

**Evaluación del efecto de una L-aminoácido oxidasa obtenida del veneno de
Bothrops asper de Colombia, sobre bacterias causantes de mastitis bovina**

Trabajo de grado para optar por el título de Médico Veterinario

Alejandro Acosta Moreno

Asesora

Silvia Posada Arias

Medica Veterinária. Adm Emp. MSc.(c) PhD

Corporación Universitaria Lasallista

Facultad de Ciencias Administrativas y Agropecuarias

Medicina Veterinaria

Caldas, Antioquia

2017

Tabla de contenido

Justificación	6
Objetivos.....	8
General.....	8
Específicos	8
Marco Teorico.....	9
Mastitis.....	9
Anatomía y fisiología de la glándula mamaria	10
Aparato suspensorio de la glándula mamaria	10
Parénquima	10
Conductos lactíferos	11
Seno lactífero	11
Vascularización de la glándula mamaria	11
Lactogénesis.....	11
Eyección o expulsión de la leche.....	12
Mecanismos de defensa de la glándula mamaria	12
Inmunidad innata	12
Anatómicos o barreras físicas.....	13
Neutrófilos.....	14
Células epiteliales mamarias	14
Lactoferrina y lactoperoxidasa.....	14
Mecanismos de defensa no celular	15
Inmunoglobulinas.....	15
Etiología.....	15
Epidemiología	16
Factores predisponentes	16
Ambiente y época del año	16
Manejo	17
Propios de la vaca	17

Transmisión.....	18
Diagnóstico	18
Observación y palpación de la ubre	18
Pruebas de la escudilla de ordeño y la prueba del paño negro	19
Pruebas químicas:	19
Californian mastitis test	19
Recuento de células somáticas (RCS).....	20
Cultivo para identificación bacteriana y susceptibilidad antimicrobiana.....	20
Conductividad eléctrica:	21
Papel indicador de mastitis:	21
Prevención.....	21
Tratamiento	22
Tratamiento alternativo	23
L-aminoácido oxidasa de veneno de serpiente	24
Materiales y Metodos	26
Determinación de la muestra	26
Colecta de muestras de leche y realización de pruebas	26
Procedimiento para la recolección de la muestra de leche	27
Aislamiento de los microorganismos causantes de la mastitis	27
Veneno	27
Aislamiento de la proteína	28
Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE	28
Masa total por espectrometría de masas MALDI-TOF	28
Actividad L-aminoácido oxidasa	29
Actividad inhibitoria de los microorganismos causantes de mastitis por LAAOs	29
Difusión en Agar	29
Análisis estadístico	29
Resultados	30
Discusión	33
Conclusiones.....	38
Referencias.....	39

Lista de figuras

Figura 1. Halo inhibición de S. aureus por efecto de LAAO	31
Figura 2. Halo inhibición de Sthapylococcus coagulasa negativo por efecto de LAAO	32
Figura 3. Halo inhibición de E.coli por efecto de LAAO	33
Figura 4. Halo inhibición de Mesófilos por efecto de LAAO.....	34

Resumen

En esta investigación se evaluó el efecto de una L- aminoácidooccidasa (LAAOs) obtenida del veneno de *Bothrops asper* de Colombia, sobre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulasa negativo*, *E. coli* y mesófilos, las anteriores aisladas de vacas positivas a mastitis identificadas mediante la prueba de campo CMT y cultivadas en diferentes agares como: Baid Parker, Agar Sangre (selectivos para gram positivos) y EMB y Mc Conkey (selectivos para gram negativos). En cuanto a la proteína, fue aislada mediante la técnica de cromatografía de baja presión y las fracciones obtenidas fueron recromatografiadas para determinar su actividad enzimática, a su vez se les realizó Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE y se analizó la Masa total por espectrometría de masas MALDI-TOF. La actividad inhibitoria de los microorganismos causantes de mastitis por LAAOs se realizó en difusión agar en la cual se inocularon bacterias que fueron sometidas a un control de crecimiento y un agente antimicrobiano como control positivo, registrándose la presencia o no de halos de inhibición. Los resultados obtenidos mostraron que la fracción rica en LAAOs inhibió el crecimiento de las cepas probadas, mostrando ninguna diferencia con respecto al agente antimicrobiano ($P > 0.05$) y diferencia significativa con respecto al control negativo ($P < 0.0001$). Se concluye así que la LAAOs es una flavonozima con alta capacidad bactericida, la cual puede de gran forma contribuir en términos farmacológicos y medicinales a futuros planes terapéuticos a desarrollarse en animales positivos a mastitis.

Justificación

Dentro del sector agropecuario colombiano, la industria lechera en particular, ha venido creciendo vertiginosamente durante los últimos años, llegando a niveles de autoabastecimiento e incluso con capacidad exportadora. La producción de leche de calidad depende de aspectos de diversa índole, entre los que se encuentran la genética, la alimentación, las buenas prácticas de higiene, buenas prácticas de ordeño, programas de prevención y control de mastitis, entre otras variables que pueden llegar a intervenir para conseguir el objetivo de tener un producto que cumpla con los estándares. La agroindustria láctea no puede ser ajena a las normativas que buscan la calidad de los productos, y por tanto es pertinente la adopción de sistemas y mecanismos que lleven a la obtención de leche con características de óptima calidad. En ese sentido, se deben conseguir no sólo los niveles suficientes de alimentos, sino también que éstos cumplan con las características de calidad e inocuidad que no pongan en riesgo la salud, especialmente en productos de origen animal. La producción primaria de leche se ve enfrentada día a día con problemas de salud animal y particularmente con problemas de mastitis bovina. Esta es la enfermedad más frecuente y costosa de la ganadería lechera a nivel mundial, la cual ocasiona pérdidas productivas y económicas, debido a la disminución de la calidad y producción de la leche, los costos del tratamiento y el desecho temprano del ganado lechero (Rainard, Fromageau, Cunha, & Gilbert, 2008). Esta enfermedad presenta daños localizados o generalizados, y dependiendo de la magnitud de los mismos puede tener manifestaciones clínicas o subclínicas (Kerro Dego, van Dijk, & Nederbragt, 2002). Para el tratamiento de la mastitis, es necesario el uso de fármacos como los antibióticos lo que conlleva el riesgo de contaminación de la leche con residuos

de medicamentos lo que a su vez puede tener implicaciones serias en salud pública e interferir en la producción de lácteos. Los residuos de antibióticos en los alimentos pueden afectar el equilibrio fisiológico de la flora intestinal humana (Cerniglia & Kotarski, 1999; Organización de las Naciones Unidas Para la Alimentación y la Agricultura, 2001; Silley, Simjee, & Schwarz, 2012), inducir el desarrollo de resistencias por parte de ciertas cepas bacterianas animales y/o humanas (Schrezenmeir & de Vrese, 2001) y pueden desencadenar reacciones alérgicas (Fuller, 1992).

Ante esta problemática, se hace necesario encontrar alternativas de tratamiento para el control y manejo de la mastitis en los hatos que no presenten los problemas que poseen los antibióticos tradicionales.

En las últimas décadas se viene considerando que los venenos de animales son fuentes ricas en compuestos bioactivos, potencialmente útiles. Se ha encontrado en venenos de serpientes un gran número de proteínas con actividades sobre receptores específicos; tal especificidad convierte las toxinas en fuentes potenciales de diseño de nuevas moléculas con actividad farmacológica; además, el descubrimiento de algunas proteínas que da origen a patentes suministra a los investigadores de campos como la biomedicina y la farmacia una herramienta indispensable para la innovación y la aplicación de dichas proteínas como alternativas terapéuticas (Pereañez, 2014).

Por todo esto, la pregunta que se quiere responder es: “¿Puede una L-aminoácido oxidasa proveniente del veneno de serpiente, inhibir las bacterias causantes de mastitis bovina, como una alternativa de solución a la problemática presentada con los antimicrobianos tradicionales?”

Objetivos

General

Determinar el efecto de una L-aminoácido oxidasa (LAAO) obtenida del veneno de *Bothrops asper* de Colombia sobre bacterias causantes de mastitis bovina.

Específicos

1. Aislar y caracterizar los microorganismos patógenos causantes de mastitis más prevalentes en hatos lecheros
2. Aislar y caracterizar una LAAO del veneno de *B. asper* de Colombia
3. Evaluar el efecto de la LAAO sobre los microorganismos patógenos causantes de mastitis más prevalentes en hatos lecheros

Marco Teórico

Mastitis

La mastitis es definida como la inflamación de la glándula mamaria por causas asociadas a patógenos (Bedolla, 2007). Ramirez, (2013) la define no solo como una inflamación de tipo infecciosa sino también traumática o tóxica. Ahondar en la enfermedad de la mastitis es importante ya que esta es una de las que más afecta a la industria láctea a nivel mundial, representando pérdidas económicas de por lo menos 35 mil millones de pesos anualmente (Aguirre Bedoya & Montes Montoya, 2016). Aunque no solo tiene estas implicaciones económicas ya que se considera hoy en día como un problema de salud pública por tener capacidad de afectar la salud humana. (Ballón Santivañez *et al.*, 2013; Kruze, 1998; E. J. Ramírez, Muñoz, Herrera, & Vergara, 2009; Ramírez Vásquez *et al.*, 2011).

La signología de la enfermedad varía según la manifestación clínica y la interacción patógeno – respuesta inmune del hospedero (Ramirez, 2013). Esta inflamación puede presentar dos formas, que podrían variar en cuanto a su signología, diagnóstico e intensidad del tratamiento. El conocer los signos clínicos físicos de forma subclínica resulta complicado, ya que esta no manifiesta inflamación a nivel físico de la ubre, haciendo de este un problema a la hora de la detección por inspección y palpación tanto de la ubre como de la leche permitiendo que el cuadro pase inadvertido (Ballón Santivañez *et al.*, 2013), pero en estos animales encontraremos una disminución en la producción y calidad de la leche reflejadas en un aumento en el conteo celular por aumento de componentes inflamatorios y bajas concentraciones en los componentes lácteos. (Ramírez Vásquez *et al.*, 2011., Smith, 2010). Para evitar que esto suceda y

poder así emitir un diagnóstico, se han venido empleando diferentes pruebas de campo, entre ellas el *Californian Mastitis Test* y el conteo de células somáticas (Ramirez, 2013). Por el contrario, a un aumento del tamaño, dolor, rubor y aumento de la temperatura a nivel de la ubre podríamos sospechar de una mastitis de tipo clínica (Ramírez Vásquez *et al.*, 2011). Aguirre Bedoya & Montes Montoya, (2016) complementan con manifestaciones sistémica como episodios febriles, disminución en el consumo de alimento, letargo, taquipnea, diarrea y animales en posición decúbito la signología local.

Anatomía y fisiología de la glándula mamaria

Para comprender bien el proceso fisiopatológico de la enfermedad debemos tener claro la anatomía y fisiología de la glándula mamaria.

Las glándulas mamarias, son clasificadas como glándulas sudoríparas exocrinas modificadas, con estructura tuboalveolar (Hernández & Bedolla, 2008), cuya función es la formación de leche para la nutrición del neonato (Koning, 2008). Sus componentes anatómicos son:

Aparato suspensorio de la glándula mamaria

Este se encarga de fijar la glándula en la zona ventral del animal a la pared torácica y abdominal (Hernández & Bedolla, 2008).

Parénquima

Compuesta por alveolos glandulares los cuales producen y excretan leche. La composición de varios alveolos que son dependientes del sistema circulatorio ya que para la formación de un litro de leche deben circular entre 300 y 500 litros de sangre por la glándula (Koning, 2008). además de allí obtienen los elementos mayoritarios de la

composición láctea que se unen a otros componentes proteicos dando forma a la leche (Hernández & Bedolla, 2008).

Conductos lactíferos

Los cuales drenan en los senos de las cisternas. Estos conductos tienen la capacidad de almacenar la leche que llega de los alveolos por los conductos de los lobulillos de la glándula mamaria. (Hernández & Bedolla, 2008; Koning, 2008)

Seno lactífero

También conocida como la cisterna de la glándula. Es un sistema colector, con una capacidad de almacenamiento de aproximadamente 100-400 ml. en momentos de presión se da su apertura y permite la salida de la leche.(Hernández & Bedolla, 2008; Koning, 2008)

Vascularización de la glándula mamaria

De forma general, la glándula mamaria esta irrigada por la arteria pudenda externa de donde surgen las arterias mamarias craneales y caudales. de forma complementaria la glándula mamaria va a tener una irrigación dada por la pudenda interna (Hernández & Bedolla, 2008; Koning, 2008; Ramirez, 2013).

Lactogénesis

Proceso fisiológico mediado por la prolactina. En acciones de manipulación de la ubre como el ordeño o la succión, se estimulan los barorreceptores que envían la señal al hipotálamo bloqueando la síntesis de dopamina, inhibidor directo de la prolactina. A su vez en el *núcleo paraventricular* se producen *péptido intestinal vasoactivo* que estimula la liberación de prolactina (Cunningham & G., 2014; Gómez-Quispe *et al*, 2015; Ramirez, 2013).

Eyección o expulsión de la leche

Es un mecanismo neurohormonal, activado por los barorreceptores localizados a nivel de la dermis del pezón, estímulos auditivos, visuales y olfativos que en respuesta va a ocurrir una liberación de oxitosina al torrente sanguíneo. La unión de estas moléculas de oxitosina a sus receptores va a generar una contracción de los alveolos y células mioepiteliales del pezón y van a generar una expulsión de la leche al conducto del pezón (Cunningham, 2009; Smith, 2010).

Mecanismos de defensa de la glándula mamaria

Para entender los mecanismo de defensa, se debe tener en cuenta que igual que el organismo, la glándula mamaria posee también unos mecanismos de defensas celulares, moleculares y anatómicos los cuales van a permitir ya sea: la expulsión del microorganismo o la “muerte del animal” (Welter *et al.*, 2002). La inmunidad innata es la primera línea de defensa en estadios tempranos de la enfermedad, dentro de estos mecanismos se encuentran las barreras físicas o anatómicas, factores solubles como la lactoferrina y el componente celular (Pereyra, Dallard, & Calvino, 2014).

Inmunidad innata

La glándula mamaria está protegida por varios mecanismos los cuales según Hernández & Bedolla (2008), pueden ser clasificados como inmunidad innata o inespecífica. Donde la respuesta innata predomina en las etapas tempranas de una infección y es mediada por la barrera física, macrófagos, neutrófilos, células de NK o *natural killers* y por algunos factores solubles.

Anatómicos o barreras físicas

Los mecanismos de defensa anatómicos son todas aquellas barreras externas e internas que van a impedir la colonización de agentes exógenos al parénquima del pezón y por consiguiente la iniciación de un cuadro infeccioso. Entre las barreras físicas o anatómicas se debe tener en cuenta la piel del pezón, que debe ser sana, con buena flexibilidad y suavidad ya que el estrato corneo actúa como una barrera que evita la penetración de agua. Factores como alteraciones dérmicas en cuanto a pH, humedad, entre otros favorece la colonización por patógenos (Gómez-Quispe, Elisban; Santivañez-Ballón, Stefani, Arauco-Villar, Fernando, Espezua-Flores, Oscar; Manrique-Meza, 2015; Meglia & Mata, 2002).

El conducto del pezón junto con el músculo liso del mismo, son otro mecanismo de defensa anatómico. La disposición anatómica del conducto del pezón de forma tortuosa, la longitud y el diámetro, dificulta la infección ya que como expone (Meglia & Mata, 2002) a mayor diámetro, mayor prevalencia de enfermedades.

Otro mecanismo es la formación del tapón de queratina, el cual es sintetizado por las células epiteliales y cuya función es la de atrapar los microorganismos y posteriormente, durante el proceso del ordeño expulsarlos. Además de esto, se han descrito cualidades bactericidas y bacteriostáticas como lo expone (Smith, 2010).

Si el agente patógeno es reconocido por los macrófagos en el interior del pezón, se va a dar un proceso de quimiotaxis que consiste en reclutar neutrófilos que fagocitan y posterior a su fagocitosis van morir. Este mecanismo esta mediado por tres tipos de células diferentes en las cuales se distinguen:

Neutrófilos

Su respuesta se basa en cuatro funciones: el reclutamiento de neutrófilos, la fagocitosis del neutrófilo, los sistemas antimicrobianos del neutrófilo y la apoptosis del neutrófilo. Los Macrófagos y linfocitos constituyen la mayor parte de las células en los cuartos sanos. Los macrófagos ingieren y matan los microorganismos, son esenciales en las infecciones de tipo crónico y presentan antígeno a los linfocitos T que liberan citoquinas para activar los linfocitos B que reconocen producen anticuerpos y secretar inmunoglobulinas. Por el contrario las células T destruyen los patógenos a través del contacto directo. (Hernández & Bedolla, 2008; Ramirez, 2013; Smith, 2010)

Células epiteliales mamarias

Como menciona Pereyra *et al.*, (2014) la reacción de las células epiteliales se da en las primeras 24 -30 horas post infección y liberan citoquinas proinflamatorias, quimioquinas y proteínas de fase aguda lo cual se destaca en el inicio y desarrollo del proceso inflamatorio.

Lactoferrina y lactoperoxidasa

Son mecanismos de defensa no celular de tipo soluble en el cual la lactoferrina es una glucoproteína fijadora de hierro sintetizada por las células epiteliales y fagocíticas. Su mecanismo de acción incrementa la capacidad fagocítica de los neutrófilos y hace que el crecimiento de las bacterias dependientes del hierro sea inhibido (Smith, 2010). Por el contrario, la lactoperoxidasa es una proteína con capacidad antimicrobiana que desempeña una función menos importante en cuanto a la defensa de la glándula.

Mecanismos de defensa no celular

Inmunoglobulinas

En la leche, las concentraciones de inmunoglobulinas son bajas, pero en procesos infecciosos se puede dar un incremento por una síntesis local. Entre estas inmunoglobulinas se destacan las opsonizadoras, las cuales son facilitadoras de los neutrófilos para una fagocitosis eficiente y las no opsonizadoras que se encargan de neutralizar tanto las toxinas como las bacterias y evitan a su vez la adherencia de bacterias a las células epiteliales (Smith, 2010).

Etiología

La etiología de la mastitis tanto clínica como subclínica varía según la región o el país. Debido a esto es importante identificar los agentes circulantes antes de implementar cualquier plan de tratamiento (Ruiz *et al.*, 2011).

Existen un número de bacterias gram positivas las cuales resultan siendo útiles, sin embargo, otras como las saprofíticas y patógenas son contaminantes, a estas pertenecen: *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Propionibacterium*, *Bacillus* y *Clostridium*. Otro tipo de bacterias, que alteran tanto composicional como físicamente la leche y afectan negativamente en la salud son las bacterias Gram negativas compuestas por: *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes* y *Acinetobacter*. Y las bacterias coliformes, las cuales incluyen los géneros: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Klebsiella* (Ramírez *et al.*, 2001)

Epidemiología

Para poder encaminar un método diagnóstico e instaurar un plan tratamiento, es importante el conocer la epidemiología de la misma. En un estudio llevado a cabo en la Sabana de Bogotá, se logró determinar que las vacas que son sometidas a un ordeño manual presentan menor incidencia de mastitis en comparación a aquellas que son llevadas a un ordeño mecánico. A su vez, lograron determinar en el mismo estudio que los animales que son trabajados en un ordeño mecánico presentan una mayor incidencia de mastitis clínica en sus cuartos afectados (Trujillo y Gallego, 2010).

En otro estudio realizado en Antioquia por Ramírez Vásquez *et al.*, (2011) detectaron con la CMT un 20% de cuartos positivos a mastitis, la mastitis subclínica tuvo una prevalencia de 39,5% por vaca y la de mastitis clínica fue de 1,7%. Realizando 648 cultivos de muestras de leche de las cuales 23,9% fueron negativas y 34% positivas a *Streptococcus agalactiae* y 10,2% a *Estaphylococcus coagulasa negativo*.

Factores predisponentes

esta enfermedad es multifactorial ya que el riesgo de infección depende tanto de la vaca y su manejo, como del ambiente y el patógeno (Corbellini, 2002).

Ambiente y época del año

Corresponde al lugar donde habitan los animales. Se debe evitar que éste sea húmedo, con altas cargas de material orgánico y fecal, ya que esto se convierte en un nicho para los “patógenos ambientales” los cuales colonizan el pezón de la vaca en momentos como el ordeño y el proceso de transición del individuo (Corbellini, 2002).

De acuerdo con Nani (2016) la época o estación del año no influye en cuanto a la frecuencia de diagnóstico de mastitis.

Manejo

Disminuir el estrés del animal involucra unas medidas higiénicas y de manejo durante la permanencia del animal en la explotación. El garantizar buenas pasturas y la aplicación de buenas prácticas ganaderas, disminuye el estrés el cual influye negativamente en los mecanismos de defensa del animal. (Kruze, 1998).

Propios de la vaca

Se debe tener en cuenta la forma de la ubre, lo ideal es buscar que la ubre sea proporcionalmente grande ya que en base a esto será la producción, con un sistema ligamentoso bien estructurado para evitar traumatismos. Como explica en su investigación Riera-Nieves *et al.*, (2006) la ubicación y forma de los pezones, la forma de la punta del pezón y el largo del pezón son características anatómicas que influyen en la predisposición de la mastitis.

En bovinos, se ha determinado la asociación de algunos genes que confieren resistencia o susceptibilidad a mastitis. Los genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad bovino (BoLA) son genes que se encuentran en el cromosoma 23, estos tienen varios marcadores moleculares asociados a mastitis, uno de estos es el DRB3 el cual se expresa en células como Macrófagos, células dendríticas y linfocitos B, quienes presentan antígenos a los linfocitos T ayudadores, para así desencadenar respuesta contra los patógenos. Estos genes han sido altamente evaluados entre ellos el DRB3.2, el cual se asocia con la presentación de mastitis. Otros genes como los receptores tipo toll-4 (TLR-4) que detectan la estructura del lipopolisacárido de bacterias

Gram negativas (E. J. Ramírez *et al.*, 2009; Ramirez, 2013; Zamorano, Echeverri, & Herrera lopez, 2008).

Transmisión

Mediante las manos del ordeñador, pezoneras, agua, trapos o utensilios de limpieza de ubres o un mal aseo de las ubres. Los anteriores son conocidos como método de transmisión de mastitis especialmente por *Estrpotococcus* y *Estaphilococcus* (Ramírez, *et al.*, 2001).

Diagnóstico

Basados en la exploración clínica rutinaria, algunos animales positivos a mastitis pueden pasar inadvertidos (Gómez-Quispe *et al.*, 2015). Para evitar esto se han empleado pruebas de laboratorio y de campo las cuales pueden facilitar el diagnóstico de las positivas o sospechosas, entre las cuales se conocen: observación y palpación de la ubre, prueba de la escudilla y prueba del paño negro, y las pruebas químicas como: *California Mastitis Test*, Método de conductividad eléctrica y conteo de células somáticas en leche de cuarto y vaca (Bedolla, 2007; Gómez-Quispe *et al.*, 2015; Ramirez, 2013).

Observación y palpación de la ubre

El proceso de inflamación originada en la mastitis genera aumento de la temperatura, enrojecimiento de la zona y dolor. Lo cual genera una activación del sistema inmune. (Bedolla, 2007).

Pruebas de la escudilla de ordeño y la prueba del paño negro

son pruebas físicas inútiles a la hora de realizar un diagnóstico de mastitis subclínica, solo son útiles en aquellos procesos avanzados en los cuales se pudiera observar coágulos en las muestras (Bedolla, 2007).

Pruebas químicas

Californian mastitis test

La prueba de campo CMT es un método diagnóstico útil, práctico y económico en el cual se emplea un reactivo conocido como lauril sulfato de sodio al 3%, que se une al material genético ADN de los leucocitos y estos a su vez con material proteico de la leche los cuales forman las estructuras fibrosas en la leche. (Bedolla, 2007; Carlos M trujillo, Andres F Gallego, 2010; Gómez-Quispe *et al*, 2015; Ramirez, 2013).

Los resultados que se obtienen de esta prueba varían según el promedio de células somáticas en cada clase, para lo cual está estipulado que:

Negativo: <200.000 células/ml

Sospechoso: 150.000 – 500.000 células/ml

1(+): 400.000 -150.000

2(++): 800.000- 5.000.000

3(+++): > 5.000.000.

Fuente: (Ramirez, 2013)

Recuento de células somáticas (RCS)

Es un método diagnóstico llevado a cabo en laboratorios y en campo, que consiste en la medición de las células somáticas, ya sean de tipo sanguíneo o epiteliales presentes en la leche, las cuales sirven como indicador de los problemas dados por la inflamación ya sea de origen infecciosa o traumática. Estas células están presente en las ubres sanas en una concentración en leche que varía entre 100.000 y 200.000SC/ ml con una proporción del 1 a 11% de neutrófilos en una ubre sana lo que en procesos inflamatorios puede incrementarse hasta un 90% (Ramírez, 2013)..

Esta es una prueba de alta utilidad para realizar diagnóstico de mastitis subclínica, aunque para Nicolás Ramírez *et al.* (2001) esta prueba presenta alta variabilidad, ya que el número de células somáticas varía según la edad, raza, hora de toma de la muestra y periodo final de la lactancia.

Cultivo para identificación bacteriana y susceptibilidad antimicrobiana.

Este método diagnóstico permite identificar de forma detallada el patógeno, ya que por medio de estudios de colonia y coloraciones de gram se evalúan morfológicamente las bacterias en gram positivos y gram negativos. A su vez, permite ahondar más en la clasificación conociendo género y especie por medio de pruebas de coagulasa y catalasa. Esta prueba se realiza cultivando las muestras obtenidas en la leche en agares sangre, *mac Conkey*, *Ogy*, entre otros. (Rangel, Rodríguez, Bernate & Velilla, 2011; Sánchez Bonilla & Gutiérrez Murillo, 2015). A su vez a estos cultivos se les puede realizar una prueba de sensibilidad a antibióticos. (Cunningham, 2014; Rangel *et al.*, 2011)

Conductividad eléctrica:

Esta prueba mide la capacidad de conducción de corrientes eléctricas entre dos electrodos que son representadas en milisiemens (mS). Para detectar la mastitis se detectan los cambios iónicos que ocurren durante la inflamación, ya que el flujo de sodio y cloro aumentan en procesos inflamatorios y aumenta el componente electrolítico de la leche. Se debe tener en cuenta que la edad y el estado de lactación siendo factores que afectan la conductividad eléctrica lo que nos puede arrojar resultados falsos positivos o falsos negativos. Lo anterior lo convierte en un método no muy confiable en comparación a algunos métodos convencionales. (Bedolla, 2007; Ramirez, 2013).

Papel indicador de mastitis

Para esta prueba se emplea una tirilla similar a la empleada para la medición de pH, la cual se impregna por una gota de leche y se obtiene una coloración. La lectura de esta se realiza observando el color arrojado. Si este corresponde a un pH superior o igual a 7 se considera un animal sospechoso a mastitis (Bedolla, 2007).

Prevención

La capacidad de producción, el recuento de células somáticas y la predisposición a mastitis están relacionadas íntimamente con la morfología del pezón. Es por esto que el tamaño, la morfología del pezón deben ser evaluados para determinar la capacidad de resistencia individual al desarrollo de mastitis (Riera-Nieves *et al.*, 2006).

Como expone Kruze (1998), un programa de prevención y control de mastitis, para que sea aceptable, económico y factible debe ser aplicado bajo diferentes condiciones

de manejo. A lo que Calderón Rangel *et al.* (2008) proponen la implementación de una buena rutina de ordeño que consiste en: formación de grupos de ordeños adecuados con un orden: comenzando por las recién paridas y finalizando con vacas enfermas o sometidas a antibioticoterapias, peluqueado de la ubre, adecuado despunte, separación de animales enfermos a mastitis, lavado o presellado y secado de los pezones.

Tratamiento

Para Ruiz (2011) la implementación de un programa de control y prevención de la mastitis debe ser con base en las características de los microorganismos para así tener un programa más eficiente. A su vez San Martín *et al.*, (2002) dice que para seleccionar adecuadamente un antibiótico, se debe conocer no solamente el agente etiológico sino también su sensibilidad a los antibióticos, mencionando los siguientes como los fármacos más usados en la mastitis clínica: Betalactámicos, cefalosporinas, tetraciclinas, macrólidos, aminoglucósidos y sulfonamidas.

Para realizar un tratamiento más efectivo, es importante conocer el periodo de tiempo por el cual se va manejar la antibioticoterapia y el peso del animal para realizar una correcta dosificación.

Con relación a los *Streptococcus coagulasa* negativos, estos tienen un grupo con una gran variedad de especies y subespecies, lo que dificulta su diagnóstico y tratamiento. El *National Mastitis Council* clasificó a las anteriores en dos grupos conocidos como ECN *novobiocino* sensibles (*v.g. S. epidermidis*) y en ECN *novobiocino* resistente (*v.g. S. sciuri*). Estos últimos no se les deben instaurar un plan de tratamiento ya que su curso clínico suele desaparecer de forma espontánea.

Tratamiento alternativo

El mundo anda en búsqueda de principios activos los cuales actúen para los principales agentes causales de enfermedades. Debido a la multirresistencia de los microorganismos por uso indiscriminado de los antibióticos, hoy en día el hombre ha investigado productos naturales, los cuales pueden ser tan eficientes como los de síntesis química. Uno de estos es el aceite de *origanum vulgare* (orégano), que es una planta perenne de la familia *Lamiaceae*. De esta planta se conocen sus propiedades bactericidas e insecticidas, y por tener un efecto mayor a algunos productos químicos utilizados en el campo. además determinaron que el aceite extraído de la planta, resulta muy eficaz en cuanto al tratamiento para mastitis por *Escherichia coli* (Oyarzabal Bastos *et al.*, 2011).

En otro estudio realizado Nascimento *et al.*, (2007) analizaron la capacidad bactericida del aceite de *Origanun aplii* y *Origanun vulgare* y lograron identificar actividad en contra de bacterias como *Salmonella cholerasuis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Streptococcus faecium*, con lo cual demostraron de forma in vitro que el aceite de *Origanun vulgare* tiene actividad contra bacterias gram positivas y gram negativas.

Voigt Mota *et al.* (2013) estudió El Jambolán, *syzygium cumini*, que es una planta de la familia de las mirtáceas, familia a la que pertenecen la guayaba (*psidium guajava*) y cereza (*Eugenia uniflora*) que son utilizadas por la medicina tradicional, para el tratamiento de la diabetes. Al Jambolán se le ha atribuido cualidades antivirales, antiinflamatorias, antibacterianas y antialérgicas. Su extracto fue utilizado en cepas

bacterianas de *Staphylococcus coagulasa positivo*, *Staphylococcus coagulasa negativo*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus uberis*, y las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. En cuanto a los resultados obtenidos definieron que las bacterias gram positivas fueron más sensibles que las bacterias gram negativas. resultado también obtenido en el estudio realizado por Loguercio *et al.* (2005).

En otro estudio, se evaluó la actividad antibacteriana de los aceites esenciales y de extractos hidroalcohólicos de las plantas, *Tagetes minuta* L. *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf y del género *Elionurus* Humb. & Bonpl. ex Willd conocidas coloquialmente como (chinchillo, hierba-cidro y limoncillo) contra los patógenos como *Staphylococcus coagulasa positivo*, *Staphylococcus coagulasa negativo*, *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. los resultados obtenidos muestran que los aceites esenciales son más efectivos que los extractos hidroalcohólicos ya que presentan actividad en todos los patógenos sometidos siendo mayor en bacterias Gram positivas que en Gram negativas (Lambrecht Gonçalves *et al.*, 2013).

L-aminoácidooxidasa de veneno de serpiente

La medicina no solo ha tratado de realizar fármacos a través de productos bioactivos a través de las plantas y sus derivados. Se han realizado investigaciones de las cuales se han aislado proteínas enzimáticas y no enzimáticas de venenos de serpientes. Dentro de las enzimáticas Kang *et al.*, 2011 describe la acetilcolinesterasa, L- aminoácidooxidasa, metaloproteinasa y fosfolipasa A2. la L aminoácido oxidasa es una flavoenzima que podemos encontrar en mayor cantidad ya que es un componente

abundante en el veneno de serpientes (Du & Clemetson, 2002) como las *Crotalidae*, *Viperidae* y *Elapidae*. Esta es la encargada de darle la coloración amarilla al veneno a su vez que contribuye con la capacidad de toxicidad atribuida a la formación de peróxido de hidrogeno durante el proceso de oxidación (Rodrigues *et al.*, 2009), a su vez que inhibe la agregación plaquetaria, también tiene función antibacteriana y antiprotozoarica por efectos del H_2O_2 (peróxido de hidrogeno) localizados en la membrana, generando una actividad apoptosis celular. Que Solís & Escobar (1999) complementan con la capacidad de catalizar la desaminación oxidativa de los L – aminoácidos que producen cetoácido, amoniaco y peróxido de hidrógeno. Y que (Vargas-muñoz, Estrada-gómez, & Vásquez-escobar, 2015) tienen actividad para bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Sin embargo, otros estudios han determinado que las LAAOs de bacterias, hongos y algunas especies de plantas, utilizan esta flavoenzima como fuente de nitrógeno (Du & Clemetson, 2002).

Materiales y Métodos

Determinación de la muestra

Se muestrearon diez vacas de diferentes hatos, ubicados en los municipios de San Pedro y Santa Elena. Las vacas debieron ser positivas a mastitis subclínica, de cualquier edad, en etapa productiva y de cualquier raza lechera. El tamaño de muestra fue calculado a conveniencia debido a que el objetivo es determinar el posible efecto de la LAAO sobre cada cepa bacteriana aislada.

Colecta de muestras de leche y realización de pruebas

A todas las vacas incluidas en el estudio se les realizó la prueba CMT según la metodología descrita por Blowey y Edmonson (1995). El resultado se interpretó como negativo (-) cuando no hubo formación visible de gel, sospechoso (S o T) cuando en el fondo de la paleta se formó una película, débilmente positiva (+) cuando en el fondo de la paleta se formaron grumos que desaparecieron rápidamente, positiva (++) cuando hubo presencia de grumos reforzantes, y muy positiva (+++) cuando se formó un gel que no desaparezca al dejar de girar la paleta (Ramirez, 2013).

A las muestras con un resultado al CMT mayor o igual a trazas se les realizó un recuento de células somáticas (RCS) por medio del contador de células somáticas, Ekomilk®. A las muestras con un RCS superior a 200.000 cel/mL se les realizó cultivo en el laboratorio de Microbiología de la Corporación Universitaria Lasallista.

Procedimiento para la recolección de la muestra de leche

El personal encargado se lavó y desinfectó las manos antes del muestreo. Los primeros chorros (aproximadamente 10 ml) se ordeñaron en una copa y se verificó la presencia de cambios en la apariencia de la leche. Si la ubre y el pezón estaban sucios se procedió a lavarlos con agua y a secar cada cuarto con una toalla de papel individual. Para la toma de la muestra de leche se procedió de la siguiente manera: desinfección con alcohol etílico al 70% a la tercera parte distal de cada pezón, en sentido del ápice a la base, usando un copo de algodón por cuarto. Secado del exceso de desinfectante con un algodón limpio para evitar el goteo de este dentro del recipiente usado para coleccionar la muestra. De cada cuarto se extrajeron 5 ml de leche que se depositaron en un recipiente, que se sujetó casi horizontalmente para evitar la entrada de contaminantes (Honkanen-Buzalski, 1995).

Aislamiento de los microorganismos causantes de la mastitis

Se aisló de la leche de los cuartos afectados por los microorganismos causantes del proceso infeccioso. Para esto se inocularon en medios como Baid Parker, Agar Sangre (selectivos para gram positivos), EMB y Mc Conkey (selectivos para gram negativos); una vez inoculados se incubaron a 37°C durante 24 horas y se evaluaron por técnicas morfológicas y bioquímicas los tipos de microorganismos encontrados.

Veneno

Se utilizó veneno crudo de *B. asper*, el cual fue obtenido por ordeño manual de varios ejemplares del Magdalena Medio Antioqueño, mantenidos en cautiverio en el serpentario de la Universidad de Antioquia. Este veneno fue centrifugado, liofilizado y congelado a -70°C hasta su uso.

Aislamiento de la proteína

Se realizó un aislamiento biodirigido, en el cual 75mg de veneno en 1.5mL de buffer acetato de Sodio (0.1 M, pH6.0) centrifugado a 4.000 rpm x 15 min, fue inyectado en una columna Sephadex G-100 (1,2 x 50 cm) equilibrada con el mismo buffer, empleando un flujo de 7mL/h. Se colectarán las fracciones automáticamente (2mL/fracción).

Las fracciones que presentaron actividad L-aminoácido oxidasa serán dializadas durante 24h en agua destilada y re-cromatografiadas en un HPLC Shimadzu® Prominence, empleando una columna BioSep (SEC-s2000; 5 µm; 145 Å, 300 x 7.8), a un flujo de 0.750mL/min en Buffer Phosphato (PBS; 0.12M NaCl, 40mM Phosphato de sodio, pH7.2). Las fracciones con actividad enzimática fueron dializadas como se describió previamente y refrigeradas hasta su uso (Lazo, Málaga, Yarlequé, & Severino, 2007).

Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE

30ug de LAAO fueron separados en geles de poliacrilamida al 12%, en condiciones nativas y desnaturalizantes (β -mercaptoetanol), en cámara mini protean (Biorad)®, por 100 minutos a 120V. Las proteínas se detectaron con Coomassie Blue-R-250 (Sigma)® (Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970. 227,680–685).

Masa total por espectrometría de masas MALDI-TOF

0.5 µL de LAAO mezclados con 0.5 µL de ácido hidroxicinámico o ácido sinapínico en 50% de acetonitrilo, 0.1% TFA, fueron colocados sobre la placa OptiTof-384 para el análisis MALDI-TOF MS. Los espectros fueron adquiridos en un instrumento 4800-Plus

(Applied Biosystems)®, en modo lineal positivo, usando 500 disparos/espectro y una intensidad de láser de 4.200, detectando M/Z 20.000 a 120.000. Se usaron calibradores externos CalMix-5 (ABSciex)® colocados en el mismo plato.

Actividad L-aminoácido oxidasa

La actividad L-aminoácido oxidasa fue determinada por adición de dosis variables de fracción LAAO (en 10µL de agua) a 90 µL de buffer que contiene 250 µM de L-Leucina, 2 mM de o-fenilendiamina, y 0.8 U/ml de Peroxidasa, en 50 mM Tris, pH 7.5 por triplicado en pozos de microplatos. Se incubó por 60 min a 37 °C. La reacción fue detenida por adición de 50 µL de H₂SO₄ 2M y la absorbancia será registrada a 492nm.

Actividad inhibitoria de los microorganismos causantes de mastitis por LAAOs

Difusión en Agar

En cajas de Petri con 20 mL de medio de cultivo se inocularon 100 µL de la suspensión microbiana (0.5 en la escala de Mcfarland) cubriendo la superficie de la placa; pasados 15 minutos se colocaron 5 µL de fracción LAAO, 5µL de cloranfenicol (como agente antimicrobiano) y 5 µL de solución salina (control de crecimiento) en las placas de agar. Se incubó por 24 horas a 35° C, registrándose la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano al medir los halos de inhibición de crecimiento.

Análisis estadístico

El procesamiento de la información recolectada por los investigadores, se llevó a una base de datos en Excel, que se analizó con el programa GraphPad Prism versión 5.01 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California, EUA).

Se analizaron de manera independiente las variables del estudio y de ellas se obtuvieron medidas de tendencia central (media y mediana), de dispersión (desviación estándar y rango intercuartil) y de posición (percentiles 25 y 75); para determinar la medida de tendencia central a analizar se utilizará prueba de normalidad D'Agostino & Pearson e histogramas.

Se compararon las medias de cada variable entre tratamientos (LAAO y controles) por medio de análisis de varianza (ANOVA de una vía, y prueba de Kruskal-Wallis). Se asumió significancia estadística de $P < 0,05$.

Resultados

En el procesamiento de las muestras de leche tomadas en el Norte de Antioquia se evidenciaron presencia de microorganismos en el 100% de las mismas y la caracterización microbiológica correspondió a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulasa negativo*, *Escherichia coli* y una amplia población de bacterias mesófilas.

En el proceso de aislamiento y caracterización de la LAAO se logró separar el veneno completo en X picos o fracciones, como se muestra en el cromatograma las cuales fueron sometidas a análisis posteriores para corroborar la pureza y características importantes como el peso molecular. Entre estas pruebas están la electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE, así como un cromatograma adicional con un gradiente de pureza. Estas pruebas demuestran que existe una fracción rica en LAAO, basándose en las pruebas de oxidación de aminoácidos.

Una vez obtenida esta fracción se llevaron a cabo los experimentos de inhibición de la fracción rica en LAAO frente a cada una de las cepas. Para *S. aureus*, el halo tuvo una media de 20,5 mm frente a 21,83 del control positivo (cloranfenicol) y de 0mm del control negativo (solución salina). El anova arrojó ninguna diferencia estadísticamente significativa entre LAAO y el cloranfenicol $p>0,05$ y estadísticamente significativa tanto entre LAAO y la solución salina, como entre el cloranfenicol y la solución salina $p<0,0001$ (Figura 1).

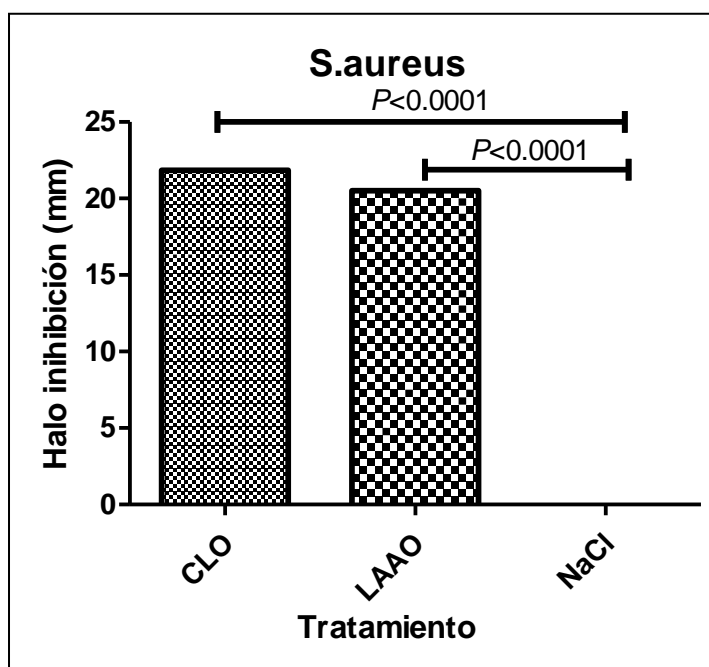


Figura 1. Halo inhibición de *S. aureus* por efecto de LAAO

Para *Staphylococcus coagulasa negativo*, el halo tuvo una media de 24,8 mm frente a 29,5 del control positivo (cloranfenicol) y de 0 mm del control negativo (solución salina). El anova arrojó ninguna diferencia estadísticamente significativa entre LAAO y

el cloranfenicol $p>0,05$ y estadísticamente significativa tanto entre LAAO y la solución salina, como entre el cloranfenicol y la solución salina $p<0,0001$ (Figura 2).

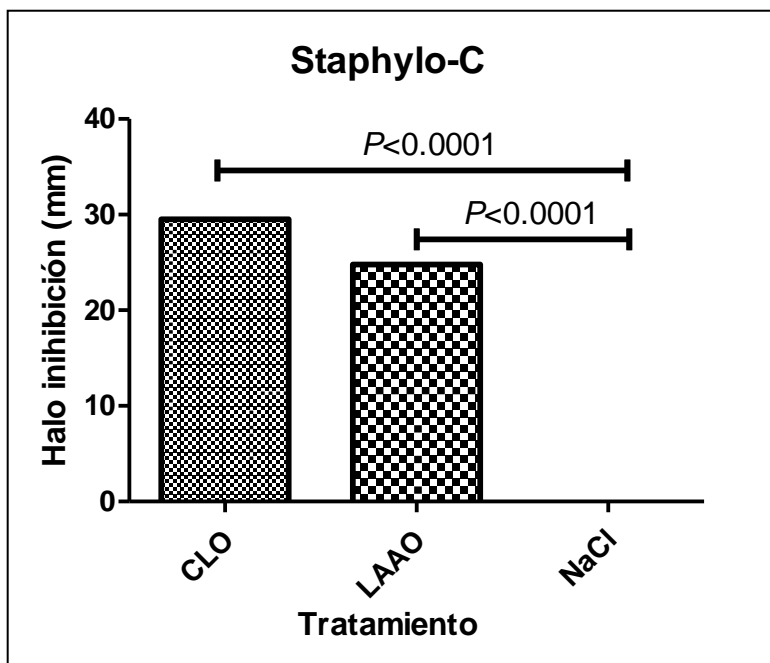


Figura 2. Halo inhibición de *Staphylococcus coagulasa negativo* por efecto de LAAO

Para *E. coli*, el halo tuvo una media de 21,83 mm frente a 28,63 del control positivo (cloranfenicol) y de 0 mm del control negativo (solución salina). El anova arrojó ninguna diferencia estadísticamente significativa entre LAAO y el cloranfenicol $p>0,05$ y estadísticamente significativa tanto entre LAAO y la solución salina, como entre el cloranfenicol y la solución salina $p<0,0001$ (Figura 3).

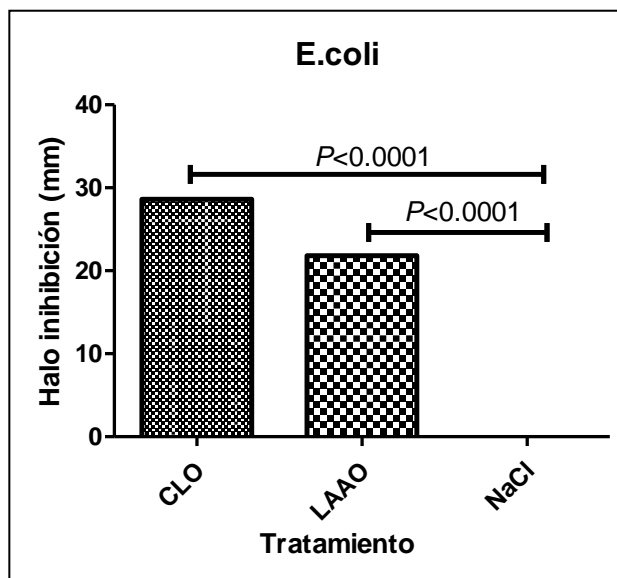


Figura 3. Halo inhibición de *E.coli* por efecto de LAAO

Para *Mesofilos*, el halo tuvo una media de 17 mm frente a 30 del control positivo (cloranfenicol) y de 0 mm del control negativo (solución salina). El anova arrojó ninguna diferencia estadísticamente significativa entre LAAO y el cloranfenicol $p > 0,05$ y estadísticamente significativa tanto entre LAAO y la solución salina, como entre el cloranfenicol y la solución salina $p < 0,0001$ (Figura 4).

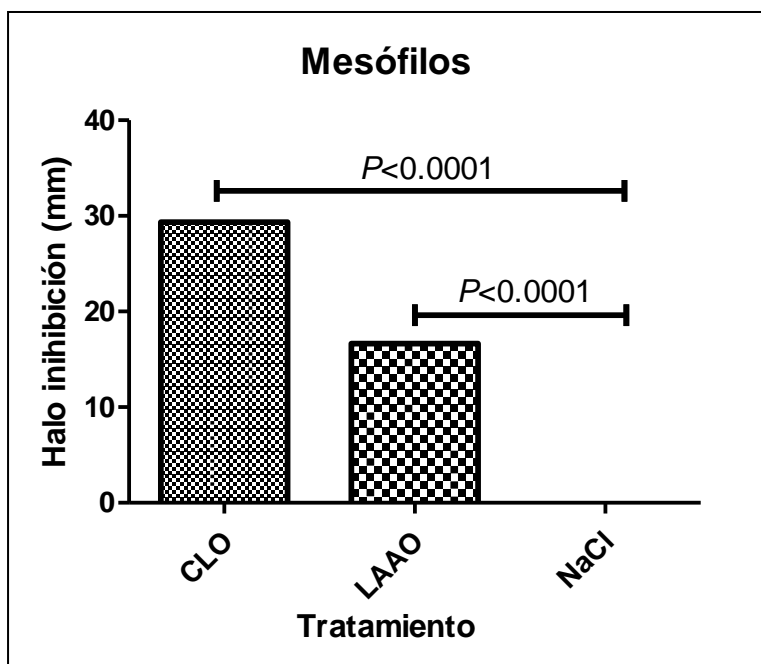


Figura 4. Halo inhibición de *Mesófilos* por efecto de LAAO

Discusión

Como se ha venido reportando en la literatura, los venenos de serpientes son un complejo proteico con actividad enzimática y no enzimática. En este caso es importante la actividad enzimática bactericida de las flavoenzimas “LAAO” sobre bacterias causantes de mastitis en el norte de Antioquia. Este estudio reporta el aislamiento y actividad antibacteriana de la LAAOs del veneno de la *Bothrops asper*.

La LAAO es una enzima que producto de la desaminación oxidativa de los L-aminoácidos genera peróxido de hidrogeno y es por esto que se le atribuye a un proceso de apoptosis o muerte celular.

La LAAOs mostró un gran potencial bactericida para los microorganismos asociados a mastitis entre estos: gram positivas como *S.aureus* y gram negativas como *E.coli*, *Mesofilas* y *S.coagulasa negativa*. Estos resultados pueden ser corroborados por los resultados obtenidos por (Rodrigues *et al.*, 2009) en el cual evaluaron las propiedades funcionales de LAAOs obtenida del veneno de *Bothrops paulensis* sobre *E.coli* y *Staphylococcus aureus* las cuales fueron inoculadas con LAAOs y posteriormente se midió la absorbancia para determinar la actividad bactericida. Se determinó su buena actividad ya que inhibió el crecimiento de ambas bacterias (gram-positivas y gram-negativas), mostrando mejor resultado en gram negativas (*E.coli*).

En otro estudio de (Vargas-Muñoz *et al.*, 2015) evaluaron la actividad antimicrobiana de venenos de serpientes donde demostraron la actividad bactericida de la LAAOs contra diferentes bacterias gram positivas como: *Eubacterium lentum*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Propionibacterium acnés*, *S. aureus*, *S. epidermidis* y Gram negativos como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *P. aeruginosa*,

Salmonella typhimurium. El mecanismo de acción bactericida que proponen es la producción del peróxido de hidrogeno, acción que no solo es ejercida por la molécula completa sino también sus subunidades las cuales conservan su actividad. Este mecanismo es también compartido por (Du & Clemetson, 2002) el cual indica que la producción de H₂O₂ induce la apoptosis sugiriendo que el estrés oxidativo es el mediador ya que la mayoría de los mediadores apoptóticos son oxidantes o inductores del metabolismo oxidativo.

En un estudio se evaluó la capacidad microbicida de L- aminoácido oxidasa del veneno de serpiente de la *Calloselasma rhodostoma* sobre *Staphylococcus aureus* y *E.coli*. En este estudio se utilizó como control positivo la ampicilina y tetracilina. Los resultados obtenidos para las cepas de *Staphylococcus aureus* evaluadas, las MIC y MCB (lo que se diferencia de nuestro estudio en el cual se realizaron pruebas de inhibición en agar) de la LAAO fueron menores que las obtenidas por los antibióticos para la cepa estándar las MIC de la LAAO fueron inferiores a las obtenidas para los antibióticos convencionales (Costa *et al.*, 2015).

En un estudio llevado a cabo por Abdelkafi-Koubaa *et al.*, (2016) en el cual se investigó sobre la actividad bactericida de la LAAO en bacterias gram positivas como gram negativas. En este se utilizó como control positivo la ampicilina. Dentro de las bacterias evaluadas se encuentran *S. aureus* y *E.coli* posterior a su incubación se realizó medición de las zonas de inhibición reportando menor inhibición en bacterias como la *E. coli*. A su vez exponen el daño que sufren las bacterias en su ADN esto como resultado del acumulo de ROS.

En este sentido, el control positivo utilizado en nuestro estudio fue el cloranfenicol. Si bien las mastitis en campo son más comúnmente tratadas con otros antibióticos, el protocolo en nuestro laboratorio tiene estandarizada la prueba con el cloranfenicol y desde aquí nuestros resultados in vitro son válidos. Para próximos abordajes de este tema, sería conveniente estandarizarla con otros antibióticos de uso más común en campo.

Conclusiones

La L- aminoácidooxidasa (LAAOs) es una flavoenzima del veneno de la serpiente *Bothrops asper* la cual tiene la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulasa negativo*, *E. coli* y Mesófilos todas bacterias desencadenantes de la mastitis bovina en un hato lechero del norte de Antioquia.

Su alta capacidad bactericida lo compara con productos tradicionales utilizados rutinariamente para el tratamiento de mastitis. Como en el caso de este estudio en el cual se empleó el cloranfenicol obteniendo resultados sin diferencias estadísticamente significativas

Estas flavoenzimas son moléculas alternativas que ameritan ser implementadas en el campo como plan terapéutico para mastitis bovinas para lo cual se propone investigaciones de forma in vivo.

Estos resultados obtenidos son de gran importancia médica y terapéutica para el campo de la veterinaria ya que no solo se podrían emplear para la mastitis sino también para otro tipo de infecciones en las cuales estén incluidas las bacterias aisladas en este mismo.

Las flavoenzimas como las LAAOs pueden ser un plan terapéutico alternativo para mastitis asociada a patógenos. Abriendo así la oferta terapéutica para estas patologías.

Referencias

- Abdelkafi-Koubaa, Z., Aissa, I., Morjen, M., Kharrat, N., El Ayeb, M., Gargouri, Y., ... Marrakchi, N. (2016). Interaction of a snake venom l-amino acid oxidase with different cell types membrane. *International Journal of Biological Macromolecules*, 82, 757–764. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.09.065>
- Aguirre Bedoya, H. A., & Montes Montoya, M. C. (2016). Comparación del diagnóstico de mastitis bovina mediante california mastitis test (cmt) y el detector de concentración iónica en la hacienda Santa Inés del municipio de Pereira. *Medicina Veterinaria y Zootecnia*. Retrieved from <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/handle/11059/6903>
- Ballón Santivañez, C. S., Quispe Gómez, O. E., Villanueva Cárdenas, L. Á., Escobedo-Enríquez, M. H., Bustinza-Cardenas, R. H., & Peña-Sánchez, J. (2013). Prevalencia y Factores Asociados a la Mastitis Subclínica Bovina en los Andes Peruanos. *Veterinaria Y Zootecnia*, 7(2), 92–104.
- Bedolla, C. (2007). Métodos de detección de la mastitis bovina (Methods of detection of the bovine mastitis). *Redvet*, 3(9), 1–17.
- Carlos M trujillo, Andres F Gallego, N. R. (2010). prevalence of mastitis in dairy herds in eastern antioquia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, XXX, 369–382. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Cerniglia, C. E., & Kotarski, S. (1999). Evaluation of veterinary drug residues in food for their potential to affect human intestinal microflora. *Regulatory Toxicology and Pharmacology : RTP*, 29(3), 238–61. <http://doi.org/10.1006/rtph.1999.1300>
- Corbellini, C. N. (2002). La mastitis bovina y su impacto sobre la calidad de la leche.

Seminario Internacional de Competitividad En Leche Y Carne (3: Argentina).

Memorias. Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, 251–263.

Retrieved from <http://en.agro.uba.ar/sites/default/files/agronomia/la-mastitis-bovina-y-su-impacto-sobre-calidad-de-leche.pdf>

Costa, T. R., Menaldo, D. L., Prinholato da Silva, C., Sorrechia, R., de Albuquerque, S., Pietro, R., ... Sampaio, S. V. (2015). Evaluating the microbicidal, antiparasitic and antitumor effects of CR-LAAO from *Calloselasma rhodostoma* venom. *International Journal of Biological Macromolecules*, *80*, 489–497.
<http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.07.004>

Cunningham, J. G. (2009). *Fisiología Veterinaria* (4°). España: Elsevier.

Cunningham, J. G. (2014). *Fisiología veterinaria* (5°). España. Retrieved from Elsevier

Du, X. Y., & Clemetson, K. J. (2002). Snake venom L-amino acid oxidases. *Toxicon*, *40*(6), 659–665. [http://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00102-2](http://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00102-2)

Fuller, R. (1992). *Problems and prospects. En Probiotics: The scientific basis.* Dordrecht.

Gómez-Quispe, Elisban; Santivañez-Ballón, Stefani, Arauco-Villar, Fernando, Espezua-Flores, Oscar; Manrique-Meza, J. (2015). Interpretation criteria for California Mastitis Test in the Diagnosis of Subclinical Mastitis in cattle. *Rev Inv Vet Perú (RIVEP)*, *26*(1), 86–95. <http://doi.org/10.15381/rivep.v26i1.10912>

Hernández, J., & Bedolla, J. (2008). Importancia del conteo de células somáticas en la calidad de la leche. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria 1695-7504*, *IX*(9), 34.

Kang, T. S., Georgieva, D., Genov, N., Murakami, M. T., Sinha, M., Kumar, R. P., ...

- Kini, R. M. (2011). Enzymatic toxins from snake venom: Structural characterization and mechanism of catalysis. *FEBS Journal*, 278(23), 4544–4576.
<http://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08115.x>
- Kerro Dego, O., van Dijk, J. E., & Nederbragt, H. (2002). Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. A review. *The Veterinary Quarterly*, 24(4), 181–198.
<http://doi.org/10.1080/01652176.2002.9695135>
- Koning, H. E. (2008). *anatomía de los animales domesticos*. España: Editorial Medica Panamericana.
- Kruze, J. (1998). La rutina de ordeño y su rol en los programas de control de mastitis bovina. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 30(2), 07–16.
<http://doi.org/10.4067/S0301-732X1998000200001>
- Lambrecht Gonçalves, C., Almeida Schiavon, D. B., Voigt Mota, F., Faccin, A., Noremborg Schubert, R., Schiedeck, G., & Damé Schuch, L. F. (2013). Actividad antibacteriana de los extractos de *Cymbopogon citratus*, *Elionurus* sp. y *Tagetes minuta* contra bacterias que causan mastitis. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(3), 487–494.
- Lazo, F., Málaga, O., Yarlequé, A., & Severino, R. (2007). Algunas propiedades bioquímicas de una L- aminoácido oxidasa aislada del veneno de la serpiente *Bothrops atrox*. *Revista de Sociedad Química de Perú*, 73(3), 131–141.
- Loguercio, A. P., Battistin, A., Vargas, A. C., Henzel, A., & Witt, N. M. (2005). Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). *Ciência Rural*, 35, 371–376. <http://doi.org/10.1590/S0103->

84782005000200019

Meglia, G. ., & Mata, H. . (2002). Mecanismos Específicos e inespecíficos de defensa, con referencia a la glándula mamaria de los bovinos productores de leche, 57–67.

Nascimento, P. F. C., Nascimento, a C., Rodrigues, C. S., Antonioli, a R., Santos, P.

O., Barbosa, a M., & Trindade, R. C. (2007). Atividade antimicrobiana dos oleos essenciais: una abordagem multifatorial dos metodos. *Rev.Brasileira de*

Farmacognosia, 17(1), 108–113. <http://doi.org/10.1590/S0102->

695X2007000100020

Organizacion de las Naciones Unidas Para la Alimentacion y la Agricultura. (2001).

Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. *Fao & Who*, (October), 1–34.

<http://doi.org/10.1201/9781420009613.ch16>

Oyarzabal Bastos, M. E., Schuch Damé, L. F., Prestes de Souza, L., Schiavon Bender

Almeida, D., Rodrigues Alves, M. R., & de Mello Braga, J. R. B. (2011). Actividad antimicrobiana de aceite esencial de *Origanum vulgare* L. ante bacterias aisladas en leche de bovino. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 16(3), 260–266.

Pereañez, A. (2014). Animal toxins with high therapeutic potential and their use in

biomedicine Toxinas de serpientes con alto potencial terapéutico y su uso en la biomedicina, (December 2009).

Pereyra, E. A., Dallard, B. E., & Calvino, L. F. (2014). Aspectos de la respuesta

inmune innata en las infecciones intramamarias causadas por *Staphylococcus aureus* en bovinos. *Revista Argentina de Microbiología*, 46(4), 363–375.

[http://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70096-3](http://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70096-3)

- Rainard, P., Fromageau, A., Cunha, P., & Gilbert, F. B. (2008). *Staphylococcus aureus* lipoteichoic acid triggers inflammation in the lactating bovine mammary gland. *Veterinary Research*, 39(5), 52. <http://doi.org/10.1051/vetres:2008034>
- Ramírez, E. J., Muñoz, M. F. C., Herrera, A. C., & Vergara, O. D. (2009). association of BoLA-DRB3 and TLR4 alleles with subclinica mastitis incattle from colombia. *Colomb Cienc Pecu*, 22(54), 642–647.
- Ramírez, N. (2013). Determinación De Factores De Riesgo Y Etiología Microbiana De La Mastitis Bovina En Hatos Lecheros De Seis Municipios Del Altiplano Norte Antioqueño 2009 - 2010, 200.
- Ramírez, N., Gaviria, G., Arroyave, O., Sierra, B., & Benjumea, J. (2001). Prevalencia de mastitis en vacas lecheras lactantes en el municipio de San Pedro de los Milagros, Antioquia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 14(1), 76–87. Retrieved from <http://rccp.udea.edu.co/index.php/ojs/article/view/19>
- Ramírez Vásquez, N., Arroyave Henao, O., Cerón-Muñoz, M., Jaramillo, M., Cerón, J., & Palacio, L. G. (2011). Factores asociados a mastitis en vacas de la microcuenca lechera del altiplano norte de Antioquia. *Revista de Medicina Veterinaria*, (22), 31–42. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-93542011000200004&lang=pt
- Rangel, A. C., Rodríguez, V. C. R., Bernate, G. J. A., & Velilla, S. M. (2011). Prevalencia de mastitis bovina en sistemas doble propósito en montería (Colombia):Etiología y susceptibilidad antibacteriana. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 24(1), 19–28.

- Riera-Nieves, M., Rodriguez-Marquez, J. M., Perozo-Prieto, E., Rizzi, R., Cefis, A., & Pedron, O. (2006). Comparison of morphological traits of teats in three dairy breeds. *Revista Científica-Facultad De Ciencias Veterinarias*, 16(4), 393–400.
- Rodrigues, R. S., da Silva, J. F., Boldrini França, J., Fonseca, F. P. P., Otaviano, A. R., Henrique Silva, F., ... Rodrigues, V. M. (2009). Structural and functional properties of Bp-LAAO, a new l-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Biochimie*, 91(4), 490–501. <http://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.12.004>
- Ruiz, A. K., Ponce, P., Gomes, G., Mota, R. A., Sampaio, E., Lucena, E. R., & Benone, S. (2011). Prevalencia de Mastitis Bovina Subclínica y Microorganismos Asociados: Comparación entre Ordeño Manual y Mecánico, en Pernambuco, Brasil. *Revista de Salud Animal*, 33(1), 57–64.
- San Martín, B., Kruze, J., Morales, M. A., Agüero, H., León, B., S, E., ... Borie, C. (2002). Resistencia bacteriana en cepas patógenas aisladas de mastitis en vacas lecheras de la V Región, Región Metropolitana y Xª Región, Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 34(2), 221–234. <http://doi.org/10.4067/S0301-732X2002000200008>
- Sánchez Bonilla, M. D. P., & Gutiérrez Murillo, N. P. (2015). Frecuencia y susceptibilidad antimicrobiana del estafilococo coagulasa negativo aislado de mastitis bovina en fincas lecheras del Tolima, Colombia. *Revista Medicina Veterinaria*, 73(30), 83. <http://doi.org/10.19052/mv.3612>
- Schrezenmeir, J., & de Vrese, M. (2001). Probiotics, prebiotics, and synbiotics--approaching a definition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2 Suppl). http://doi.org/10.1007/10_2008_097

- Silley, P., Simjee, S., & Schwarz, S. (2012). Surveillance and monitoring of antimicrobial resistance and antibiotic consumption in humans and animals. *Rev.Sci.Tech.*, 31(0253–1933 (Print)), 105–120.
- Smith, B. P. (2010). *Medicina interna de grandes animales* (4°). España: Elsevier.
- Solís, C., & Escobar, E. (1999). purificación y caracterización de la L- amino ácido oxidasa del veneno de la serpiente *Bothrops brazili* "jergón shushupe". *Revista Peruana de Biología*, 6(1), 75–84.
- Vargas-muñoz, L. J., Estrada-gómez, S., & Vásquez-escobar, J. (2015). Toxinas de venenos de serpientes y escorpiones , una fuente natural de moléculas con actividad antimicrobiana ., 2015, 1–40. <http://doi.org/10.16925/cu.v2i2.1166>
- Voigt Mota, F., Damé Schuch, L. F., Lambrecht Gonçalves, C., Faccin, Â., Almeida Schiavon, D. B., Conrad Bohm, B., & Ferreira Lessa, L. (2013). Actividad antibacteriana de los extractos de *Syzygium cumini* (L.) Skeels (jambolán) frente a los microorganismos asociados a la mastitis bovina. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(3), 495–501. Retrieved from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962013000300016&lng=es&nrm=iso&tlng=pt
- Zamorano, J. C., Echeverri, J., & Herrera lopez, A. (2008). Alleles of the BoLA DRB3.2 genes are associated with mastitis in dairy cows, 11(7), 145–156.