



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
MAESTRÍA EN SALUD Y PRODUCCIÓN ANIMAL
SUSTENTABLE

EVALUACIÓN DE TOLERANCIA, SEGURIDAD Y EFICACIA DE DOS LISADOS
DE *CORYNEBACTERIUM CUTIS* ADMINISTRADOS EN EL PERIODO SECO Y
LA LACTANCIA TEMPRANA EN VACAS LECHERAS.

T E S I S

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN SALUD Y PRODUCCIÓN ANIMAL SUSTENTABLE

P R E S E N T A

JESÚS HUMBERTO TORRES GARCÍA

Co-dirigido por:

MC. José Eduardo Salazar Vázquez

Dr. Gonzalo López Rincón

CENTRO UNIVERSITARIO
QUERÉTARO, QUERÉTARO.
Diciembre, 2015
MÉXICO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
MAESTRÍA EN SALUD Y PRODUCCIÓN ANIMAL
SUSTENTABLE

EVALUACIÓN DE TOLERANCIA, SEGURIDAD Y EFICACIA DE DOS LISADOS DE
***Corynebacterium cutis* ADMINISTRADOS EN EL PERIODO SECO Y LA LACTANCIA**
TEMPRANA EN VACAS LECHERAS.

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN SALUD Y PRODUCCIÓN ANIMAL SUSTENTABLE

PRESENTA

JESÚS HUMBERTO TORRES GARCÍA

CO-DIRIGIDO POR:

MC. José Eduardo Salazar Vázquez
Dr. Gonzalo López Rincón

Sinodales

M.C. José Eduardo Salazar Vázquez
Presidente

Dr. Gonzalo López Rincón
Secretario

Mo. Ma de Jesús Chávez López
Vocal

Mo. Francisco Alberto Olvera Valencia
Suplente

Dr. Feliciano Milian Susto
Suplente

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca
Directora de la facultad

Firma

Firma

Firma

Firma

Firma

Dra. Ma. Guadalupe Flevia Loarca Piña
Directora de investigación y posgrado

CENTRO UNIVERSITARIO
QUERÉTARO, QUERÉTARO.
Diciembre, 2015
MÉXICO

RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar la seguridad, tolerancia y eficacia de los dos lisados de *Corynebacterium cutis* después de la administración subcutánea en vacas lecheras antes y después del parto. Se utilizaron 31 vacas gestantes clínicamente sanas distribuidas al azar en tres grupos. Grupo 1: 10 vacas tratadas con *Corynebacterium cutis*-UC1, Grupo 2: 11 vacas tratadas con *Corynebacterium cutis* UC2 y Grupo 3: 10 vacas tratadas con NaCl 0.9%. Fueron inoculadas a dosis única de (2 mL/100kgP.V) 30 días antes del parto y en el día 30, 37 y 44 de la lactancia temprana. La seguridad se evaluó mediante examen físico, observación continúa de reacciones adversas que alteraran parámetros fisiológicos de (temperatura, frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria) y parámetros de hemograma y química sanguínea. La tolerancia del sitio de inoculación fue determinada por ecografía y análisis termografico para identificar signos sugestivos de inflamación atribuidos a las diferentes aplicaciones del medicamento. La eficacia fue relacionada por la evaluación clínica de la incidencia de mastitis mediante la prueba California y análisis de células somáticas para determinar casos de mastitis subclínica. Los resultados de este estudio indican que los dos lisados de *Corynebacterium cutis* son seguros y bien tolerados en vacas lecheras a una sola dosis de 10 mL/PV antes del parto y a tres dosis de 2 mL/100 kg PV con intervalo de 7 días en la lactancia temprana, ya que no se observaron efectos adversos y alteraciones en parámetros fisiológicos. También se observa, que no se ven alterados parámetros productivos o la calidad de la leche. Al valorar CCS/mL se pudo identificar un aumento $\geq 200,000$ en animales bajo tratamiento con *Corynebacterium cutis*. En contraste, se observó una disminución de incidencia de mastitis en los primeros 60 días post-parto. En conclusión este producto podría considerarse como un inmunoestimulante seguro y eficaz para ser utilizado en vacas lecheras durante el periodo inmunosupresivo del peri-parto.

Palabras Clave: Peri-parto, inmunoestimulantes, conteo celular somático.

SUMMARY

The aim of the study was to evaluate the safety, tolerability and efficacy of the two lysates *Corynebacterium cutis* after subcutaneous administration in dairy cows during the peripartum period. 31 pregnant cows were used. Group 1: 10 cows treated with *Corynebacterium cutis*-UC1, Group 2: 11 cows treated with *Corynebacterium cutis*-UC2 and Group 3: 10 cows treated with NaCl 0.9%. Were inoculated with single dose (10 mL/PV) 30 days before delivery and 3-dose of 2 ml/100 Kg PV on day 30, 37 and 44 early lactation. The safety and tolerability was evaluated by physical examination, observation continues to adverse events (AEs), measurement values of hematology and blood chemistry and determining signs of inflammation of the site of inoculation by thermography and ultrasound. Efficacy was determined by the clinical evaluation of the incidence of mastitis by California somatic testing and analysis to determine subclinical mastitis cells. The results of this study indicate that both lysates *Corynebacterium cutis* are safe and well tolerated in dairy cows before delivery and in early lactation. Adverse effects and alterations in physiological parameters (rectal temperature, heart rate, respiratory rate) were observed. Also, It was observed a decrease in cases of mastitis in animals treated, in contrast increases the number of somatic cells/mL. However, little is known about the physiological effect on milk production, being necessary more studies to assess changes inmunofisiológicos in dairy cows. In conclusion this product might be considered as a safe immunostimulant for use in dairy cows during the peri-partum.

Key words: Peripartum, immunoestimulants, somatic cell count.

DEDICATORIAS

A mi madre por siempre alentarme para luchar en pro de mis objetivos, por siempre estar ahí sin importar el momento.

A mi padre porque con su ejemplo de vida me señalo el camino correcto.

A mi familia por el apoyo incondicional.

A mis hermanos y hermanas, gracias por estar ahí siempre apoyándome para alcanzar mis sueños y metas. Gracias por apoyarme en estos momentos tan difíciles para mi vida personal y profesional sin ustedes no lo hubiera logrado.

A la vida por darme la oportunidad de seguir preparándome.

A DIOS por darme la vida.

AGRADECIMIENTOS

Al consejo nacional de ciencia y tecnología (CONACYT) por la beca proporcionada para la realización de los estudios de posgrado.

A la universidad autónoma de Querétaro por la facilidades otorgadas

Al planta académica de la facultad de ciencias naturales, por su esfuerzo, dedicación y esfuerzo para transmitir sus conocimientos

A mi comité tutorial por el apoyo brindado

Al establo lechero "POSTA EL 4" por las facilidades otorgadas en la ejecución de la fase animal del experimento.

Al médico Humberto Hernández por el apoyo y colaboración durante la fase experimental

A los empleados del establo por su valiosa colaboración

Miguel Ángel Soto Rosales, por brindarme tu amistad y siempre estar dispuesto a colaborar.

A laboratorios VIRBAC por todas la facilidades técnicas y financieras para la ejecución del proyecto.

En especial al Dr. Gonzalo López Rincón, por todo el apoyo brindado durante este proceso, no solo en lo académico sino también en lo personal, Gracias por convertirse en más que un amigo en los momentos donde todo era obscuridad, nunca olvidare lo que hizo por mí.

CONTENIDO

| | |
|--|-----|
| Resumen | III |
| Summary | III |
| Dedicatorias..... | V |
| Agradecimientos | VI |
| I Introducción..... | 1 |
| II Revisión de literatura | 3 |
| 2.1 Farmacovigilancia en medicina veterinaria..... | 3 |
| 2.2 Evaluación de la seguridad de los medicamentos durante el desarrollo de fármacos | 4 |
| 2.3 Uso de antibióticos en la industria lechera | 6 |
| 2.4 Alternativas para disminuir el uso de antibióticos en vacas lecheras..... | 7 |
| 2.5 Inmunoestimulantes no específicos utilizados en el control de mastitis | 8 |
| 2.6 <i>Corynebacterium cutis</i> un inmunoestimulante en la prevención de enfermedades de la vaca lechera..... | 11 |
| 2.7 Manejo clínico del periodo seco de la vaca lechera | 12 |
| 2.8 Inmunosupresión y susceptibilidad a enfermedades en el peri-parto de la vaca lechera | 13 |
| 2.9 Mastitis y su importancia en la industria lechera. | 15 |
| 2.10 Clasificación clínica de la mastitis bovina | 16 |
| 2.11 Métodos de detección de la mastitis bovina | 19 |
| 2.12 Prueba de california..... | 20 |
| 2.13 Conteo celular somático | 21 |
| III Justificación | 22 |
| IV Hipótesis..... | 23 |
| V Objetivos..... | 24 |
| 5.1 Objetivo general..... | 24 |
| 5.2 Objetivos específicos | 24 |
| VI Metodología..... | 25 |
| 6.1 Sitio de prueba | 25 |
| 6.2 Animales | 25 |
| 6.3 Elemento de prueba..... | 26 |
| 6.4 Caracterización del lisado de <i>corynebacterium cutis</i> | 26 |
| 6.5 Dosis y vía de administración de <i>Corynebacterium cutis</i> | 27 |
| 6.6 Evaluación de Seguridad | 27 |
| 6.6.1 Análisis de hemograma y química sanguínea..... | 27 |
| 6.6.2 Análisis de Signos vitales (parámetros fisiológicos)..... | 28 |
| 6.7 Evaluación de Tolerancia | 29 |

| | | |
|-------|---|----|
| 6.7.1 | Análisis de hemograma y química sanguínea..... | 29 |
| 6.8 | Evaluación de eficacia en la incidencia de mastitis..... | 30 |
| 6.9 | Determinación de mastitis subclínica mediante la prueba California | 30 |
| 6.10 | Determinación de mastitis subclínica mediante citometría de flujo..... | 31 |
| 6.11 | Evaluación de parámetros productivos y calidad de la leche..... | 32 |
| 6.12 | Análisis estadístico..... | 32 |
| VII | Resultados..... | 33 |
| 7.1 | Unidad de experimentación..... | 33 |
| 7.2 | Elemento de prueba..... | 35 |
| 7.3 | Caracterización del lisado de <i>Corynebacterium cutis</i> | 35 |
| 7.4 | Evaluación de seguridad después de la aplicación de <i>Corynebacterium cutis</i> . 36 | |
| 7.4.1 | Hematología y química sanguínea..... | 36 |
| 7.5 | Análisis de signos vitales en el periodo seco | 40 |
| 7.5.1 | Análisis de signos vitales en la lactancia temprana | 40 |
| 7.6 | Evaluación de tolerancia después de la aplicación de <i>Corynebacterium cutis</i> 41 | |
| 7.7 | Presencia de mastitis después de la aplicación de <i>Corynebacterium cutis</i> 43 | |
| 7.8 | Evaluación de producción y calidad de la leche después de la aplicación de <i>Corynebacterium cutis</i> | 44 |
| 7.9 | Determinación de la calidad de la leche | 44 |
| VII | Discusión..... | 46 |
| IX | Conclusiones | 51 |
| X | Literatura citada | 52 |
| XI | Apendice..... | 60 |
| 11.1 | Procedimiento de ética y bienestar animal | 60 |
| | Principios de la Comisión de Ética y Bienestar Animal | 62 |

Índice de tablas

| Tabla | Página |
|--|--------|
| 1.-Escala de clasificación de la mastitis bovina en vacas lecheras | 17 |
| 2.- Escala de interpretación para la prueba de california | 20 |
| 3.- Lisados de <i>Corynebacterium cutis</i> | 26 |
| 4.- Características de los animales bajo estudio | 34 |
| 5.- Hematología 30 días antes del parto | 37 |
| 6.- Química sanguínea 30 días antes del parto..... | 37 |
| 7.- Hematología al día 52 de la lactancia temprana | 38 |
| 8.- Química sanguínea al día 52 de la lactancia temprana | 38 |

Índice de figuras

| Figura | Página |
|--|---------------|
| 1.- Peso y tiempo de gestación de los animales bajo estudio | 33 |
| 2.- Elementos de prueba | 35 |
| 3.- Caracterización del patrón de proteínas <i>Corynebacterium cutis</i> | 36 |
| 4.- Constantes fisiológicas después de la primera aplicación | 40 |
| 5.- Constantes fisiológicas de la 2da, 3ra y 4ta aplicación. | 41 |
| 6.- Valoración del sitio de aplicación | 42 |
| 7.- Conteo celular somático e incidencia de mastitis | 43 |
| 8.- Producción láctea..... | 44 |
| 9.- Calidad nutrimental de la leche. | 45 |

I INTRODUCCIÓN

A pesar de las medidas de bioseguridad y control de las enfermedades que afectan a las vacas lecheras durante el peri-parto, las pérdidas económicas a consecuencia de estos problemas en la industria lechera continúan presentándose. Aunado a esto es cada vez más evidente la resistencia a los antibióticos, los riesgos potenciales para el ambiente y los consumidores que enfrentan los problemas de residuos químicos después de la administración indiscriminada de fármacos con fines terapéuticos en los animales. La farmacovigilancia en medicina veterinaria se fundamenta en buscar la seguridad clínica y la eficacia de los medicamentos, independiente de que éstos sean de naturaleza química o biológica, todo fármaco tiene que garantizar no inducir reacciones adversas al paciente.

La mastitis bovina es una enfermedad con alta incidencia en la industria lechera y es considerada como la mayor causa de pérdidas económicas (Taverna, Negri *et al.* 2007), por la disminución de la calidad de la leche y presencia de residuos de antibióticos (Bradley, 2002). Cuando la vaca está en producción hay una correlación entre la producción de leche y la incidencia de mastitis, asociado al incremento de estrés metabólico por la alta exigencia de la producción. Cuando la vaca está en el período seco, la glándula mamaria sufre una serie de cambios hormonales e inmunológicos que influyen en la susceptibilidad a infecciones intramamarias (Pantoja *et al.* 2009). El uso de antibióticos para el tratamiento de la mastitis durante el periodo seco fue implementado desde la década de 1950 (Bramley *et al.* 1984). Sin embargo, poco se sabe sobre la presencia de residuos en la lactancia temprana, lo que ha permitido el uso de inmunoestimulantes favoreciendo mecanismos de defensa y logrando una protección eficaz en enfermedades del puerperio sin riesgos de contaminación de leche. En contraste, ha sido poco explorada la estimulación artificial de la inmunidad innata. Los inmunoestimulantes aumentan la resistencia a la enfermedad mediante un incremento en los mecanismos de defensa específicos e inespecíficos,

convirtiéndose en agentes profilácticos primarios, no curativos. Las limitaciones de la inmunoestimulación dependen del estado de desarrollo del sistema inmune, órgano blanco, tipo de inmunoestimulante usado y los procedimientos de administración. Muchos inmunoestimulantes son nutrientes habituales de la dieta como polisacáridos, lípidos o proteínas que suministrados en concentraciones superiores a las normales producirán un efecto estimulante. Las vitaminas y minerales pertenecen al grupo de inmunomoduladores los cuales pueden actuar regulando el sistema inmune, con la capacidad de aumentar o disminuir la capacidad de este.

Los inmunoestimulantes de mayor uso son los de origen bacteriano (lipopolisacárido, lipopeptidos, peptidoglucanos y muramilo péptidos de pared celular, así como los β -glucanos de hongos y levaduras). La respuesta a los lisados de pared bacteriana está asociada con un incremento del factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$), la citocina-IL-1 β y cortisol circulante en vacas adultas, y tanto el $TNF\alpha$ como la IL-1 β modulan los niveles de cortisol sanguíneo (Ohtsuka et al., 1997) regulando de esta manera la respuesta al estrés. Los peptidoglucanos son fragmentos de la pared de microorganismos que brindan más resistencia a infecciones microbianas (López et al., 2003). El lisado de *Corynebacterium cutis* ha demostrado ser reconocido rápidamente por células inmunes, activando la síntesis y liberación de citocinas y linfocinas. Por lo tanto, los inmunoestimulantes surgen como una herramienta de manejo del aspecto sanitario en las producciones pecuarias y suplen en gran parte las deficiencias halladas con el uso de fármacos tipo antibiótico (Santoma, 1998). El efecto protector de estos compuestos depende de la enfermedad o patógenos contra los cuales se quiere prevenir y controlar; por ende se hace imperante el desarrollo de estudios que permitan vislumbrar compuestos con características inmunoestimulantes y que a su vez confieran eficacia ante agentes etiológicos específicos.

II REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Farmacovigilancia en medicina veterinaria.

Dentro de las características de un fármaco ideal está el que no genere daño alguno en el paciente. Sin embargo, la realidad es diferente al considerar que todo medicamento tiene la capacidad de producir efectos adversos (Rang et al., 2000). Esta situación obliga a la existencia de un sistema encargado de vigilar ciertas características de los medicamentos, como la seguridad, la eficacia y la calidad, de manera de proteger la salud de los pacientes de los efectos no deseados.

La farmacovigilancia es una actividad dirigida a la detección y estudio de Reacciones Adversas a Medicamentos (RAM). En la medicina humana ha tomado importancia desde hace ya más de treinta años.

Diversos autores y organismos internacionales coinciden al señalar que “una reacción adversa a medicamentos corresponde a una reacción nociva no intencionada y que tiene lugar a las dosis normalmente utilizadas para la profilaxis, diagnóstico o tratamiento de una enfermedad o para la modificación de una función fisiológica” (Unión Europea 1993, Comisión Europea 2001).

La farmacovigilancia y RAM, han sido también aplicados a la medicina veterinaria. No obstante, surgen algunas complicaciones al considerar la existencia de factores que no están contemplados en la medicina humana y que algunas veces pueden ser determinantes para la presentación de una RAM en la medicina veterinaria. Estas pueden ser la especie animal, la raza, el uso de medicamentos no registrados para uso veterinario o el uso de medicamentos sin considerar las indicaciones señaladas en el etiquetado, entre otros (Woodward 2005b).

Dentro del amplio campo de interés, el principal objetivo es la seguridad clínica y la eficacia de los medicamentos, independiente de que éstos sean de naturaleza química (como son los antimicrobianos, antiparasitarios, anestésicos y otros) o biológica, como, por ejemplo, las vacunas es la identificación y el estudio de las RAM conocidas y esperadas que se pueden presentar en la población expuesta. Adicionalmente, la farmacovigilancia en medicina veterinaria se fundamenta más aún si consideramos que es común el uso de medicamentos sin respetar las instrucciones del etiquetado o se utilizan medicamentos que no han sido registrados para uso veterinario (Jalil et al., 1987).

Es importante señalar que no sólo los animales que son tratados con productos veterinarios competen a la farmacovigilancia. También se deben considerar las RAM que puedan ocurrir en las personas que manipulan los medicamentos veterinarios y las RAM que pueden ocurrir en humanos que consumen alimentos provenientes de animales tratados con fármacos (Unión Europea 2001a; Woodward 2005c).

2.2 Evaluación de la seguridad de los medicamentos durante el desarrollo de fármacos.

Desde que un nuevo fármaco es descubierto hasta que éste es comercializado deben realizarse numerosos estudios de alta complejidad, enfocados a descubrir o verificar los efectos de los fármacos (clínicos y adversos).

Un estudio clínico consiste en uno o varios ensayos relacionados con la administración de uno o más medicamentos a los pacientes; se realizan cuando ya existe la evidencia que dicho medicamento tiene efectos benéficos. Sin embargo, en la actualidad esta definición resulta de escasa aplicabilidad debido a que no contempla información completa (Aronson 2004). La Unión Europea (2001a), en la Directiva 2001/20/EC, define a un ensayo clínico como “una

investigación llevada a cabo en individuos con la intención de verificar los efectos clínicos, farmacológicos y farmacodinámicos de uno o varios medicamentos, identificar cualquier reacción adversa a uno o varios medicamentos y para estudiar su absorción, distribución, metabolismo y excreción, con el objetivo de determinar su seguridad y eficacia, ya sea se realice en uno o varios lugares físicos, determinando en este último caso ensayos clínicos multicéntricos”. Los ensayos clínicos corresponden entonces a un método para comparar objetivamente, a través de estudios prospectivos, los resultados de dos o más tratamientos.

En medicina veterinaria los ensayos clínicos son realizados en las especies para las cuales está destinado el medicamento y contemplan distintas etapas (Fase I, II III y IV). Las evaluaciones que se realizan para determinar la seguridad de los fármacos están consideradas en los estudios clínicos fase I o fase de seguridad. Estos ensayos están destinados a caracterizar las dosis y los procesos farmacocinéticos en las especies animales a las que va destinado el producto (Honrubia y col 2002); se incluyen individuos sanos (Cato y col 2002). En los ensayos clínicos Fase II están dirigidos a determinar el régimen de dosis y evidenciar el posible potencial terapéutico, estimando su eficacia frente a la patología a la que va destinado. Los ensayos Fase III o estudios de utilidad comparada consideran una extensión de los anteriores y están orientados a comparar la actividad del nuevo fármaco con la de estándares de actividad conocida. En estos estudios se expone un gran número de pacientes con el objetivo de delinear el perfil de seguridad y eficacia del fármaco. Esta fase es crucial para la introducción del producto en el mercado terapéutico (Honrubia y col 2002).

Al término de los estudios clínicos Fase III ya se han identificado las reacciones adversas asociadas a una formulación determinada y, dependiendo de la gravedad, frecuencia y evaluación riesgo/beneficio, el producto avanza a la fase siguiente que corresponde al registro y comercialización (Unión Europea 2001a).

El uso excesivo de medicamentos en la industria lechera son atribuidos al desbalance fisiológico de la vaca con su fin zootécnico de producción, por lo tanto, hay susceptibilidad a enfermedades infecciosas principalmente en el periparto, esto origina el uso de diversos antibióticos o profilácticos para los cuales se tiene que implementar un programa de farmacovigilancia que permitan la identificación de las reacciones adversas por parte de profesionales médicos veterinarios, propietarios de animales, industria farmacéutica y todos quienes estén involucrados en la fabricación, distribución, administración y manipulación de medicamentos de uso veterinario. La notificación de una reacción adversa en algunos países corresponde a un proceso voluntario, sin embargo, en otros constituye un proceso obligatorio para los profesionales sanitarios y para la industria farmacéutica (OMS 2001).

2.3 Uso de antibióticos en la industria lechera.

La producción de leche en forma intensiva se complica por el uso excesivo de antibióticos, la generación de bacterias resistentes a los medicamentos y la transferencia de este último a la cadena alimentaria (Ingvarsen et al., 2003; Mulligan et al., 2008). Estas cuestiones fueron destacadas en un informe publicado en 2009 por el Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades y la Agencia Europea de Medicamentos (ECDC / EMEA, 2009), que hizo hincapié en la diferencia entre la creciente aparición de bacterias resistentes a múltiples fármacos en Europa y el escaso desarrollo de los antibióticos para el tratamiento de infecciones por tales bacterias (Fey et al., 2000).

En particular, el alto rendimiento de la vaca lechera la predispone a ser más susceptible a las enfermedades infecciosas (mastitis) el estrés metabólico es un factor importante para la susceptibilidad de infecciones, esta condición se agrava en tiempos de inmunocompetencia condición que es característica del período

seco e inicio de la lactancia (Lacetera et al., 2005; Sordillo et al., 2009a.; Trevisi et al., 2011a).

La mastitis es la principal razón para el uso de antibióticos en la industria lechera, por lo tanto, es imperativo que los productores y los profesionales sigan las mejores prácticas para utilizar los antibióticos de forma selectiva y con criterio; se tienen que valorar factores de la vaca tales como edad, estado de lactancia días en leche, SCC, patógenos causantes, virulencia y la susceptibilidad a los antibióticos.

Por otra parte, la producción mundial de leche y carne de bovino se duplicará en 2050 creando un fuerte impacto por uso de antibióticos en la cadena alimentaria. Esto significa que se tienen que buscar estrategias para controlar las enfermedades del ganado productor de leche.

La reciente conferencia internacional de la OIE / IABS en " Alternativas a los antibióticos " (OIE / IABS, 2012) proporciono evidencia de que una reducción del uso de antibióticos en animales de granja se puede lograr mediante una adecuada combinación de péptidos antibacterianos naturales, pre y probióticos, e inmunoestimulantes principalmente. En particular, hay evidencia de que los inmunoestimulantes pueden representar una importante contribución para el control de enfermedades en los hatos de ganado lechero (Frola et al., 2012; Nader-Macías et al., 2008).

2.4 Alternativas para disminuir el uso de antibióticos en vacas lecheras.

En los últimos años se han buscado diversas alternativas para disminuir el uso de antibióticos en medicina veterinaria, varias sustancias han demostrado su eficacia en ensayos de campo en términos de resistencia a las enfermedades y disminución de los costos de producción en la industria lechera (Malinowski, 2002). Los costos de tales tratamientos son generalmente comparables a las

vacunas; sin embargo, su uso implica un programa adecuado de vigilancia del hato, que debe definir la prevalencia y riesgo de enfermedad.

La mayor incidencia de las enfermedades en la vaca lechera suele ocurrir en el período de transición, que comprende 3 semanas antes y 3 semanas después del parto. Este período se caracteriza por la ocurrencia de una respuesta inflamatoria asociada a proteínas de fase aguda tanto positivas como negativas, como respuesta a disturbios de la hemostasia característica del peri-parto donde sucede. Estos resultados implican que las vacas en mayor riesgo de aparición de la enfermedad podrían ser identificadas en el período no lactante. De esta forma, podría ser seleccionado este periodo para la asistencia sanitaria y el cuidado de la vaca post-parto (LeBlanc et al., 2003)

El tratamiento preventivo podría basarse en anti-inflamatorios, ya que estos controlan el proceso inflamatorio y con ello resguarda la integridad de la glándula mamaria (Bertoni et al., 2004; Trevisi et al., 2005; Trevisi et al., 2008). Otra alternativa prometedora es la inmunonutrición (Calderón, 2003), es decir, la posible modulación del sistema inmune por nutrientes específicos. A este respecto, se obtuvieron resultados interesantes fortificando los alimentos con omega3, con antioxidantes (Sordillo et al., 2009b), Fitoextractos (por ejemplo, *Echinacea purpurea* (Trevisi et al., 2008) o plantas enteras alrededor del parto (Trevisi et al., 2013). Por lo tanto, se tienen que buscar estrategias integradas para la reducción de los antibióticos en las granjas lecheras, que beneficiaría el problema de salud pública y los costos de producción de los ganaderos ya que se ha reportado que la mastitis cuesta tratarla entre 140-260 euros por caso. La diferencia en los costos se debió principalmente a los protocolos terapéuticos aplicados.

2.5 Inmunoestimulantes no específicos utilizados en el control de mastitis.

A pesar de las diferentes medidas de control implementadas en los sistemas de producción para delimitar la entrada o contrarrestar los efectos de las

enfermedades infecciosas, la pérdida debido a estas sigue siendo un severo problema para el óptimo desarrollo de la industria pecuaria (Templeton et al., 1988). Otro aspecto importante es la creciente resistencia antibiótica observada en las diferentes especies domesticas aunado a los riesgos de salud pública que se puedan llegar a suscitar por el consumo de productos con residuos de sustancias químicas (Templeton et al., 1988).

Los inmunoestimulantes son sustancias de origen diverso que tienen la capacidad de regular o modular el sistema inmune. Como lo indica el término, tienen la capacidad de aumentar o disminuir la respuesta inmune (Blecha., 1988). Estas sustancias también son conocidas como inmunomoduladores o modificadores de la respuesta inmune (Blecha., 1988; Liew et al., 1991). Existen diversas sustancias que actúan como inmunoestimulantes entre las que se pueden destacar: microorganismos y sus derivados, antihelmínticos, vitaminas, minerales y citocinas.

El uso de inmunomoduladores puede conducir a la mejora de la sanidad animal y disminuir costos en las granjas lecheras. Se ha demostrado que la administración de interferón e interleucina 12 a través de una dosis baja parenteral pueden restringir significativamente la aparición de nuevas infecciones intramamarias y el uso relacionado de medicamentos veterinarios (Zecconi et al., 1999; Zecconi et al., 2009). Por lo tanto, la modulación de la respuesta inmune podría ser una estrategia eficaz para el control de diferentes enfermedades en el ganado lechero, lo que lleva a una exigencia menor de antibióticos en las granjas lecheras. Esta estrategia tendría un papel crucial en la veterinaria, instituciones reguladoras de residuos de antibióticos, productores de leche y los consumidores sobre la seguridad alimentaria (Templeton., et al 1988).

La necesidad de encontrar agentes que modifiquen la respuesta inmune en el tratamiento profiláctico del ganado lechero, ha generado interés en el uso de varias sustancias biológicas y químicas con actividad inmunomoduladora. La

aplicación exitosa de sustancias inmunomoduladoras requiere del entendimiento de la respuesta inmune entre el huésped y los patógenos, así como los mecanismos de inmunoevasión que estos utilizan para prevenir su destrucción por la respuesta inmune. La inmunostimulación se clasifica en inmunomoduladores específicos y no específicos. Los primeros, los más numerosos actúan independientemente de la especificidad a un antígeno determinado. Los segundos producen una respuesta antígeno específica. La naturaleza de la respuesta inmune naturalmente es dirigida por las interacciones entre células inmunocompetentes y sus mecanismos inmunomoduladores, las variables que influyen en dicho balance son importantes. En este sentido los inmunomoduladores no específicos tienen influencia positiva o negativa sobre tal equilibrio. La vía, el tiempo de administración, y la dosis son variables importantes que determinan como estos agentes influyen sobre el balance (Klesius., 1981). El uso de inmunostimulantes que favorezcan el sistema inmune inespecífico está incrementando su uso en medicina veterinaria ya que al parecer otorgan un método eficiente para la estimulación del sistema inmune no específico. Estos Compuestos tienen el potencial inmunostimulante para contrarrestar el efecto del medio ambiente o factores microbianos supresores. Pudiendo así reducir la morbilidad, mortalidad y pérdidas económicas resultantes de enfermedades infecciosas, también pueden funcionar como adyuvantes, potenciando la respuesta inmune a las vacunas aplicadas (Mayr., 1981). Los principales estimulantes son generalmente componentes estructurales de la pared microbiana, las cuales son captadas rápidamente por los macrófagos (Gialdroni., 1981; Al-izzi et al., 1982) estos incluyen micobacterias y algunas fracciones de *corynebacterias anaeorbias* (*Propionobacterium acnés*, *Corynebacterium cutis*) una vez reconocidos por los macrófagos tienen la capacidad de estimular la síntesis de citocinas, incluidas la interleucina 1, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 6. Secundario a este efecto probablemente puedan activar linfocitos con una liberación de interleucina e interferón- gamma. Esto potenciara la resistencia a infecciones víricas, así como la producción de anticuerpos, células

asesinas naturales (NK), además de mediar en las reacciones inflamatorias y de cicatrización.

2.6 *Corynebacterium cutis* un inmunoestimulante en la prevención de enfermedades de la vaca lechera.

El uso potencial de sustancias inmunoestimulantes naturales tienen interés para la salud pública y bienestar animal (Eid et al., 1995). El lisado de *Corynebacterium cutis* es un inmuno-estimulante no específico, ha demostrado ser reconocido y fagocitados rápidamente por macrófagos, estimulando la síntesis y liberación de citocinas como TNF- α , IL- β (interleucina β) e IL-6, colaborando en la activación de linfocitos T y la liberación de IL-2 y TNF γ iniciando la reactivación del sistema inmune. Recientemente, se demuestra que al aplicarse en el periodo seco favorece la producción y concentración de anticuerpos maternos a través de calostro que provee a los becerros de mayor resistencia a las enfermedades y reduce la mortalidad en esta etapa fisiológica (Yilmaz et al., 2012; 2013); también se ha demostrado que disminuye la cantidad de células somáticas en vacas lecheras (Won-Chang Lee et al., 1996). Estudios en cerdos han demostrado que la administración de *Corynebacterium cutis* reduce significativamente la mortalidad y aumenta la ganancia de peso corporal en lechones con síndrome de desmedro, por lo que en Corea es usado como agente profiláctico en cerdos. En becerros se ha demostrado que la utilización de *corynebacterium cutis* en combinación con vacunas bivalentes, potencia largos periodos de respuesta inmune (Mahmoud et al., 2013). En búfalos ha sido aplicado en periodo seco y se ha determinado que favorece el nivel de inmunoglobulinas en calostro, la fertilidad post-parto y la viabilidad de los neonatos (Hussein et al., 2008). Shalaby (1992) realizó un estudio con becerros y vacas próximas al parto, obteniendo que los animales tratados tenían mayor ganancia de peso, menor incidencia a patógenos virales y que redujo la mortalidad.

El uso de lisado de *Corynebacterium cutis* ha sido probado en vacas lecheras gestantes, cerdos, búfalas gestantes, pollos, cabras y borregas, demostrando eficacia en el estímulo de inmunidad inespecífica (Shalaby., 1992). Sin embargo, nunca ha sido reportada una prueba de seguridad de los antígenos del lisado *Corynebacterium cutis* en vacas gestantes al inicio del periodo seco y posteriormente en la lactancia temprana. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue demostrar la seguridad, tolerancia y eficacia de dos nuevas formulaciones de inmunoestimulantes (lisados) a base de *Corynebacterium cutis* en el periodo seco y la lactancia temprana en vacas lecheras considerado este periodo de tiempo como el más crítico en la susceptibilidad a enfermedades de la vaca lechera.

El control de este periodo en el ganado vacuno lechero se hace imprescindible en las nuevas condiciones de producción lechera en el que la competitividad es necesaria para asegurar el rendimiento económico.

2.7 Manejo clínico del periodo seco de la vaca lechera.

El aplicar un antibiótico de liberación prolongada, formulado específicamente para ser depositado dentro de cada cuarto (teta) de la ubre de una vaca en el día del secado (la última ordeña de la lactancia) se le conoce comúnmente como el tratamiento o la terapia de la vaca seca. El uso de esta terapia está ampliamente difundido en la industria lechera como una herramienta eficaz para el control de la mastitis método desarrollado hace más de 50 años. Es en esta etapa, donde la terapia para tratar infecciones subclínicas es más eficaz que la terapia en la lactancia, ya que el índice de curación es más elevado, se observa que la tasa de curación puede llegar hasta el 80% (Ruegg *et al.*, 2004). La utilización de dosis mayores de antibióticos, el tiempo de antibiótico en el tejido mamario es mayor y el riesgo de contaminación de leche es mínimo.

La mayoría de los productos para la terapia de la vaca seca son diseñados para eliminar infecciones existentes causadas por las bacterias Gram-positivas, particularmente *Staphylococcus aureus* e infecciones provocadas por

estreptococos, especialmente *Streptococcus uberis*, pero carecen de actividad contra bacterias ambientales Gram-negativas, especialmente coliformes. La duración de la protección efectiva varía entre los productos, a menudo según el tipo de antibiótico o de la dosis. En Europa y Australia, se dispone de productos para la terapia de la vaca seca que proporcionan protección hasta 54 días.

2.8 Inmunosupresión y susceptibilidad a enfermedades en el peri-parto de la vaca lechera.

A lo largo del ciclo productivo de la vaca acontecen importantes cambios. Dichos cambios no solo incluyen alteraciones metabólicas y hormonales sino que también ocurren cambios en el manejo que se les da. A medida que el sistema de producción se vuelve más intensivo y la población aumenta, el riesgo de sufrir enfermedades de tipo metabólico también se incrementa el efecto en la salud de los animales (Goff et al., 1997; Bell et al., 1997; Persson et al., 2000). Las enfermedades de tipo infeccioso aumentan, tornándose en presentaciones clínicas que incluyen el desarrollo de infecciones intramamarias (Kimura et al., 1999).

El periodo de mayor susceptibilidad en la vaca lechera se torna entre la tercera semana previa y posteriores al parto, durante este tiempo los animales se tornan más propensos de desarrollar alguna enfermedad ocasionando un impacto económico negativo al sistema (Saad et al., 1989; Kehrlí et al., 1989; Mallard et al., 1998). Paralelamente, el consumo de materia seca (CMS) se disminuye cerca de un 30% durante el preparto, aunque la mayor parte (89%) de esta disminución ocurre durante la última semana de gestación (Hayirli et al., 2002). A los 21 días antes del parto el CMS de novillas y vacas es de aproximadamente 1.7 y 2.0 % de su peso vivo respectivamente y cae el día anterior al parto a 1.3 y 1.4% (Grummer et al., 2004). La reducción en el CMS unido al incremento en la demanda de nutrientes, genera un balance energético negativo al final de la gestación, el cual se prolonga hasta varias semanas después del parto. Este balance energético negativo ha sido asociado con inmunosupresión, enfermedades del peri-parto e incremento del intervalo a la primera inseminación.

La capacidad fagocitaria de los neutrófilos y la proliferación de linfocitos y su producción de anticuerpos es menor durante la semana previa al parto y la semana posterior al mismo. La causa son factores endócrinos y nutricionales. La progesterona inhibe muchas funciones leucocitarias que se relacionan con la necesidad de evitar el rechazo materno-fetal durante la gestación. A pesar de ello la progesterona disminuye durante el peri-parto por lo que su responsabilidad se descarta. Es probable que los estrógenos y glucocorticoides sean responsables. Los estrógenos y glucocorticoides tienen un potente efecto inmunosupresor, también el aumento de la cetonemia y la deficiencia de ciertas vitaminas y oligoelementos relacionada con el consumo disminuido de materia seca durante ese período.

Los niveles de estrógenos durante el parto son entre 10 y 100 veces superiores a los niveles de estrógenos fisiológicos del celo y estas concentraciones alteran la función inmunitaria. Además, entre 24 y 48 horas previas al parto los niveles de prostaglandinas aumentan provocando luteólisis lo que resulta en disminución de progesterona y dominio definitivo de los estrógenos. Estos cambios en los perfiles hormonales que desencadenan el parto son estresantes. En situaciones de estrés se liberan cantidades importantes de cortisol. Los niveles elevados de cortisol y estrógenos desencadenantes del parto son los que inciden directamente en la inmunosupresión, que hasta cierto punto es inevitable.

Respecto a la calostrogénesis, los mecanismos desencadenantes del parto, fundamentalmente el dominio estrogénico, favorecen la producción y transferencia de inmunoglobulinas a la glándula mamaria para la formación de calostro, en detrimento de las defensas celulares del propio animal (Goff et al 1997; Arnott et al 2012).

Lo expuesto ha llevado a proponer y explorar nuevas alternativas para aumentar la eficacia de curación de las infecciones intramamarias y prevenir

nuevas en las etapas en las cuales aumenta la exposición a organismos causantes de mastitis.

2.9 Mastitis y su importancia en la industria lechera.

La mastitis, es la respuesta inflamatoria de la glándula mamaria normalmente causada por bacterias (Kerr et al., 2003; Bannerman et al., 2004; Hansen et al., 2004; Hillerton et al., 2005). Es probablemente la más costosa de las enfermedades infecciosas endémicas que afecta a las vacas y otras especies lecheras. Su impacto es en la producción animal, bienestar animal y la calidad de la leche producida (Hillerton et al., 2005). Se caracteriza por la entrada de células somáticas, principalmente neutrófilos polimorfonucleares (PMN), en la glándula mamaria y por un aumento en el contenido de proteasa en la leche (Kerr et al., 2003). La mastitis es la enfermedad más común y costosa en la industria lechera de todo el mundo, debido a los efectos negativos que ocasiona sobre la producción y la calidad de leche. Algunas investigaciones aseguran que la mastitis causa una disminución en la producción del 70% de las pérdidas totales, y otros porcentajes contribuyen a la disminución en el precio por deficiencias de calidad, gastos en medicamentos, servicio veterinario, desecho de animales, descarte en la leche, problemas de residuos de antibióticos y los cambios en la composición de la leche (reducción de calcio, fósforo, proteína y grasa, e incrementos de cloro y sodio) reduciendo su calidad (Agrobit Gestión Agropecuaria 2004; Acebo 2006). Según el Consejo Nacional de Mastitis en México, se estima una pérdida promedio de 225 dólares anuales por vaca en el hato, de los cuales 78 dólares son atribuidos a casos de mastitis clínica (López et al. 2006).

Miller et al (2004) define la mastitis como la inflamación de la glándula mamaria que generalmente se presenta como una respuesta generada por la invasión de microorganismos dentro del canal del pezón y se caracteriza por daños en el epitelio glandular, seguido por una inflamación y cambios patológicos

localizados o generalizados, dependiendo de la magnitud del daño (Ávila *et al*, 2004).

Se estima que la mastitis afecta entre el 15 y 20% de las vacas en producción láctea (Phelps, 1989). La mastitis, ya sea clínica o subclínica, es casi siempre causada por una Infección intramamaria asociada a bacterias. Las bacterias que comúnmente causan la mastitis son clasificadas en patógenos contagiosos, que se transmiten de vaca a vaca por fómites durante el ordeño y patógenos ambientales (Royster *et al.*, 2015). La incidencia de mastitis puede ser favorecida por: lesiones físicas, limpieza inadecuada de los cuartos durante el ordeño, máquinas de ordeño mal utilizadas, deficiente sellado post-ordeño, mal estado de las camas, entre otros factores que permiten el ingreso de microorganismos patógenos a las glándulas mamarias o causan daño físico del tejido, provocando así su inflamación. Diferentes investigadores han reportado que los porcentajes de vacas eliminadas a causa de mastitis varían anualmente desde 1.3% hasta 25% (Ávila *et al.*, 2004).

2.10 Clasificación clínica de la mastitis bovina.

La mastitis subclínica no es fácilmente visible ya que no se aprecian signos claros de la enfermedad ni cambio aparente en la leche además de esto, el diagnóstico no se puede llevar a cabo sin la ayuda de pruebas especiales tales como la prueba de California, conductividad eléctrica y conteo celular somático. La concentración de células somáticas está estrechamente relacionada con la infección existente en la glándula mamaria o algún proceso traumático (Dohoo *et al.*, 1982); Munro *et al.*, 1984; Pedraza *et al.*, 1994a, 1994b; Barría *et al.*, 1998).

Casi todos los cuartos afectados se ven normales y la leche tiene apariencia normal; Ávila., *et al* (2004) determina una disminución en la producción de leche e incremento en el número de células somáticas en animales con mastitis subclínica.

La mastitis subclínica tiene un efecto negativo sobre la capacidad de producción de leche la cual alcanza hasta un 25 % sobre la capacidad láctea y cuyos efectos pasan desapercibidos, ya que las vacas con mastitis subclínica son normalmente ordeñadas y no se reconocen como animales con problemas de salud (NMC, 2006). En el estudio publicado por Pedraza et al., (1994a), registraron en vaquillas una disminución de 0,61 kg de leche y en vacas de dos o más lactancias una disminución de 0.73 kg de leche. Tyler et al., (1989) encontraron descensos en la producción láctea de 0.89 y 1.11 kg por incrementos equivalentes a una unidad de CCS, en vaquillas y vacas, respectivamente. Un hato lechero de aparente estado de salud mantiene entre 15 y 45 % de animales con la presentación subclínica de la enfermedad, dichos porcentajes pueden ser altamente variables dependiendo los programas de manejo de la rutina de ordeño, factores ambientales entre otros (Pinzón 1989).

La mastitis clínica es aquella que se puede ver a simple vista y se caracteriza por anomalías en la leche tales como escamas o grumos (Cuadro 1). Se caracteriza por la tumefacción, dolor, enrojecimiento de la ubre y la leche es de apariencia anormal. Además, las bacterias están presentes en la leche, el rendimiento es muy reducido, y su contenido está alterado considerablemente (Heringstad et al., 2000).

Tabla 1 .-Escala de clasificación de la mastitis bovina en vacas lecheras

| Escala de mastitis (Grado) | |
|----------------------------|--|
| 1 | Leche con leves cambios (Formación de coágulos, acuosa) |
| 2 | La leche anormal moderada y signos de inflamación de la ubre (Calor, dolor, edema) |
| 3 | Grave enfermedad sistémica (Fiebre, deshidratación, debilidad, inapetencia) |

Fuente: Canadian Bovine Mastitis and Milk Quality Research Network (CBMRN), 2010. Royster et al. 2015.

Además de la clasificación dada por los signos presentados durante el desarrollo de la enfermedad, la mastitis suele clasificarse según el o los agentes patógenos que la ocasionen designándose la clasificación de mastitis contagiosa o ambiental (Philpot et al., 2002).

La mastitis contagiosa es causada por microorganismos como: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis*, *Mycoplasma spp*; y sus reservorios son la glándula mamaria y la leche de vacas infectadas. Su transmisión puede ocurrir en el momento del ordeño por prácticas inadecuadas durante el mismo como son : el uso compartido de toallas para lavar y secar las ubres , a través de las manos contaminadas de los ordeñadores o por el uso de pezoneras no desinfectadas entre vacas en los ordeños mecánicos, (Calderón 2008; Blowey., 1999; Philpot et al., 2002).

La mastitis ambiental es producida principalmente por patógenos, Gram-negativos, los cuales son saprofitos del medio ambiente donde se desarrollan los animales entre los que podemos encontrar: *Escherichia coli*, *Klebsiella spp*, *Enterobacter spp*, *Serratia spp*, *Pseudomonas spp* y *Proteus spp*, y algunas bacterias Gram positivas como: *Streptococcus uberis* y *Streptococcus dysgalactiae*. *Streptococcus uberis* y *Streptococcus dysgalactiae*, originan casos de mastitis leves y moderadas, especialmente durante el período seco. Estos dos microorganismos se han aislado de las heces, de los genitales externos, de las ubres y de lesiones de la piel de los pezones de las vacas (Jones, 2006). Los coliformes como *Escherichia coli* (*E. coli*), *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), *Enterobacter aerogenes* (*E. aerogenes*) y *Corynebacterium pyogenes* (*C. pyogenes*), son habitantes normales del tracto digestivo de los animales o se encuentran en el suelo (Bradley et al., 1997; Boyer., 1997). La infección con estos gérmenes se produce por la utilización de sondas, cánulas contaminadas y el descuido en las medidas profilácticas como deficiente higiene de los pezones (lavado o presellado) y no sellado de los pezones, la aplicación de la terapia de la vaca seca (TVS) sin una desinfección del esfínter del pezón y la introducción total de la cánula (Dairy Australia., 2011; Jones., 2006; Hogan et al., 1989). La terapia

con antibióticos durante la lactancia o el período seco es de poco valor en el control de la mastitis ambiental en hatos lecheros, con la excepción de la prevención de la infección por estreptococos del medio ambiente durante el período seco.

2.11 Métodos de detección de la mastitis bovina.

Dentro de los métodos que se usan con mayor frecuencia a nivel de campo para diagnosticar mastitis clínicas, se encuentran el método de observación y palpación de la ubre y las pruebas físicas, como la prueba de escudilla de ordeño, prueba del paño negro y taza probadora. Las pruebas químicas, como la prueba de conductividad eléctrica de la leche, papel indicador de mastitis y prueba de whiteside que sirven también para diagnosticar mastitis clínicas y subclínicas. Las pruebas biológicas, como son la prueba de California para mastitis, la prueba de Wisconsin, el diagnóstico bacteriológico por los métodos de aislamiento, cultivo, tinción, pruebas bioquímicas e identificación y el conteo de células somáticas por microscopía directa y el somaticell (Pérez., 1986; Carrión., 2001; Fernández., 1997; NMC., 1999; Bedolla., 2004b). Otros métodos utilizados actualmente por su rapidez y efectividad son los electrónicos como el fossomatic y el counter coulter, los cuales tienen una aplicación universal sobre todo en laboratorios de control lechero o dedicados al diagnóstico e investigación de la mastitis. Los métodos de detección de mastitis son una herramienta que permite identificar el tipo de infección clínica o subclínica que puede presentarse dentro de un hato lechero, por lo que el método que se elija para determinar las pruebas será esencial para tener un diagnóstico más preciso (Fernández., 1997; Carrión., 2001; Medina et al., 2003; Norger et al., 2004).

Las pruebas más utilizadas para el diagnóstico de la mastitis en la cuenca lechera de los altos de Jalisco son la Prueba de California y el conteo de células somáticas.

2.12 Prueba de california.

La Prueba de California para Mastitis (CMT, por sus siglas en inglés) ha sido empleada durante décadas y sigue siendo la prueba más utilizada a nivel de campo para el diagnóstico de mastitis en el ganado bovino lechero (Morresey., 1999; Radostits., 2000; Medina et al., 2003; Erskine., 2001; Bedolla., 2004b). Es una prueba sencilla que es útil para detectar la mastitis subclínica por valorar la presencia de células somáticas de la leche. No proporciona un resultado numérico, sino más bien nos arroja un indicador de si el recuento es elevado o bajo, por lo que todo resultado por encima de una reacción por mínima que sea podrá considerarse como sospechosa (Blowey et al., 1995; Bedolla., 2004b). La prueba consiste en el agregado de un detergente a la leche, el alquil-aril sulfonato de sodio, causando la liberación del ADN de los leucocitos presentes en la ubre y este se convierte en combinación con agentes proteicos de la leche en una gelatina. A mayor presencia de células se libera una mayor concentración de ADN, por lo tanto mayor será la formación de la gelatina, traduciéndose en nuestra lectura e interpretación del resultado como el grado más elevado de inflamación (Smith 1990; Saran et al., 2000; Medina et al., 2003). Los resultados se leen como Negativos, Traza (sospechoso), 1+, 2+ y 3+, según la cantidad de formación en la muestra (NMC, 1999).

Los resultados son clasificados en cinco diferentes grados, los cuales van desde negativo en el que la leche y el reactivo no registra ningún cambio y aparecen de forma líquida, hasta el recuento de células más elevado en el que la mezcla de la leche y el reactivo forman un gel de consistencia densa (Blowey et al., 1995; Bedolla., 2004b).

Tabla 2.- Escala de interpretación para la prueba de california

| Escala de CMT | Rango relativo del Conteo celular somático |
|----------------------|---|
| Negativo | $\leq 200,000$ |
| Traza | 150,000- 500,000 |

| | |
|---|--------------------|
| 1 | 400,000- 1,500,00 |
| 2 | 800,000- 5,000,000 |
| 3 | ≥ 5,000,000 |

Fuente: NMC, 1999; Saran et al, 2000.

2.13 Conteo celular somático.

El contenido de células somáticas (CCS) nos permite conocer el estado funcional y de salud de la glándula mamaria en el periodo lactante; debido a su estrecha relación con la composición de la leche, es un criterio de calidad muy importante (Wolter et al., 2004; Bedolla., 2004b). La leche de una ubre sana presenta un recuento celular somático bajo. En este caso se trata de células de tejido (células epiteliales) y células inmunes (neutrófilos polimorfonucleares, granulocitos, macrófagos, linfocitos). La distribución de los diferentes tipos de células somáticas en la leche de las glándulas mamarias sanas es como sigue: a) macrófagos 60 %; b) linfocitos 25 %; y c) neutrófilos o leucocitos polimorfonucleares 15 % (Philpot., 2001; Wolter et al., 2004; Bedolla., 2004b). De todas las células de la leche de un cuarto infectado, aproximadamente el 99 % serán leucocitos, mientras que el resto 1% serán células secretoras que se originan de los tejidos de la ubre. Juntos esos dos tipos de células constituyen la cuenta de células somáticas (CCS) de la leche que comúnmente es expresada en mililitros (Philpot., 2001; Bedolla., 2004b). La infección intramamaria es el principal factor causante de cambios en el CCS en la leche. La glándula mamaria que nunca se han infectado normalmente tienen CCS de 20,000 a 50,000/ml (Pérez et al., 2005). Estudios demuestran que la mayoría de las vacas con una CCS menor de 200,000/ml probablemente no están infectadas, y que la mayoría de esas vacas con cuentas mayores de 300,000/ml tienen altas probabilidades de estar infectadas (Philpot., 2001). Aunque estas pruebas de monitoreo no diagnostican la causa o tipo de infección, si alertan al ganadero y al veterinario de que un problema de salud en el hato (Bedolla., 2004b; Pérez et al., 2005).

II JUSTIFICACIÓN.

La mayoría de las formulaciones antimicrobianas para vaca seca incluyen antibióticos con buena acción sobre organismos Gram positivos y negativos durante las primeras semanas del periodo de secado y probablemente brinden poca o ninguna protección contra las infecciones intramamarias que se producen durante el periodo de inmunosupresión del peri-parto. Inducido por el aumento de hormonas como cortisol, estrógenos y prolactina aunado a esto, el consumo de materia seca disminuye particularmente durante las últimas semanas de gestación mientras que las necesidades energéticas y proteicas de la vaca aumentan. Este desbalance energético-hormonal ha sido asociado con el aumento a la susceptibilidad a enfermedades que originan el uso indiscriminado de antimicrobianos y con ello la incertidumbre de residuos farmacológicos en leche. Por ello, es necesaria la exploración de nuevas alternativas que busquen tener un efecto inmunoestimulante para aumentar la eficacia de curación de las infecciones intramamarias y patologías del peri-parto. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la seguridad, tolerancia y eficacia de dos lisados de *Corynebacterium cutis* usados como inmunoestimulantes en el periodo seco y la lactancia temprana de la vaca lechera.

IV HIPÓTESIS.

La aplicación de lisado de *Corynebacterium cutis* 2 mL/100kgPV vía subcutánea en el periodo seco y la lactancia temprana no induce efectos adversos ni altera los perfiles de seguridad y parámetros fisiológicos disminuyendo la incidencia de mastitis.

V OBJETIVOS.

5.1 Objetivo general

Evaluar la tolerancia, seguridad y eficacia de dos diferentes lisados de *Corynebacterium cutis* administrado una sola dosis de 2mL/100kgPV en el periodo seco y 60 días de la lactancia temprana.

5.2 Objetivos específicos

1.- Evaluar la tolerancia y seguridad de los dos lisados de *Corynebacterium cutis* (UC1-UC2) 30 días antes del parto después de una sola aplicación subcutánea a una dosis de 2mL/100kgPV .

2.- Evaluar la tolerancia, seguridad y eficacia de dos lisados de *Corynebacterium cutis* (UC1 y UC2) 60 días después del parto aplicando 2mL/100kgPV los días 30, 37 y 42 de la lactancia temprana.

3.- Evaluar si la aplicación repetida de tres inyecciones de los dos lisados de *Corynebacterium cutis* (UC1 y UC2) alteran la producción y calidad de la leche.

VI METODOLOGIA.

6.1 Sitio de prueba

El estudio fue realizado en la granja lechera “Posta el cuatro” ubicada en la cuenca lechera de los Altos de Jalisco. El estudio fue realizado entre los meses de Agosto-Noviembre de 2014. La elegibilidad de la unidad de producción se llevó a cabo de acuerdo al número de animales en producción y a la disponibilidad de instalaciones necesarias para el manejo zootécnico que garantizar el bienestar animal.

6.2 Animales

Se utilizaron 31 vacas gestantes aparentemente sanas con 8 meses de gestación +/-4 días. Los animales fueron divididos en tres grupos en forma aleatoria con respecto al número de partos: Grupo 1: 10 vacas tratadas con *Corynebacterium* UC1 (Virbac Francia); Grupo 2: 11 vacas tratadas con *Corynebacterium* UC2 (Virbac Francia) y Grupo 3: 10 vacas tratadas con solución salina fisiológica/ grupo control. Los criterios para la evaluación de la seguridad y la tolerabilidad en estos ensayos se describen basados en los eventos adversos a los medicamentos (EA) que se definieron como cualquier signo desfavorable y no intencionado, signo o enfermedad que ocurre con el uso de la administración de *Corynebacterium cutis*, a la alteración de parámetros fisiológicos y a las pruebas de laboratorio que incluyen hematología y química sanguínea. La eficacia del uso del *Corynebacterium cutis* fue determinada mediante pruebas de campo (test california) y pruebas de laboratorio citometría de flujo. Todos los animales fueron considerados clínicamente sanos basado en examen clínico y estudios de química sanguínea y hemograma realizados por la UMSNH. Los procedimientos realizados a los animales fueron valorados y aprobados por el comité de ética y bienestar animal (GEDOQ/ASC/POP/707).

6.3 Elemento de prueba

Fueron utilizados dos lisados de *Corynebacterium cutis* identificados por la empresa fabricante (Virbac Company, France) como (UC1-UC2). Es considerado como lisado total de *Corynebacterium cutis* (lisado por ultrasonicación) a una concentración de 20 mg/mL, es usado para la prevención de enfermedades respiratorias y digestivas en recién nacidos y como modulador de la respuesta inmune cuando se administra en la última etapa de la gestación, previniendo infecciones post-parto. Las condiciones de almacenamiento son (2- 16 ° C).

Tabla 3.- Lisados de *Corynebacterium cutis*

| Identificación | Lote No. | Ingrediente activo | Presentación | Manufactura |
|----------------|----------|---|--------------|----------------------------|
| UC1 | 4DB3 | <i>Corynebacterium cutis</i> Inmunoestimulante | 10 mL vial | Carros France Sep 13 |
| UC2 | 47ZA | | | |

6.4 Caracterización del lisado de *corynebacterium cutis*

Para determinar diferencias moleculares en el patrón de expresión de los dos lisados de *Corynebacterium cutis* las proteínas totales fueron reconcentradas en Centricon de 3,000 NMWL Ultracel- Millipore a 3500 x g por 20 minutos a 4° C hasta obtener el homogenizado deseado. Posteriormente fueron precipitadas con acetona añadiendo 3 volúmenes de acetona preenfriada a -20°C al extracto. Se dejó precipitar a -20°C toda la noche. Se recuperaron las proteínas precipitadas por centrifugación 5000 x g. Se les agrego buffer RIPA (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.5% deoxicolato de sodio, y 0.1% dodecilsulfato de sodio [SDS] (Sigma Chemical CO. St Luis, MO USA), que contiene una mezcla de inhibidores de proteasas (aprotinina, leupeptina, pepstatina, quimostatina, antipaina y fluoruro de fenilmetil sulfonilo [PMSF 100 mM]) (MP Biomedical, LLC. Santa Ana, CA USA) e inhibidores de fosfatasa (ortovanadato de sodio NA3VO4 1 mM y NAF 50 mM) (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Delaware A USA). El lisado celular fue

centrifugado durante 20 minutos a 4°C. Las proteínas fueron cuantificadas por el método de Lowry (Pierce Biotechnology, Inc. Rockford, IL USA) en un lector de microplacas Synergy H4 (BioTek Instruments, Inc. Vermont W, USA). Para desnaturalizar las proteínas se homogenizaron con buffer de muestra 4X (Tris base 3 gr, glicerol 40 ml, SDS 8 gr, B- mercaptoetanol 8 ml) (Bio-Rad Laboratories, Inc. Philadelphia, PA, USA), azul de bromofenol 0.2 gr, pH 6.8. Y se observaron en geles teñidos con azul de Coomassie. Aproximadamente, 40 µg de proteínas totales fueron cargadas en geles de poliacrilamida al 12 %. Se utilizó un marcador de peso molecular de 250 a 10 kDa (Bio-Rad- 1610393).

6.5 Dosis y vía de administración de *Corynebacterium cutis*.

Los dos lisados de *Corynebacterium cutis* (UC1 y UC2) fueron administrado vía subcutánea en la tabla del cuello a una dosis de 2mL/100kg P.V. La 1^{er} aplicación fue en el octavo mes de gestación iniciando el periodo seco 30 días antes del parto, la 2^{da}, 3^{er} y 4^{ta} aplicación fue en los días 30, 37 y 44 post-parto. AL grupo control solo se le aplico la misma cantidad de Solución Salina fisiológica

6.6 Evaluación de Seguridad

6.6.1 Análisis de hemograma y química sanguínea

Para determinar la seguridad de *corynebacterium cutis* en vacas lecheras se realizaron estudios de hemograma y química sanguínea a todos los animales, antes de la aplicación del inmunoestimulante (periodo seco) y al final del tratamiento (Lactancia temprana). Todas las muestras fueron tomadas de la vena coccígea en tubos vacutainer® de color morado con EDTA para hemograma y de color rojo para química sanguínea. Para determinar los analitos de hemograma se utilizó el analizador veterinario de hemogramas BCvet de la marca Kontrol-lab el analizador sanguíneo de células Vet BC utiliza un solo canal para realizar el conteo de glóbulos rojos y células blancas, en la misma muestra. Las muestras

son diluidas de manera cuantitativa, se mantiene la sangre diluida en la sonda de muestra. Después de que la sangre se diluye en el recipiente para muestras este ejecutará el recuento. El cátodo y el electrodo interior de la fuente de corriente constante se encuentran en la cámara frontal y posterior respectivamente. Hay un rubí con un diámetro en su abertura de 80 μm entre estas dos cámaras. La cámara posterior está llena de un líquido eléctrica y la cámara delantera está llena de alguna dilución. Cuando una partícula pasa la abertura de rubí, habrá una pulso eléctrico transitorio entre la electrodos interior y exterior, desde la celda de conductividad es menor que la de dilución. El número de pulsos generados es indicativo del número de partículas que atraviesan la abertura. La amplitud de cada pulso es esencialmente proporcional al volumen de partículas que lo produjo. Un volumen de las células pasará a la abertura rubí bajo la presión negativa para generar una serie de señales de impulsos. Se puede obtener un volumen determinado de número total de células por amplificación del pulso, la identificación, la deformación, el ajuste de la válvula y la conversión A / D. Para determinar los analitos de química sanguínea se utilizó el analizador bioquímico automatizado de la marca (IKEM) equipado con el software (IchemManager). Se utilizó el método de punto final el cual consiste en poner en contacto los reactivos y la muestra biológica y tras un periodo de retardo se mide la absorbancia. Estudios hematológicos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Patología Clínica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Los resultados fueron considerados anormales si estaban por debajo o por encima del 20% de los valores de los parámetros fisiológicos normales de la vaca Holstein.

6.6.2 Análisis de Signos vitales (parámetros fisiológicos)

Para determinar si la aplicación de *Corynebacterium cutis* era segura y no inducía algún efecto adverso se midieron parámetros fisiológicos (temperatura corporal, frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria antes y después de cada

inoculación) 7 días continuos dos veces por día. Los resultados fueron considerados anormales si estaban por debajo o por encima del 20% de los valores de los parámetros fisiológicos normales de la vaca Holstein. Se utilizó un termómetro infrarrojo marca Fluke 561 HVAC pro. Con el objetivo de no inducir estrés que afectara la variabilidad de los datos. Las lecturas fueron tomadas a tiempos establecidos a las 10:00 am y 6:00 pm en los corrales establecidos para las vacas bajo estudio.

6.7 Evaluación de Tolerancia

6.7.1 Análisis de hemograma y química sanguínea

Para determinar si la aplicación de *Corynebacterium cutis* era segura y no inducía algún efecto adverso locales se realizó un examen clínico del sitio de inoculación por el médico veterinario del sitio de experimentación y el monitor clínico de virbac donde se realizó una palpación visual por medio de ecoscopia para determinar signos sugestivos de inflamación, mediante Doppler determinamos la ausencia o presencia de vascularización. Esta técnica permite además de visualizarlas signos sugestivos de procesos inflamatorios, se puede medir y determinar la profundidad y el compromiso de los tejidos adyacentes. Se utilizó el ultrasonido de la marca Kontrol Lab modelo Kc-20 vet el cual cuenta con el software DICOM 1.0. También fueron tomadas imágenes termograficas para determinar la temperatura del sitio de inoculación con la cámara FLIR-E8, el software utilizado es el FLIR TOOLS 4.1. La medición es presentada mediante una escala de colores que van del amarillo al morado, los puntos donde la temperatura era mayor respecto eran visualizados en color morado. Si no había identificado alteraciones de temperatura la imagen se mostraba en color amarillo. Pudiendo obtener cuatro temperaturas equidistantes del punto de inyección. En caso de inflamación grave visualmente identificada se consideró tomar largo, ancho y profundidad con un vernier o pie de rey.

Otro parámetro considerado en la evaluación de tolerancia fue la incidencia de abortos en animales bajo tratamiento en los 30 días antes del parto, ya que por ser un inmunoestimulante caracterizado de inducir una respuesta celular tipo TH1 podría ocasionar abortos en la última etapa de gestación.

6.8 Evaluación de eficacia en la incidencia de mastitis

Todos los animales bajo estudio fueron seguidos clínicamente después de 60 días después del parto. Para determinar la eficacia del producto se buscó determinar la incidencia de mastitis subclínica mediante la prueba de California y la alteración en el número de células somáticas en leche.

6.9 Determinación de mastitis subclínica mediante la prueba California

La determinación de mastitis subclínica se realizó mediante la prueba de California para Mastitis (CMT, por sus siglas en inglés) en los días 15, 30, 45 y 60 post-parto. Esta técnica ha sido empleada durante décadas y sigue siendo la prueba más utilizada a nivel de campo para el diagnóstico de mastitis en el ganado bovino lechero (Morresey, 1999; Radostits, 2002; Medina et al., 2003; Erskine, 2001; Bedolla et al., 2007). Es una prueba sencilla que es útil para detectar la mastitis subclínica por valorar groseramente el recuento de células de la leche. No proporciona un resultado numérico, sino más bien una indicación de si el recuento es elevado o bajo, por lo que todo resultado por encima de una reacción vestigial se considera sospechoso (Ávila, 1996; Ávila et al., 2001; Barkema et al., 1997). La prueba consiste en el agregado de un detergente a la leche, el alquil-aril sulfonato de sodio, causando la liberación del ADN de los leucocitos presentes en la ubre y este se convierte en combinación con agentes proteicos de la leche en una gelatina. A mayor presencia de células se libera una mayor concentración de ADN, por lo tanto mayor será la formación de la gelatina, traduciéndose en nuestra lectura e interpretación del resultado como el grado más elevado de inflamación. Es decir, permite determinar la respuesta inflamatoria con base en la viscosidad del gel que se forma al mezclar el reactivo (púrpura de

bromocresol) con la misma cantidad de leche en una paleta con cuatro pozos independientes permitiendo evaluar cada cuarto independientemente (Smith 1990; Saran et al., 2000; Medina et al., 2003). Los resultados se leen como Negativos, Traza (sospechoso), 1+, 2+ y 3+, según la cantidad de formación en la muestra (NMC, 1999).

6.10 Determinación de mastitis subclínica mediante citometría de flujo

Fueron tomados 30 mL de leche de los 4 cuartos de cada vaca posteriormente se realizó un pool de las 4 muestras y se determinó el conteo de células somáticas bajo la metodología descrita por (Coulter., 1953) la cual fue denominada citometría de flujo-Fossomatic a los días 30, 37 y 44 de la lactancia temprana. Esta técnica consiste en el filtrado de una solución de leche mezclada con detergente (Triton X-100 EDTA) a través de una membrana con poros finos (COFOCALEC, A.C.- Guadalajara, Jalisco). Un procedimiento colorimétrico basado en la reacción con el ADN de las células es entonces utilizado para determinar el contenido de ADN que está relacionado directamente con el número de células presentes en la muestra inicial (Djabri et al., 2002; Bedolla et al., 2007). Se coloca una muestra de leche de 5ml de leche a 40° C. En el Fossomatic se tiñen las células somáticas con un colorante fluorescente para obtener una reacción solo con el ADN de las células. Es por eso que las partículas sucias y los glóbulos de los lípidos no se suman al número de las células somáticas. La muestra pasa frente a una luz especial y un detector registra cada célula somática. Entre cada muestra el aparato limpia su sistema de flujo para evitar el efecto del arrastre de una muestra a otra. Se puede decir que el Fossomatic es un contador específico de ADN basado en un principio óptico de fluorescencia. Debido a que el bromuro de ethidio penetra en la célula y forma un complejo fluorescente con el ADN nuclear, cada célula produce un pulso eléctrico que se amplifica y se registra (Martínez et al., 2003).

6.11 Evaluación de parámetros productivos y calidad de la leche

Como parte de valorar la eficacia de *Corynebacterium cutis* se realizó un estudio para determinar su efecto en la producción de leche esta fue monitoreada por 60 días de la lactancia temprana mediante la lectura en kilogramos en los medidores instalados en la sala de ordeño. Las vacas tenían asignado un podómetro con el cual se identificaban los registros de leche en las 2 ordeñas diarias. También fueron obtenidas muestras de leche de 30 ml por cuarto, se realizó un pool de las cuatro muestras y se valoró a los días 30, 37 y 44 de la lactancia temprana la cantidad nutrimental (Grasa, proteína, lactosa) en el laboratorio de COFOCALEC, A.C.- Guadalajara, Jalisco, dichos parámetros fueron determinados mediante el método de espectroscopia de infrarrojo de acuerdo a la nom NMX- 708-COFOCALEC-2004.

6.12 Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó en el programa estadístico GraphPad Prisma 5.0 mediante la prueba de ANOVA de 2 vías comparando los grupos tratados contra el control, considerando una diferencia significativa como ($P < 0.05$).

VII RESULTADOS

El estudio clínico de seguridad, tolerancia y eficacia en vacas lecheras donde se aplicó *Corynebacterium cutis* a una dosis de 2mL/kgPV fue realizado en la granja lechera “Posta el cuatro”. La fase clínica del estudio empezó en noviembre de 2014 y terminó en enero de 2015.

7.1 Unidad de experimentación.

Las 31 vacas fueron distribuidas en tres diferentes grupos de estudio los cuales quedaron conformados de manera homogénea en base al tiempo de gestación, condición corporal, peso y número de lactancias (Cuadro 4; Figura 1).

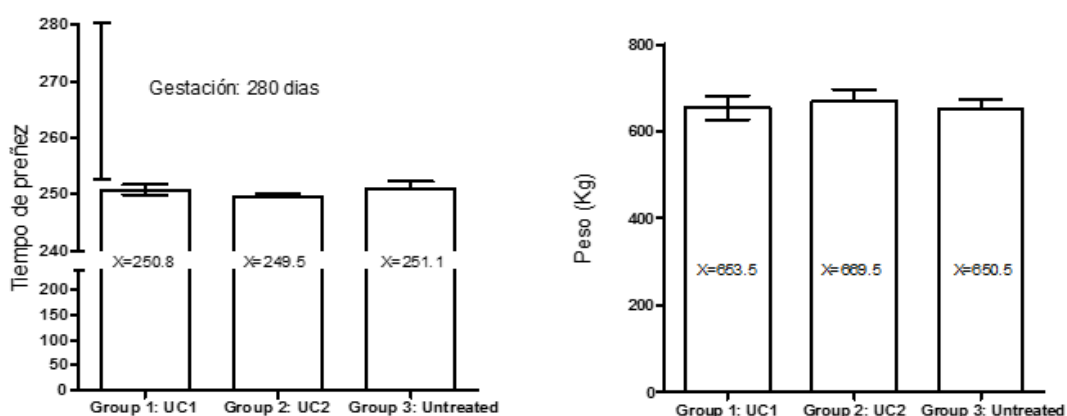


Figura 1.- Peso y tiempo de gestación de los animales bajo estudio

Figura 1. Muestra la homogeneidad de grupos bajo estudio. A) Se observa que no hay diferencia significativa entre el promedio de peso entre grupos. B) Se observa que no hay diferencia significativa entre el promedio de días de gestación entre grupos.

Tabla 4.- Características de los animales bajo estudio

| Identificación | Días de gestación | Condición corporal (1-5) | Peso (Kg) | No. de Lactancia |
|---|-------------------|--------------------------|-----------|------------------|
| Grupo1: Inoculados con 2mL/100kgPV de UC1 | | | | |
| 68 | 253 | 3 | 567 | Primera |
| 2047 | 246 | 3 | 623 | |
| 70 | 248 | 3 | 623 | |
| 62 | 252 | 3 | 575 | Segunda |
| 4762 | 253 | 3 | 580 | |
| 9649 | 251 | 3 | 745 | |
| 2147 | 252 | 3 | 801 | Tercera |
| 4062 | 254 | 3 | 657 | Cuarta |
| 8712 | 246 | 3 | 600 | |
| 666 | 253 | 3 | 764 | Quinta |
| Media | 250.8 | 3 | 653.5 | |
| Grupo2: Inoculados con 2mL/100kgPV de UC2 | | | | |
| 121 | 248 | 3 | 591 | Primera |
| 2408 | 250 | 3 | 640 | |
| 4165 | 249 | 3 | 600 | |
| 73 | 250 | 3 | 585 | Segunda |
| 1038 | 251 | 3 | 745 | |
| 5328 | 249 | 3 | 727 | |
| 566 | 251 | 3 | 640 | Tercera |
| 4218 | 247 | 3 | 607 | |
| 8128 | 252 | 3 | 685 | |
| 8837 | 248 | 3 | 665 | Cuarta |
| 4580 | 250 | 3 | 880 | Quinta |
| Media | 249.5 | 3 | 669.55 | |
| Grupo 3: Inoculados con 2mL/100kgPV de Solucion Salina fisiologica | | | | |
| 1848 | 252 | 3 | 691 | Primera |
| 3395 | 246 | 3 | 718 | |
| 4321 | 247 | 3 | 600 | |
| 9687 | 254 | 3 | 607 | Segunda |
| 353 | 249 | 3 | 591 | |
| 1338 | 257 | 3 | 650 | |
| 5974 | 249 | 3 | 682 | Tercera |
| 4304 | 248 | 3 | 800 | |
| 5698 | 256 | 3 | 575 | |
| 6665 | 253 | 2 | 591 | Quinta |
| Media | 251.1 | 2.9 | 650.5 | |

7.2 Elemento de prueba.

Fue aplicado vía subcutánea el lisado de *Corynebacterium cutis* identificados como UC1 y UC2, fueron lotes fabricados por Virbac Francia de uso exclusivo para pruebas clínicas. Como control del experimento fue utilizada solución salina fisiológica (Figura 2).

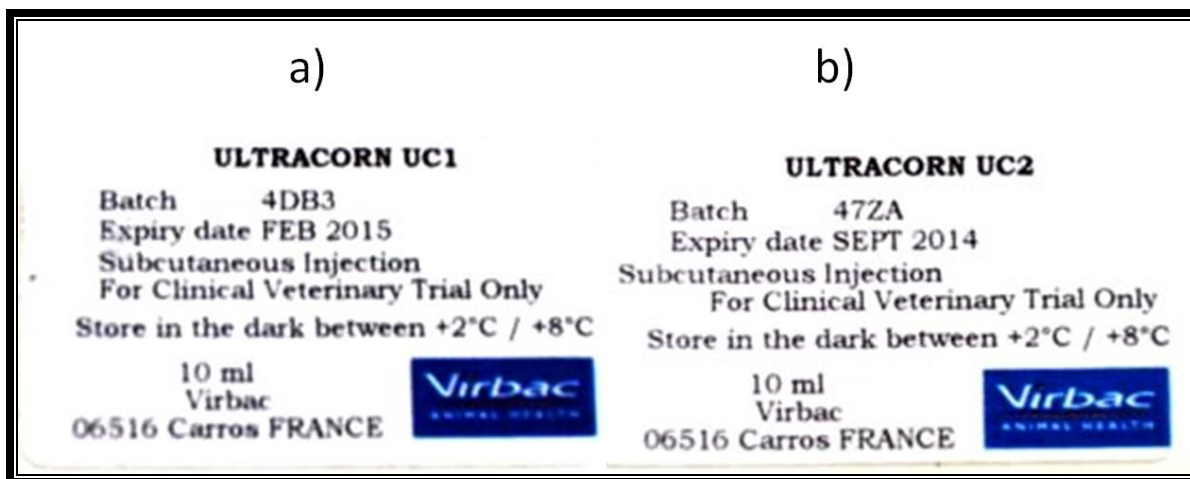


Figura 2.- Elementos de prueba

Figura 2.- Muestra las características de los lotes de *Corynebacterium cutis* aplicado a los diferentes grupos de vacas lecheras. Los lotes solo fueron autorizados para pruebas clínicas.

7.3 Caracterización del lisado de *Corynebacterium cutis*.

A los dos lotes de *Corynebacterium cutis* se les caracterizo el perfil de expresión de proteínas totales expresadas en el lisado. Las proteínas totales pudieron ser separadas en un gel de poliacrilamida al 12 % y esto nos permitió observar que son muy similares los productos de prueba. Se puede apreciar una mayor expresión en las proteínas de alto peso molecular en el lisado UC2 (Figura 3).

Extracto total de *Corynebacterium cutis*

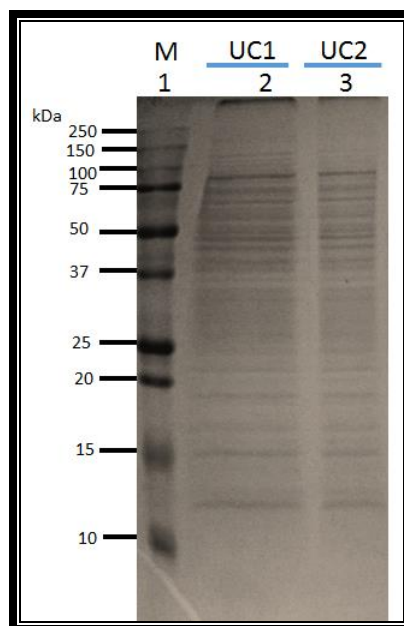


Figura 3.- Caracterización del patrón de proteínas *Corynebacterium cutis*

Figura 3.- Muestra la caracterización del patrón de proteínas totales de los dos lotes de *Corynebacterium cutis*. Carril M. corresponde al marcador de peso molecular. Carril 2. Corresponde al lote experimental número 1 UC1. Carril 3. Corresponde al Lote experimental número UC2. Se puede observar mayor expresión de proteínas de alto peso molecular en la fórmula 1. En la fórmula 2 se observa la ausencia de proteínas mayores de 75 kDa.

7.4 Evaluación de seguridad después de la aplicación de *Corynebacterium cutis*.

7.4.1 Hematología y química sanguínea

Para determinar la seguridad de la aplicación de dos lotes diferentes de *Corynebacterium cutis* vía subcutánea a una dosis de 2mL/100kgPV se tomaron muestras de sangre 30 días antes del parto y 52 días de la lactancia temprana. Se observaron valores fuera del rango de referencia. Sin embargo, no hubo significancia clínica y estadística $p > 0.05$.

Tabla 5.- Hematología 30 días antes del parto

Valores hematológicos medios de vacas lecheras tratadas con *Corynebacterium cutis* en el periodo seco.

| Analito | Grupo 1:UC1 N=10 | Grupo2: UC2 N=11 | Grupo3: Control N=10 | Valor de referencia |
|----------------------------------|---------------------|---------------------|----------------------------|------------------------|
| Hematocrito (L/L) | 0.31 ± 0.04 | 0.31 ± 0.04 | 0.31 ± 0.04 | 0.24-0.46 |
| Eritrocitos x10 ¹² /L | 6.49 ± 0.55 | 6.64 ± 0.64 | 6.78 ± 0.65 | 5.0-10.0 |
| Hemoglobina, g/L | 119.7 ± 16.46 | 118.36 ± 19.59 | 127.6 ± 22.56 | 80-150 |
| VGM, F/L | 51.2 ± 8.77 | 48.3 ± 4.24 | 53.3 ± 8.45 | 40-60 |
| CGMH, g/L | 358.7 ± 16.98 | 352.36 ± 14.36 | 356.8 ± 19.81 | 300-360 |
| Plaquetas x10 ⁹ /L | 357.3 ± 161.7 | 383.36 ± 157.19 | 348.9 ± 135.7 | 110-800 |
| Leucocitos x10 ⁹ /L | 46.59 ± 107.18 | 18.78 ± 12.49 | 16.05 ± 8.66 | 4.0-12.0 |
| Linfocitos x10 ⁹ /L | 9.37 ± 6.15 | 13.59 ± 11.53 | 11.15 ± 8.15 | 2.5-7.5 |
| Eos x10 ⁹ /L | 0.19 ± 0.179 | 0.26 ± 0.304 | 0.4 ± 0.329 | 0-2.4 |
| Bas x10 ⁹ /L | 0 | 0.02 ± 0.042 | 0.01 ± 0.031 | 0-0.2 |
| Monocitos x10 ⁹ /L | 0.46 ± 0.397 | 0.61 ± 0.428 | 0.49 ± 0.284 | 0.25-0.84 |
| Fibrina x10 ⁹ /L | 6.3 ± 2.79 | 6.09 ± 2.11 | 6.3 ± 2.31 | 3.0-7.0 |
| Proteínas, g/L | 80.2 ± 8.66 | 82.18 ± 4.51 | 81.4 ± 7.66 | 70-85 |
| N.S, g/L | 3.11 ± 0.942 | 4.1 ± 1.31 | 3.81 ± 1.49 | 0.6-4.0 |
| N.B, g/L | 0.2 ± 0.290 | 0.254 ± 0.233 | 0.19 ± 0.331 | 0-1.2 |

Tabla 6.- Química sanguínea 30 días antes del parto

Valores bioquímicos medios de vacas lecheras tratadas con *Corynebacterium cutis* en el periodo seco.

| Analito | Grupo 1:UC1 N=10 | Grupo2: UC2 N=11 | Grupo3: Control N=10 | Valor de referencia |
|--------------------|---------------------|---------------------|----------------------------|------------------------|
| Glucosa, mmol/L | 3.56 ± 0.769 | 3.26 ± 0.772 | 3.21 ± 1.07 | 2.03-3.94 |
| Colesterol, mmol/L | 2.08 ± 0.322 | 2.28 ± 0.579 | 2.33 ± 0.400 | 2.26-6.6 |
| Urea, mmol/L | 4.2 ± 0.768 | 4.64 ± 0.744 | 4.88 ± 1.06 | 0.99-3.66 |
| Creatinina, umol/L | 113 ± 11.29 | 116.72 ± 12.69 | 115.6 ± 12.30 | 88.4-177 |
| DHL, U/L | 2561 ± 435.634 | 2682.36 ± 252.6 | 2989.3 ± 432.80 | 6.92-1445 |
| AST, U/L | 81.7 ± 22.301 | 88.09 ± 18.08 | 132 ± 103.27 | 48-100 |
| FA, U/L | 113.7 ± 36.29 | 110.63 ± 31.84 | 102.3 ± 22.30 | 68-320 |
| Proteínas, g/L | 77 ± 8.472 | 78.36 ± 3.90 | 77.6 ± 7.83 | 59-81 |
| Albumina, g/L | 33.78 ± 3.346 | 35.34 ± 4.05 | 34.46 ± 2.78 | 29-39 |
| Globulina, g/L | 43.33 ± 9.041 | 42.7 ± 4.99 | 43.14 ± 7.44 | 25-47 |
| A/G, calculado | 0.826 ± 0.258 | 0.779 ± 0.110 | 0.83 ± 0.213 | 0.6-1.3 |
| Ca, umol/L | 2.54 ± 0.279 | 2.47 ± 0.214 | 2.49 ± 0.246 | 2.10-2.67 |
| P, umol/L | 2.33 ± 0.469 | 2.03 ± 0.527 | 2.27 ± 0.447 | 1.32-2.65 |
| Na, umol/L | 125.8 ± 5.452 | 129.63 ± 6.59 | 129.8 ± 3.19 | 132-152 |
| K, umol/L | 4.8 ± 0.447 | 4.87 ± 0.588 | 4.89 ± 0.328 | 3.6-5.1 |
| Cl, umol/L | 106.3 ± 3.26 | 105.36 ± 4.56 | 106.9 ± 3.66 | 97-111 |

Tabla 7.- Hematología al día 52 de la lactancia temprana

Valores hematológicos medios de vacas lecheras tratadas con *Corynebacterium cutis* en la lactancia temprana.

| Analito | Grupo 1:UC1 N=10 | Grupo2: UC2 N=11 | Grupo3: Control N=10 | Valor de referencia |
|----------------------------------|---------------------|---------------------|----------------------------|------------------------|
| Hematocrito (L/L) | 0.31 ± 0.04 | 0.31 ± 0.04 | 0.31 ± 0.04 | 0.24-0.46 |
| Eritrocitos x10 ¹² /L | 6.96 ± 1.07 | 5.97 ± 0.549 | 6.88 ± 0.754 | 5.0-10.0 |
| Hemoglobina, g/L | 107.5 ± 15.61 | 101.62 ± 7.85 | 102.77 ± 10.09 | 80-150 |
| VGM, F/L | 47 ± 4.44 | 51.5 ± 4.44 | 46.44 ± 5.89 | 40-60 |
| CGMH, g/L | 330.62 ± 15.03 | 332.37 ± 17.79 | 323.55 ± 18.04 | 300-360 |
| Plaquetas x10 ⁹ /L | 475.87 ± 136.2 | 400.87 ± 138.09 | 359.77 ± 105.93 | 110-800 |
| Leucocitos x10 ⁹ /L | 9.98 ± 1.32 | 10.45 ± 1.08 | 9.74 ± 1.28 | 4.0-12.0 |
| Linfocitos x10 ⁹ /L | 7.31 ± 1.54 | 8.33 ± 1.28 | 7.84 ± 2.26 | 2.5-7.5 |
| Eos x10 ⁹ /L | 0.112 ± 0.03 | 0.112 ± 0.08 | 0.155 ± 0.133 | 0-2.4 |
| Bas x10 ⁹ /L | 0.01 0.03 | 0 | 0 | 0-0.2 |
| Monocitos x10 ⁹ /L | 0 | 0.06 ± 0.09 | 0 | 0.25-0.84 |
| Fibrina x10 ⁹ /L | 2.5 ± 1.06 | 3.37 ± 1.40 | 2.77 ± 1.39 | 3.0-7.0 |
| Proteínas, g/L | 86.75 ± 31.92 | 84.62 ± 5.42 | 86.88 ± 4.38 | 70-85 |
| N.S, g/L | 1.77 ± 1.27 | 1.62 ± 1.12 | 1.27 ± 0.871 | 0.6-4.0 |
| N.B, g/L | 0.77 ± 0.83 | 0.312 ± 0.318 | 0.322 ± 0.233 | 0-1.2 |

Tabla 8.- Química sanguínea al día 52 de la lactancia temprana

Cuadro 8. Valores bioquímicos medios de vacas lecheras tratadas con *Corynebacterium cutis* en la lactancia temprana.

| Analito | Grupo 1:UC1 N=10 | Grupo2: UC2 N=11 | Grupo3: Control N=10 | Valor de referencia |
|--------------------|---------------------|---------------------|----------------------------|------------------------|
| Glucosa, mmol/L | 3.45 ± 0.523 | 3.25 ± 0.462 | 3.17 ± 0.22 | 2.03-3.94 |
| Colesterol, mmol/L | 4.53 ± 1.26 | 4.08 ± 0.880 | 4.62 ± 1.71 | 2.26-6.6 |
| Urea, mmol/L | 5.46 ± 0.417 | 5.52 ± 0.675 | 5.57 ± 0.76 | 0.99-3.66 |
| Creatinina, umol/L | 105.5 ± 12.85 | 106.87 ± 21.01 | 99.33 ± 6.98 | 88.4-177 |
| DHL, U/L | 3695.8 ± 820.17 | 3112.37 ± 562.3 | 3322.6 ± 259.2 | 6.92-1445 |
| AST, U/L | 90.62 ± 21.36 | 100.12 ± 26.98 | 85.11 ± 17.29 | 48-100 |
| FA, U/L | 109.62 ± 19.05 | 119.37 ± 38.78 | 106.33 ± 15.39 | 68-320 |
| Proteínas, g/L | 83.12 ± 3.83 | 81 ± 4.27 | 83 ± 3.24 | 59-81 |
| Albumina, g/L | 37.2 ± 2.87 | 38.26 ± 5.08 | 38.27 ± 4.13 | 29-39 |
| Globulina, g/L | 45.92 ± 5.26 | 42.73 ± 7.51 | 44.72 ± 5.83 | 25-47 |
| A/G, calculado | 0.825 ± 0.161 | 0.93 ± 0.24 | 0.88 ± 0.218 | 0.6-1.3 |
| Ca, umol/L | 2.43 ± 0.150 | 2.55 ± 0.21 | 2.51 ± 0.297 | 2.10-2.67 |
| P, umol/L | 1.87 ± 0.380 | 1.65 ± 0.42 | 1.66 ± 0.239 | 1.32-2.65 |
| Na, umol/L | 126.5 ± 1.41 | 126.12 ± 4.70 | 125 ± 3.35 | 132-152 |
| K, umol/L | 4.28 ± 0.264 | 4.6 ± 0.36 | 4.7 ± 0.308 | 3.6-5.1 |
| Cl, umol/L | 103.87 ± 1.95 | 104.5 ± 1.77 | 105.11 ± 2.47 | 97-111 |

*Todos los resultados fueron considerados normales 20 % mayor o menor del valor de referencia. Los valores por encima o por debajo de los valores normales se indican en cursiva negrita estándar. Todos los valores encima o por debajo de 20% de los valores normales se observan en amarillo.

Los 31 animales tuvieron resultados aceptables ya que no se observó una diferencia estadística o clínica con referencia al grupo de tratamiento. El periodo seco de las vacas lecheras causa estrés fisiológico asociado con el cambio de los parámetros hematológicos. Además, el periodo seco de las vacas lecheras causa el estrés por reducción de nutrientes asociada con el cambio de los parámetros de química sanguínea.

El índice de variabilidad se atribuyó al periodo seco de la vaca lechera donde hay un estrés fisiológico asociado con el cambio de los parámetros hematológicos. Además, el periodo seco de las vacas lecheras causa estrés por reducción de nutrientes esto asociado al cambio de los parámetros de química de la sangre. Durante el ciclo de producción de la vaca, el período de transición es crítico debido a cambios endocrinos y metabólicos que acompañan al periodo seco, parto y el inicio de la lactancia. Además, Los parámetros de hematología y bioquímica son influenciados por la edad, el sexo, la nutrición, la actividad física, etc. El periodo seco (60 días) afecta el metabolismo de la energía alrededor del parto en las vacas lecheras, así como la producción de leche en la lactancia subsiguiente. La longitud del período seco también pudo afectar las concentraciones plasmáticas de urea, colesterol, transaminasas aspartato, glutamato deshidrogenasa y la concentración de insulina en plasma. Independientemente de la duración del período seco, la dieta glucogénica (producción de leche) también mejoró el estado metabólico en comparación con la dieta lipogénica (período seco). Hay que tomar en cuenta cambios, endocrinos, metabólicos e inmunológicos asocian con el estrés fisiológico de la vaca lechera.

La valoración clínica del director de estudio y médico veterinario del sitio de prueba determinaron que los animales no presentaban signos sugestivos a una reacción adversa inducida por la aplicación del inmunostimulante.

Todos los animales fueron aceptados no se observó significancia estadística y clínica comparando los parámetros de referencia. Hay que resaltar que fueron menos los metabolitos y los animales que fueron observados fuera del rango establecido en animales clínicamente sanos.

7.5 Análisis de signos vitales en el periodo seco

Después de la 1^{er} dosis 30 días antes del parto (periodo seco) se les valoro por 7 días temperatura rectal, frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria y tolerancia local (mediante termografía) esto permitió observar que el producto no modifico las condiciones fisiológicas (Figura 4). Además no se presentaron abortos y eventos adversos en ninguno de los animales tratados.

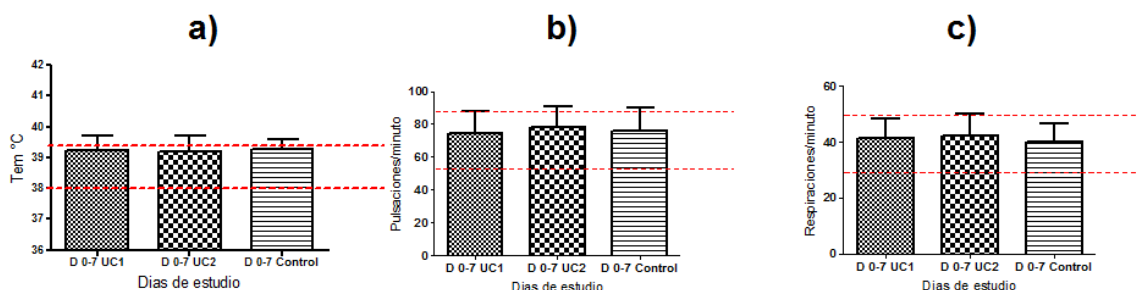


Figura 4.- Constantes fisiológicas después de la primera aplicación

Figura 4. Muestra la variabilidad en las Constantes fisiológicas después de la primera aplicación de *Corynebacterium cutis*. a) Temperatura rectal. b) Frecuencia Cardiaca. C) Frecuencia Respiratoria. No hay diferencias estadísticamente significativas entre grupos $P \geq 0.05$ d)

7.5.1 Análisis de signos vitales en la lactancia temprana

Se realizaron 3 aplicaciones post-parto en los días 30, 37 y 44 se observó que el inmunostimulante no modifico los parámetros fisiológicos de los animales tratados con los dos lisados de *Corynebacterium cutis*.

2^{da}, 3^{era} y 4^{ta} aplicación lactancia temprana

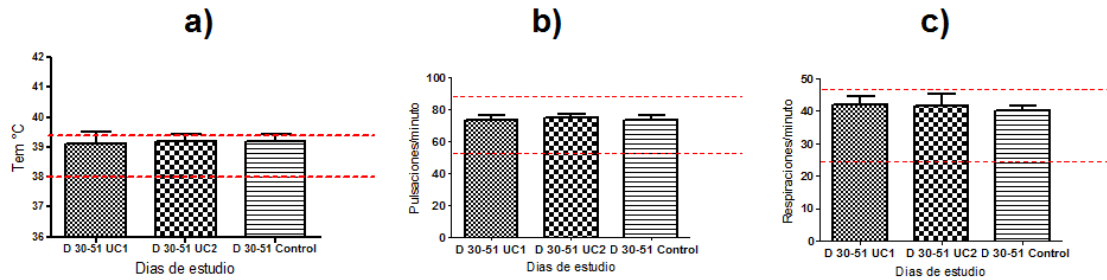


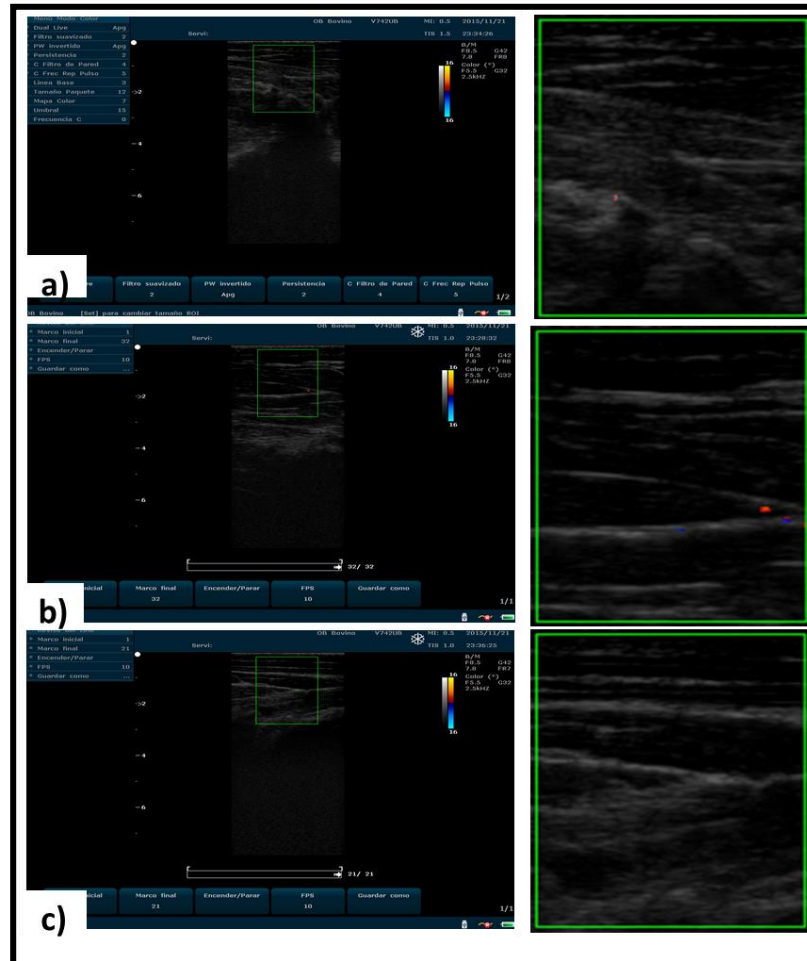
Figura 5.- Constantes fisiológicas de la 2da, 3ra y 4ta aplicación.

Muestra las constantes fisiológicas de los animales bajo tratamiento del día 30-51 después del parto a) Temperatura rectal. b) Frecuencia Cardíaca. C) Frecuencia Respiratoria. No hay diferencias estadísticamente significativas entre grupos $P \geq 0.05$.

7.6 Evaluación de tolerancia después de la aplicación de *Corynebacterium cutis*

Se determinó que la aplicación de los dos lotes de *Corynebacterium cutis* la 1^{er} aplicación 30 días antes del parto, la 2da, 3er y 4ta aplicación a los días 30,37 y 44 de la lactancia temprana fue segura y no indujo efectos adversos locales los cual se determinado por el examen clínico y ecoscopia del sitio de inyección no observando signos sugestivos de vascularización e inflamación (Figura 6A). También fue valorado el sitio de inyección mediante imágenes termografías que nos permitieron corroborar que no había un incremento de temperatura local asociado a la administración de UC1 y UC2 (Figura 6B).

6 A)



6 B)

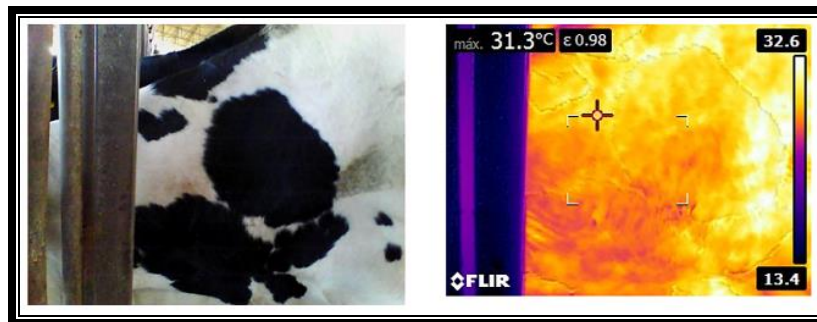


Figura 6.- Valoración del sitio de aplicación

Figura 6: Muestra la valoración de la tolerancia local. A todos los animales se les realizo ecoscopia y termografía. Panel A). No fueron observados signos de vascularización e inflamación en el sitio de aplicación mediante ecoscopia. B) No se observan signos de inflamación ni aumento de temperatura en el sitio de aplicación basado en fotografías termograficas.

En otro aspecto fue importante valorar que la aplicación del inmunoestimulante no indujo presencia de abortos en todos los animales bajo tratamiento a pesar de inducir una respuesta celular tipo TH1, este parámetro fue determinante en considerar una aplicación segura en vacas lecheras en el periodo seco.

7.7 Presencia de mastitis después de la aplicación de *Corynebacterium cutis*

Al evaluar la incidencia de mastitis mediante la prueba california en los días 15, 30, 44 y 60 post-parto se observó que el 90 % de los animales tratados con los dos lisados de *Corynebacterium cutis* no presentaron signos sugestivos de mastitis subclínica. Por lo contrario, en el grupo control se observó un 70 % de animales con mastitis en los primeros 60 días de lactancia. En contraste, al evaluar el número de células somáticas en los grupos tratados con los dos lisados de *Corynebacterium cutis* demostraron mayor número de células somáticas/mL respecto al control (Figura 7).



Figura 7.- Conteo celular somático e incidencia de mastitis .

- a) Muestra el promedio de células somáticas entre los días 30-51 post-parto. Se observa diferencia significativa $P \leq 0.05$ de los animales tratados con UC1 y UC2 versus el grupo control. b) Se observa que los animales tratados con UC1 y UC2 tienen menor incidencia de presentar mastitis.

7.8 Evaluación de producción y calidad de la leche después de la aplicación de *Corynebacterium cutis*.

Se realizó la medición de la producción de leche posterior a las 3 aplicaciones post-parto en los días 30, 37 y 44, se observó que el inmunestimulante no modificó los parámetros productivos en la lactancia temprana. Sin embargo, se observa una tendencia a aumentar la producción de leche en los animales tratados con los dos lisados de *Corynebacterium cutis*.

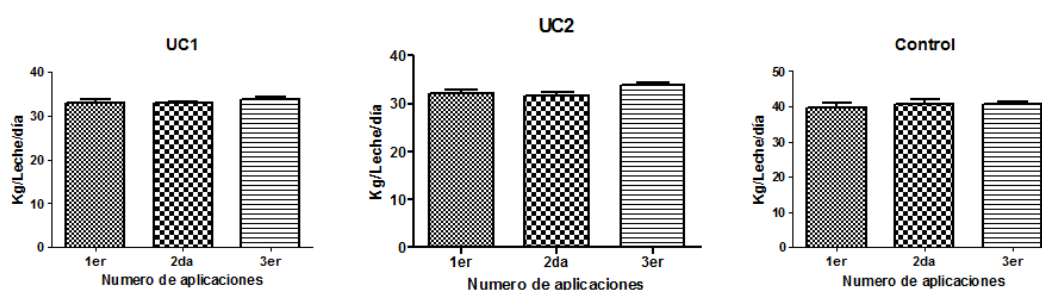


Figura 8.- Producción láctea

Muestra la producción de leche después de las 3 aplicaciones post-parto. No hay diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes aplicaciones del inmunestimulante $P \geq 0.05$.

7.9 Determinación de la calidad de la leche

Para determinar la calidad nutricional de la leche se evaluaron los parámetros de proteína, grasa y lactosa siendo considerados los elementos más importantes que la leche aporta al consumidor final. Esto nos permitió observar que la administración de *Corynebacterium cutis* al día 30, 37 y 44 de la lactancia no induce cambios en la calidad nutricional de la leche (Figura 9).

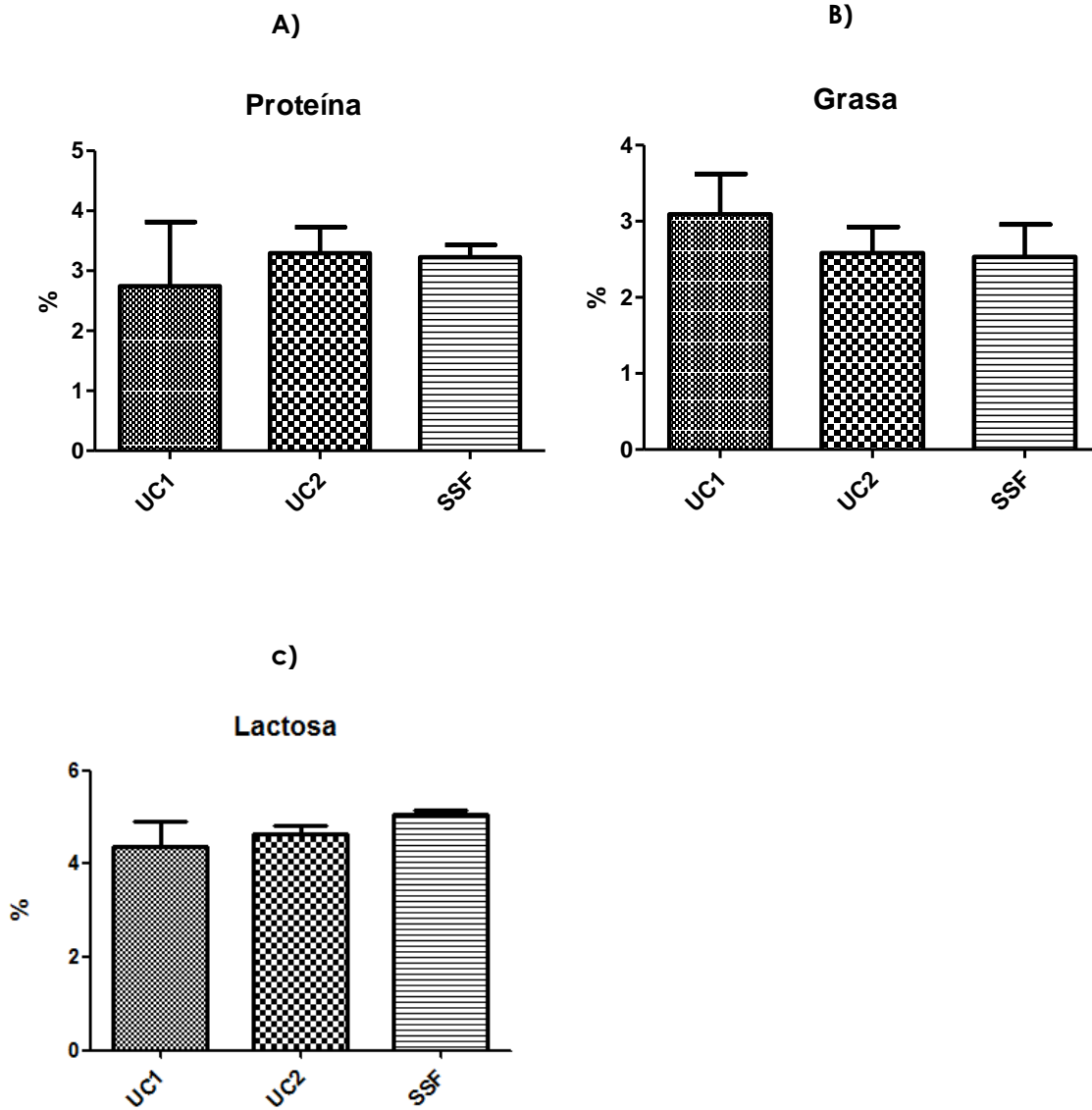


Figura 9.- Calidad nutrimental de la leche.

Figura 9.- Muestra el análisis de la calidad de la leche después de la aplicación de *corynebacterium cutis* en la lactancia temprana. A).- Proteína total. B).- Grasa total. C.- Lactosa. Se observó que el tratamiento con el inmunoestimulante no induce cambios en el porcentaje de proteína, grasa y lactosa.

VII DISCUSIÓN

Los inmunoestimulantes surgen como alternativa de manejo del aspecto sanitario en las producciones lecheras y suplen en gran parte los problemas de salud pública, generados por el uso de fármacos tipo antibióticos (Parant et al. 1984). Al final de la década de los 80 se empezaron a utilizar como profilácticos primarios en las vacas lecheras, los cuales actúan como sustancias que fomentan la actividad del sistema inmunitario y que ayudan a la disminución de enfermedades infecciosas en el puerperio (Rodríguez et al., 2003; Vadstein, 1995). El efecto protector depende de la enfermedad o patógenos contra los cuales se quiere prevenir y controlar (Rodríguez et al., 2003).

Los inmunoestimulantes de mayor uso son los de origen bacteriano (lipopolisacárido, oligodeoxinucleótidos, β -glucanos de hongos y levaduras). Entre los de mayor uso en medicina veterinaria se encuentran las preparaciones de pared celular bacteriana que estimulan la respuesta inmune innata, sin embargo, estos productos pueden causar inflamación y ser tóxicos a concentraciones ligeramente mayores de la dosis segura (Raa, 2000; Ohtsuka et al., 1997; Jara, 2011). El uso de inmunoestimulantes podría contribuir la exacerbación de la respuesta inflamatoria, por ello, es importante que durante en el desarrollo de nuevos fármacos se valore la seguridad, tolerancia y eficacia en la especie blanco en relación dosis respuesta en condiciones habituales. El objetivo del presente estudio fue determinar que un inmunoestimulante a base de lisado total de *Corynebacterium cutis* aplicado en vacas lecheras 30 días antes del parto y 30, 37 y 44 días durante la lactancia temprana, no induce efectos adversos en vacas lecheras en condiciones habituales de una granja comercial. Además de relacionar la reducción de casos de mastitis, posterior a la aplicación de este inmunoestimulante en el peri-parto. Se utilizaron dos lotes diferentes de *Corynebacterium cutis*, en grupos de vacas lecheras homogéneas en peso y etapa fisiológica, al analizar el patrón de expresión de proteínas totales de los dos lisados de *Corynebacterium cutis* se puede apreciar una ligera diferencia en la expresión de proteínas de alto peso molecular pudiendo ser estas las

determinantes de la respuesta inmune innata. Posteriormente, se evaluó la seguridad del lisado de *Corynebacterium cutis* después de una sola aplicación 30 días antes del parto y tres aplicaciones en la lactancia temprana 30, 37 y 44 días postparto de la vaca lechera. Se identificó variabilidad en parámetros fisiológicos (temperatura rectal, frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria), parámetros de hemograma y química sanguínea. Sin embargo, estas alteraciones fueron observables en un rango no mayor del 20 % respecto al valor de referencia, además, estas alteraciones fueron identificadas en las vacas tratadas con el lisado de *Corynebacterium cutis* y en las vacas pertenecientes al grupo control, por lo que no fue asociado a la inoculación del inmunostimulante ya que no existió diferencia estadística significativa ($P \geq 0.05$) en los parámetros evaluados entre grupos, ni signos clínicos que alteraran la homeostasis de los animales.

Estudios previos indican que la variabilidad en el ritmo cardíaco de las vacas puede verse alterado por: la temperatura ambiente, la altitud, la actividad física, el peso corporal, las etapas de la lactación, y el estrés de las vacas por el hacinamiento antes y después del ordeño (Kovács et al 2013; Kovács et al 2014; Hagen et al., 2005; Hagen et al., 2015). La frecuencia respiratoria podría verse influenciada por el clima, la actividad física, manejo del ganado, el peso corporal, la edad, la gestación, la producción de leche y el estrés asociado al desbalance negativo de la producción (Canario et al., 2012; Huzzey et al., 2012). La variabilidad de la temperatura en las vacas tiene que considerar diferentes factores como el hacinamiento, la temperatura ambiental, el manejo zootécnico, la profundidad de penetración en el recto del termómetro y defecación al momento de realizar la lectura (Frondeus et al., 2015; Burfeind et al., 2010).

El interpretar los análisis de hemograma y química sanguínea se observaron parámetros fuera de rango, sin embargo, no pasaban el 20 % del valor de referencia, la variabilidad de estos parámetros principalmente son asociados a que durante el ciclo de producción de la vaca, el período seco es crítico debido a cambios endocrinos, metabólicos y nutrimentales que acompañan el parto y el

inicio de la lactancia (Quiroz-Rocha et al., 2009; Ospina et al., 2010). En el periodo de lactancia de las vacas lecheras cursan por un estrés fisiológico asociado a los altos índices de producción de leche. Se ha demostrado que el estado fisiológico y el fin zootécnico determinan cambios en parámetros hematológicos y de química sanguínea no asociados a patología o reacciones adversas inducidas por un producto farmacéutico (Cozzi et al., 2011).

El análisis de tolerancia en el sitio de aplicación se valoró mediante la identificación de signos sugestivos de inflamación en el sitio de inoculación mediante ecoscopia y termografía después de una sola aplicación 30 días antes del parto y tres aplicaciones en la lactancia temprana 30, 37 y 44 días postparto de la vaca lechera. En este estudio se demostró que los dos lotes de *Corynebacterium cutis* son seguros y tolerables al aplicar en vacas lecheras una dosis de 2mL/100kgPV, ya que no fueron observadas reacciones adversas al medicamento (RAM) que alteraran alguna función biológica (Unión Europea 1993, Comisión Europea 2001; OMS 1972); además no se observó ningún signo de inflamación local en todos los animales bajo tratamiento.

Al evaluar el conteo celular somático (CCS) entre los grupos tratados con *Corynebacterium cutis* se observó que los animales tratados con el inmunoestimulante tienden a presentar una mayor cantidad de CCS/mL en comparación con el grupo de vacas control estos hallazgos son contradictorios ya que el *Corynebacterium cutis* se ha utilizado bajo la recomendación de disminuir el número de células somáticas en ganado lechero (Virbac-Francia). Won-chang lee et al., (1996) reporto una reducción significativa en el conteo celular somático en vacas lecheras tratadas con tres inoculaciones de *Corynebacterium cutis*. Sin embargo nuestros resultados coinciden con lo encontrado por (Pretorious, 2011) donde reporta que el uso de *Corynebacterium cutis* en la lactancia temprana de la vaca lechera induce el aumento de células somáticas. En este estudio clínico se utilizó una dosis de 2 mL 100kg PV de *Corynebacterium cutis* observándose que en los grupos tratados el número promedio de CCS/mL fue de 317,000 CS/ML y el

grupo control el promedio fue de 113,000 CS/ml existiendo una diferencia estadística significativa ($P \leq 0.05$). El conteo celular somático proveniente de vacas sin cambios en la apariencia de la leche o alteraciones en la glándula mamaria es de 200,000 CCS/ mL y un aumento es asociado a que el animal cursa por algún grado de enfermedad ya sea clínica o subclínica (Harmon, 1994; Hillerton, 1999; Philpot, 2001; Wolter et al., 2004; Bedolla, 2004b).

El aumento en el conteo celular somático en leche esta fisiológicamente sustentado ya que el lisado de *Corynebacterium cutis* son componentes totales de pared celular que después de ser inoculados son rápidamente fagocitado favoreciendo la quimiotaxis y reclutamiento celular por la síntesis y liberación de TNF- α , IL1 β , IL12 y IL18 citocinas determinantes en la respuesta del huésped ante agentes infecciosos. En otros estudios se ha demostrado que un lisado de pared celular de *Corynebacterium parvum* favorece la proliferación celular y quimiotaxis potencializando la inmunidad adaptativa demostró que estimula la actividad de linfocitos B y T, lo cual incrementa la síntesis de anticuerpos, aumenta la hipersensibilidad además de la actividad citotóxica llevada a cabo por linfocitos CD8+ (Halpern et al; Wolter et al., 2004; Bedolla, 2004b).

Esta aumentó de CCS podría favorecer una adecuada respuesta inmune ante la interacción de diferentes patógenos. En este estudio se pudo comprobar que los animales tratados con *Corynebacterium cutis* disminuyo significativamente la incidencia de mastitis subclínica en comparación con los animales del grupo control. En contraste, el aumento de $\geq 500,000$ CCS/mL podría penalizar la venta de leche. Sin embargo, solo el 12% total del hato se encuentra en periodo seco este porcentaje no interferiría en el análisis de CCS/mL ya que es una prueba que se realiza en tanque (Eberhart 1982). Por lo tanto, no habría pérdidas económicas al productor y si disminución de costos económicos por enfermedades al periparto al utilizar *Corynebacterium cutis* (Barkema et al 1999; DeGraves et al 1993; Eberhart et al 1982; Heeshen et al, 1996; Raubertas et al 1982).

Al evaluar los parámetros de calidad nutricional en leche de animales tratados con *Corynebacterium cutis* no se observaron diferencias estadísticas significativas con los valores de referencia para grasa es de 3 al 4 %, proteína aproximadamente el 3.5% y la lactosa el 5 %. Estos resultados coinciden con lo reportado por Pretorius (2011) que utilizó una dosis de 2mL/100 kgPV *Corynebacterium cutis* en vacas lecheras no observando cambios en la calidad nutricional de leche.

En otros estudios demuestran que el uso de *Corynebacterium cutis* en el periodo seco de la vaca reduce la mortalidad neonatal, lo que ha conllevado a un incremento en el número de becerros nacidos vivos y favorecidos en peso, atribuido a mayor cantidad de inmunoglobulinas en calostro procedente de animales tratados (Shalaby 1992).

En otras especies como las ovejas se ha determinado que el uso de *Corynebacterium cutis* a los 140 días de gestación a una dosis de 2 mL, favorece la concentración de inmunoglobulinas en el calostro y disminuye la incidencia de enfermedades en el peri-parto (Yilmaz et al, 2011).

El uso de inmunoestimulantes como profilácticos podría ayudar a montar una adecuada respuesta inmune ante diferentes agentes etiológicos de la vaca lechera. Definitivamente quedan aún muchas preguntas por contestar, sin embargo, el uso de estimulantes del sistema inmune innato pueden llevar al desarrollo de nuevas terapias profilácticas en el ganado productor de leche que nos garanticen la eficiencia en la explotación ganadera y la salvaguarda de la salud pública.

IX CONCLUSIONES

Este producto en desarrollo fase III podría considerarse como un inmunoestimulante seguro para ser utilizado en vacas lecheras en periodo seco y la lactancia temprana. Además demostró favorecer la disminución de mastitis en las vacas tratadas con 4 dosis de *Corynebacterium cutis* a una dosis de 2mL/100 kg lactancia temprana, por lo que podría reducir el riesgo de residuos de antibióticos en leche y evitar la resistencia bacteriana importante problema en salud pública en México. Sin embargo, son necesarios más estudios para dilucidar los mecanismos inmunitarios que son activados cuando se usan sustancias inmunomoduladoras de la respuesta inmune inespecífica.

X LITERATURA CITADA

Al-itzi SÂ, Maxie M, et al:' The pulmonary clearance of pasteurilla haemolytica in calves given corynebacterium parvum and infected with parainfluenza-3 virus. Can J Comp Med 1982; 46:85.

Arnott G, Roberts D, Rooke JA, Turner SP, Lawrence AB, Rutherford KM. Board invited review: The importance of the gestation period for welfare of calves: maternal stressors and difficult births. J Anim Sci. 2012 Dec;90(13):5021-34. doi: 10.2527/jas.2012-5463. Epub 2012 Sep 5. Review. PubMed PMID: 22952359

Barajas, J., Jaramillo, J. y Velásquez, V. (1999). Factores de riesgo asociados a infecciones subclínicas producidas por los biotipos humano y bovino de Staphylococcus aureus en la glándula mamaria de vacas en lactancia. Revista Veterinaria y Zootecnia de Caldas, 11, 30-39

Barkema. 2006. JAVMA 228:1565-1573

Barría, N.P. y Jara, A. 1998. Efecto del recuento de células somáticas sobre la producción y los componentes lácteos en vacas lecheras. XXIII Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Producción Animal A.G. 21 octubre 1998. Chillán, Chile. p. 3.

Bedolla CC. 2004a. Mastitis Bovina. Cuatro Vientos. No 41. Febrero-Marzo. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. pp. 24-26.

Bedolla CC. 2004b. Métodos de detección de la mastitis bovina. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Blecha. F. 1988. Immunomodulation: A means of disease prevention in stressed livestock. J. Anim. Sci., 66:2084-2090

Blood D.C , Radostits O.M. Veterinary medicine in: textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses. 1989.

Blowey R, y Edmonson P. 1995. Control de la mastitis en granjas de vacuno de leche. Acribia. Zaragoza. 208 pp.

Boyer P.J. Outbreak of clinical mastitis in dairy cows following "Blitz" therapy. 1997. Vet rec 141:155

Bradley, A. (2002). "Bovine mastitis: an evolving disease." *Vet J* **164**(2): 116-128.

Bradley, A.J; Green, M.J. Clinical mastitis in dairy cows after "Blits" therapy. 1997. *Vet rec* 141: 179-180

Burfeind O, von Keyserlingk MA, Weary DM, Veira DM, Heuwieser W. Short communication: repeatability of measures of rectal temperature in dairy cows. *J Dairy Sci.* 2010 Feb;93(2):624-7. doi: 10.3168/jds.2009-2689. PubMed PMID:20105534.

Canario L, Mignon-Grasteau S, Dupont-Nivet M, Phocas F. Genetics of behavioural adaptation of livestock to farming conditions. *Animal.* 2013 Mar;7(3):357-77. doi: 10.1017/S1751731112001978. Epub 2012 Nov 6. Review. PubMed PMID: 23127553.

Canario L, Mignon-Grasteau S, Dupont-Nivet M, Phocas F. Genetics of behavioural adaptation of livestock to farming conditions. *Animal.* 2013 Mar;7(3):357-77. doi: 10.1017/S1751731112001978. Epub 2012 Nov 6. Review. PubMed PMID: 23127553.

Carrión GM. 2001. Principios básicos para el control de la mastitis y el mejoramiento 8. de la calidad de leche. Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional-Michoacán, Departamento de Recursos Naturales Programa de Apoyo a la Ganadería Regional. pp 28-30.

Christa de Vos. The Effect of Coryne Bacterium Cutis Lysate on Somatic Cell Counts: A Study on Somatic Cell Counts of Dairy Cattle. LAP LAMBERT Academic Publishing (November 10, 2011). ISBN-10: 384653496X.

Cozzi G, Ravarotto L, Gottardo F, Stefani AL, Contiero B, Moro L, Brscic M, Dalvit P. Short communication: reference values for blood parameters in Holstein dairy cows: effects of parity, stage of lactation, and season of production. *J Dairy Sci.* 2011 Aug;94(8):3895-901. doi: 10.3168/jds.2010-3687. PubMed PMID:21787926.

Dairy Australia 2011. Environmental mastitis increasing

Dohoo, I.R. and Meek, A.H. 1982. Somatic cell counts in bovine milk. *Can. Vet. J.* 23: 119-125.

Dulin A.M, Paape M.J, Nickerson S.C. Comparison of phagocytosis and chemiluminescence by blood and mammary gland neutrophils from multiparous and nulliparous cows. 1988. *J vet Res* 49: 172-177.

Erskine RJ. 2001. Mastitis Control in Dairy Herds. In: Radostits OM, editor. Herd Health Food Animal Production Medicine. Philadelphia, Penn: WB Saunders Co. pp 397-433.

Fernández del Río JA. 1997. Mastitis. Tema V., en: Calidad y eficiencia en la producción de leche. Manual de procedimientos para la ordeña. Virbac. Departamento técnico. pp. 13-18.

Frondelius L, Järvenranta K, Koponen T, Mononen J. The effects of body posture and temperament on heart rate variability in dairy cows. *Physiol Behav.* 2015 Feb;139:437-41. doi: 10.1016/j.physbeh.2014.12.002. Epub 2014 Dec 3. PubMed PMID: 25481355.

Gialdroni-Grassi G: Bacterial products as immunostimulating agents. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1985; 76(Suppl I):119- tz1.

Giraudó, J.A. 1996. Conceptos básicos sobre inmunología de la glándula mamaria y utilización de vacunas contra mastitis. Congreso Nacional de Calidad de Leche y Mastitis. 1996. p. 80.

Goff JP, Horst RL. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *J Dairy Sci.* 1997 Jul;80(7):1260-8. Review. PubMed PMID: 9241588.

González, R.N.; Cullor, J.S.; Jasper, D.E. 1989. Prevention of clinical coliform mastitis in dairy cows by a mutant *Escherichia coli* vaccine. *Canadian Journal of Veterinary Research.* 53: 301-305.

Grummer, R. R., D. G. Mashek, and A. Hayirli. 2004. Dry matter intake and energy balance in the transition period. *Vet. Clin N Am. Food Anim.* 20:447-470.

Hagen K, Langbein J, Schmied C, Lexer D, Waiblinger S. Heart rate variability in dairy cows-influences of breed and milking system. *Physiol Behav.* 2005 Jun 2;85(2):195-204. PubMed PMID: 15894344 .

Harmon R.J. Physiology of of mastitis and factors affecting somatic cell count. 1994. *J.dairy sci* 77:2103-2112

Hayirli, A., R.R. Grummer, E. V. Nordheim, and P.M. Crump. 2002. Animal and Dietary Factors Affecting Feed Intake During The Prefresh Transition Period in Holsteins. *J. of Dairy Sci.* 85:3430-3443.

Hogan, J. S., K. L. Smith, K. H. Hoblet, P. S. Schoenberger, D. A. Todhunter, W. D. Hueston, D. E. Pritchard, G. L. Bowman, L. E. Heider, B. L. Brockett, and H. R. Conrad. 1989. Field survey of clinical mastitis in low somatic cell count herds. *J.Dairy Sci.* 72:1547-1556

Hogan J.S & Smith K.L. Centro de Investigación y Desarrollo de Agricultura de Ohio Universidad Estatal de Ohio, Wooster, Ohio. National Mastitis Council Annual Meeting Proceedings (2003), NMC Regional Meeting Proceedings (2008).

Huxley, J.H., M.J. Green, L.E. Green, et al. 2002. Evaluation of the efficacy of an internal teat sealer during the dry period. *J. Dairy Sci.* 85:551-561.

Huzzey JM, Nydam DV, Grant RJ, Overton TR. The effects of overstocking Holstein dairy cattle during the dry period on cortisol secretion and energy metabolism. *J Dairy Sci.* 2012 Aug;95(8):4421-33. doi: 10.3168/jds.2011-5037. PubMed PMID: 22818455.

International dairy federation. Bovine mastitis: Definition and guidelines for diagnosis. Bulletin of the international dairy federation. 1987.

Jara. JV, Berber. A, Primary prevention of acute respiratory tract infections in children using a bacterial immunoestimulant: a doble- maske, placebo-controlled clinical trial. *Clin ther.* 2000: 22(6): 748-59.

Jones, G.M. Understanding the basis of mastitis. Virginia cooperative extension, Virginia state university. 2006.

Klesius, P.H.: Immunopotential against internal parasites. En: Immunoparasitology Symposium. Nebraska Center for continuing education. Lincoln, Nebraska. Junio 17-19, 1981.

Kovács L, Tózsér J, Bakony M, Jurkovich V. Short communication: Changes in heart rate variability of dairy cows during conventional milking with nonvoluntary exit. *J Dairy Sci.* 2013;96(12):7743-7. doi: 10.3168/jds.2013-7030.Epub 2013 Oct 17. PubMed PMID: 24140325.

Kovács L, Jurkovich V, Bakony M, Szenci O, Póti P, Tózsér J. Welfare implication of measuring heart rate and heart rate variability in dairy cattle: literature review

and conclusions for future research. *Animal*. 2014 Feb;8(2):316-30. doi: 10.1017/S1751731113002140. Epub 2013 Dec 6. Review. PubMed PMID: 24308850.

Lago, A., S. M. Godden, R. Bey, P. L. Ruegg, and K. Leslie. 2011. The selective treatment of clinical mastitis based on on-farm culture results: I. Effects on antibiotic use, milk withholding time, and short-term clinical and bacteriological outcomes. *J. Dairy Sci.* 94:4441–4456.

LeBlanc, S.J, Herdt, T.H, Seymour ,W.M, Duffield, T.F, Leslie, K.E. Peripartum serum vitamin E, Retinol, and Beta-Carotene in Dairy Cattle and their associations with disease. *J.dry.Sci.*88 PP. 609-619.

Liew, F.Y; Cox, F.E.G. 1991. Non specific defence mechanism: The role of nitric oxide. *Parasitol. Today*, 7:A17-A21.

LÓPEZ, N.; CUZON, G.;GAXIOLA, G.; TABOADA, G.;VALENZUELA, M.,PASCUAL, C.; SANCHEZ, A.; ROSAS, C. 2003. Physiological, nutritional, and immunological role of dietary 1-3 glucan and ascorbic acid 2-monophosphate in *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture*. 224: 223-243.

Makovec, J. A., and P. L. Ruegg. 2003. Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001. *J. Dairy Sci.* 86:3466–3472.

Mayr A: Introduction of paraimmunity in biological products for viral diseases. Munich symposium on microbiology. Munich: Francis and Verlag, 1981;201-207.

Medina CM, y Montaldo VH. 2003. El uso de la prueba de conductividad eléctrica y su relación con la prueba de California para mastitis. CNM. V Congreso Nacional de Control de Mastitis. Aguascalientes, Ags., México. 29-31 de Mayo.

Medina CM, y Montaldo VH. 2003. El uso de la prueba de conductividad eléctrica y su relación con la prueba de California para mastitis. CNM. V Congreso Nacional de Control de Mastitis. Aguascalientes, Ags., México. 29-31 de Mayo.

Mein G.A, Schuring N. Lessons from scrapbooks and scrapheaps of history. 2003. *Bulletin-international federation*.

Mein G.A, Neijenhuis F, Morgan W.F, reinemann D.J, Hillerton J.E. Evaluation of bovine teat condition in commercial dairy herds; 1 Non- infectious factors. Proceedings of the 2nd international symposium on mastitis and milk quality, (2001) NMC/AABP, Vancouver, 374-351.

Miller G, Bartlett P. Economic effects of mastitis prevention strategies for dairy producers. *J Am Vet Med Associ.* 2004; 198:227-231.

Mohamed Mahmoud Eman; Ehab El-Sayed Ibrahim and Fatma Sayed Mohamed. Effect of administration of ultra-corn with bivalent Foot and Mouth disease oil vaccine in calves. *Vetworld.*2013.486-492

Morresey PR. 1999. Bovine Mastitis. In: Howard JL, Smith RA, editors. *Current Veterinary Therapy 4 Food Animal Practice.* Philadelphia, Penn: WB Saunders Co, 563- 568.

Munro, G.L.; Grieve, P.A. and Kitchen, B.J. 1984. Effects of mastitis on milk yield, milk composition processing properties and yield and quality of milk products. *Austr. J. Dairy Technol.* 39: 7-16.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. 1990. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection. 3rd ed, USA.

Norberg E, Hogeveen H, Korsgaard IR, Friggens NC, Sloth KHMN, y Løvendahl P. 2004. Electrical Conductivity of Milk: Ability to Predict Mastitis Status. *J. Dairy Sci.* 87:1099– 1107.

Nyman, A., Ekman, T., Emanuelson, U., Gustafsson, A., Holtenius, K., Persson, K. Hallén Sandgren, C. (2007). Risk factors associated with the incidence of veterinary-treated clinical mastitis in Swedish dairy herds with a high milk yield and a low prevalence of subclinical mastitis. *Preventive veterinary medicine*, 78 (2), 142-160.

OHTSUKA, H.; OHKI, K.; TAMAKA, T.; TAJIMO, M.; YOSHINO, T.; TAKAHASHI, K. 1997. Circulating tumor necrosis factor and interleukin 1 after administration of LPS in adults cows. *J Vet Med Sci.* 59(10): 927-929

Ospina PA, Nydam DV, Stokol T, Overton TR. Associations of elevated nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate concentrations with early lactation reproductive performance and milk production in transition dairy cattle in the northeastern United States. *J Dairy Sci.* 2010 Apr;93(4):1596-603. doi:10.3168/jds.2009-2852. PubMed PMID: 20338437

Pantoja, J. C., C. Hulland, et al. (2009). "Somatic cell count status across the dry period as a risk factor for the development of clinical mastitis in the subsequent lactation." *J Dairy Sci* **92**(1): 139-148.

Parant M, Chedid L. Stimulation of non-specific resistance to infections by synthetic immunoregulatory agents. *Infection.* 1984 May-Jun;12(3):230-4. PubMed PMID: 6469369.

Pedraza, C.G.; Agüero, H.E.; Gómez, M. C.; Jahn, E.B.; Lanuza, F.A.; Hazard, S.T.; Vidal, A.V.; Fajardo, P.F. y Leiva, R.A. 1994a. Relación entre la concentración de células somáticas y producción diaria de leche, determinada en cinco rebaños de Chile. *Agricultura Técnica (Chile)* 54: 259-267.

Pedraza, C.G.; Agüero, H.E.; Gómez, M.C.; Flores, H.P.; Mansilla, A.M. y Fajardo, P.R. 1994 b Relación entre el recuento de células somáticas y características de la curva de lactancia en vacas lecheras. *Agricultura Técnica (Chile)* 54: 268-276.

Pérez CG, Bedolla CC, Castañeda VH. 2005. Importancia del conteo de células somáticas en la cría sustentable de vacas productoras de leche. *Sustentabilidad. Vol III, No 1. Universidad de Guadalajara, Jalisco., México.* pp. 86-94.

Philpot N, Nickerson S. *Ganando la lucha contra la mastitis.* Naperville, USA y Oelde, Germany. 2002.

Philpot WN. 2001. Importancia de la cuenta de células somáticas y los factores que la afectan. III Congreso Nacional de Control de Mastitis y Calidad de la Leche. Junio de 2001. León, Gto. México. 26 pp

Philpot, W.N.; Nickerson S.C. 1992. *Mastitis: el contraataque.* Babson Bros. Co. Naperville, Illinois, USA. 150 p.

Pinzón-Sánchez, C., and P. L. Ruegg. 2011. Risk factors associated with short-term post-treatment outcomes of clinical mastitis. *J. Dairy Sci.* 94:3397–3410.

Quiroz-Rocha GF, LeBlanc SJ, Duffield TF, Wood D, Leslie KE, Jacobs RM. Reference limits for biochemical and hematological analytes of dairy cows one week before and one week after parturition. *Can Vet J.* 2009 Apr;50(4):383-8. PubMed PMID: 19436445; PubMed Central PMCID: PMC2657519.

Raa, J., 2000. The use of immune-stimulants in fish and shellfish feeds. In: Cruz - Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R., (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola.* 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, Mexico.

Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. 2000. *Veterinary Medicine A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses.* 9th ed. London, GB: WB Saunders Co.

Rodríguez, G. (2006). Comportamiento de la mastitis bovina y su impacto económico en algunos hatos de la Sabana de Bogotá, Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria*, 12, 35-55.

Sanford, C.J., G.P. Keefe, I.R. Dohoo, K.E. Leslie, R.T. Dingwell, L. DesCôteaux, and H. Mastitis and factors affecting somatic cell counts. 1994. *J. Dairy Sci* 77 :2103-2112.

SANTOMÁ, G. 1998. Estimuladores de la inmunidad. XIV curso de especialización: Avances en nutrición y alimentación animal.

Saran A, y Chaffer M. 2000. Mastitis y calidad de leche. Inter-Médica. Buenos Aires. 194 pp.

Scaramelli A, González Z. Epizootiología y diagnóstico de la mastitis bovina. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela. Manual de ganadería doble propósito, 2005.

Schukken Y.H, Grommers F.J, Van de Geer D, Brand A. Incidence of clinical mastitis on farms with low somatic cell counts in bulk milk. 1989. *Vet Rec* 125:60-63.

Schukken, Y. H., G. J. Bennett, M. J. Zurakowski, H. L. Sharkey, B. J. Rauch, M. J. Thomas, B. Ceglowski, R. L. Saltman, N. Belomestnykh, and R. N. Zadoks. 2011. Randomized clinical trial to evaluate the efficacy of a 5-day ceftiofur hydrochloride intramammary treatment on nonsevere gram-negative clinical mastitis. *J. Dairy Sci.* 94:6203–6215.

Shalaby, M.A., Saleh, S.M., El-Atrash, S., Sami, A.M., El-Sanousi, A.A., Saber, M.A., Reda, M.I., 1992. Application of *Corynebacterium cutis* lysate as an immune stimulant in cattle. *Mol. Biotechnol.* 4, 147–150

Sharma,N,Maiti S.K.. Incidence, etiology and antibiogram of sub clinical mastitis in cows in durg. 2010. *J Vet Res* 19:45-54.

Smith BP. 1990. Large Animal Internal Medicine. St Louis, Missouri: The C. V. Mosby Co.

Taverna, F., A. Negri, et al. (2007). "Characterization of cell wall associated proteins of a *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis case by a proteomic approach." *Vet Microbiol* 119(2-4): 240-247.

TECNOLOGÍA DE PROCESOS INDUSTRIALES S. A. 2006. Yodóforos: Dipping para el control de la mastitis. Kemical. Costa Rica

Templeton, J.W., Smith III, R. and Adams, L.G.: Natural disease resistance in domestic animals. JA VMA, 192: 1306- 1315, 1988.


Tyler, J.W.; Thurmond, M.C. and Lasslo, L. 1989. Relationships between test-day measures of somatic cell count and milk production in California dairy cows. Can. J. Vet. Res. 53(2): 182-187.

Yılmaz ÖG, Kaşıkçı G, Gündüz MC: Benefits of pregnant sheep immunostimulation with *Corynebacterium cutis* on post-partum and early newborn's life IgG levels, stillbirth rate and lamb's weight. Small Rumin Res, 97, 146-151, 2011.

Wolter W, Castañeda H, Kloppert B, y Zschöck M. 2004. Mastitis bovina. Prevención, diagnóstico y tratamiento. Editorial Universitaria. Universidad de Guadalajara. 146 pp.

XI APENDICE

11.1 Procedimiento de ética y bienestar animal

| | | |
|--|---|---------------------------|
|  Laboratorios Virbac México S.A. de C.V. | COMISIÓN DE ETICA Y BIENESTAR ANIMAL | |
| | Procedimiento Normalizado de Operación | Página 1 de 6 |
| | No.: GEDOQ/ASC/POP/707 | Fecha de Emisión: Ene/14 |
| | Versión:01 | Fecha de Revisión: Ene/17 |
| | Anexos: 01,02,03,04,05,06,07,08 | |
| Fecha: | Elaboró: Nombres: Dr. Gonzalo López Rincón Puesto: Redactor de Investigación Clínica | Firma: |
| Fecha: | Revisó: Nombre M. en C. Leticia García Casanova Puesto: Jefe Desarrollo Clínico | Firma: |
| Fecha: | Aprobó: Nombre: MVZ. José Manuel Moreno Puesto: Gerente de Investigación y Desarrollo | Firma: |

OBJETIVO

El propósito de la Comisión de Ética y Bienestar Animal (CEBA) de Laboratorios Virbac México es promover la seguridad y el bienestar animal que se lleva a cabo en todos los estudios que implican el uso de animales con fines experimentación. Asimismo, promoverá actividades de capacitación para el adecuado manejo de animales utilizados en protocolos de investigación.

ALCANCE

Esta normativa incluye el rancho experimental de Laboratorios Virbac México S.A. de C.V denominado “El astillero” y los centros experimentales externos que manifiesten su consentimiento.

Ningún investigador del departamento de R&D o persona vinculada a Laboratorios Virbac México incluyendo a los técnicos ubicados en diferentes regiones del país podrán iniciar actividades que involucren la utilización de animales sin la correspondiente aprobación de la (CEBA).

DEFINICIONES

Estudio: es una colección de procedimientos experimentales realizados en animales para un propósito específico.

Comisión de ética y bienestar animal: El órgano interno de Laboratorios Virbac México que tiene como finalidad emitir la opinión técnica sobre los aspectos éticos y de bienestar animal de las investigaciones propuestas que requieran una fase de experimentación animal.

Investigación con riesgo: estudios prospectivos que emplean tratamientos terapéuticos que alteren las condiciones fisiológicas del animal.

Protocolo: documento que proporciona los antecedentes, razones y objetivos de un proyecto de investigación y describe su diseño metodología y organización.

Requisitos: elementos obligatorios que expresan y contemplan consideraciones éticas y de bienestar animal cuya implementación es considerada indispensable para realizar la investigación.

Sujeto de investigación: especie animal que participa en el proyecto de investigación, ya sea como receptor directo de la intervención, como un control o a través de la observación.

Investigación sin riesgo: estudios que emplean métodos y técnicas de investigación documental retrospectiva y aquellos en los que no se realiza ninguna intervención en las variables fisiológicas y sociales que impacten la conducta de los individuos.

Consentimiento: Manifestación de voluntad libre, inequívoca, específica e informada mediante la cual la persona interesada consiente en ser incluido en un proyecto de investigación.

Equipo de investigación: Grupo de investigadores que de manera organizada y bajo la dirección de al menos una persona responsable trabajan conjuntamente en la realización de actividades de investigación.

INFORMACIÓN GENERAL

Principios de la Comisión de Ética y Bienestar Animal

El diseño de los experimentos con animales son determinantes en la investigación biológica y médica, son usados como modelos para investigar y comprender las causas, diagnóstico y tratamiento de enfermedades que afectan al humano y a los animales, además de sus importantes aportes en el desarrollo, producción y control de medicamentos y alimentos.

Por razones científicas, legales y éticas a partir del 1 de Enero de 2014, el 100% de los estudios gestionados por los investigadores de Laboratorios Virbac México deben de someterse a una revisión de bienestar animal antes de su implementación. De esta manera se podrán obtener investigaciones con resultados válidos, confiables, reproducibles y comparables, así como adoptar una

actitud responsable desde el punto de vista ético y moral frente al uso de seres vivos (sujeto de investigación).

La comisión de ética y bienestar animal evaluará los estudios sometidos de acuerdo a los principios éticos en la investigación con animales. Las tres "R's": Reducir, Reemplazar y Refinar. Estos son los fundamentos para una racional e inteligente estrategia para minimizar el uso de animales y las causas de dolor y estrés.

Reducir: Limitación del número de animales al mínimo imprescindible para la obtención de conclusiones válidas.

Reemplazar: Sustitución por procedimientos que no requieran uso de animales, y en el caso de que no sea posible deberá justificarlo.

Refinar: Utilización de procedimientos que minimicen los efectos adversos sobre el bienestar animal. Calidad del ambiente donde son criados y mantenidos antes y durante la experimentación.

La decisión de la Comisión de Ética y Bienestar Animal de Virbac México debe ser emitida antes del comienzo del estudio.

