichos de la glándula (ápice del pezón, canal del pezón, y secreciones mamarias), están interconectados como un ecosistema microbiano altamente dinámico.

Utilizando las expresiones nuevas para ayudar a conocer los nuevos parámetros que han entrado en jue-

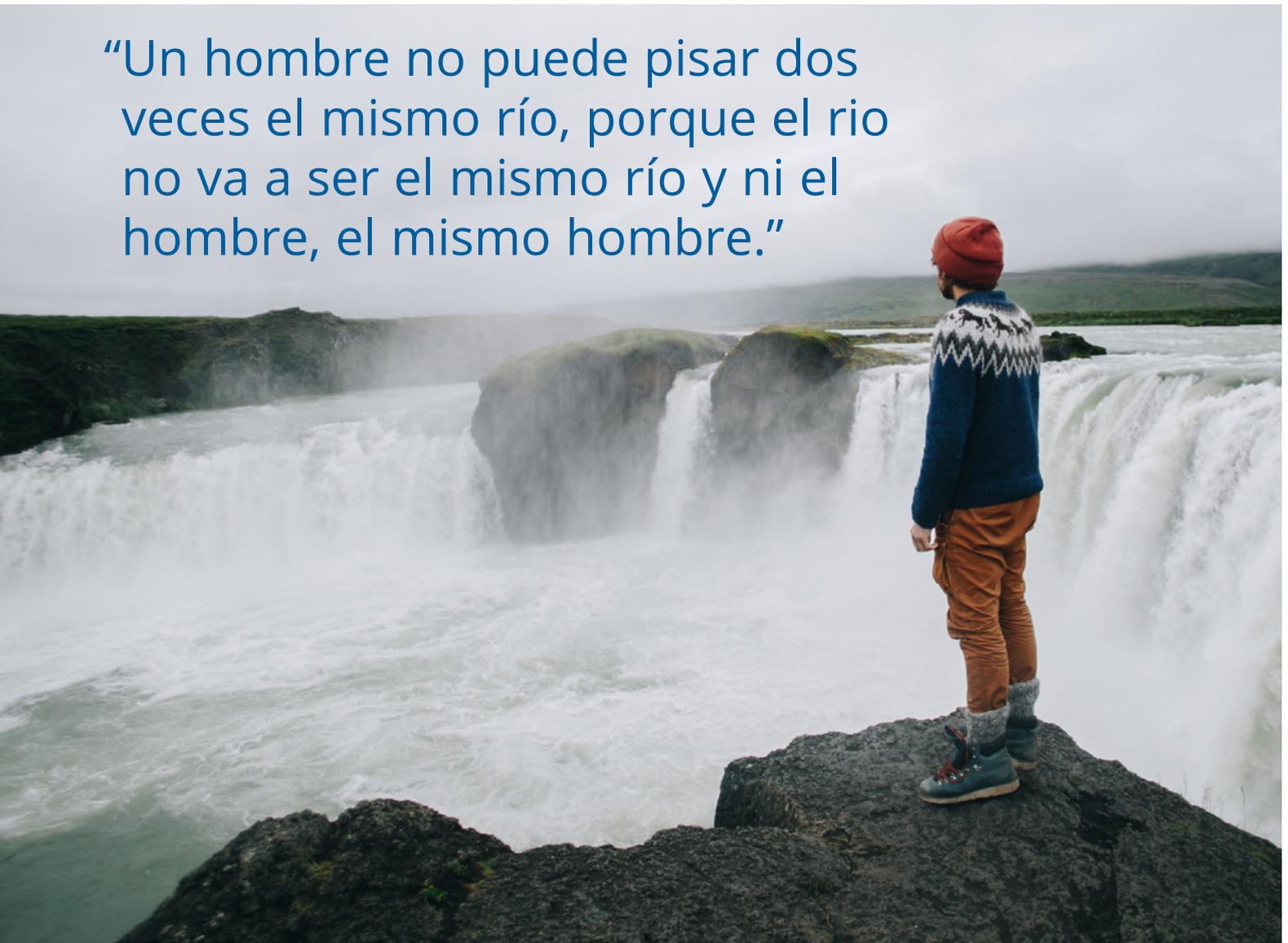
go, por sí solo no ayudan a cambiar la visión clásica, incluso, en ciertos casos, puede provocar rechazo por no coincidir con los datos habitualmente en uso.

El Proyecto de Microbioma de la Tierra (EMP\*) para procesar la diversidad y el potencial funcional de 200.000 muestras ambientales, aproximadamente, en una primera visión pareció tan enorme y ambicioso, que al principio fue tachado de pura locura<sup>16</sup>, sin embargo, este proyecto ya está en marcha.

Este proyecto es un amplio esfuerzo de colaboración, que intenta caracterizar la diversidad de la vida microbiana en el planeta, tanto desde el punto de vista taxonómico como funcional.

Ahora bien, acercándonos a las explotaciones ganaderas, donde se suele realizar la actividad de producción con la presencia de ganado y el personal responsable de llevar a cabo el manejo, podemos considerar ya la presencia de microbioma en los individuos, en los animales y en el

“Un hombre no puede pisar dos veces el mismo río, porque el río no va a ser el mismo río y ni el hombre, el mismo hombre.”



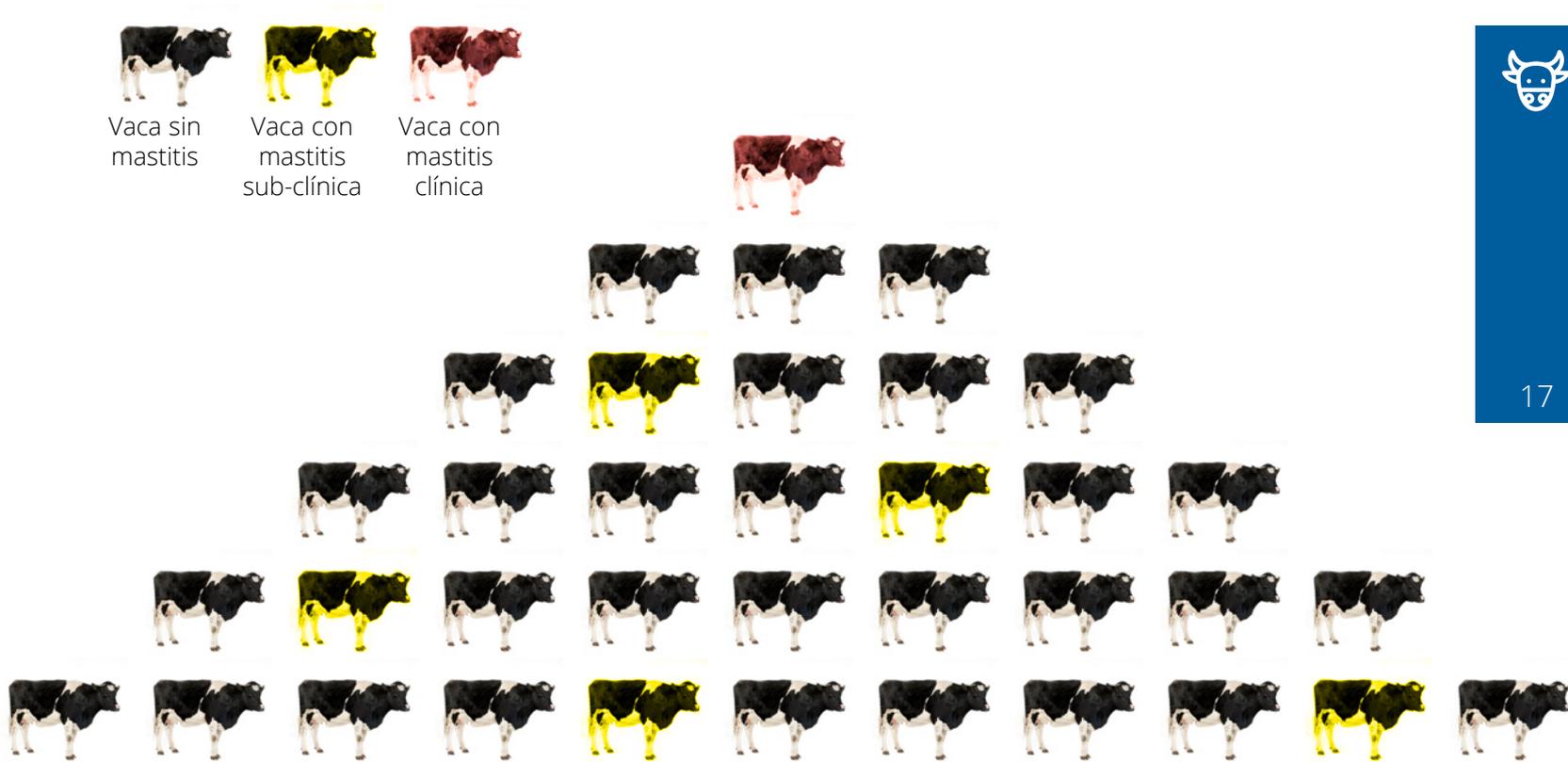


Figura 1. Mastitis clínica y subclínica, punto de iceberg (Disbiosis)

ambiente y sospechar de la posibilidad que pueden interactuar entre sí. Hay que tener presente el carácter dinámico de la microbiota, tanto desde el punto de vista numérico, como de composición en cuanto a las especies presentes.

Según los cálculos especulativos, cada vaca podría albergar más de  $10^{15}$  (mil billones) de microorganismos en su rumen<sup>25,59</sup>

Estos microorganismos abarcan a bacterias, protozoarios y hongos.

La población de microorganismos está en constante cambio debido a muchos factores, entre ellos la división y la eliminación. Esto nos recuerda la cita de Heráclito:

“Un hombre no puede bañarse dos veces el mismo río, porque el río no va a ser el mismo río y ni el hombre, el mismo hombre.”

Todos los fenómenos que ocurren en la naturaleza están en constante movimiento y cambio.

Aunque el microbioma del hombre en un principio nos suele recordar el microbioma intestinal, sin embargo no hay que olvidar que hay microbiotas en el estómago, esófago, cavidad oral, cabello, fosas nasales, piel, aparato reproductor, etc.

Lo mismo ocurre con las vacas lecheras. Sin embargo, aquí, el microbioma del rumen y el microbioma de las ubres revisten mayor importancia y están más estudiados.

Las bacterias presentes en la leche en la especie humana constituyen el microbioma de leche humana. Tanto el trabajo tradicional de cultivo bacteriológico, como los estudios recientes con la detección molecular del DNA bacteriano, han llegado a la misma conclusión: el microbioma de la leche consiste mayormente en *Staphylococcus epidermidis*, y *Streptococcus*. La prevalencia de otros grupos de bacterias, como *Lactobacillus*, varía bastante mientras la prevalencia de *Bifidobacterias* es normalmente baja. (Ver también **Fig. 3A**).

Actualmente, se ha aceptado al microbioma de la leche humana como parte de un estado fisiológico normal con sugerencia de potenciales efectos benéficos<sup>18</sup>.

Se ha observado que algunas bacterias intestinales pueden también desplazarse a la glándula mamaria.

El desplazamiento de ciertas bacterias desde el intestino a la glándula mamaria, la llamada translocación bacteriana, ocurre sin provocar sepsis. Se cree que la migración de estas

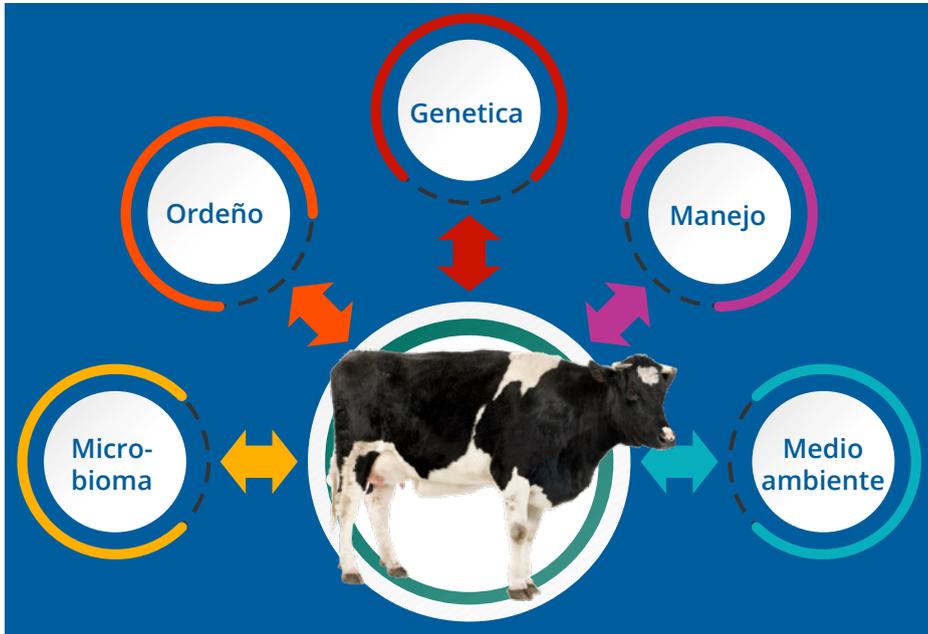
bacterias ocurre dentro de células derivadas del intestino (posibles fagocitos mononucleares)<sup>45</sup>.

En las vacas, aunque los estudios no han logrado confirmar el desplazamiento de bacterias intestinales a las secreciones mamarias, sin embargo sostienen que existe una ruta entero mamaria para ciertos componentes bacterianos durante la lactación<sup>46</sup>.

También en el ganado bovino hay trabajos sobre cepas de bacterias de ácido láctico, estudiando su potencial de colonización del tejido mamario y sus propiedades inmunomoduladoras. La finalidad es encontrar cepas que puedan competir con bacterias patógenas e impedir su colonización y así ejercer efectos benéficos prolongados<sup>19,10</sup>.

En las vacas, la comunidad bacteriana de las ubres cambia en relación al historial de mastitis de un animal; los cuarterones sanos y los que han sufrido mastitis demuestran perfiles taxonómicos divergentes, lo que podría tener aplicación para el desarrollo de técnicas de diagnóstico del estado de salud mamaria<sup>4</sup>.

Los avances en el estudio de la patogénesis de la mastitis bovina, sin lugar a dudas, van a tener una repercusión importante en la prevención,



**Figura 2.** Principales factores implicados en mastitis bovina.

diagnóstico y control de la mastitis bovina.

La mastitis se suele clasificar según la intensidad de la respuesta inflamatoria. Se considera mastitis clínica cuando la leche o la ubre tienen un aspecto anormal visible.

Cuando la leche tiene una apariencia normal, pero el número de células somáticas en la leche supera niveles normales, se habla de mastitis subclínica.

Anteriormente, según la costumbre, la leche que tenía un aspecto normal y menos de 100.000 células somáticas/ml y que resultaba negativa en cultivo bacteriológico aerobio, se consideraba sana e incluso "estéril".

La aplicación de nuevas técnicas (técnicas de secuenciación) a las muestras de leche negativas en cultivo bacteriológico, han dado lugar a la detección de nuevas bacterias no identificadas previamente.

Las investigaciones indican que la leche sana contiene DNA de bacterias que no se asociaban con la leche previamente. Se puede citar, entre otras, a miembros de la familia *Lachnospiraceae* y géneros *Faecalibacterium* y *Enhydrobacter*.

El concepto de la microbiota está interrogado debido a la fisiología de la glándula mamaria y a la baja concentración de bacterias viables o DNA bacteriana, en las muestras de leche recogidas de glándulas con apariencia saludable.

La microbiota es más abundante, pero menos diversa, en los cuarterones que tienen inflamación o un historial de inflamación. Muchos tipos de bacterias que previamente no han sido asociadas con la leche o mastitis pueden ser dianas para futuras investigaciones de microbiota de leche<sup>7</sup>.

A medida que crece el interés en nuevos terapéuticos para la mastitis bovina, se ve la necesidad de tener un mejor conocimiento de los factores que pueden influenciar la homeostasis mamaria.

La microbiota comensal de los distintos nichos de las ubres (pezón, ápice del pezón y conducto de los pezones) y el ecosistema intramamario, pueden modular la susceptibilidad de una vaca a la mastitis por medio del contacto directo microorganismo-microorganismo (diafonía -*cross talk*), estimulación indirecta de la inmunidad o por ambas vías<sup>8</sup>.

Aunque el conocimiento actual del ecosistema microbiano de ubres está en su infancia, se supone que la diversidad óptima de la microbiota intramamaria, compuesto con un equilibrio sano entre los grupos bacterianos comensales y oportunistas, es fundamental para el mantenimiento del equilibrio entre las respuestas pro y antiinflamatorias y por tanto, el mantenimiento de la homeostasis.

El estado fisiológico de la vaca, las características anatómicas de las

ubres, los rasgos genéticos asociados con la capacidad de la respuesta inmune y factores ambientales pueden alterar la composición de la microbiota de la ubre.

Se requiere un gran esfuerzo para descifrar los mecanismos potenciales por cuya intervención, las microbiotas de varios compartimentos de la ubre interactúan entre sí, con bacterias patógenas y con el sistema inmune.

Hay cada vez más evidencias de que la incidencia de mastitis clínica está asociada con el descenso de la diversidad y la composición alterada (disbiosis) de la microbiota intramamaria.

Los patógenos que provocan mastitis tienen varios factores de virulencia que les hace capaces de colonizar la ubre. Como consecuencia, después de la colonización inicial, los patógenos pueden sobrecrecer en el ecosistema de la ubre y reducir su microbiota comensal.

La dominancia de una bacteria patógena dentro del ecosistema de la ubre normalmente no persiste y se resuelve de forma espontánea, sea por la actividad de células del sistema inmune y el despeje por medio de ordeño regular o bien con la ayuda de intervenciones terapéuticas.

La resolución de la respuesta inflamatoria inducida por bacterias patógenas, es seguida de una sucesión de bacterias que pueden resultar en la recuperación total de comensales perdidos. La recuperación parcial de especies perdidas conduce al desarrollo de un estado degradado de microbiota.

El grado de recuperación de las bacterias comensales, depende del espectro de actividad de los antibióticos utilizados para el tratamiento de mastitis. Pero también depende mucho de los factores de virulencia de los patógenos invasivos. Las características de virulencia, como la formación de biofilm y la capacidad de internalización de las células epiteliales mamarias, hace posible que ciertas bacterias patógenas ocupen distintos nichos de la ubre durante extensos intervalos de tiempo y de esta forma, suprimen el crecimiento de bacterias comensales<sup>8</sup>.



Los biofilms se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo. El crecimiento en biofilms representa la forma habitual de crecimiento de las bacterias en la naturaleza<sup>38</sup>. Los exopolisacáridos son polímeros secretados por microorganismos a su entorno.

La disminución de bacterias comensales puede tener efectos perjudiciales sobre la homeostasis, estabilidad y resistencia a la mastitis.

Las bacterias comensales pueden resistir la colonización de patógenos exógenos e inhibir el sobrecrecimiento de oportunistas existentes por medio de varios mecanismos, incluyendo competencia metabólica en cuanto a recursos nutritivos limitantes, producción de péptidos inhibidores (bacteriocinas), alterando las condiciones de ecosistema para desfavorecer el crecimiento de patógenos (disminución de pH), la competencia por los sitios de adherencia de las células epiteliales y regulando las respuestas pro y antiinflamatoria del huésped.

Por lo tanto, la recuperación parcial de bacterias comensales después de una infección mamaria o tratamiento antibiótico puede facilitar tanto una nueva infección como la recurrencia de infecciones persistentes.

Recientemente se habla del papel crucial de los microbiomas de rumen

y colon en las enfermedades intestinales y extraintestinales.

Se ha demostrado que tanto el microbioma de rumen, como el de colon, tienen impacto sobre la fisiología, metabolismo y la función inmune, confiriendo resistencia directa e indirecta (inmunomediada) contra patógenos entéricos.

La ruptura de microbiomas de rumen y colon o la disbiosis - que se refiere a un desequilibrio anormal de los miembros benéficos y protectores en relación a los miembros oportunistas de la microbiota - ha sido relacionado a varios trastornos metabólicos que ocurren, desde los inicios a mediados de lactación, como la acidosis subaguda de rumen, el descenso de grasa de la leche y el timpanismo.

La disbiosis de microbioma de colon hace impacto sobre los metabolitos y compuestos producidos por la microbiota.

Estas moléculas repercuten en las capacidades metabólicas e inmunológicas del huésped tanto dentro como fuera del colon. Por ejemplo, por medio de ruta enterohepática o eje colono-cerebral, que de forma retroactiva, hace impacto sobre la diversidad y el comportamiento de microbioma en el tracto digestivo, y también influye potencialmente sobre los microbiomas de otros sitios, como el tracto vaginal y la glándula mamaria, resultando en la iniciación o progresión de enfermedades infecciosas o inflamatorias en

estos sistemas como la mastitis (Khaifipour *et al* 2017)<sup>17</sup>.

Las interacciones entre los miembros comensales que ocupan diferentes nichos ecológicos de la ubre (ápice del pezón, conducto del pezón y la leche) tienen un papel crucial en la composición y las propiedades funcionales del microbioma de la glándula mamaria y gobiernan de forma potencial la susceptibilidad de la vaca lechera frente a la mastitis infecciosa.

## EL SISTEMA INMUNE

El sistema inmune como es de esperar, juega un papel importante en la prevención de infecciones mamaras. La función principal del sistema inmune es prevenir la infección bacteriana primaria de la glándula mamaria, eliminar las infecciones existentes y restaurar la función normal de la glándula.

La glándula mamaria utiliza una red de factores físicos, celulares y humorales para proteger a la vaca frente a los diferentes grupos de patógenos que provocan la mastitis<sup>1</sup>.

La mastitis de procedencia ambiental es la forma más común y más costosa de control en las granjas modernas. Puede producirse por un amplio rango de especies bacterianas y la clasificación binaria de especies, como patógenos o ambientales, suele ser desorientadora, particularmente con respecto a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* y especies de *Streptococcus spp.* incluido *Streptococcus agalactiae*.

El estiércol bovino, el ambiente interno de naves y los pastos usados, son las mayores fuentes de patógenos de las mastitis, incluyendo *E. coli* y *S. uberis*.

Un ciclo de transmisión por alimentos contaminados con estiércol puede ampliar y perpetuar la presencia de tales patógenos, incluidos *Klebsiella pneumoniae* y *S. agalactiae*.

Debido a la presión social para reducir el recurso a los antibióticos como instrumento de control de mastitis, en el manejo de la mastitis de origen ambiental se ha de recurrir, cada vez más, a la prevención que el tratamiento. Esto requiere la reduc-





ción de la exposición ambiental por medio del control de la cama, del pasto, el manejo preordeño, así como el refuerzo de la respuesta del huésped al desafío bacteriano.

Existen vacunas eficaces para reducir el impacto de la mastitis por coliformes, pero el desarrollo de vacunas frente a mastitis por bacterias Gram positivas no ha progresado mucho.

Medios más adecuados para la identificación de agentes causales y averiguar la pauta de transmisión, pueden contribuir a que el uso de antibióticos y la aplicación de medidas de control tengan un enfoque más acertado<sup>2</sup>.

Los componentes inmunes, celulares y humorales, asociados a la glándula mamaria también juegan un papel importante en la protección de la glándula frente a los agentes infecciosos<sup>3</sup>.

Hemos de recordar que el epitelio de la glándula mamaria no es un epitelio mucoso.

## **SUPERFICIE MUCOSA**

Una superficie mucosa, colonizada por poblaciones bacterianas, despliega distintos mecanismos protectores. Dentro del epitelio columnar

simple, las células caliciformes secretan el mucus que cubre la superficie.

Las células caliciformes son células epiteliales especializadas o "glándulas unicelulares" secretoras de mucus, presentes en los revestimientos epiteliales de las mucosas de las vías respiratorias y del aparato digestivo. Las células caliciformes también secretan proteínas antimicrobianas, quimiocinas y citocinas, que demuestran funciones en la inmunidad innata, más allá del mantenimiento de una barrera.

Las capas internas y externas de mucus retienen altas concentraciones de IgA secretora y péptidos antimicrobianos de huésped secretados por células epiteliales o células especializadas, como las células de Paneth. Las células M transportan antígenos de lumen intestinal a las células dendríticas de la zona inferior.

Las células M (o células Microfold), asociadas al tejido linfóide del tubo digestivo, captan los microorganismos en la luz intestinal y los transportan a través de la pared intestinal hasta lamina propia, donde puede tener lugar la interacción con células inmunitarias<sup>51</sup>.

Las células plasmáticas secretan IgA. Las células T y B están presentes en la lamina propia y algunas están aso-

ciadas en las formaciones linfoides pertenecientes a la mucosa<sup>12</sup>.

## **SUPERFICIE DESPROVISTA DE MUCOSA**

El epitelio de la glándula mamaria esta desprovisto de mucosa y la leche de vaca contiene bajas concentraciones de IgG. Se pueden ver pocos macrófagos y neutrófilos en el lumen, pero cuando hay una inflamación, los neutrófilos se reúnen en masa.

Las bacterias intrusas serán detectadas por el epitelio, compuesto por células epiteliales y células dendríticas intraepiteliales.

Las células dendríticas son un tipo de células especializadas, características del sistema inmunitario de los mamíferos. Aunque forman parte de la inmunidad innata, siendo capaces de fagocitar patógenos, su función principal es procesar material antigénico.

Los macrófagos y células T están presentes en la lamina propia, pero formaciones linfoides organizadas no están presentes en las glándulas sanas.

Ciertos investigadores no están convencidos con la hipótesis de la micro-

bioma mamario, debido en parte a su incompatibilidad con los conocimientos actuales de los sistemas inmune innato y adaptativo<sup>12</sup>.

Algunos estudios han demostrado que la comunidad bacteriana de las ubres varía en función del historial de mastitis del animal, aparte del episodio de infección. Puesto que los cuarterones sanos y los que ya han desarrollado mastitis muestran perfiles taxonómicos divergentes, que pueden ser separados en dos grupos, esto puede servir como un instrumento diagnóstico con el fin de verificar la salud mamaria<sup>13</sup>.

Aunque el mecanismo de acción de la microbiota de la glándula mamaria no está del todo claro, hay ciertos trabajos que indican que tiene algún papel inmunomodulador. Se creen que el uso de bacterias de ácido láctico puede ser una alternativa efectiva en la prevención de mastitis durante el secado.

En los animales inoculados en el periodo del secado por vía intramamaria con bacterias de ácido láctico se han visto la estimulación de defensas locales y sistémicas<sup>(14)</sup>. Estos informes necesitan confirmación y no hay que juzgar de forma apresurada su eficacia clínica.

También se ha investigado la microbiota del calostro para verificar la

diversidad bacteriana y su asociación con la mastitis clínica en la lactación temprana.

Según algunos estudios, el microbioma del calostro de vacas primíparas difiere del de las vacas múltiparas y acoge algunas diversidades y marcadores taxonómicos de la salud de glándula mamaria que son, únicamente, específicos de vacas primerizas<sup>15</sup>.

## UN NUEVO ENFOQUE PARA EL CONTROL Y PREVENCIÓN

Una mirada a las distintas bacterias que componen las diversas microbiotas en los distintos nichos ecológicos, de vacas lecheras en general y en las ubres en particular, puede cambiar la percepción clásica que se suele tener de la situación sanitaria de una granja y las medidas recomendables para la solución de los problemas, como el uso de antibióticos y la mejora de las condiciones higiénicas (Fig.4).

Conviene revisar los factores predisponentes de la mastitis bovina y repasar brevemente los pasos que, de forma clásica o tradicional, se

solían dar para una prevención eficaz antes de ver si puede haber posibles vías de modificación.

El plano clásico de control de mastitis todavía en uso comprende varios puntos<sup>(5) (29) (21)</sup>:

- Tratamiento y registro de los casos clínicos de mastitis.
- Desinfección de pezones después de ordeño.
- Tratamiento durante el secado.
- Eliminación de casos crónicos.
- Mantenimiento eficaz del equipo de ordeño.

Aunque en la práctica se suele utilizar programas con estos o parecidos rasgos, sin embargo, esto no indica que una vez establecido el plan todo va funcionar de una forma ideal y exitosa.

En cuanto a un buen manejo para el control de mastitis, hay también consejos para prevenir infecciones en momentos críticos como:

- Vigilancia de las vacas primerizas un mes antes y un mes después del parto, manteniéndolas en un ambiente limpio antes, durante y después del parto.
- Limpieza a fondo del área destinada al parto antes de entrada de las vacas.





- Alojamiento de vacas de libre pasto con suficiente antelación para evitar un estrés excesivo.
- Separación de las vacas tratadas del resto del grupo y su ordeño al final, aplicando medidas higiénicas.
- Aplicación de medidas higiénicas rigurosas, como disposición permanente de cama limpia e higiene de las ubres cuando hay retención de secundinas, partos con distocia...etc. Sin olvidar otras medidas básicas y de sentido común <sup>(6) (21)</sup>.

Los géneros bacterianos patógenos más comunes aislados por cultivo de muestras de leche de mastitis han sido *Staphylococcus*, *Enterobacter* y *Streptococcus*. Aunque las especies implicadas son mucho más numerosas.

Las siguientes bacterias reflejan una colección de patógenos de mastitis; The Mastitis Pathogen Culture Collection (MPCC)<sup>52</sup>.

*Corynebacterium spp.*, *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Nocardia*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus spp. (coagulasa negativas)*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus canis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus spp.*, *Trueperella pyogenes*.

Cabe recordar de paso los llamados *Estafilococos coagulasa negativos* que

se están convirtiendo en patógenos predominantes en muchos países.

La expresión *Estafilococos no aureus*; *Non-aureus staphylococci (NAS)*, es sinónimo de este grupo que están en el enfoque de nuevas investigaciones<sup>53</sup>.

Tradicionalmente, la glándula mamaria antes del primer parto, la producción de calostro y el inicio de la secreción de leche solía considerarse estéril. Después del comienzo de la secreción de leche, la glándula se convertiría funcionalmente en un sistema abierto, con conexión directa al medio ambiente. Sin embargo, como hemos visto, actualmente se habla de una comunidad natural de bacterias de la glándula mamaria: la microbiota. (Fig.4).

Las vacas con mastitis clínica tienen cambios más ostensibles en el rendimiento de leche y su composición que las vacas con mastitis subclínica.

Las alteraciones en la composición de la leche asociadas con las mastitis se deben a varios factores que incluyen la síntesis y secreción deteriorada de leche, degeneración y necrosis de células epiteliales de la glándula y el transporte de sustancias de la sangre a la leche y viceversa.

Los cambios más notables asociados con mastitis son el descenso de concentraciones de grasa, lactosa, caseína, y calcio y aumento de con-

centraciones de albumina, sodio y cloruro.

Las concentraciones de lipasas, proteasas, oxidasas y plasminogeno (profibrinolisisina) aumentan, lo que puede de forma adversa perjudicar la estabilidad y sabor de la leche y productos lácteos procesados.

Además, en vacas con mastitis se han detectado factores que no están presentes normalmente en la leche tales como mediadores inflamatorios, enterotoxinas y endotoxinas bacterianas.

Desde la perspectiva de industria láctea, la mastitis disminuye la concentración de componentes deseables y aumenta la concentración de componentes no deseables. Todo esto afecta el sabor y la vida útil de producto<sup>20</sup>.

Los microorganismos que con más frecuencia provocan mastitis se suelen dividir en dos categorías amplias:

- a. Microorganismos patógenos que se pueden transmitir de una vaca a otra y en primer lugar durante el proceso de ordeño
- b. Microorganismos patógenos ambientales que se encuentran en todo el hábitat de vacas lecheras.



## MASTITIS CONTAGIOSA

Los microorganismos que provocan mastitis contagiosa incluyen, en primer lugar a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y *Mycoplasma bovis*. Otras especies de *Mycoplasma* se citan cada vez más como patógenos importantes de mastitis contagiosa.

La primera fuente de estos microorganismos es la ubre de vacas afectadas. Las características más importantes de granjas con problema de mastitis infecciosa son las siguientes:

- Alta prevalencia de infección intramamaria durante la lactación.
- Recuento alto de células somáticas en leche de tanque.
- Infección de larga duración.
- La mastitis clínica normalmente tiene una baja incidencia. La infección es frecuentemente subclínica.
- La prevalencia de la infección es baja durante el periodo seco

## MASTITIS AMBIENTAL

La mastitis ambiental está provocada en un primer lugar por Estreptococos ambientales (*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*), y coliformes (*Escherichia coli* y especies de *Klebsiella*).

Las características de mastitis ambiental incluyen:

- Baja prevalencia durante la lactación
- Bajo recuento de células somáticas en leche de tanque
- Infección de corta duración
- Alta prevalencia durante el secado
- Muchos casos resultan en mastitis clínica

## CONTROL DE MASTITIS EN UNA POBLACIÓN BOVINA

Para poder abordar de una forma práctica el control de mastitis tenemos que prescindir de conceptos clásicos temporalmente sin restar su importancia como ayuda eficaz para el control.

En una población o granja bovina la proporción más importante de las infecciones ocurren de forma subclínica y la forma clínica se presenta en pocas ocasiones, lo que ha dado lugar a considerar el caso clínico como la punta del iceberg (**Fig. 1**).

No cabe duda de que, en la aparición de mastitis influyen numerosos factores (**fig. 2**). En una situación dada, algunos de estos factores se pueden controlar, otros son para reflexionar. El manejo de posibles vehículos de contagio, control de utensilios de ordeño, higiene de personal, contaminación del medio ambiente, el suelo, el agua... son factores importantes que hay que tener en cuenta.

Una mirada de paso para evaluar la importancia de fuentes de contagio puede ser útil para diseñar el sistema de control y sopesar la envergadura con que estamos enfrentados. Echando un vistazo a las distintas microbiotas del hombre, que es el que maneja el ordeño directamente, a las distintas microbiotas de la propia vaca y considerando otros factores, como son elementos de ecosistema donde se localiza la granja, presencia de animales de otras especies, presencia de insectos, etc., vemos en que medio inmenso se ha de llevar a cabo el control de mastitis. (Ver **Fig. 3A**, **Fig. 3B**, **Fig. 4**).

No se incluyen los agentes de zoonosis, ni otras bacterias patógenas que pueden estar involucradas en ciertos casos.

## MICROBIOMAS NORMALES, EL UNIVERSO SILENCIOSO

Exponer el amplio universo de componentes de un microbioma normal no significa abrir la caja de Pandora, puesto que no se trata de bacterias patógenas en sentido estricto, sino más bien de elementos que tienen un papel principal en conseguir el bienestar animal y el estado de homeostasis.

Las gráficas siguientes exponen los principales microbiomas que interactúan a nivel de las granjas bovinas

A. Microbiota del hombre. Fig.-3 A y Fig.-3 B

B. Microbiota de vaca. Fig.4

Conviene citar de paso que no se han tratado datos homogéneos puesto que se ha utilizado términos taxonómicos diferentes, filas, familias, géneros, especies, etc.

Hay motivos prácticos para este tema. Primero no enfrentar las terminologías tradicionales con más recientes. En segundo lugar, para evitar nombrar decenas o cientos de bacterias e ciertos casos, y por último optar por reflejar nombres que suenan más familiares en la práctica diaria.

La filogenia de las bacterias se desarrolla en la actualidad a partir de la elaboración de árboles filogenéticos moleculares, especialmente basados en el ARN ribosomal, pero también sobre la base de proteínas (proteoma) y genes (genoma). Se reflejan como ejemplo, los rasgos más básicos de la taxonomía bacteriana para una lectura más fluida (**Tabla 1**).

Para aclarar dudas respecto a nombres de bacterias, su taxonomía y más descripción consultar literatura especializada<sup>44</sup>. Las bacterias reflejadas en la descripción de las gráficas se incluyen sólo como ejemplo del amplio espectro de componentes de una determinada microbiota.

La abreviación sp. (spp. En plural) utilizada después de epíteto genérico, indica la especie, bien porque se desconoce o porque todavía no ha sido identificada.

Figura 3A. Microbiota del hombre. Fuente de datos<sup>42</sup>.

**1** Microbiota normal de oído externo:

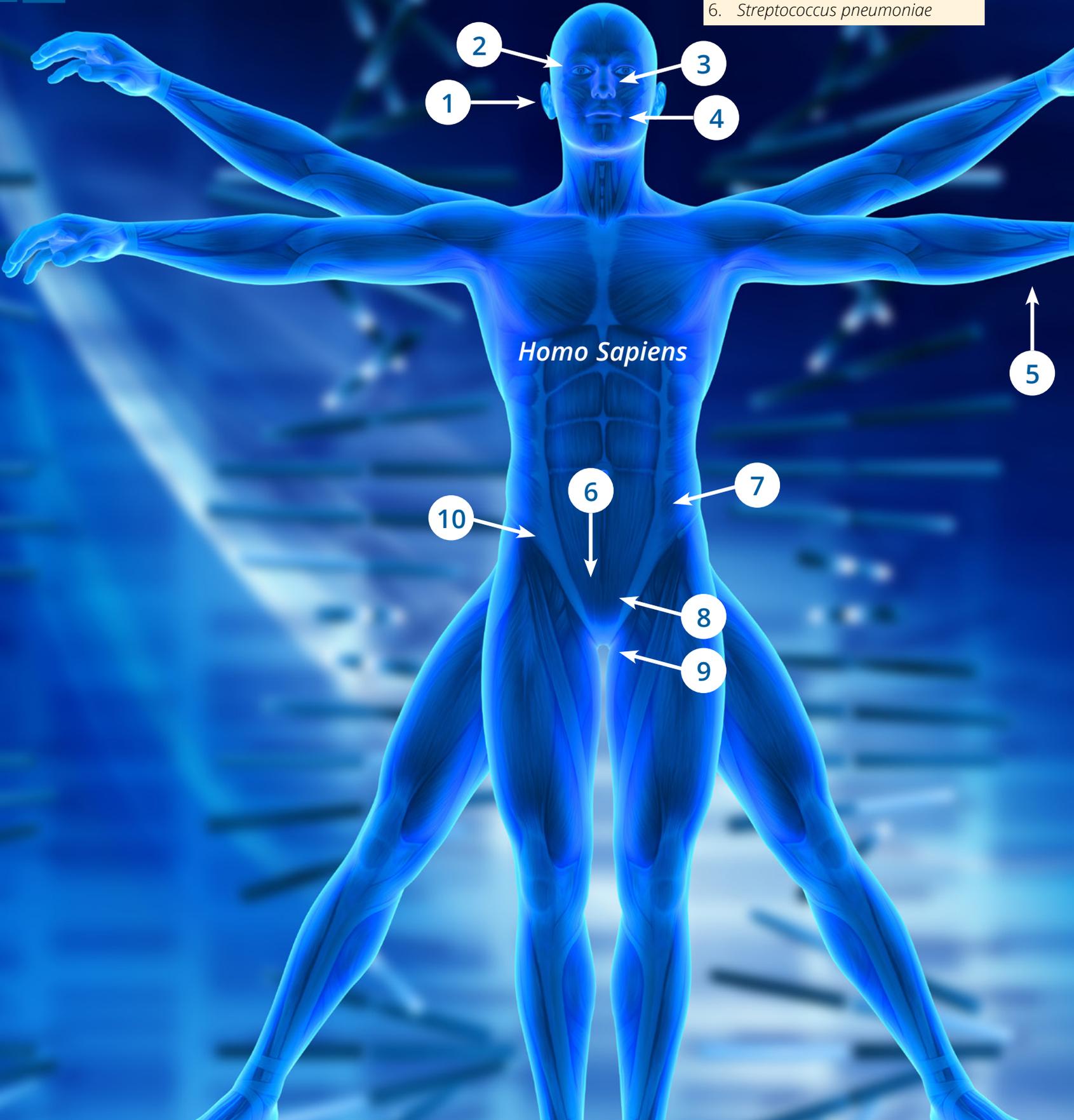
1. *Estafilococos coagulasa negativo*
2. *Difteroides*
3. *Pseudomonas spp.*
4. *Enterobacteriaceae* (ocasional)

**2** Microbiota normal de la conjuntiva:

1. *Estafilococos coagulasa negativo*
2. *Haemophilus spp.*
3. *Staphylococcus aureus*
4. *Estreptococos* (varias especies)

**3** Microbiota normal de la nariz:

1. *Estafilococos coagulasa negativo*
2. *Streptococcus viridans*
3. *Staphylococcus aureus*
4. *Neisseria spp.*
5. *Haemophilus spp.*
6. *Streptococcus pneumoniae*



## 4 Microbiota normal de boca y oro faringe:

1. *Streptococcus viridans*
2. Estafilococos coagulasa negativo
3. *Veillonella spp.*
4. *Fusobacterium spp.*
5. *Treponema spp.*
6. *Porphyromonas spp.*
7. *Neisseria spp.* y *Branhamella catarrhalis*
8. *Streptococcus pneumoniae*
9. *Streptococcus hemolíticos (no grupo A).*
10. *Candida spp.*
11. *Haemophilus spp.*
12. *Diphtheroides*
13. *Actinomyces spp.*
14. *Eikenella corrodens*
15. *Staphylococcus aureus*

## 5 Microbiota normal de la piel:

1. Estafilococos coagulasa negativo
2. *Difteroides (incluido Propionobacterium acnes)*
3. *Staphylococcus aureus*
4. *Estreptococos* varias especies
5. *Bacillus spp.*
6. *Malassezia furfur*
7. *Candida spp.*
8. *Mycobacterium spp.* (Ocasional)

## 6 Microbiota normal del intestino grueso:

1. *Bacteroides spp.*
2. *Fusobacterium spp.*
3. *Clostridium spp.*
4. *Peptostreptococcus spp.*
5. *E. coli*
6. *Klebsiella spp.*
7. *Proteus spp.*
8. *Lactobacillus spp.*
9. *Enterococos*
10. *Streptococcus (varias especies)*
11. *Pseudomonas spp.*
12. *Acinetobacter spp.*
13. *Estafilococos coagulasa negativo*
14. *Staphylococcus aureus*
15. *Mycobacterium spp.*
16. *Actinomyces spp.*

## 7 Microbiota normal del estómago:

1. *Streptococcus*
2. *Staphylococcus*
3. *Lactobacillus*
4. *Peptostreptococcus*

## 8 Microbiota normal de la uretra:

1. Estafilococos coagulasa negativo
2. *Difteroides*
3. *Estreptococos* (varias especies)
4. *Mycobacterium spp.*
5. *Bacteroides spp.* y *Fusobacterium spp.*
6. *Peptostreptococcus spp.*
7. Para microbioma urogenital más detallado en el hombre consultar literatura especializada.

## 9 Microbiota mamaria:

Microbiota de leche materna en mujeres sanas.

Fuentes de datos<sup>43,18</sup>:

1. *Staphylococcus spp.*
2. *Streptococcus spp.*
3. *Lactococcus spp.*
4. *Leuconostoc spp.*
5. *Weisella spp.*
6. *Enterococcus spp.*
7. *Propionibacterium spp.*
8. *Lactobacillus spp.*
9. *Bifidobacterium spp.*

## 10 Microbiota de intestino delgado

1. *Lactobacillus spp.*
2. *Bacteroides spp.*
3. *Clostridium spp.*
4. *Enterococos*
5. *Enterobacteriaceae?*



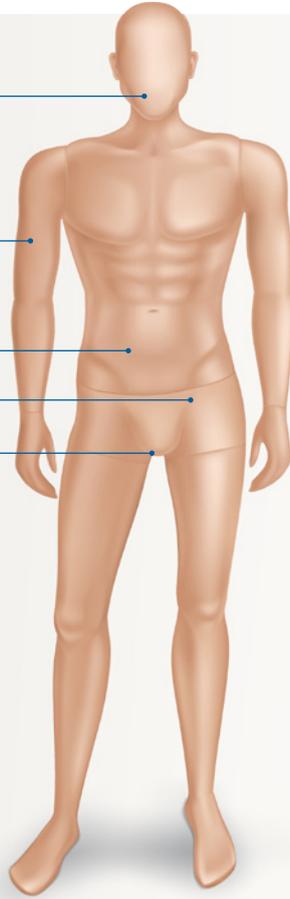
**Boca, faringe, sistema respiratorio:**  
600 especies

**Piel:** 1.000 especies

**Estómago:** 25 especies

**Intestinos:** 500-1.000 especies

**Tracto urogenital:** 60 especies



**Microbioma del hombre**

**Figura 3B.** El número de diferentes especies que constituyen una comunidad bacteriana representa la variedad de bacterias involucradas, también puede oscilar en función de distintos factores (microbioma). El número de bacterias en una comunidad (aproximativo) representa la importancia numérica de la comunidad (microbiota) sin importar las especies constituyentes<sup>48</sup>.



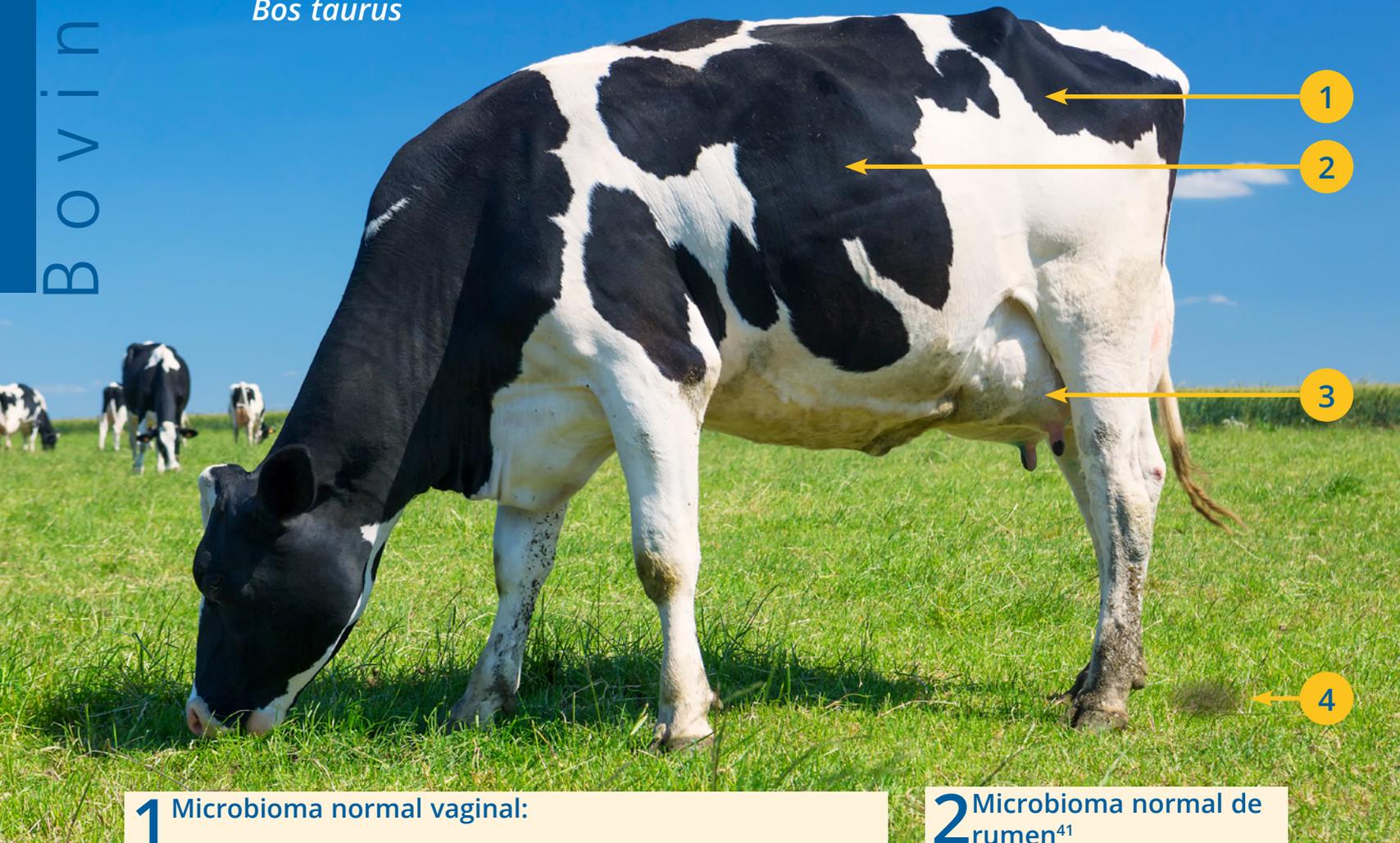
**Tabla 1.** Rango o niveles taxonómicos en orden ascendente.

Rango o nivel	Ejemplo	Sufijos de rango
<b>Especies</b>	<i>E.coli</i>	
<b>Genero</b>	<i>Escherichia</i>	(ae)
<b>Familia</b>	Enterobacteriaceae	(aceae)
<b>Orden</b>	Enteroacteriales	(ales)
<b>Clase</b>	γ- Proteobacteria	(ia)
<b>Filo (División)</b>	Proteobacteria	ver notas*
<b>Dominio (Reino, Taxón)</b>	Bacteria	

\* Notas: El filo no lleva código bacteriológico, la comunidad científica sin embargo utiliza el plural de tipo género normalmente con la excepción de Firmicutes, Cyanobacteria y Proteobacteria cuyos nombres no proceden de nombre de género<sup>47</sup>.



*Bos taurus*



## 1 Microbioma normal vaginal:

Se ha recurrido a diferentes fuentes para reflejar un listado relativamente representativo, aunque no sea muy exacto.

- Microbioma vaginal post parto de vacas sanas<sup>11</sup>
  - *Lactobacillus sakei subsp.* (Dominante en vacas sanas)
  - *Weissella koreensis.* (Dominante en vacas sanas)
  - *Bacteroides spp.*
  - *Fusobacterium spp.*
  - *Enterococcus spp.*
  - *Prevotella spp.*
  - *Clostridium perfringens* (cepas)
  - *Escherichia coli*
- Vacas sanas<sup>36</sup>
  - *Streptobacillus spp.*
  - *Aggregatibacteria spp.*
  - *Phocoenobacter spp.*
  - *Sediminicola spp.*
  - *Sporobacter spp.*
- Vacas sanas tratadas para sincronización de estero (filos)<sup>28</sup>:
  - *Firmicutes*
  - *Tenericutes*
  - *Proteobacteria*
  - *Bacteriodetes*
  - *Actinobacteria*
  - *Spirochaetae*

## 2 Microbioma normal de rumen<sup>41</sup>

- Bacterias fibrolíticas(familias):
  - *Lachnospiraceae*
  - *Eubacteriaceae*
  - *Prevotellaceae*
  - *Fibrobacteraceae*
- Bacterias metanógenas:
  - *Metanobacteriaceae*
- Otras bacterias:
  - *Pasteurellaceae*
  - *Desulfovibrionaceae*
  - *Coriobacteriaceae*
  - *Spirochaetaceae*
  - *Helicobacteraceae*
  - *Veillonellaceae*
  - *Lactobacillaceae*

Figura 4. Microbiota de vaca. Solo se detallan los nichos ecológicos más importantes.



### 3 Microbioma normal de la glándula mamaria<sup>8</sup>

<b>Microbiota del calostro:</b>	Firmicutes <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Staphylococcus</i></li> <li>• <i>Lachnospiraceae</i></li> <li>• <i>Ruminococcaceae</i></li> <li>• <i>Enterococcus</i></li> <li>• <i>Clostridiales</i></li> </ul>	Bacteroidetes <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Prevotella</i></li> <li>• <i>Bacteroidales</i></li> <li>• <i>Flavobacteriaceae</i></li> <li>• <i>Sphingobacterium</i></li> </ul>	Proteobacteria <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Acinetobacteria</i></li> <li>• <i>Pseudomonas</i></li> <li>• <i>Stenotrophomonas</i></li> <li>• <i>Alcaligenaceae</i></li> </ul>	Actinobacteria <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Corynebacterium</i></li> <li>• <i>Mycobacterium</i></li> </ul>
<b>Microbiota de la leche:</b>	Firmicutes <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Staphylococcus</i></li> <li>• <i>Streptococcus</i></li> <li>• <i>Lachnospiraceae</i></li> <li>• <i>Ruminococcaceae</i></li> <li>• <i>Enterococcus</i></li> <li>• <i>Clostridiales</i></li> <li>• <i>Aerococcus</i></li> </ul>	Bacteroidetes <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Prevotella</i></li> <li>• <i>Bacteroidales</i></li> <li>• <i>Flavobacteriaceae</i></li> <li>• <i>Sphingobacterium</i></li> </ul>	Proteobacteria <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Acinetobacteria</i></li> <li>• <i>Pseudomonas</i></li> <li>• <i>Stenotrophomonas</i></li> </ul>	Actinobacteria <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Corynebacterium</i></li> <li>• <i>Bifidobacterium</i></li> <li>• <i>Propionibacterium</i></li> </ul>
<b>Microbioma del canal del pezón</b>	Firmicutes <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Staphylococcus</i></li> <li>• <i>Lachnospiraceae</i></li> <li>• <i>Ruminococcaceae</i></li> <li>• <i>Planococcaceae</i></li> <li>• <i>Clostridiales</i></li> <li>• <i>Aerococcus</i></li> </ul>	Bacteroidetes <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Flavobacteriaceae</i></li> <li>• <i>Bacteroidales</i></li> <li>• <i>Sphingobacterium</i></li> </ul>	Proteobacteria <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Acinetobacter</i></li> <li>• <i>Pseudomonas</i></li> <li>• <i>Stenotrophomonas</i></li> <li>• <i>Comamonas</i></li> </ul>	Actinobacteria <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Corynebacterium</i></li> <li>• <i>Arthrobacter</i></li> </ul>
<b>Microbiota del ápice del pezón</b>	Firmicutes <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Staphylococcus</i></li> <li>• <i>Lachnospiraceae</i></li> <li>• <i>Ruminococcus</i></li> <li>• <i>Aerococcus</i></li> <li>• <i>Facklamia</i></li> <li>• <i>Lactobacillaceae</i></li> <li>• <i>Clostridiales</i></li> </ul>	Bacteroidetes <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Bacteroidaceae</i></li> <li>• <i>Prevotellaceae</i></li> <li>• <i>Sphingobacterium</i></li> </ul>	Proteobacteria <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Sphingomonadaceae</i></li> <li>• <i>Pseudomonadaceae</i></li> <li>• <i>Enterobacter</i></li> </ul>	Actinobacteria <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Corynebacterium</i></li> <li>• <i>Propionibacterium</i></li> </ul>

Las principales fuentes de microbiota mamaria son el material de cama, el equipo de ordeño mecánico, las manos de los operarios de ordeño, los insectos y la lactación cruzada de terneros (*cross suckling*)<sup>8</sup>.

### 4 Microbioma fecal<sup>40</sup>

<b>Todos los filos*</b>	1. <i>Bacteria NA</i>	4. <i>Planctomycetes</i>	7. <i>Cyanobacteria</i>	10. <i>Proteobacteria</i>
	2. <i>Fibrobacteres</i>	5. <i>Spirochaetes</i>	8. <i>Tenericutes</i>	11. <i>Bacteroidetes</i>
	3. <i>Verrucomicrobia</i>	6. <i>Lentisphaerae</i>	9. <i>Actinobacteria</i>	12. <i>Firmicutes</i>
<b>Bacteroidetes:</b>	1. <i>Marinilabiaceae</i>	4. <i>Bacteroidetes NA</i>	7. <i>Bacteroidaceae</i>	9. <i>Bacteroidales NA</i>
	2. <i>Flavobacteriaceae</i>	5. <i>Prevotellaceae</i>	8. <i>Porphyromonadaceae</i>	
	3. <i>Rhodothermaceae</i>	6. <i>Rikenellaceae</i>		
<b>Proteobacteria:</b>	1. <i>Deltaproteobacteria NA</i>	4. <i>Neisseriaceae</i>	7. <i>Desulfovibrionaceae</i>	10. <i>Acetobacteriaceae</i>
	2. <i>Rickettsiales NA</i>	5. <i>Rodospirillaceae</i>	8. <i>Succinivibrionaceae</i>	11. <i>Enterobacteriaceae</i>
	3. <i>Desulfuromonadaceae</i>	6. <i>Proteobacteria NA</i>	9. <i>Alcaligenaceae</i>	
<b>Firmicutes:</b>	1. <i>Pasteuriaceae</i>	5. <i>Lactobacillaceae</i>	10. <i>Bacillaceae</i>	15. <i>Clostridia NA</i>
	2. <i>Bacillales NA</i>	6. <i>Streptococcaceae</i>	11. <i>Eubacteriaceae</i>	16. <i>Clostridiaceae</i>
	3. <i>Thermoactinomycetaceae</i>	7. <i>Aerococcaceae</i>	12. <i>Peptococcaceae</i>	17. <i>Erysipelotrichaceae</i>
	4. <i>Planococca</i>	8. <i>Penibacillaceae</i>	13. <i>Firmicutes NA</i>	18. <i>Lachnospiraceae</i>
		9. <i>Veillonellaceae</i>	14. <i>Clostridiales NA</i>	19. <i>Ruminococcaceae</i>

NA: not applicable (no corresponde en el caso)<sup>58</sup>; \*Aumenta su proporción(%) de 1 a 12

## EL MICROBIOMA FECAL, EL FACTOR IMPORTANTE DE LA CONTAMINACIÓN AMBIENTAL

El microbioma fecal de bovinos juega un papel importante en la salud y productividad de animales sin olvidar su importancia en la seguridad alimentaria y eliminación de patógenos.

Los miembros patógenos de esta comunidad microbiana como *E. coli* O157:H7, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., *Leptospira interrogans*, *Cryptosporidium parvum* pueden suponer un serio riesgo para la salud pública.

Las vacas estabuladas corren más riesgo de contraer mastitis ambiental que las vacas en libertad. El estallido de mastitis ambiental suele ocurrir durante el verano, debido a una lluvia abundante o por el tiempo muy caluroso que hace que las vacas se refugien bajo la sombra de los árboles y crean una zona muy contaminada. Las fuentes de bacterias patógenas ambientales pueden ser estiércol, cama, pienso, polvo, barro y agua.

Los materiales usados como cama pueden ser una fuente importante de patógenos ambientes por su contacto con las ubres.

La fluctuación de la población bacteriana en la cama depende de presencia de nutrientes (contaminación), la humedad y la temperatura. Las materias inorgánicas con humedad reducida como arena o piedra caliza molida, son mejores que el material orgánico desmenuzado y cortado.

Generalmente la cama hecha de material seco lleva menor número de patógenos. El ambiente más cálido favorece el crecimiento de bacterias, mientras las bajas temperaturas lo reducen.

Los intentos de desinfección con desinfectantes químicos o cal (CaO) para reducir el número de los coliformes suelen ser poco prácticos, puesto que han de aplicarse con frecuencia por no decir diariamente. El reemplazo de la cama orgánica en el tercio posterior de establo ha sido útil reduciendo el contacto de orificios mamarios con las bacterias coliformes.

Los factores ambientales que pueden favorecer el contacto de microorganismos con las ubres son: hacinamiento, ventilación pobre, recogida inadecuada de estiércol, acceso a charcos o terrenos lodosos, falta de higiene en la sala de maternidad o espacios destinados a parto y en general la falta de limpieza y la mala higiene de la granja<sup>39</sup>.

## GRANJAS ECOLÓGICAS

Las granjas ecológicas procuran evitar las condiciones que provocan la enfermedad. Las vacas están mucho más tiempo en el pastizal y tratan de evitar los tratamientos antibióticos<sup>35</sup>.

Cabe recordar las características de una granja ecológica para centrarse mejor en el tema de la importancia de factores ambientales.

Aparte de las condiciones necesarias para considerar a una granja como de producción ecológica o convencional, lo que nos puede interesar, es la gran diferencia que existe entre estas dos formas de producción.

Mientras que la leche ecológica tiene que proceder de vacas que nunca hayan sido tratadas con antibióticos, la leche convencional puede proceder de vacas que han recibido un tratamiento antibiótico y pasado suficiente tiempo hasta no tener ningún residuo de antibiótico en su leche. Por tanto, no hay que confundir la leche etiquetada como libre de antibióticos con la leche ecológica.

Los rumiantes, gracias a su peculiar sistema digestivo, son capaces de digerir materias altamente fibrosas como la hierba. Una dieta basada en granos, como el maíz, es demasiado rica en almidones para el sistema digestivo de la vaca. Este tipo de dieta provoca problemas digestivos como timpanismo, acidosis, ulceración y abscesos de rumen.

En el sistema de corrales además, el tema del estiércol agrava este problema, por estar la vaca la mayor parte del tiempo de pie o tumbado sobre el estiércol. Por lo que aparte de problemas digestivos, pueden sufrir mastitis, procesos respiratorios, infecciones pódalas y metritis.

El tratamiento convencional de todos estos procesos se basa en los antibióticos.

## EL EFECTO DE ANTIBIÓTICOS EN LA MICROBIOTA MAMARÍA BOVINA

La búsqueda de una relación armónica de las poblaciones bacterianas de distintos nichos microecológicos con su huésped, está abriendo el camino para ver cómo se puede conseguir un estado de salud y bienestar sin perjudicar la producción y la calidad de vida del animal.

En realidad, se está considerando que las infecciones mamarias no son meras infecciones por una bacteria patógena, sino consecuencia de una disbiosis poblacional. El uso no justificado de antibióticos puede ser un factor importante al perturbar el mantenimiento requerido para la homeostasis microbiana.

El uso metódico de antibióticos en el secado en las vacas sin antecedente de mastitis, no parece aportar ventaja alguna según investigaciones recientes, en comparación con vacas similares que no reciben antibióticos en el secado<sup>49</sup>.

## ¿QUÉ HACER?

Hemos de empezar con soluciones que sean factibles para la mayoría de las granjas, al mismo tiempo que van apareciendo nuevas posibilidades de mejora.

Cada granja tiene un perfil propio de los microorganismos implicados en mastitis.

Para determinar este perfil hay que recurrir a un laboratorio con suficiente experiencia en el diagnóstico y determinación los microorganismos implicados.

El uso de medios de diagnóstico molecular no ha cambiado la verdadera patobiología de la mastitis o de los microorganismos implicados, pero ha contribuido a un diagnóstico y manejo más precisos a nivel de la granja<sup>54</sup>.

Las técnicas tradicionales de cultivo bacteriológico, de momento pueden ser útiles para lograr un perfil de microorganismos implicados en patologías de mastitis en una granja determinada. Los gastos a largo plazo pueden ser recompensados por un control más eficaz de la patología



mamaria y una producción de leche con mejor calidad.

Se puede, con un sistema racional, utilizar los antibióticos más convenientes y solamente optar por el uso de antibióticos acertados que van a funcionar con gran probabilidad de ser eficaces, y no porque son meramente recomendados.

Conseguir un perfil acertado de microorganismos que pueden ser implicados en casos de mastitis por mediación de laboratorios, requiere el envío de dos tipos de muestras principalmente:

1. Muestras recogidas de casos individuales de mastitis a lo largo de un periodo determinado (se pueden guardar las muestras en refrigeración y enviarlas juntas, previa consulta con el laboratorio).
2. Muestras recogidas de leche de tanque, utensilios de ordeno, y del ambiente, para evaluar entre otros, la contaminación ambiental.

Es imprescindible realizar pruebas de sensibilidad a los antibióticos (antibiograma) de bacterias patógenas que se han aislado de muestras remitidas.

Solo de una forma metódica y actualizando la situación de la granja, se puede lograr un control relativamente eficaz que perdure en el tiempo.

## CASOS ESPECIALES

En ciertas ocasiones es imprescindible recurrir a métodos complementarios para el control de la mastitis bovina. Como breve indicación, se puede tener en cuenta las siguientes notas:

### El estado VBNC de las bacterias cultivables

Varios factores como la presión de antibióticos, temperaturas altas o bajas, inanición (falta de nutrientes), cloración, cambio de pH y estrés oxidativo pueden inducir en cualquier bacteria su paso al estado Viable Pero No Cultivable VBNC (por sus siglas en inglés: Viable But Non-Culturable). Los mecanismos específicos para la transición de bacterias al estado VBNC y su regresión a la forma cultivable no parecen del todo claros.

Se citan entre las bacterias que nos pueden interesar la *E.coli* (*E. coli* O157:H7), *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*<sup>56</sup>.

Durante el proceso de infección, muchos microorganismos patógenos se esfuerzan por sobrevivir en el sitio de infección en frente de otros microorganismos que rivalizan con ellos, y medicamentos antibacterianos que pueden recibir para el tratamiento. Estos factores pueden influir en que los patógenos entren en el estado VBNC, haciéndolos metabólicamente inactivos. Sin embargo, bajo unas condiciones particulares pueden volver a expresar sus rasgos de virulencia.

El estado VBNC, una estrategia de supervivencia adoptado por bacterias, tiene implicaciones en muchos campos, incluidos el control de medio ambiente, y el manejo de enfermedades infecciosas<sup>56</sup>.

En una situación compleja sería necesaria una investigación con el uso conjunto de métodos de cultivo, de diagnóstico molecular y otras técnicas complementarias para descartar este fenómeno.

El uso de PCR en el diagnóstico de mastitis puede ser muy compli-

cado, puesto que el ADN de una bacteria que haya sido eliminado por mecanismos del sistema inmune sin haber causado ningún daño, puede considerarse como una señal de una infección intramamaria por dicha bacteria. El recurso a las pruebas moleculares en el diagnóstico y epidemiología de mastitis requiere considerar muchos factores y recurrir a laboratorios especializados<sup>55</sup>.

### Las bacterias no cultivables

Existen todavía muchas incógnitas respecto a la vida de las bacterias. Los microbiólogos ambientales estiman que menos del 2% de las bacterias pueden cultivarse en el laboratorio. ¿Por qué las condiciones de cultivo *in vitro* no permiten el crecimiento de todas las bacterias de una muestra?<sup>57</sup>.

Esto puede ser debido a la falta de un nutriente necesario, a la toxicidad del propio medio de cultivo, o a que otras bacterias presentes en la muestra produzcan sustancias que inhiben al microorganismo diana.

Otra de las razones de falta de crecimiento *in vitro* puede ser la ruptura de las redes de citoquinas bacte-





rianas<sup>50</sup>. Se piensa que las citoquinas bacterianas son mediadores de señalización bacteria-bacteria y pueden ser particularmente importantes coordinando el crecimiento de microorganismos en el biofilm bacteriano.

Además, cada vez se es más consciente de la magnitud con que las bacterias patógenas en infecciones mixtas se comunican entre sí y con su huésped mamífero.

Los microorganismos de la microbiota normal del hombre han evolucionado como un biofilm y pueden depender el uno del otro para la alimentación, así como asociarse para provocar la enfermedad en sujetos susceptibles. La investigación *in vitro* de tales microorganismos ha de tener en cuenta esta interdependencia.

Solo con la aparición de biología molecular se han logrado técnicas que permiten estudiar comunidades bacterianas mixtas en su totalidad sin sesgo por el cultivo. Lo que más frecuentemente se utiliza para la determinación de las bacterias, es la secuenciación de RNA de la pequeña subunidad del ribosoma (16S).

### Las bacterias siguen su camino

Las pruebas utilizadas para evaluar la calidad de la leche, tanto el conta-

je de las células somáticas como el recuento de bacterias o Bactoscan<sup>37</sup>, son de gran ayuda para evaluar tanto la existencia de mastitis infecciosa como la higiene aplicada durante el proceso de ordeño. Este último puede reflejar la limpieza insuficiente de equipo de ordeño, o preparación inadecuada de las ubres antes de ordeño. Puede indicar también el nivel contaminación de bacterias patógenas ambientales.

Las bacterias no suelen crecer por debajo de 5 grados centígrados en la leche, sin embargo, con altas temperaturas se multiplican en poco tiempo y afectan las propiedades de leche haciéndola inadecuada para procesar y reduciendo su fecha de caducidad.

El análisis específico de poblaciones bacterianas que contribuyen al Bactoscan de la leche de tanque también puede ayudar a identificar las bacterias responsables de mastitis en una granja determinada.

La contaminación ambiental es, principalmente, un problema de contaminación fecal y es un indicador de higiene inadecuada, produciendo un recuento alto de Coliformes. Las *Pseudomonas*, aunque no son de origen entérico, también indican una contaminación ambiental. Se clasifican como psicotrofas.

Determinar las bacterias en muestras de leche del tanque puede ir

mucho más lejos que un ensayo de control, puede también determinar muchos microorganismos que revistan importancia para el control de mastitis (*Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium bovis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Mycoplasma*, etc.)

Las bacterias ambientales están por todas partes, el estiércol, el barro, el aire, el agua, la piel, la cama, etc. Pueden contaminar e incluso producir una seria infección. El control higiénico del equipo de ordeño mecánico de forma regular es otro de los puntos claves de prevención.

## DISCUSIÓN

Existen innumerables artículos y estudios dirigidos al control de la mastitis bovina. Sin embargo, en la práctica vemos que este objetivo no se suele conseguir de la forma deseada.

El factor más importante en este campo consiste más bien en la óptica restringida que se ha tenido durante un largo periodo sobre los planes de control. La realidad es que no se puede tener un resultado fijo de un tema dinámico y multifactorial, solo puede haber resultados mejores y peores.

Los nuevos métodos de diagnóstico microbiológico conseguidos en los últimos decenios vienen, además de



añadir nuevos factores que han de ser tenidos en cuenta, para mejorar el plan de control. El conocimiento del microbioma sin duda alguna va a cambiar nuestro concepto clásico de causa y efecto en diagnóstico y tratamiento.

A parte de la práctica, entran en juego otros factores que no suelen considerarse muy importantes desde el punto de vista técnico. En el manejo y trato de animales hay factores que a veces pueden ser tan importantes para conseguir mejoras como una asociación de antibióticos. El cambio de un operario, por ejemplo, puede ser objeto fundamental de una queja de responsables de la granja que sospechan de una infección reciente como factor del descenso de la producción de leche.

La mastitis es la enfermedad endémica más importante de las vacas lecheras, y aparte de por bacterias, puede ser provocada por traumas, agentes químicos y daño térmico de las ubres.

El tejido secretor y los conductos de la ubre pueden ser dañados por

toxinas bacterianas. En ciertas ocasiones pueden perjudicar a las ubres de forma permanente. Aunque las vacas se recuperan aparentemente, las consecuencias pueden permanecer por el resto de la lactación y lactaciones siguientes.

Los medicamentos que con mayor probabilidad desequilibran el microbioma son los antibióticos.

Los antibióticos de amplio espectro pueden producir más daños al microbioma porque pueden actuar contra más especies.

La extensión de estos daños será función de varios factores, como son el tipo de antibiótico, la dosis, la duración del tratamiento, vía de administración y tiempo de eliminación<sup>26</sup>.

Los antibióticos de amplio espectro son antibióticos que suelen ser efectivos tanto contra las bacterias Gram positivas como Gram negativas.

Normalmente se suelen utilizar cuando no se dispone de estudios etiológicos y resultados de ensayo de la sensibilidad del agente casual, para

salvar tiempo y cuando se requiere un tratamiento inmediato.

Los antibióticos de espectro estrecho o limitado se pueden utilizar cuando se conoce el agente etiológico o se dispone del antibiograma correspondiente.

El resultado de los análisis y el diagnóstico tienen que estar disponibles de forma precisa y rápida antes de que se agrave la infección.

Los antibióticos no solo actúan sobre las bacterias que provocan infecciones, sino que también afectan a la microbiota residente<sup>27</sup>.

El equilibrio de la comunidad de microbioma puede ser alterado durante semanas, meses e incluso años según la dieta, factores ambientales, estrés, y medicaciones<sup>26</sup>.

Debido a la existencia de lazos entre la microbiota y el animal huésped, una perturbación de microbiota debido al uso de antibióticos puede afectar la fisiología y salud de huésped. Esto está demostrado en los estudios de microbioma intestinal del hombre.



# BOVINO CONCLUSION

La existencia de fronteras entre las distintas disciplinas de la Ciencia y consecuentemente profesiones, aunque en un principio parece útil para formación de conceptos orientados a ramas muy especializadas, tiene la desventaja de crear una visión estrecha y desconectada. Esta visión es inadecuada para actualizar temas tradicionalmente aceptados que se tratan dentro de unos márgenes determinados.

Las nuevas tecnologías han abierto muchas ventanas (y seguirán haciéndolo) a este nuevo universo microbiano donde tiene que ocurrir la producción ganadera, los microbiomas de las ubres, de otros órganos, del suelo y del ambiente en general y de

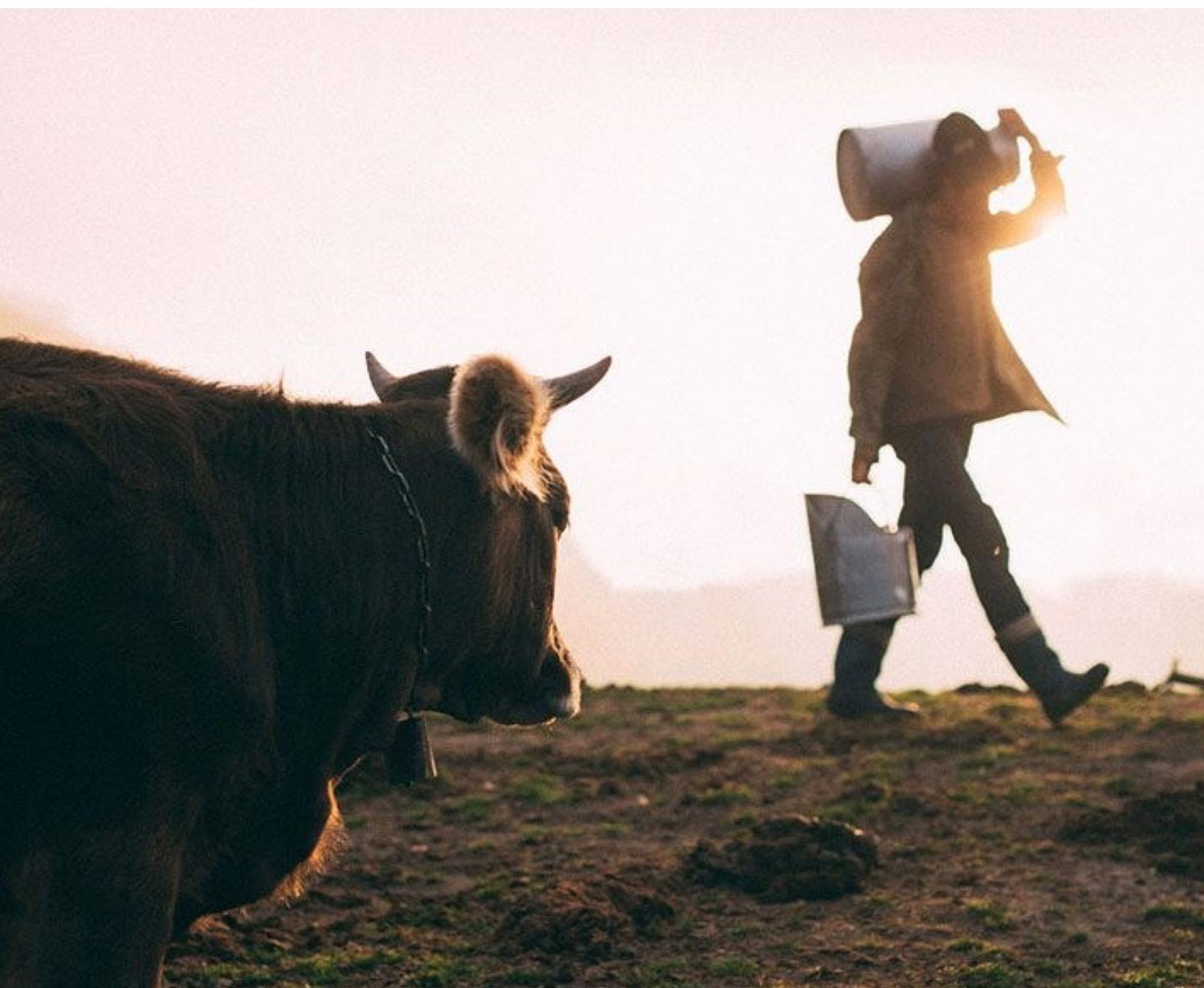
los operarios, todos pueden participar en el establecimiento de una microbiota mamaria con posibles procesos de inflamación y mastitis.

Mirando desde el punto de vista epidemiológico, la selección de bacterias con potencial patógeno por antibioterapias habituales, sin realizar pruebas de sensibilidad a los antibióticos, puede también provocar problemas adicionales, como la disbiosis, resistencia, etc.

Un repaso a los nuevos hallazgos tecnológicos es imprescindible para evitar las confusiones que suelen surgir y persistir al aceptar ciertos conceptos como fórmulas inamovibles.

## ABREVIACIONES

- HMP\* :Human microbiome project
- EMP\* :Earth microbiome project
- VBNC\* : Viable But Non-Culturable



# BIBLIOGRAFÍA

1. Sordillo LM.: Mammary Gland Immunobiology and Resistance to Mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2018 Nov;34(3):507-523.
2. I. C. Klaas R. N. Zadoks: An update on environmental mastitis: Challenging perceptions  
First published: 30 October 2017  
<https://doi.org/10.1111/tbed.12704>
3. Lorraine M. Sordillo, Katie L. Streicher: Mammary Gland Immunity and Mastitis Susceptibility  
*Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*  
April 2002, Volume 7, Issue 2, pp 135-146
4. H el ene Falentin, Lucie Rault, Aur elie Nicolas1, Damien S. Bouchard, Jacques Lassalas, Philippe Lamberton, Jean-Marc Aubry, Pierre-Guy Marnet, Yves Le Loir and Sergine Even : Bovine Teat Microbiome Analysis Revealed Reduced Alpha Diversity and Significant Changes in Taxonomic Profiles in Quarters with a History of Mastitis  
*Front. Microbiol.*, 08 April 2016 | <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00480>
5. Rick Watters : A fresh look at the five-point mastitis control plan  
*Progressive Dairyman* Published on 18 January 2018  
<https://www.progressivedairy.com/topics/herd-health/a-fresh-look-at-the-five-point-mastitis-control-plan>
6. Ann-Kristin Nyman : Epidemiological Studies of Risk Factors for Bovine Mastitis  
Doctoral thesis  
Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science  
Department of Clinical Sciences  
Swedish University of Agricultural Sciences  
Uppsala 2007
7. Stephanie A. Metzger, Laura L. Hernandez, Joseph H. Skarlupka, Teresa M. Walker, Garret Suen and Pamela L. Ruegg: A Cohort Study of the Milk Microbiota of Healthy and Inflamed Bovine Mammary Glands From Dryoff Through 150 Days in Milk  
*Front. Vet. Sci.*, 09 October 2018 | <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00247>
8. Derakhshani H, Fehr KB, Sepehri S, Francoz D, De Buck J, Barkema HW, Plaizier JC, Khafipour E: Invited review: Microbiota of the bovine udder: Contributing factors and potential implications for udder health and mastitis susceptibility.  
*J Dairy Sci.* 2018 Dec;101(12):10605-10625. doi: 10.3168/jds.2018-14860. Epub 2018 Oct 3.
9. continuum  
<https://www.psicoadapta.es/blog/que-es-el-continuum/>
10. Could cow's own lactic acid bacteria serve as a tool to prevent and/or treat mastitis? – Innovation for Agriculture. Farm antibiotics  
<https://www.farmantibiotics.org/tool-links/cows-lactic-acid-bacteria-serve-tool-prevent-and-or-treat-mastitis-innovation-agriculture/>
11. JunWang, ChengtaoSun, ChangLiu, YujiangYang, WenfaLu: Comparison of vaginal microbial community structure in healthy and endometritis dairy cows by PCR-DGGE and real-time PCR  
*Anaerobe*  
Volume 38, April 2016, Pages 1-6  
<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.11.004>Get rights and content
12. Pascal Rainard: Mammary microbiota of dairy ruminants: fact or fiction?  
*Vet Res.* 2017; 48: 25.
13. H el ene Falentin, Lucie Rault, Aur elie Nicolas, Damien S. Bouchard, Jacques Lassalas, Philippe Lamberton, Jean-Marc Aubry, Pierre-Guy Marnet, Yves Le Loir and Sergine Even: Bovine Teat Microbiome Analysis Revealed Reduced Alpha Diversity and Significant Changes in Taxonomic Profiles in Quarters with a History of Mastitis  
*Front. Microbiol.*, 08 April 2016
14. Pellegrino M, Berardo N, Giraudo J, Nader-Mac as MEF, Bogni C.: Bovine mastitis prevention: humoral and cellular response of dairy cows inoculated with lactic acid bacteria at the dry-off period.  
*Benef Microbes.* 2017 Aug 24;8(4):589-596. doi: 10.3920/BM2016.0194. Epub 2017 Jul 13.
15. Svetlana F.Lima,Andre G.V.Teixeira,- Fabio S.Lima,Erika K.Ganda,Catherine H.Higgins,GeorgiosOikonomou,Rodrigo C.Bicalho: The bovine colostrum microbiome and its association with clinical mastitis  
*Journal of Dairy Science*  
Volume 100, Issue 4, April 2017, Pages 3031-3042
16. Jack A Gilbert, Janet K Jansson & Rob Knight : The Earth Microbiome project: successes and aspirations  
*BMC Biology* volume 12, Article number: 69 (2014)  
<https://bmcbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12915-014-0069-1>  
<https://ebi-metagenomics.github.io/blog/2019/04/17/Earth-Microbiome-Project>
17. Khafipour, H. Derakhshani, K. B. Fehr, H. Khalouei, Z. Zhang, J. C. Plaizier: Associations between gut, mammary and vaginal microbiomes in dairy cows: Role in health and disease  
*Journal of Animal Science*, Volume 95, Issue suppl\_4, August 2017, Page 366, <https://doi.org/10.2527/asasann.2017.757>  
Published: 01 August 2017
18. Olga Sakwinska and Nabil Bosco : Host Microbe Interactions in the Lactating Mammary Gland  
*Front. Microbiol.*, 13 August 2019
19. Damien S. Bouchard ,Bianca Seridan,Taous Saraoui, Lucie Rault, Pierre Germon,Candelaria Gonzalez-Moreno,Fatima M. E. Nader-Macias,Damien Baud,Patrice Fran ois,Victoria Chuat,Florian Chain,Philippe Langella,Jacques Nicoli,Yves Le Loir,Sergine Even: Lactic Acid Bacteria Isolated from Bovine Mammary Microbiota: Potential Allies against Bovine Mastitis  
Published: December 29,2015  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144831>
20. Best Management Practices to Reduce Mastitis and Improve Milk Quality  
REFB: <https://dairy-cattle.extension.org/best-management-practices-to-reduce-mastitis-and-improve-milk-quality/>
21. Mickayla Myers, Lauren Mayo, Derek Nolan, and Donna Amaral-Phillips:



- Prevention of Mastitis in Fresh Cows  
<https://afs.ca.uky.edu/dairy/prevention-mastitis-fresh-cows>
22. Juan José Ibáñez:  
Principios Universales de los microbios animales y rizosferas vegetales: Salud, Alimentación y Sistema Inmune  
<http://www.madrimasd.org/blogs/universo/2017/05/08/148171>
23. Leroy Hood: Tackling the microbiome  
Science 08 Jun 2012: Vol. 336, Issue 6086, pp. 1209  
<https://science.sciencemag.org/content/336/6086/1209.full>
24. Joseph Edwards, Cameron Johnson, Christian Santos-Medellín, Eugene Lurie, Natraj Kumar Podishetty, Srijak Bhatnagar, Jonathan A. Eisen, and Venkatesan Sundaresan: Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice  
PNAS February 24, 2015 112 (8) E911-E920; first published January 20, 2015  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1414592112>  
Frontiers in plant microbiome research - Feb 24, 2015
25. Hank Puch : Rumens bugs 101 – feeding the microbes, not just the cow  
Progressive Cattleman Published on 23 December 2016  
<https://www.progressivecattle.com/topics/feed-nutrition/rumen-bugs-101-feeding-the-microbes-not-just-the-cow>
26. Caroline Horizny: HOW ANTIBIOTICS AFFECT YOUR MICROBIOME  
Wednesday, April 17, 2019  
<https://www.taconic.com/taconic-insights/microbiome-and-germ-free/antibiotics-affect-microbiome.html>
27. Megan Cully:  
Antibiotics alter the gut microbiome and host health  
MILESTONES 17 JUNE 2019  
<https://www.nature.com/articles/d42859-019-00019-x>
28. Quadros, Ricardo Zanella, Carlos Bondan, Giovana Ciacci Zanella, Fernanda Luiza Facioli, Arthur Neryda Silva, Eraldo Lourenso Zanella:  
Study of vaginal microbiota of Holstein cows submitted to an estrus synchronization protocol with the use of intravaginal progesterone device  
Volume 131, August 2020, Pages 1-6  
Research in Veterinary Science  
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.03.027> Get rights and content
29. Shokouhi Vahid: PROPHYLAXIE DES MAMMITES CHEZ LA VACHE  
Memoire (Maître –esSCIENCES VETERINAIRE 1975.  
Ecole Nationale Veterinaire de Lyon –Franc
30. Graeme T. Attwood, Steve A. Wakelin, Sinead C. Leahy, Suzanne Rowe, Shannon Clarke, David F. Chapman, Richard Muirhead and Jeanne M. E. Jacobs: Applications of the Soil, Plant and Rumen Microbiomes in Pastoral Agriculture  
Front. Nutr., 16 July 2019 | <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00107>  
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2019.00107/full>
31. [https://en.wikipedia.org/wiki/Microbial\\_ecology](https://en.wikipedia.org/wiki/Microbial_ecology)
32. Gaurab Karki : Microbial ecology and Role of microorganism in ecosystem-July 19, 2018  
<https://www.onlinebiologynotes.com/microbial-ecology-and-role-of-microorganism-in-ecosystem/>
33. Environment and Living Planet  
[http://scienceinspiration.blogspot.com/2014\\_10\\_01\\_archive.html](http://scienceinspiration.blogspot.com/2014_10_01_archive.html)
34. <https://biologydictionary.net/ecology/>
35. Heather Baker: Organic Dairy Regulations: What Makes a Cow “Organic?”  
<https://ubiquinol.org/blog/organic-dairy-regulations-what-makes-cow-organic>
36. Jeffrey D. Swartz, Medora Lachman, Kelsey Westveer, Thomas O'Neill, Thomas Geary, Rodney W. Kott, James G. Berardinelli, Patrick G. Hatfield, Jennifer M. Thomson, Andy Roberts and Carl J. Yeoman.:  
Characterization of the vaginal microbiota of ewes and cows reveals a unique microbiota with low levels of lactobacilli and near-neutral pH  
Front. Vet. Sci., 15 October 2014
37. <https://www.wynnstayagriculture.co.uk/blog/bactoscans-measure-milk-quality.html>
38. Lasa, J. L. del Pozo, J. R. Penadés, J. Leiva:  
Biofilms bacterianos e infección  
Anales del Sistema Sanitario de Navarra  
versión impresa ISSN 1137-6627
39. Christy E. Manyi-Loh, Sampson N. Mamphweli, Edson L. Meyer, Golden Makaka, Michael Simon, and Anthony I. Okoh:  
An Overview of the Control of Bacterial Pathogens in Cattle Manure  
Int J Environ Res Public Health. 2016 Sep; 13(9): 843.
40. Orin C. Shanks, Catherine A. Kelty, Shawn Archibeque, Michael Jenkins, Ryan J. Newton, Sandra L. McLellan, Susan M. Huse, Mitchell L. Sogin:  
Community Structures of Fecal Bacteria in Cattle from Different Animal Feeding Operations  
APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, May 2011, p. 2992–3001 Vol. 77, No. 9
41. Frédérique Chaucheyras-Durand and Faisury Ossa:  
The rumen microbiome: Composition, abundance, diversity, and new investigative tools  
The Professional Animal Scientist 30 (2014): 1–12
42. Prescott et al, Microbiology 4E, McGraw-Hill, 1999  
<https://www.garmaonhealth.com/4-food-solution/>
43. Lina María Osorio, Ana Solanye Umbarilab :  
Microbioma de la glándula mamaria  
Pediatría Vol. 48. Núm. 1. Microbiota de la glándula mamaria  
Rev Col Ped. 2015;48:1-  
<https://www.elsevier.es/es-revista-pediatrica-213-articulo-microbiota-glandula-mamaria-S0120491215000026>
44. Ashwathi P : Taxonomy: Definition, Objectives and Characteristics  
<https://www.biologydiscussion.com/bacteria/bacterial-taxonomy/bacterial-taxonomy-meaning-importance-and-levels/54679>
45. Lauren Milligan Newmark: From Mother's Gut to Milk  
SPLASH! milk science update: APRIL 2013  
<https://milkgenomics.org/article/from-mothers-gut-to-milk/>
46. Wayne Young, Brad C. Hine, Olivia A.M. Wallace, Megan Callaghan, and Rodrigo: Transfer of intestinal bacterial components to mammary secretions in the cow  
PeerJ. 2015; 3: e888.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4411484/>

47. [https://en.wikipedia.org/wiki/Bacterial\\_taxonomy](https://en.wikipedia.org/wiki/Bacterial_taxonomy)  
Phyla endings
48. Il microbioma: i nostri batteri, la nostra salute  
L'insieme di microorganismi che ci abita ci protegge da numerose malattie. Adesso è possibile conoscerli e preservarli.  
Infezioni · 26 Agosto, 2015  
<http://www.infezioniobiettivozero.info/8-infezioni/16-microbioma-nostri-batteri-nostra-salute>
49. Milk microbiome and bacterial load following dry cow therapy without antibiotics in dairy cows with healthy mammary gland  
Erika C. R. Bonsaglia, Marilia S. Gomes, Igor F. Canisso, Ziyao Zhou, Svetlana F. Lima, Vera L. M. Rall, Georgios Oikonomou, Rodrigo C. Bicalho & Fabio S. Lima  
Scientific Reports volume 7, Article number: 8067 (2017)  
<https://www.nature.com/articles/s41598-017-08790-5>
50. Citoquina - Wikipedia, la enciclopedia libre  
[es.wikipedia.org/wiki/Citocina](https://es.wikipedia.org/wiki/Citocina)
51. [https://en.wikipedia.org/wiki/Microfold\\_cell](https://en.wikipedia.org/wiki/Microfold_cell)
52. Simon Dufour, corresponding author  
Josée Labrie,<sup>a</sup> and Mario Jacques: The Mastitis Pathogens Culture Collection  
Journal List Microbiol Resour Announc. v.8(15); 2019 Apr PMC6460030  
Published online 2019 Apr 11. doi: 10.1128/MRA.00133-19
53. Bovine Bacteriology. Mastitis  
<https://vet.ucalgary.ca/labs/veterinary-bacteriology/research/mastitis>
54. Abhijit Gurjar, , Gloria Gioia, Ynte Schukken, Frank Welcome, Ruth Zadoks, Paolo Moroni: Molecular Diagnostics Applied to Mastitis Problems on Dairy Farms  
<https://milkquality.webhosting.cals.wisc.edu/wp-content/uploads/sites/212/2011/09/molecular-diagnostics-applied-to-mastitis-problems-on-dairy-farms.pdf>
55. Pamela L. Ruegg: PCR, PFGE, ABCD... Understanding and Using Molecular Tests to Diagnose and Control Mastitis  
Published on: 7/15/2014  
<https://en.engormix.com/dairy-cattle/articles/pcr-pfge-abcdunderstanding-using-t36217.htm>
56. Thandavarayan Ramamurthy, Amit Ghosh, Gururaja P. Pazhani and Sumio Shinoda:  
Current perspectives on viable but non-culturable (VBNC) pathogenic bacteria  
Public health review 31 July 2014
57. William Wade: Unculturable bacteria—the uncharacterized organisms that cause oral infections  
J R Soc Med. 2002 Feb; 95(2): 81–83.
58. not applicable (no corresponde en el caso)  
<https://es.wikipedia.org/wiki/N/a>
59. <https://www.purinamills.com/cattle-feed/education/detail/rumen-microbes-in-cows-101>

