



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 331 650**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2006.01)

A61P 13/00 (2006.01)

A61P 15/14 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04770417 .6**

96 Fecha de presentación : **15.10.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1675603**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.07.2006**

54 Título: **Utilización de bacterias probióticas en el tratamiento de una infección.**

30 Prioridad: **17.10.2003 IE 2003/0773**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.01.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.01.2010

73 Titular/es: **TEAGASC, THE AGRICULTURE AND
FOOD DEVELOPMENT AUTHORITY
19 Sandymount Avenue
Dublin 4, IE
University College Cork**

72 Inventor/es: **Ross, Paul y
Hallahan, Stephen**

74 Agente: **Trullols Durán, María del Carmen**

ES 2 331 650 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Utilización de bacterias probióticas en el tratamiento de una infección.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la utilización de cultivos vivos de bacterias probióticas apatógenas o sobrenadantes de dichos cultivos en la realización de una composición para el tratamiento de infecciones bacterianas, que consisten en mastitis de naturaleza infecciosa. En particular, la presente invención tal como se ha definido anteriormente comprende la utilización de cultivos vivos de *Lactococcus lactis* o el sobrenadante de dichos cultivos. La presente invención tal como se ha definido anteriormente se refiere a la utilización de bacterias probióticas “inocuas” de una calidad apropiada para alimentos para el tratamiento de enfermedades infecciosas (o de infecciones localizadas) en seres humanos y en animales. En particular, el tratamiento implica la aplicación de una bacteria del ácido láctico apatógena al animal/ser humano con lo que se obtiene una reducción de los síntomas clínicos de la infección/enfermedad.

15

Antecedentes de la invención

El concepto de bacterias “beneficiosas” que contribuyen a la salud y el bienestar lo propuso por primera vez hace aproximadamente un siglo el Prof. E. Metchnikoff, pero ha sido en las dos últimas décadas cuando se ha apreciado completamente el papel potenciador de la salud por parte de algunas bacterias. Los tratamientos probióticos utilizan la interferencia y el ajuste de la respuesta inmunitaria mediante bacterias para el control de las infecciones, inflamaciones y trastornos inmunitarios graves. Por ejemplo, cada vez existen más pruebas que indican que si bien la reducción de la microflora o la falta de la misma en el tracto gastrointestinal (GI) pueden provocar problemas digestivos tales como una intolerancia hipoalérgica, la recolonización mediante bacterias “beneficiosas” presenta la capacidad de rehabilitar la tolerancia oral y recuperar el desarrollo de un sistema inmunitario equilibrado (Alvarez-Olmos & Oberhelman, 2001; Cross, 2002). Aunque se desconoce con exactitud la complejidad de la señalización entre las colonizadoras *de novo* y el sistema inmunitario, se considera que el ajuste de la respuesta inmunitaria se produce probablemente mediante uno de los mecanismos siguientes o una combinación de los mismos (Cross, 2002):

30

1. La producción localizada de ácido láctico por parte de probióticos, lo que puede limitar el crecimiento de los organismos patógenos.

35

2. La producción de sustancias apatógenas por parte de la cepa probiótica, por ejemplo bacteriocinas, que constituyen unos potentes compuestos bactericidas.

3. La limitación de la colonización mediante la competición de zonas de colonización-“exclusión competitiva”.

40

4. La producción de señales de ajuste inmunitario por parte de la cepa probiótica que estimulan la inmunidad del anfitrión en un nivel suficiente para proporcionar una mayor protección.

Las bacterias del ácido láctico (LAB), que comprenden miembros de los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pedococcus* y *Streptococcus* se han utilizado durante miles de años en la producción de alimentos fermentados. Como resultado de sus antecedentes como bacterias inocuas, dichos microorganismos se contemplan como GRAS (consideradas generalmente como inocuas) en muchas aplicaciones, que comprenden el consumo por parte de seres humanos y animales. En los últimos años, se ha realizado una investigación exhaustiva por lo que se refiere a la utilización de las LAB en el control de los microorganismos patógenos, y como sustancias saludables o “probióticas”.

50

Hasta la fecha, se ha utilizado la terapia probiótica principalmente en el tratamiento de problemas gastrointestinales. Aunque en un principio se partía de rumores y prácticas tradicionales, actualmente las pruebas científicas contrastadas respaldan que el papel protector de los probióticos y en particular de los lactobacilos LAB en el tracto GI es considerable. Se ha propuesto una pluralidad de propiedades antimicrobianas como factores protectores potenciales en el aparato digestivo humano contra microorganismos tales como *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori* y especies de *Salmonella* y *Listeria* (Alvarez-Olmos & Oberhelman, 2001). Por ejemplo, se alimentaron ratones con *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei* o una combinación de ambos, antes de una exposición oral a *Salmonella typhimurium*, y tuvo como resultado un desplazamiento reducido de los patógenos hacia el bazo y el hígado, en comparación con los ratones de control. Ello tuvo como resultado un aumento de la supervivencia de los ratones en los grupos alimentados con probióticos, en particular en el grupo alimentado con ambas cepas. Este estudio demostró asimismo que en los grupos alimentados con probióticos, los macrófagos habían aumentado su actividad fagocitaria (Perdigon *et al.*, 1990a).

60

Se ha investigado asimismo el efecto protector en ratones de *Lb. casei* contra *S. typhimurium*, *E. coli* y *Shigella sonnei*. Se observó una mayor protección ante la exposición oral a los patógenos mencionados anteriormente cuando los ratones se alimentaron previamente con *Lb. casei*. Además, se observaron unos mayores niveles de IgA y los ratones alimentados con probióticos expuestos a *Shigella* presentaron una mayor cantidad de anticuerpos anti-*Shigella* en el suero y el tracto GI en comparación con el grupo de control (Perdigon *et al.*, 1990b; 1991).

65

Por lo tanto, un conjunto de pruebas cada vez mayor, relaciona una protección antimicrobiana superior con el aumento de las respuestas inmunitarias apropiadas mediante los probióticos. Recientemente, se ha investigado la utilización de probióticos que ajustan de la respuesta inmunitaria como agentes protectores del tracto GI y, asimismo, en otras superficies mucosas. En un estudio, se sometieron los ratones alimentados previamente con *Lb. casei* a la exposición con aerosol a *Pseudomonas aeruginosa* (Alvarez *et al.*, 2001). Los resultados demostraron que la alimentación con probióticos aumentaba el coeficiente de depuración de *P. aeruginosa* de los pulmones, sobrerregulaba la capacidad fagocitaria de los macrófagos alveolares y aumentaba los niveles de IgA en el suero y en el líquido del lavado broncoalveolar. A partir de estos resultados se pone de manifiesto que la alimentación probiótica puede influir en las respuestas inmunitarias de los tejidos del tracto respiratorio y que este efecto resulta suficiente para proporcionar protección contra los patógenos bacterianos del tracto respiratorio. Además, se han admitido *Lb. rhamnosus* GR-1 y *Lb. fermentum* RC-14 como agentes terapéuticos en la prevención y el tratamiento de infecciones genitourinarias en mujeres. El restablecimiento de una flora vaginal sana y normal se produce tras la aplicación local de lactobacilos, lo que de muestra que los lactobacilos administrados localmente, así como aquellos administrados por vía oral, pueden proporcionar una mayor protección contra los patógenos (Reid *et al.*, 2001; Gardiner *et al.*, 2002). Por lo tanto, en las últimas décadas se han extendido las áreas de utilización potencial de probióticos y actualmente comprenden la prevención y el tratamiento de enfermedades diarreicas en adultos y niños, la prevención de la vaginitis e infecciones del tracto urinario en adultos, la prevención de alergias alimentarias y una acción antitumoral en los intestinos, la vejiga y el cuello del útero (Cross, 2002).

Aparte de las ventajas obvias de la utilización de organismos GRAS para estos últimos propósitos, la utilización de bacterias grampositivas como los lactococos, los lactobacilos y los estreptococos presenta la ventaja adicional que se ha demostrado que la pared celular de las bacterias grampositivas actúa como activador de la respuesta inmunitario. Otra ventaja importante de la utilización de bacterias del ácido láctico como agentes terapéuticos deriva de su capacidad para producir bacteriocinas, unos potentes péptidos antimicrobianos (Ross *et al.*, 1999). Dichos péptidos eliminan rápidamente otros microorganismos destruyendo o extendiéndose por la membrana microbiana y disminuyendo la capacidad de realización de los procesos metabólicos. Debido a su modo de acción, resulta poco probable que se enfrenten a los mismos mecanismos de resistencia antimicrobiana que limitan la utilización de los antibióticos actuales.

La nisina fue la primera bacteriocina identificada obtenida a partir de la fermentación de una bacteria del ácido láctico, el *Lactococcus lactis*. Está autorizada su utilización como conservante alimentario en los Estados Unidos y obtuvo la categoría GRAS en el Registro Federal de los EE. UU. en el año 1988. Está asimismo autorizado como conservante natural en más de 40 países así como por la Organización Mundial de la Salud y la Unión Europea. Aparte de su utilización como aditivo alimentario para inhibir organismos putrefactivos y patógenos, varios estudios han investigado su utilización como agente terapéutico, en el tratamiento de enfermedades tan diversas como el acné, las infecciones gastrointestinales en seres humanos y la mastitis bovina (Blackburn *et al.*, 1994; Sears *et al.*, 1995). Se utiliza actualmente como componente del producto comercial para desinfectar chupetes (CONSEPT®, Babson Bros.).

La lacticina 3147 es una bacteriocina de amplio espectro producida asimismo a partir de una cepa de lactococos, la *L. lactis* DPC3147. Se identificó por primera vez en una colonia bacteriana obtenida a partir de granos del tipo kéfir irlandés de uso doméstico en la producción de suero de la leche. Mata todos las bacterias grampositivas analizadas hasta la fecha, entre ellas patógenos resistentes a antibióticos potentes tales como estafilococos resistentes a la metilicina, enterococos resistentes a la vancomicina y neumococos resistentes a la penicilina (Galvin *et al.*, 1999) además de organismos causantes de intoxicaciones alimentarias tales como la *Listeria monocytogenes* y el *Clostridium botulinum* (Ross *et al.*, 1999). De un modo similar a la nisina, es un miembro de la familia de bacteriocinas denominada lantibióticos. Consiste en una bacteriocina de dos componentes, requiriéndose los dos componentes para desarrollar una actividad completa. Su modo de acción implica la formación de poros que, al dañar la membrana de las células sensibles, se escapan los iones potasio y fosfato. Se ha de destacar que la lacticina 3147 presenta ventajas sobre la lisina como opción en calidad de agente terapéutico, que comprenden su efectividad en un amplio espectro de pH (la nisina es más efectiva a un pH ácido), lo que indica unas posibilidades adicionales en alimentos no ácidos y en aplicaciones biomédicas (Ross *et al.*, 1999). Se ha utilizado y la lacticina 3147 en una amplia gama de aplicaciones que comprenden su utilización como bioconservante pulverulento (Morgan *et al.*, 1999) y en el tratamiento de la mastitis bovina (Ryan *et al.*, 1999; Twomey *et al.*, 2000).

Se establece la competencia nutritiva como un mecanismo importante mediante el que los probióticos consiguen su efecto. Se han implicado asimismo factores inhibidores tales como las bacteriocinas y productos metabólicos finales (Alvarez-Olmos & Oberhelman, 2001; Cross, 2002).

Se define la mastitis como una inflamación de las glándulas mamarias y se indica mediante incrementos en el recuento de células somáticas (SCC). El SCC constituye un indicador de los niveles de neutrófilos en la leche, lo que a su vez constituye un indicador de la presencia de una infección. Un cuadrante normal de la ubre carece de bacterias patógenas, presenta muy pocos neutrófilos en la leche y, por lo tanto, un SCC bajo ($< 0,2 \times 10^6/\text{ml}$ de SCC). Un aumento en el SCC indica habitualmente la presencia de una infección.

Cuando una vaca presenta mastitis clínica, el cuadrante afectado puede presentar signos evidentes de inflamación - calor, dolor e hinchazón, y la vaca puede presentar una temperatura corporal elevada. El SCC aumenta hasta valores superiores a $0,2 \times 10^6/\text{ml}$ y los patógenos pueden ser detectables (específicamente clínicos) o no ser detectables (no específicamente clínicos). Los cuadrantes se consideran asimismo como clínicos si la leche presenta alteraciones

evidentes a simple vista - por ejemplo coágulos presentes, incluso cuando no aparecen signos clínicos mediante palpación. La mastitis clínica se puede clasificar basándose en el aspecto de la leche de los cuadrantes afectados. Se hace referencia a una infección clínica o subclínica como “crónica” si persiste durante un período prolongado y no responde al tratamiento con antibióticos. Los casos clínicos crónicos los puede identificar fácilmente el ordeñador. En los casos subclínicos, la ubre afectada presenta un aspecto normal pero la leche presenta un SCC elevado ($> 0,2 \times 10^6/\text{ml}$) y habitualmente se encuentran patógenos presentes en la leche. Los casos crónicos subclínicos se identifican únicamente mediante la obtención repetida de muestras y la realización de análisis de laboratorio. Una directiva del Consejo de la CE estipula las normativas sobre la producción higiénica de leche y productos lácteos.

Los casos agudos y crónicos se tratan periódicamente con antibióticos. Sin embargo, existen casos que no responden al tratamiento con antibióticos, o casos que responden durante poco tiempo y a continuación se producen recaídas, incluso tras una administración repetida del antibiótico. La administración repetida de antibióticos tiene como resultado la pérdida de leche, ya que se ha de retener la leche de la lechería hasta que no presenta residuos de antibióticos.

Se ha investigado la utilización de un cultivo vivo de *L. lactis* 3147 en el tratamiento de la mastitis bovina. La utilización de un cultivo productor de bacteriocina en lugar de una preparación de lacticina concentrada presenta ciertas ventajas. En primer lugar, el organismo productor, *L. lactis* es de tipo GRAS, y se aisló a partir de una fuente alimentaria. La utilización del cultivo vivo en el tratamiento de la mastitis, se puede contemplar como un ataque prolongado al patógeno - no se trata únicamente de bacteriocina producida de un modo natural y estable, sino que el cultivo competirá asimismo con los patógenos en la colonización de la ubre. Además, otras sustancias antimicrobianas tales como ácidos orgánicos, ácidos grasos libres, amoníaco y peróxido de hidrógeno se pueden producir asimismo como productos finales del metabolismo. Por último, la inyección de *L. lactis* 3147 en el conducto mamario tiene como resultado un efecto de ajuste de la respuesta inmunitaria, caracterizado por un aumento breve del SCC, con una reducción o eliminación simultánea de los patógenos, seguido por una mejora drástica tanto en el desenlace clínico como en el aspecto y la calidad de la leche.

Objetivo de la invención

Constituye un objetivo de la presente invención proporcionar una utilización mejorada según las reivindicaciones para combatir la mastitis infecciosa. Constituye un objetivo adicional proporcionar una composición farmacéutica para dicha infección que no implique la utilización de antibióticos y que utilice las propiedades de bacterias apatógenas y de una calidad apropiada para alimentos.

Sumario de la invención

Según la presente invención se proporciona la utilización de un cultivo vivo de una bacteria probiótica apatógena y de una calidad apropiada para alimentos tal como se define en las reivindicaciones.

La bacteria probiótica es una bacteria de ácido láctico apatógena. La bacteria del ácido láctico puede ser una cepa de *Lactococcus*. Una cepa apta de *Lactococcus* es el *Lactococcus lactis* DPC3147.

En una forma de realización alternativa, la presente invención proporciona asimismo la utilización del sobrenadante de un cultivo vivo de una bacteria probiótica apatógena y de una calidad apropiada para alimentos tal como se ha definido anteriormente.

En otra forma de realización adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente efectiva de un cultivo vivo apatógeno de una bacteria de una calidad apropiada para alimentos o una cantidad farmacéuticamente efectiva del sobrenadante de un cultivo de una bacteria probiótica apatógena y de una calidad apropiada para alimentos tal como se define en las reivindicaciones junto con un excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Se proporciona asimismo la utilización tal como se define en las reivindicaciones para el tratamiento de la mastitis.

No se puede predecir que dichos cultivos vivos resulten efectivos en el tratamiento de enfermedades por muchos motivos. En primer lugar, en la mayor parte de aplicaciones probióticas el organismo utilizado es uno que se encuentra normalmente en la zona de tratamiento y la mayoría de dichas aplicaciones están destinadas al tratamiento de problemas en el tracto gastrointestinal. La efectividad del *L. lactis*, resulta particularmente sorprendente por el hecho de que no es un organismo entérico y además no se encuentra habitualmente en la ubre. Además, nunca se ha propuesto en las técnicas anteriores que se podía utilizar apatógenos satisfactoriamente en la estimulación del sistema inmunitario para dichas aplicaciones.

En otra forma de realización, la presente invención proporciona la utilización de un cultivo vivo de una bacteria probiótica apatógena y de una calidad apropiada para alimentos o el sobrenadante de un cultivo vivo de una bacteria probiótica apatógena y de una calidad apropiada para alimentos tal como se define en las reivindicaciones para la estimulación del sistema inmunitario para dichas aplicaciones.

Breve descripción de los dibujos

Figuras 1A y B: valores del recuento de células somáticas y recuentos bacterianos en los cuadrantes de animales tratados.

Figura 2A. Aspecto de la leche de muestras de la vaca 1154LF obtenidas antes y después de la inyección de *Lactococcus lactis* DPC 3147.

Figura 2B. Gráficos del recuento de células somáticas y la puntuación clínica en leche de muestras de la vaca 1154LF obtenidas antes y después de la inyección de *L. lactis* DPC 3147.

Figura 3A. Aspecto de la leche de muestras de la vaca 1178LH obtenidas antes y después de la inyección de *Lactococcus lactis* DPC 3147.

Figura 3B. Gráficos del recuento de células somáticas y la puntuación clínica en leche de muestras de muestras de la vaca 1178LH obtenidas antes y después de la inyección de *L. lactis* DPC 3147.

Figura 4A. Aspecto de la leche de muestras de la vaca 1850RF obtenidas antes y después de la inyección de *Lactococcus lactis* DPC 3147. Muestras representadas en el día 0 y 9 días tras la inyección.

Figura 4B. Gráficos del recuento de células somáticas y la puntuación clínica en leche de muestras de la vaca 1850RF obtenidas antes y después de la inyección de *L. lactis* DPC 3147.

Figura 5A. Aspecto de la leche de muestras de la vaca 1163RH obtenidas antes y después de la inyección de *Lactococcus lactis* DPC 3147.

Figura 5B. Gráficos del recuento de células somáticas y la puntuación clínica en leche de muestras de la vaca 1163RH obtenidas antes y después de la inyección de *L. lactis* DPC 3147.

Figura 6A. Aspecto de la leche de muestras de la vaca 1184RF obtenidas antes y después de la inyección de *Lactococcus lactis* DPC 3147.

Figura 6B. Gráficos del recuento de células somáticas y la puntuación clínica en leche de muestras de la vaca 1184RF obtenidas antes y después de la inyección de *L. lactis* DPC 3147.

Figura 7A. Aspecto de la leche de muestras de la vaca 14LH obtenidas antes y después de la inyección de *Lactococcus lactis* DPC 3147.

Figura 7B. Gráficos del recuento de células somáticas y la puntuación clínica en leche de muestras de la vaca 14LH obtenidas antes y después de la inyección de *L. lactis* DPC 3147.

Figura 8A. Aspecto de la leche de muestras de la vaca 717RF obtenidas antes y después de la inyección de *Lactococcus lactis* DPC 3147.

Figura 8B. Gráficos del recuento de células somáticas y la puntuación clínica en leche de muestras de la vaca 717RF obtenidas antes y después de la inyección de *L. lactis* DPC 3147.

Figura 9A. Aspecto de la leche de muestras de la vaca 264LF obtenidas antes y después de la inyección de *Lactococcus lactis* DPC 3147.

Figura 9B. Gráficos del recuento de células somáticas y la puntuación clínica en leche de muestras de la vaca 264LF obtenidas antes y después de la inyección de *L. lactis* DPC 3147.

Figura 10. Número de PMN (neutrófilos polimorfonucleares) y linfocitos en cuadrantes individuales antes y después del tratamiento con *L. lactis* DPC3147 (vaca 273RH y vaca 1850RF); o caldo estéril (vaca 273 LH).

Figura 11. Número de PMN y linfocitos en cuadrantes individuales en la vaca 1803 antes y después del tratamiento con *L. lactis* DPC3147 (RH); antibiótico intramamario (LF); sobrenadante sin células (LH) o control sin tratar (RF).

Figura 12A. Producción del anión superóxido por parte de los PMN en cada uno de los cuatro cuadrantes de una vaca (vaca 1803) antes y después del tratamiento con *Lactococcus lactis* DPC3147 (RH); antibiótico intramamario (LF); sobrenadante sin células (LH) o control sin tratar (RF).

Figura 12B. Niveles de intensidad de fluorescencia del anión superóxido en cada uno de los cuatro cuadrantes de la vaca 1803 antes y después del tratamiento con *L. lactis* DPC3147 (RH); antibiótico intramamario (LF); sobrenadante sin células (LH) o control sin tratar (RF).

Figura 13. Recuento de células somáticas en los cuatro cuadrantes de la vaca 1803 tras la inyección con *L. lactis* DPC3147 (RH); antibiótico intramamario (LF); sobrenadante sin células (LH) o control sin tratar (RF). Día 0 = antes de la inyección.

Figura 14. Números de PMN en cuadrantes individuales en la vaca 1137, la vaca 1852 y la vaca 1570 antes (día 0) y después del tratamiento con *L. lactis* vivos DPC3147, *L. lactis* muertos DPC3147, disolución salina estéril o control sin tratar.

Figura 15. Números de PMN en cuadrantes individuales antes y después del tratamiento con *L. lactis* DPC3147 (*L. lactis*); *L. lactis* DPC5399 (Bact. neg.); *Lb. plantarum* DPC4922 (*plantarum*) o controles sin tratar.

Figura 16. Aumento proporcional relativo posterior al tratamiento en los PMN obtenidos a partir de la leche con respecto al tratamiento previo en la vaca 1163, la vaca 1171 y la vaca 1181 respectivamente.

Figura 17. Efecto de inyectar distintas preparaciones de *L. lactis* DPC3147 en los números de PMN en la vaca 275, la vaca 1134 y la vaca 2810. Se trataron los cuadrantes de cada vaca con un cultivo realizado durante la noche de *L. lactis* DPC3147 (O/N); un cultivo liofilizado de *L. lactis* DPC3147 (FD) o se dejaron sin tratar. A continuación se procedió al análisis de los números de PMN procedentes de cada cuadrante durante dos días.

Descripción detallada de la invención

Materiales y Métodos

Preparación de la mezcla de inyección

Se aisló previamente *Lactococcus lactis* DPC3147 a partir de granos de kéfir. Se diseminó del modo habitual a 30°C en caldo M17 (Difco Laboratories, Detroit, EE. UU.) enriquecido con glucosa o lactosa al 0,5%. Dicho cultivo (3 ml, $\sim 10^9$ cfu ml⁻¹) se utilizó directamente o se preparó una mezcla para inyectar del siguiente modo: se mezclaron 2 ml de un cultivo realizado por la noche de *L. lactis* DPC3147 con 3 ml de agua estéril para inyectar (Antigen Pharmaceuticals) a fin de producir una concentración de trabajo del cultivo de aproximadamente 10^9 cfu ml⁻¹. Las mezclas de control para inyectar comprendían caldo sin inocular, incubado durante la noche a 30°C y diluido a continuación de un modo similar al del cultivo.

Técnicas de inyección

Se inyectaron los cultivos diluidos de *L. lactis* DPC3147 directamente en los senos del pezón por el canal galactóforo. Se inoculó el cultivo hasta una profundidad de 17 mm utilizando una jeringa de punta roma alisada a fin de evitar heridas en el pezón. Se realizó habitualmente la inyección de la mezcla tras el ordeño de la tarde. En el caso de seis casos enfermos crónicos se procedió a una única aplicación de 3 ml de cultivo sin diluir. En el caso de nueve casos de mastitis clínica, se realizó la inyección dos veces con un intervalo de 24 h para los siete cuadrantes (vacas 1163RH, 14LH, 717RF, 1154LF, 1850RF, 1184RF, 1176LH), dos veces con un intervalo de 72 h para un cuadrante (1178LH) y cuatro veces para la vaca 264LF, con 24 h entre las inyecciones primera y segunda, 84 h entre las inyecciones segunda y tercera y 48 h entre las inyecciones tercera y cuarta (Apéndices 1 a 9). Se prepararon 5 ml de la mezcla de la inyección tal como se ha descrito anteriormente para inyectar en los cuadrantes con mastitis clínica.

Selección de las vacas para el tratamiento

Antes de iniciar los experimentos *in vivo*, se recogieron muestras del calostro de los cuadrantes de un modo aséptico de todas las vacas potenciales y éstas se seleccionaron con respecto a los patógenos que provocan la mastitis disponiendo 10 µl de cuadrantes distintos de la superficie de placas AVA y procediendo a su incubación durante 16 h a 37°C. Se determinaron los resultados del recuento de células somáticas (SCC) o la CMT (prueba de la mastitis) para cada cuadrante antes del tratamiento. Se consideró asimismo el historial previo de infección durante la selección. Se seleccionaron inicialmente seis cuadrantes de ubre procedentes de 4 vacas con un historial de infección crónica para el tratamiento. También se trataron posteriormente nueve cuadrantes procedentes de 9 vacas con infecciones clínicas adquiridas recientemente.

Recuento bacteriano

Dieciocho horas tras la inyección, se tomaron muestras de calostro de los cuadrantes tratados de un modo aséptico para su análisis microbiológico. Se dispusieron cien microlitros de cada muestra de leche en la superficie de una placa de agar sangre con esculina (ABA) que contenía la base de agar sangre n.º 2 (Oxoid), enriquecido con sangre de ternera entera con citrato al 7% y esculina al 0,1% (Sigma, S. Luis, MO, USA) y se incubaron durante 24 h a 37°C. Tras la incubación, se procedió al recuento e identificación de las colonias basándose en la actividad hemolítica y el aspecto de la colonia sobre el ABA. Se dispusieron asimismo cien microlitros de cada muestra de leche en la superficie de una placa de agar M17 enriquecido con glucosa o lactosa al 0,5% y se incubaron durante la noche a 30°C.

Ensayo de la actividad de la bacteriocina

Se analizó la actividad antimicrobiana de las colonias de *L. lactis* contra *L. lactis* HP, utilizando el ensayo de difusión en pocillos con agar descrito previamente (Parente & Hill, 1992). Además, se seleccionaron al azar colonias aisladas en GM17 o LM17 procedentes de la leche, se purificaron y se analizaron para confirmar el aislamiento de *L. lactis* DPC3147 procedente de los cuadrantes de las ubres.

Estudios inmunológicos

Se realizaron dos estudios independientes para investigar el efecto de *L. lactis* DPC3147 en la inmunidad de las vacas. En el primer estudio, se utilizaron dos vacas, un animal sin infectar (vaca 273) y animal infectado con un SCC elevado (vaca 1850). Se inyectó un cuadrante de la vaca 273 con caldo estéril como control (posterior izquierdo, LH) y se inyectó un cuadrante con el cultivo de *L. lactis* (posterior derecho, RH). Se inyectó asimismo un cuadrante de la vaca 1850 con el cultivo de *L. lactis* (RF). Se tomaron muestras de leche inmediatamente antes de la inyección intramamaria (día 0) para determinar los niveles basales de las subpoblaciones de leucocitos. Se recogieron asimismo muestras de leche 16 horas tras el tratamiento (día 1). En un segundo estudio se escogió una vaca no infectada con unos recuentos SCC en todos los cuadrantes de las ubres < 100.000/ml para los estudios inmunológicos. Un cuadrante (RH) se inoculó con la preparación de *L. lactis* DPC3147, un segundo cuadrante (LH) se inyectó con sobrenadante sin células procedente de un cultivo realizado por la noche de *L. lactis* DPC3147, un tercer cuadrante (LF) se inyectó con el contenido de una jeringa intramamaria con antibiótico que contenía 250 mg de sulfato de neomicina, 100 mg de penicilina procaína, 10 mg de hidrocortisona de oxitetraciclina y 10 mg de prednisolona (Multimast L.C., Bimeda Ltd., Dublín) y un cuadrante (RF) se dejó sin tratar. Se tomaron muestras de leche justo antes de las inyecciones intramamarias (día 0) y asimismo en las horas 24 y 48 tras el tratamiento. Se almacenaron todas las muestras de ambos ensayos a temperatura ambiente tras el ordeño y se analizaron en menos de tres horas después de la recogida. Se identificaron los neutrófilos y los linfocitos utilizando una combinación de anticuerpos específicos de bovinos (BN15.6 y CD3 respectivamente) y unas técnicas precisas de control en la citometría de flujo. Se realizaron ensayos de producción de aniones para determinar la actividad funcional de los neutrófilos. En el segundo ensayo, se tomaron asimismo muestras de leche cada 24 h durante hasta 7 días para realizar el seguimiento del recuento de células somáticas (SCC).

Efecto de la utilización de células muertas

Se realizó un experimento para investigar el efecto de la inyección de células muertas de *L. lactis* DPC3147 en la respuesta inmunitaria de las vacas. Se seleccionaron tres vacas con un SCC bajo (vacas 1852, 1135 y 1570) y los pezones se inyectaron tanto con lactococos vivos, lactococos muertos o disolución salina estéril (0,85% NaCl {p/v}) de un modo aleatorio. Se prepararon las mezclas para la inyección de los lactococos vivos tal como se ha descrito anteriormente. Las células muertas se prepararon mediante el cultivo de *L. lactis* DPC3147 en LM17 durante la noche tal como se ha descrito anteriormente, y a continuación se hirvieron a 100°C durante 10 minutos. Una vez se hubieron hervido se cultivaron las bacterias en placas con agar LM17 y se incubaron durante la noche para confirmar su falta de viabilidad. El cultivo muerto se mezcló con agua estéril para inyectar en una proporción de 2:3, y esta mezcla se utilizó para inyectar tal como se ha descrito anteriormente. De un modo similar, la disolución salina estéril se mezcló asimismo con agua estéril para inyectar y se inyectó como control. Se dejó sin tratar un cuarto cuadrante de cada vaca como control negativo. Se tomaron muestras de leche justo antes de las inyecciones intramamarias (día 0) y en los días 1, 3, 6, 7 y 10 después del tratamiento. A continuación se analizaron todas las muestras con respecto a su actividad inmunitaria tal como se ha descrito anteriormente.

Efecto de la utilización de otras bacterias del ácido láctico

Se cultivó *Lactobacillus plantarum* DPC4922 en un medio MRS en condiciones anaeróbicas a 37°C. Se cultivó *L. lactis* DPC5329, un derivado de *L. lactis* DPC3147, que es incapaz de producir bacteriocina (Bac-), de un modo idéntico al *L. lactis* DPC3147 (tal como se ha descrito anteriormente). Se seleccionaron tres vacas (la vaca 1163, la vaca 1171 y la vaca 1181) para investigar los efectos de inyectar cepas bacterianas probióticas potenciales en la respuesta inmunitaria de las glándulas mamarias de vacas con un recuento bajo de células somáticas. Se utilizaron tres vacas para realizar el seguimiento de las respuestas inmunitarias entre los distintos animales. Se administró un tratamiento distinto a cada cuadrante, distribuyendo los tratamientos en los pezones de un modo aleatorio.

Se tomaron muestras de leche justo antes de las inyecciones intramamarias (día 0), a fin de determinar los niveles basales de subpoblaciones de leucocitos. Se recogieron muestras de leche también en los días 1, 2, 3, 7 y 10 después del tratamiento. Se almacenaron todas las muestras a temperatura ambiente tras el ordeño y se analizaron en menos de tres horas después de la recogida. Se identificaron los neutrófilos y los linfocitos utilizando una combinación de anticuerpos específicos de bovinos y citometría de flujo.

*Preparación de *L. lactis* DPC 3147 liofilizado*

Se inoculó LM17 (200 ml) con un 1% (v/v) de *L. lactis* DPC3147 y se incubó durante la noche a 30°C. A continuación se recogieron mediante centrifugación a 4°C y a 4500 rpm en una centrífuga Sorvall RC 3C plus. Se retiró el sobrenadante y se volvieron a suspender las células en ~150 ml de agua destilada estéril. A continuación se recogieron de nuevo las células por centrifugación y se volvió a suspender el sedimento en ~100 ml de agua destilada estéril. Tras ello, se liofilizaron las células resuspendidas en una preparación pulverulenta durante la noche utilizando un liofili-

ES 2 331 650 T3

zador Modulyo (Edwards). A continuación se volvió a suspender una muestra del polvo resultante en agua destilada estéril como una disolución al 10% y se procedió al recuento de bacterias sembrando diluciones en agar LM17 agar y se incubó durante la noche a 30°C. A continuación se añadieron unas cantidades adecuadas de polvo a 5 ml de agua estéril para inyecciones de tal modo que la concentración final resultó equivalente a aproximadamente 10^9 cfu ml⁻¹.
5 El polvo resuspendido de este modo se utilizó a continuación como mezcla de la inyección.

Comparación entre preparaciones distintas de L. lactis DPC3147

Se preparó, tal como se ha descrito anteriormente, una mezcla para inyectar que comprendía células de *L. lactis* DPC3147 liofilizadas resuspendidas. Esta mezcla y una mezcla estándar para inyectar (caldo de cultivo diluido) se inyectaron al azar en los pezones de tres vacas distintas. Se utilizaron tres vacas distintas para permitir variaciones de la respuesta inmunitaria entre vacas distintas. Se dejó un cuadrante de cada vaca sin tratar como control negativo. Se tomaron muestras de leche justo antes de las inyecciones intramamarias (día 0) para determinar los niveles basales de las subpoblaciones de leucocitos. Se recogieron asimismo muestras de leche en las horas 24 y 48 tras el tratamiento. Se almacenaron todas las muestras a temperatura ambiente tras el ordeño y se analizaron en menos de tres horas después de la recogida. Se identificaron los neutrófilos y los linfocitos tal como se ha indicado anteriormente.

Comparación del tratamiento con L. lactis utilizando caldos de cultivo con el tratamiento con antibióticos

Se realizó un ensayo a pequeña escala para determinar la eficacia del tratamiento con *L. lactis* DPC3147 en comparación con el antibiótico intramamario que se utiliza habitualmente que contiene amoxicilina (200 mg) y ácido clavulánico (50 mg), (synulox, Pfizer animal Health). Se utilizaron 24 cuadrantes infectados de 12 vacas y se inyectaron los cuadrantes con *L. lactis* DPC3147 (285LH, 370RH, 400LH, 598LF, 1157LF, 1170LF, 1183LH, 1658RF, 1807LF, 1827RH, 1867LH, 1868LF) o synulox (285RF, 370RF, 400RH, 598RF, 1157RF, 1157LH, 1170LH, 1183LF, 1807RH, 1807LH, 1867RH, 1868RF). Se administró el antibiótico tres veces, en intervalos de 12 horas, tal como se indica en las instrucciones del productor. Se administró dos veces la inyección de *L. lactis* DPC3147, con un intervalo de 24 h entre las inyecciones. Se realizó el SCC y un análisis microbiológico estándar antes y después de la inyección, y se tomaron asimismo muestras después de 7 días tras la inyección y 12 días tras la inyección.

30 *El tratamiento de la mastitis clínica utilizando una preparación de L. lactis DPC3147 liofilizados resuspendidos en comparación con un control positivo (tratamiento con antibióticos)*

Se realizó este estudio durante un período de 6 meses. Se detectaron 50 casos de mastitis clínica en 48 vacas por parte del personal de la granja durante el ordeño rutinario y se seleccionaron para el ensayo. Los cuadrantes se clasificaron según presentasen mastitis clínica leve (mastitis C1/C2 mastitis, 25 cuadrantes) o grave (mastitis C3/C4, 25 cuadrantes). Se trataron los cuadrantes con el antibiótico Leo Yellow Milking Co® (hidroyoduro de penetamato 150 mg, dihidroestreptomicina 150 mg, sulfato de frameticina 5 mg, Leo Laboratories Ltd., Dublín, Irlanda) o con un cultivo de *L. lactis* DPC 3147 liofilizado resuspendido que se preparó tal como se ha indicado anteriormente. Las inyecciones del cultivo o el antibiótico se administraron tres veces, con un intervalo de 24 h entre cada inyección. Se tomaron muestras de leche en el día 1 antes del tratamiento y después en el día 7 y el día 14 después del tratamiento. Se procedió al recuento de patógenos y se determinó el SCC o la CMT de todas las muestras tal como se ha descrito anteriormente. También se analizaron los cuadrantes en cada ordeño durante el período de ensayo 14 días para detectar cualquier efecto adverso del tratamiento. Los análisis de la muestra del día 14 permitieron clasificar los cuadrantes como “curación” o “no curación”. Los cuadrantes curados se definieron como presentando una “curación clínica” si la leche no presentaba coágulos o copos, y el SCC era $< 9 \times 10^6$ células ml⁻¹. No se tomó en consideración la presencia o ausencia de patógenos cuando se clasificaron como “curación clínica”. Los cuadrantes se definieron como una “curación bacteriológica” si el SCC de la muestra del día 14 era $< 1 \times 10^6$ células ml⁻¹ y el recuento de patógenos era $< 0,5$ cfu μ l⁻¹ en la muestra de leche.

50 *Resultados*

Tratamiento de infecciones crónicas

Se seleccionaron para el tratamiento seis cuadrantes de ubres procedentes de 4 vacas con un historial de infección crónica. Dieciocho horas después de inyectar el cultivo de *L. lactis* DPC3147, se tomaron muestras de la leche a intervalos de hasta aproximadamente 30 días después de la inyección y se procedió al recuento tal como se ha descrito anteriormente. Se identificaron las colonias como *L. lactis* DPC3147 mediante la producción de lacticina 3147. Se identificaron los estafilococos y los estreptococos basándose en su hemólisis característica en el agar sangre. En tres de los cuadrantes (714RH, 714LF y 96RF), tras la inyección de *L. lactis* DPC3147 se produjo un aumento rápido del SCC, y una reducción/eliminación simultánea del patógeno (estafilococos) (Figura 1A). En tres de los cuadrantes (714LH, 700RH y 408RH) persistió la infección a pesar de la inyección del cultivo de lactococos (Figura 1B). Sin embargo, resulta interesante que en los últimos tres cuadrantes de la ubre, no pareció que el cultivo de lactococos colonizara el cuadrante de la ubre (Figura 1B), mientras que en los cuadrantes “curados”, resultó evidente la presencia de *L. lactis* DPC 3147 (Figura 1A). El cultivo de lactococos no sobrevivió a largo plazo en ninguno de los cuadrantes de la ubre. Los recuentos de células somáticas volvieron rápidamente, permaneciendo en ellos, a unos niveles aceptables en todos los cuadrantes.

Tratamiento de la mastitis clínica

Los resultados anteriores nos llevaron a investigar el efecto de inyectar *L. lactis* DPC3147 en cuadrantes afectados clínicamente. Se trataron nueve cuadrantes de 9 vacas con signos clínicos recientes de mastitis. Tras el tratamiento, se recogieron muestras de leche diarias hasta 14 días y de un modo intermitente hasta 55 días. Se procedió al recuento de los cultivos bacterianos en ABA o GM17 tal como se ha descrito anteriormente. En todos los casos la calidad y el aspecto de la leche mejoraron drásticamente después de la inyección del cultivo de lactococos (Figuras 2 a 9). En algunos casos, a pesar de la naturaleza clínica de la leche, no se cultivó patógeno alguno antes de la inyección. Cuando se identificó un patógeno, sin embargo, la inyección del cultivo de *L. lactis* DPC3147 tuvo como resultado la eliminación/reducción del patógeno. Los patógenos eliminados comprendían *Staphylococcus epidermidis* (vaca 14 LH), *S. aureus* (vaca 1184 RF) *E. coli* no hemolítica (vaca 1163 RH) y *Strep. uberis* (vaca 1154 LF y vaca 264 LF) (Tabla 1). En dos casos, aunque el tratamiento tuvo como resultado una mejora en el aspecto y la calidad de la leche, no se eliminó el patógeno. Dichos casos comprendían una infección por *Strep. uberis* (vaca 1176 LH) y una infección por *S. aureus* (vaca 1850 RF) (Tabla 1). Los datos de este ensayo, que comprenden los datos históricos de todas las vacas utilizadas se pueden examinar en los apéndices 1 a 9.

Estudios inmunológicos

Se investigó el efecto del *L. lactis* DPC3147 probiótico en los sistemas inmunitarios de las vacas analizando los niveles de leucocitos y los fenotipos en la leche. En un estudio preliminar se investigó el efecto de *L. lactis* en la respuesta inmunitaria de dos vacas. Se utilizaron un animal infectado y una vaca sin infección. Los resultados (Figura 10) indicaron que la inyección del *L. lactis* DPC3147, pero no la inyección del caldo estéril, tuvo como resultado una acumulación masiva de PMN en la ubre, indicando que el *L. lactis* puede ser un activador específico de la respuesta inmunitaria mamaria y provoca la migración y la acumulación de los PMN. Se realizaron asimismo ensayos de producción del anión superóxido e indicaron que los neutrófilos recién acumulados presentaban una capacidad de absorción respiratoria superior que los neutrófilos que permanecen, proporcionando de este modo a la glándula mamaria un mecanismo efectivo para la eliminación de los patógenos de la mastitis.

A la vista de estos resultados, se realizó un segundo ensayo. Se seleccionó un animal sin infectar (vaca 1803) para investigar los efectos del cultivo de *L. lactis*. Como controles, se inyectó un cuadrante (LF) con un antibiótico para una vaca produciendo leche (Multimast L. C.) y un cuadrante (RF) se dejó sin tratar. Un tercer cuadrante (LH) se inyectó con el sobrenadante sin células de un cultivo realizado por la noche de *L. lactis* DPC3147, y el cuadrante final (RH) se inyectó con el cultivo de *L. lactis* DPC3147 diluido. Se recogieron muestras de leche antes y después de la inyección y se analizaron con respecto al SCC y a la fórmula leucocítica. La Figura 11 presenta las proporciones de neutrófilos (PMN) y linfocitos (CD3) en las muestras de leche antes del tratamiento (hora 0) y después del tratamiento (horas 24 y 48). Se calcularon los valores reales utilizando el porcentaje de células positivas a partir del análisis de citometría de flujo de células vivas/muertas y los resultados del contador de células somáticas Bentley Somacount Somatic Cell Counter. Los niveles de PMN en el cuadrante de control (RF) permanecieron invariables durante el período de ensayo. El cuadrante en el que se inyectó el probiótico (RH) experimentó un aumento drástico en el número de neutrófilos durante el primer período de 24 h de $2,85 \times 10^2$ células/ml antes del tratamiento hasta $1,46 \times 10^4$ células/ml al cabo de 24 h después del tratamiento (Figura 11 y Tabla 2). Los tratamientos con sobrenadante y antibiótico provocaron también un aumento, aunque no tan pronunciado (desde $4-29 \times 10^2$ células/ml hasta $1,68 \times 10^3$ células/ml y desde $5,5 \times 10^2$ hasta $1,3 \times 10^3$ respectivamente), en los niveles de PMN de la leche (Tabla 2). Al cabo de 48 horas, pareció que disminuían los niveles de PMN en el cuadrante tratado con *L. lactis* y en el cuadrante tratado con Multimast, pero continuaron aumentando en el cuadrante tratado con el sobrenadante (Tabla 2). Considerando estos resultados, se puede llegar a la conclusión que la inyección del cultivo de *L. lactis* tuvo como resultado una acumulación masiva de PMN en la ubre durante el período de 24 horas después del tratamiento. El sobrenadante del cultivo provocó asimismo una acumulación de PMN en la ubre y consistió en un aumento más continuo durante 24 horas y siguió aumentando hasta 48 después del tratamiento. El antibiótico Multimast provocó una acumulación temporal más pobre de PMN en la ubre. Estos resultados indican que tanto el cultivo de *L. lactis* como el sobrenadante del cultivo podrían ser activadores específicos de la respuesta del sistema inmunitario mamario y provocar la migración y la acumulación de PMN. Resulta posible que el factor responsable de la respuesta inmunitaria se pudiese liberar en el medio de cultivo, lo que explicaría la migración significativa de PMN como respuesta al sobrenadante del cultivo. Se investigaron asimismo los niveles de linfocitos. El cultivo de *L. lactis* y el sobrenadante del cultivo en un menor grado, activaron una afuencia de linfocitos hacia la ubre; sin embargo, el antibiótico no alteró el nivel de linfocitos presentes cuando se comparó con los valores de control (Tabla 2).

Se investigó la actividad funcional de los PMN de las muestras de leche de cuadrante en todas las muestras antes y después de la inyección. Los resultados de los ensayos de producción del anión superóxido se presentan en las Figuras 12A y 12B. El aumento de varias veces se refiere al aumento proporcional de la producción del anión superóxido por parte de los PMN, desde un estado de reposo (T0) hasta un estado activado tras la activación con acetato de miristato forbol (PMA; incubación durante 10 minutos, {TI 10}). La activación más evidente se produjo en el cuadrante LH que se trató con sobrenadante sin células, con una activación masiva de los neutrófilos al cabo de 24 horas. Sorprendentemente, el tratamiento con el cultivo de *L. lactis* no tuvo como resultado una gran activación de varias veces por parte de los neutrófilos (Figura 12A). Esto se puede explicar, sin embargo, mediante los resultados de los análisis de la intensidad de fluorescencia de todas las muestras (Fig. 12B). La intensidad relativa de fluorescencia constituye una medida de la fluorescencia emitida por las células; una mayor fluorescencia indica una capacidad superior para generar el anión superóxido. Los neutrófilos que permanecen en reposo del cuadrante tratado con *L.*

lactis (T0) y presentaban una capacidad muy elevada de producción del anión superóxido (intensidad de fluorescencia elevada) al cabo de 24 horas y, por lo tanto, no podían presentar un aumento notable de la activación tras el tratamiento con PMA. En resumen, el tratamiento con *L. lactis* tuvo como resultado una acumulación masiva en la ubre de PMN que se encontraban un estado de activación elevada. El tratamiento con Multimast no alteró la producción del anión superóxido en el cuadrante tratado y el cuadrante de control no cambió significativamente durante el período del ensayo (Figuras 12A y 12B). Los PMN acumulados como respuesta al tratamiento con el sobrenadante del cultivo presentaron asimismo una capacidad elevada de producción del anión superóxido, que parecía alcanzar su máximo en el primer período de 24 horas después del tratamiento. Los resultados indicaron que el tratamiento intramamario con *L. lactis* DPC3147 o con el sobrenadante sin células obtenido a partir de dicho cultivo, activaba la respuesta inmunitaria mamaria provocando la afluencia de neutrófilos hacia la glándula mamaria (Figura 11). Dichos neutrófilos recién acumulados presentaron una capacidad de absorción respiratoria superior que los neutrófilos que permanecen (Fig. 12).

Se realizó el seguimiento del recuento de células somáticas cada 24 horas hasta 7 días después del tratamiento. Los recuentos de células se presentan en la Figura 13 y la Tabla 3. Al observar la Figura 13 y la Tabla 3, resulta evidente que el *L. lactis* DPC3147 provoca una gran respuesta celular en 24 horas lo que tiene como resultado un SCC elevado, que alcanza su máximo tras 48 horas con lo que se obtiene una infección clínica leve y progresivamente se llega a un estado normal en el curso de 3 a 4 días. El tratamiento con el sobrenadante del cultivo provocó una respuesta similar. Nuestro análisis de las poblaciones de leucocitos y de los niveles de la actividad de los neutrófilos confirman estos resultados hasta las 48 horas.

Efectos de la utilización de células muertas

A fin de investigar si se requerían *L. lactis* DPC3147 viables para producir la respuesta inmunitaria provocada anteriormente, se prepararon mezclas para inyectar que contenían células vivas o muertas y se inyectaron al azar en los pezones de tres vacas tal como se indica en la Tabla 4. Tanto las células vivas como las muertas provocaron un aumento en el SCC (datos no representados) y, tal como se puede observar en la Figura 14, las células muertas provocaron una pobre afluencia de ambos PMN en cada una de las vacas. Se observó asimismo un aumento en los números de linfocitos (datos no representados). Dicha acumulación de PMN y de linfocitos en los cuadrantes con el cultivo muerto, sin embargo, resultó insignificante en comparación con la afluencia como respuesta al cultivo vivo. Por lo tanto, parece que el *L. lactis* viable, pero no el cultivo muerto, puede provocar específicamente la acumulación de PMN y linfocitos en la glándula mamaria.

Efecto de la utilización de otras bacterias del ácido láctico (LAB)

Al analizar los resultados, surge la cuestión de si el fenómeno de la acumulación de los PMN se limita al propio *L. lactis* DPC3147 o si otras cepas bacterianas pueden ejercer también dicho efecto. Se decidió, por lo tanto, examinar el efecto inyectando otras bacterias apatógenas de una calidad apropiada para alimentos en las ubres de vacas productoras de leche. Se seleccionó una cepa bacteriana, *Lb. plantarum* DPC4922 basándose en su divergencia evolutiva del *L. lactis* (una relación bastante lejana) así como por el hecho de que se aisló originariamente a partir de una fuente alimentaria, por lo que se puede considerar, del mismo modo que el *L. lactis* DPC3147, como un organismo GRAS. Se utilizó asimismo una tercera cepa, el *L. lactis* 5329 (un derivado Bac- del *L. lactis* DPC3147) debido a su gran similitud con el *L. lactis* DPC3147. Se prepararon las mezclas para inyectar tal como se ha descrito en Materiales y Métodos y a continuación se inyectaron las mezclas en los pezones de tres vacas tal como se indica en la Tabla 5. Las Figuras 15 y 16 presentan las proporciones de neutrófilos (PMN) en las muestras de leche procedentes de tres vacas durante el período de ensayo de 10 días. Se calcularon los valores reales utilizando el porcentaje de células positivas a partir del análisis por citometría de flujo de células vivas/muertas y las lecturas del Somacount. La respuesta en las tres vacas resultó variable pero se observó una tendencia similar en cada caso. Los niveles de PMN de los tres cuadrantes sin tratar permanecieron relativamente invariables durante el período del ensayo (Figura 15). El tratamiento con *Lb. plantarum* DPC4922 tuvo como resultado un ligero aumento de los PMN en todos los cuadrantes, que se acercaba a unos niveles similares a los que se obtenían con el tratamiento con *L. lactis* DPC3147 en el día 3 en la vaca 1181 (Figura 15). Sin embargo, la respuesta al *L. lactis* DPC3147 response en la vaca 1181 resultó de algún modo reducida en comparación con los otros dos animales (Fig. 15).

La inyección de *L. lactis* DPC3147 en cada animal tuvo como resultado un aumento drástico de los neutrófilos en el primer período de 24 horas tras el tratamiento. El cultivo Bac- (*L. lactis* DPC5399) provocaba también un aumento en todos los cuadrantes tratados, con unos niveles particularmente superiores de PMN obtenidos en la leche de la vaca 1163. Sin embargo, si se comparan los incrementos proporcionales de PMN con respecto a los D0 (Figura 16), se puede observar que se produce un aumento proporcional significativo en los PMN del cuadrante tratado con *L. lactis* DPC3147 en comparación con el cuadrante tratado con *L. lactis* DPC5399. Parece que la afluencia de PMN se produce antes en los cuadrantes tratados con *L. lactis* DPC3147 (en el día 1) en comparación con los cuadrantes tratados con *L. lactis* DPC5399 (Bac-) o *Lb. plantarum* DPC4922 (Figura 15). En los cuadrantes tratados con los últimos dos tratamientos, se observó únicamente un aumento significativo en el día 2 (Figura 15). Por lo tanto, parece que el *L. lactis* DPC3147 puede provocar una respuesta inmunitaria de mayor intensidad y rapidez que tanto un derivado negativo a la bacteriocina de la misma cepa u otra cepa de LAB, aunque estas últimas cepas pueden provocar asimismo una respuesta más débil.

Comparación de distintas preparaciones de L. lactis DPC3147

A fin de investigar si diferentes preparaciones de *L. lactis* DPC3147, distintas del cultivo estándar preparado durante la noche (preparación del caldo), podían producir la respuesta inmunitaria provocada anteriormente, se prepararon
 5 unas mezclas para inyectar que contenían células liofilizadas o caldos de cultivo. A continuación se inyectaron las mezclas al azar en los pezones de tres vacas tal como se indica en la Tabla 6. Los resultados (Figura 17) muestran un aumento de los PMN en el día 1 en ambos cuadrantes tratados en comparación con el cuadrante sin tratar de una animal examinado. Ello parece que se trata de una mayor afluencia en dos de los cuadrantes tratados con el cultivo
 10 realizado por la noche en comparación con los cuadrantes tratados con el cultivo liofilizado (vaca 275 y vaca 1134) obteniéndose un número superior de PMN con el cultivo liofilizado en el animal restante (vaca 2810). Las variaciones en la respuesta se deben a las variaciones normales de la respuesta inmunitaria entre animales distintos. Por lo tanto, las preparaciones “frescas” y liofilizadas de *L. lactis* DPC3147 pueden provocar una respuesta inmunitaria en la glándula mamaria.

Comparación del tratamiento con L. lactis DPC3147 con un tratamiento intramamario con antibióticos

Los efectos de la utilización del tratamiento con *L. lactis* DPC3147 con respecto a la utilización de un tratamiento con antibióticos empleado habitualmente tanto en el tratamiento como en la prevención de infecciones intramamarias provocadas por *S. aureus* se representan en la Tabla 7. Tal como se puede observar en la Tabla, en el día 7, los
 20 resultados con el *L. lactis* eran muy prometedores, con estafilococos aislados a partir de únicamente dos cuadrantes de los 7 cuadrantes infectados con dicho organismo. En comparación, los cuadrantes tratados con synulox eliminaban el *S. aureus* en 6 de los 8 cuadrantes infectados originalmente. Sin embargo, en el día 12, dos cuadrantes más inyectados con *L. lactis* eliminaban asimismo el *S. aureus*, proporcionando un total de 3/7 “curados” mediante el tratamiento con *L. lactis* a diferencia de los 2/8 “curados” mediante el tratamiento con synulox. Estos datos indican que el tratamiento
 25 con *L. lactis* DPC3147 resulta tan efectivo en la eliminación de infecciones como el tratamiento con synulox.

El tratamiento de la mastitis clínica utilizando una preparación liofilizada resuspendida de L. lactis DPC3147 en comparación con un control positivo (tratamiento con antibióticos)

En este estudio, se realizó la comparación de la eficacia de la inyección de una preparación liofilizada resuspendida de *L. lactis* DPC3147 (aproximadamente 10^9 cfu ml⁻¹) en el tratamiento de la mastitis clínica con la eficacia de utilizar un antibiótico intramamario comprobado. En conjunto, 18 de los 25 casos tratados con el antibiótico se definieron como presentando una “curación clínica” en el día 14. De dichos 18 cuadrantes, nueve se definieron como presentando una “curación bacteriológica”, es decir, el SCC era $< 1 \times 10^6$ células ml⁻¹ y el recuento bacteriológico era $< 0,5$ cfu
 35 μ l⁻¹ en la muestra de leche. Ello corresponde a un índice de curación clínica global del 72% y a un índice de curación bacteriológica del 36% para los cuadrantes tratados con el antibiótico. En el caso de los cuadrantes tratados con la preparación liofilizada resuspendida de *L. lactis* DPC3147, 16 (de 25) casos presentaron una “curación clínica” y 7 (de 25) casos presentaron una “curación bacteriológica”. Ello corresponde a un índice de curación clínica del 64% y a un índice de curación bacteriológica del 28% para los cuadrantes tratados con el probiótico. Al comparar los dos
 40 tratamientos, el índice de curación clínica resultó del 72% en comparación con el 64% y el índice de curación bacteriológica resultó del 36% en comparación con el 28% con el antibiótico con respecto a los tratamientos con *L. lactis*, respectivamente. Cuando se compararon dichos valores utilizando la prueba de la probabilidad exacta de Fischer, no se detectaron diferencias estadísticas entre los tratamientos. Ello indica que la inyección de la preparación liofilizada resuspendida de *L. lactis* DPC3147 resultaba tan efectiva como un antibiótico en el tratamiento de la mastitis clínica.
 45 Cuando se subdividieron los grupos de tratamiento en función de la gravedad de la mastitis del cuadrante (es decir, subgrupos C1/C2 o subgrupos C3/C4) se observó una tendencia similar. En el grupo C1/C2, 8 de los 12 casos tratados con el antibiótico presentaron una curación clínica (66,7%). De ellos, 4 casos presentaron una “curación bacteriológica” (33,3%). Trece cuadrantes con mastitis C1/C2 se trataron con *L. lactis* DPC3147, y dichos cuadrantes alcanzaron un índice de curación clínica del 76,9% y un índice de curación bacteriológica del 30,8%. En el grupo C3/C4, 10
 50 de los 13 casos tratados con el antibiótico presentaron curación clínica (76,9%). De ellos, 5 casos presentaron una “curación bacteriológica” (38,5%). De los doce cuadrantes con mastitis C3/C4 que se trataron con *L. lactis* DPC3147, 6 alcanzaron una curación clínica (50%) y 3 se definieron como presentando una curación bacteriológica (25%). La comparación de todos estos valores utilizando la prueba de la probabilidad exacta de Fischer indicó que no existía una diferencia significativa entre el índice de curación clínica o bacteriológica, con independencia del tratamiento en cualquiera de los cuadrantes con mastitis C1/C2 o los cuadrantes con mastitis C3/C4. Por lo tanto, se puede llegar a
 55 la conclusión que la inyección intramamaria de una preparación liofilizada resuspendida de *L. lactis* DPC3147 resulta tan efectiva como un antibiótico intramamario en el tratamiento de la mastitis clínica.

Conclusiones

A partir de estos resultados se pueden extraer diversas conclusiones. En primer lugar, resulta evidente que la inyección intramamaria de *L. lactis* DPC3147 en vacas con infecciones crónicas tiene como resultado un aumento rápido del SCC, seguido a menudo con la eliminación de la infección. Además, la inyección en vacas con mastitis clínica recién adquirida tiene como resultado una rápida mejora de la calidad de la leche. Se ha demostrado que el tratamiento
 65 con *L. lactis* DPC3147 también resulta tan efectivo como la utilización de un antibiótico intramamario de amplio uso comercial en el tratamiento y la prevención de infecciones intramamarias provocadas por *S. aureus*. Resulta posible, por lo tanto, que la inyección de *L. lactis* actúe como estímulo que provoca la liberación de factores proinflamatorios y dé lugar a la acumulación de neutrófilos en la glándula mamaria. Los resultados de los estudios inmunológicos des-

tacan un cierto número de descubrimientos importantes que pueden aportar alguna luz al mecanismo de acción de las bacterias probióticas *L. lactis* en la glándula mamaria. Dichos descubrimientos comprenden los siguientes:

- El tratamiento intramamario tanto con un cultivo de *L. lactis* como con el sobrenadante de un cultivo activa la respuesta inmunitaria mamaria iniciando la afluencia de neutrófilos hacia la glándula mamaria.

- El cultivo con *L. lactis* y el sobrenadante del cultivo parecen ser específicos en la provocación de la acumulación de PMN en la ubre, cuando se compara con el antibiótico Multimast L. C.

- Dichos neutrófilos recién acumulados presentan una capacidad de absorción respiratoria superior que los neutrófilos que permanecen, proporcionando de este modo un mecanismo efectivo para la eliminación de los patógenos de la mastitis.

- El/los factor(es) responsable(s) de la provocación de una respuesta inmunitaria en la ubre puede(n) ser factor(es) soluble(s) liberado(s) en el medio de cultivo, dicho(s) factor(es) ha(n) de ser termolábil(es) o destruido(s)/utilizado(s) rápidamente cuando se matan las células, ya que las células muertas más el sobrenadante no provocan una respuesta inmunitaria.

- El cultivo de *L. lactis* ha de ser viable para provocar una respuesta inmunitaria adecuada, aunque una preparación liofilizada resulta asimismo efectiva en la estimulación del sistema inmunitario de la glándula mamaria.

- Otras LAB pueden provocar también una respuesta inmunitaria en la glándula mamaria, de un modo similar al *L. lactis* DPC 3147, aunque posiblemente no en el mismo grado que el *L. lactis* DPC 3147. Ello implica que otras LAB pueden ser también capaces de curar mastitis clínicas en vacas lecheras y en otros animales si los cuadrantes infectados se inyectan con dichos cultivos.

- El tratamiento con un cultivo de *L. lactis* o con una preparación liofilizada de *L. lactis* DPC3147 resulta tan efectivo en la eliminación de infecciones como el tratamiento antibiótico intramamario.

Los términos “comprende/comprendiendo” y los términos “presentando/incluyendo” cuando se utilizan en la presente memoria con referencia a la presente invariables se utilizan para especificar la presencia de las características, enteros, etapas o componentes indicados aunque no excluye la presencia o adición de una o más características, enteros, etapas, componentes o grupos de los mismos.

Referencias

Alvarez, S., Herrero, C., Bru, E. y G. Perdigon (2001). Effect of *Lactobacillus casei* and yoghurt administration on prevention of *Pseudomonas aeruginosa* infection in young mice. *J. Food Prot.* 64: 1768-1774.

Alvarez-Olmos, M. I. y R. A. Oberhelman. 2001. Probiotic agents and infectious diseases: a modern perspective on a traditional therapy. *Clin. Infect. Diseases* 32: 1567-1576.

Blackburn, P. Projan, S. J. y E. B. Goldberg. 1994. Pharmaceutical bacteriocin compositions and methods for doing the same. United States Patent 5: 304, 540.

Cross, M. L. 2002. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS Immun. Med. Microbiol.* 1442: 1-9.

Galvin, M., Hill, C. y R. P. Ross. 1999. Lactacin 3147 displays activity in buffer against Gram-positive bacterial pathogens which appear sensitive in standard plate assays. *Lett. Appl. Microbiol.* 28: 355-358.

Gardiner, G. E., Heinmann, C., Bruce, A. W., Beuerman, D. y G. Reid. 2002. Persistence of *Lactobacillus fermentum* RC-14 and *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 but not *L. rhamnosus* GG in the human vagina as demonstrated by randomly amplified polymorphic DNA. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9: 92-96.

Morgan, S. M., Galvin, M., Kelly, J., Ross, R. P. y C. Hill. 1999. Development of a lactacin 3147 enriched whey powder with inhibitory activity against foodborne pathogens. *J. Food Protection.* 62: 1011-1016.

Parente, E., y C. Hill. (1992). Comparison of factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 73: 290-298.

Perdigon, G., de Marcias, M. E. N., Alvarez, S., Oliver, G. y A. P. de Ruiz Holgado. 1990a. Prevention of gastrointestinal infection using immunobiological methods with milk fermented with *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Res.* 57: 255-264.

Perdigon, G., Alvarez, S., de Marcias, M. E. N., Roux, M. E. y A. P. de Ruiz Holgado. 1990b. The oral administration of lactic acid bacteria increases the mucosal immunity in response to enteropathogens. *J. Food Protect.* 53: 404-410.

Perdigon, G., Alvarez, S. y A. P. de Ruiz Holgado. 1991. Immunoadjuvant activity of oral *Lactobacillus casei*: influence of dose on the secretory immune response and protective capacity in intestinal infections. *J. Dairy Res.* 58: 485-496.

Reid, G., Beuerman, D., Heinemann, C. y A. W. Bruce. 2001. Probiotic lactobacillus dose required to restore and maintain a normal vaginal flora. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 32: 37-41.

Ross, R. P., Galvin, M., McAuliffe, O., Morgan, S., Ryan, M., Twomey, D., Meaney, W. y C. Hill. 1999. Developing applications for lactococcal bacteriocins. *Antonie van Leeuwenhoek* 76: 337-346.

Ryan, M. P., Flynn, J., Hill, C., Ross, R. P. y W. J. Meaney. 1999. The natural food grade inhibitor, lacticin 3147 can prevent mastitis in non-lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82: 2625-2631.

Sears, P.M., Peele, J., Lassauzet, M., y P. Blackburn. 1995. Use of antimicrobial proteins in the treatment of bovine mastitis. In: Proceedings of the 3rd International Mastitis seminar (p 17-18).

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

Referencias citadas en la descripción

La presente lista de referencias citadas por el solicitante se presenta únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de patente europea. Aunque se han compilado las referencias muy cuidadosamente, no se pueden excluir errores u omisiones y la Oficina Europea de Patentes (EPO) declina toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patente citados en la descripción

- US 5304540 A [0050]

Documentos citados en la descripción que no corresponden a patentes

Alvarez, S., Herrero, C., Bru, E. y G. Perdigon (2001). Effect of *Lactobacillus casei* and yoghurt administration on prevention of *Pseudomonas aeruginosa* infection in young mice. *J. Food Prot.*, 2001, vol. 64: 1768-1774 [0050]

Alvarez-Olmos, M. I. y R. A. Oberhelman. Probiotic agents and infectious diseases: a modern perspective on a traditional therapy. *Clin. Infect. Diseases*, 2001, vol. 32: 1567-1576 [0050]

Cross, M. L. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS Immun. Med. Microbiol.* 2002, vol. 1442: 1-9 [0050]

Galvin, M., Hill, C. y R. P. Ross. Lacticin 3147 displays activity in buffer against Gram-positive bacterial pathogens which appear sensitive in standard plate assays. *Lett. Appl. Microbiol.*, 1999, vol. 28: 355-358

Gardiner, G. E., Heinmann, C., Bruce, A. W., Beuerman, D. y G. Reid. Persistence of *Lactobacillus fermentum* RC-14 and *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 but not *L. rhamnosus* GG in the human vagina as demonstrated by randomly amplified polymorphic DNA. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2002, vol. 9: 92-96 [0050]

Morgan, S. M., Galvin, M., Kelly, J., Ross, R. P. y C. Hill. Development of a lacticin 3147 enriched whey powder with inhibitory activity against foodborne pathogens. *J. Food Protection.*, 1999, vol. 62: 1011-1016 [0050]

Parente, E., y C. Hill. Comparison of factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria. *J. Appl. Bacteriol.*, 1992, vol. 73: 290-298 [0050]

Perdigon, G., de Marcias, M. E. N., Alvarez, S., Oliver, G. y A. P. de Ruiz Holgado. Prevention of gastrointestinal infection using immunobiological methods with milk fermented with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Res.*, 1990, vol. 57: 255-264 [0050]

Perdigon, G., Alvarez, S., de Marcias, M. E. N., Roux, M. E. y A. P. de Ruiz Holgado. The oral administration of lactic acid bacteria increases the mucosal immunity in response to enteropathogens. *J. Food Protect.*, 1990, vol. 53: 404-410 [0050]

Perdigon, G., Alvarez, S. y A. P. de Ruiz Holgado. Immunoadjuvant activity of oral *Lactobacillus casei*: influence of dose on the secretory immune response and protective capacity in intestinal infections. *J. Dairy Res.*, 1991, vol. 58: 485-496 [0050]

ES 2 331 650 T3

Reid, G., Beuerman, D., Heinemann, C. y A. W. Bruce. Probiotic lactobacillus dose required to restore and maintain a normal vaginal flora. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2001, vol. 32: 37-41 [0050]

Ross, R. P., Galvin, M., McAuliffe, O., Morgan, S., Ryan, M., Twomey, D., Meaney, W. y C. Hill. Developing applications for lactococcal bacteriocins. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1999, vol. 76: 337-346 [0050]

Ryan, M. P., Flynn, J., Hill, C., Ross, R. P. y W. J. Meaney. The natural food grade inhibitor, lacticin 3147 can prevent mastitis in non-lactating dairy la vacas. *J. Dairy Sci.*, 1999, vol. 82: 2625-2631 [0050]

Sears, P.M., Peele, J., Lassauzet, M., y P. Blackburn. Use of antimicrobial proteins in the treatment of bovine mastitis. *Proceedings of the 3rd International Mastitis seminar*, 1995, 17-18 [0050]

Twomey, D. P., Wheelock, A. I., Flynn, J., Meaney, W. J., Hill, C. y R. P. Ross. Protection against *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy la vacas using a bismuth-based teat seal containing the bacteriocin, lacticin 3147. *J. Dairy Sci.*, 2000, vol. 83: 1981-1988 [0050]

REIVINDICACIONES

1. Utilización de un cultivo vivo de una bacteria probiótica apatógena de una calidad apropiada para alimentos o del sobrenadante de un cultivo vivo de una bacteria probiótica apatógena de una calidad apropiada para alimentos en la preparación de una composición para estimular el sistema inmunitario, en la que se selecciona una cepa de *Lactococcus* de entre los grupos que comprenden: *Lactococcus lactis* DPC3147, *Lactococcus lactis* DPC5399 y *Lb. plantarum* DPC4922, estando destinada la composición a ser utilizada en el tratamiento de una infección de tipo mastitis.

2. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el cultivo vivo de una bacteria probiótica apatógena de una calidad apropiada para alimentos se encuentra liofilizado.

3. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en la que el cultivo vivo o el sobrenadante están destinados a ser utilizados en la estimulación de las células polimorfonucleares (PMN) a fin de provocar una respuesta inmunitaria.

Tabla 1. Patógenos aislados y recuentos de células somáticas de la leche antes y después de la inyección.

Vaca n.º / Cuadrante	Patógeno aislado	Patógeno s día 0	Patógenos después de la inyección ^s	Puntuación clínica [¥]	SCC después de la inyección * x 1000/ml	SCC Final ³ x 1000/ml
14LH	<i>S. epidermis</i>	++++	0	3	2500	237
1850RF	<i>S. aureus</i>	++++	+	4	1890	898
1184RF	<i>S. aureus</i>	+	0	1	531	85
1154LF	<i>Strep. uberis</i>	++++	0	5	2585	333
264LF	<i>Strep. uberis</i>	++++	0	3	3239	269
6LH11	<i>Strep. uberis</i>	++++	++++	2	6354	5992
1163RH	<i>E. coli</i> no hemolítica	++++	0	3	846	148
1178LH	Sin bacterias	0	0	5	1814	90
717RF	Sin bacterias	0	0	2	933	43

++++ Demasiado numerosas para realizar el recuento

+ = 500 - 1000 cfu ml⁻¹

¥ Todas las vacas eran clínicas. La puntuación se calculó a partir del aspecto clínico de la leche y de cualquier irregularidad adicional (por ejemplo, coágulos visibles en la leche). Un valor de 0 indica que la leche era subclínica en cuyo caso se determinó el SCC. Dichas puntuaciones clínicas se utilizaron asimismo en la elaboración de los gráficos de los datos.

* Se tomaron muestras de la vaca 14LH y la vaca 717 en el día 4. La vaca 1184RF y la vaca 1154LF en el día 6, la vaca 302RF en el día 7, la vaca 1163RH y la vaca 1850RF en el día 8, la vaca 1178LH y la vaca 1176LH en el día 12 y la vaca 264 LF en el día 16.

^s Se tomaron muestras de la vaca 1154LF en el día 8, la vaca 1184RF en el día 16, la vaca 1163RH en el día 25, la vaca 264LF en el día 35, la vaca 14LH y la vaca 717RF en el día 36, la vaca 1650 en el día 40 y la vaca 1178 en el día 55.

Tabla 2. Niveles de PMN y linfocitos (CD 3) en todos los cuadrantes de la vaca 1803 antes y después de cada tratamiento durante el período de ensayo de 48 horas.

Cuadrante	PMN			CD3		
	0 h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h
Anterior derecho (RF) ¹	215	253	101	77,7	218	129
Posterior derecho (RH) ¹	285	14600	5850	108	2920	4280
Anterior izquierdo (LF) ¹	551	1330	297	143	596	137
Posterior izquierdo (LH) ¹	429	1680	3330	85,1	651	2500

1. Las mezclas para inyección se prepararon tal como se describe en Materiales y Métodos y se trataron los cuadrantes del siguiente modo: RF: sin tratar, RH: *L. lactis* DPC3147; LF: Antibiótico (Multimast) y LH: sobrenadante sin células.

Tabla 3. Recuento de células somáticas (x 1000/ml) de la leche en cuatro cuadrantes de ubres analizadas con respecto a las respuestas inmunitarias en la vaca 1803.

Días (horas)	Anterior derecho ^a (RF)	Posterior derecho ^a (RH)	Anterior izquierdo ^a (LF)	Posterior izquierdo ^a (LH)
0 (0)*	66	1	158	7
1 (24)	149	121	1834	95
2 (48)	43	1150	99	1542
2 (60)	94	Clínica	908	3360
3 (72)	4	2779	69	6296
4 (96)	9	656	81	202
6 (120)	69	85	58	54

* día 0 = Tiempo de inyección. Se tomaron muestras cada día después de la inyección.

^a El cuadrante RF se dejó sin tratar, los cuadrantes RH, LF y LH se inyectaron con un cultivo de *L. lactis* DPC3147 realizado durante la noche, el antibiótico Multimast o el sobrenadante de un cultivo sin células procedente de un cultivo de *L. lactis* DPC3147 realizado durante la noche.

Tabla 4. Distribución de los tratamientos entre los pezones en el ensayo para investigar la capacidad de los lactococos muertos para provocar una respuesta inmunitaria.

Vaca	Cuadrante	Tratamiento
1137	RF	Disolución salina ¹
1137	RH	Vivas ²
1137	LF	Control ³
1137	LH	Muertas ⁴
1852	RF	Muertas ⁴
1852	RH	Disolución salina ¹
1852	LF	Control ³
1852	LH	Vivas ²
1570	RF	Control ³
1570	RH	Vivas ²
1570	LF	Disolución salina ¹
1570	LH	Muertas ⁴

1. Tratamiento con disolución salina: se inyectaron los cuadrantes con 2 ml de disolución salina estéril (0,85% NaCl (p/v)) más 3 ml de agua estéril para inyectar.
2. Tratamiento con un cultivo vivo: se inyectaron los cuadrantes con 2 ml de caldo de cultivo de *L. lactis* DPC3147 realizado durante la noche más 3 ml de agua estéril para inyectar.
3. Controles sin tratar.
4. Tratamiento con un cultivo muerto. Un caldo de cultivo de *L. lactis* DPC3147 se mató hirviéndolo durante 10 minutos. A continuación se inyectaron en los cuadrantes 2 ml del cultivo muerto más 3 ml de agua estéril para inyectar.

Tabla 5. Distribución de los tratamientos en cada uno de los doce cuadrantes de las tres vacas utilizadas para determinar el efecto de inyectar distintas cepas de LAB en la respuesta inmunitaria de las vacas

Vaca n.º	Cuadrante	Tratamiento
1163	RF	<i>Lb. plantarum</i> ¹
	RH	Sin tratar
	LF	<i>L. lactis</i> 3147 ²
	LH	Bact. neg. ³
1171	RF	<i>L. lactis</i> 3147 ²
	RH	Bact. neg. ³
	LF	<i>Lb. plantarum</i> ¹
	LH	Sin tratar
1181	RF	<i>L. lactis</i> 3147 ²
	RH	<i>Lb. plantarum</i> ¹
	LF	Sin tratar
	LH	Bact. neg. ³

1. Tratamiento con *Lb. plantarum*: 2 ml de cultivo de *Lb. plantarum* DPC4922 realizado durante la noche y 3 ml de agua estéril para inyectar.

2. Tratamiento con *L. lactis* DPC3147: 2 ml de cultivo de *L. lactis* DPC3147 realizado durante la noche y 3 ml de agua estéril para inyectar.

3. Tratamiento con Bact. neg.: 2 ml de cultivo de *L. lactis* DPC5329 realizado durante la noche (mutante de *L. lactis* DPC3147 que carece de bacteriocina) y 3 ml de agua estéril para inyectar.

Tabla 6. Tratamientos en cada uno de los doce cuadrantes de las tres vacas utilizadas para determinar el efecto de inyectar distintas preparaciones de *L. lactis* DPC3147 n la respuesta inmunitaria de las vacas.

Vaca n.º	Cuadrante	Tratamiento
275	RF	Cultivo liofilizado ¹
	RH	Caldo de cultivo ²
	LF	Sin tratar ³
1134	RH	Cultivo liofilizado ¹
	RF	Caldo de cultivo ²
	LF	Sin tratar ³
2810	LF	Cultivo liofilizado ¹
	RH	Caldo de cultivo ²
	RF	Sin tratar ³

¹ Cultivo liofilizado: se preparó el polvo liofilizado tal como se describe en Materiales y Métodos y se resuspendió en un volumen total de 5 ml.

² Caldo de cultivo: se diluyó con agua un cultivo de *L. lactis* DPC3147 preparado por la noche tal como se describe en Materiales y Métodos y se utilizó como mezcla para inyectar.

³ Sin tratar: cuadrantes de control sin tratar.

Tabla 7. Efectos de utilizar los tratamientos con *L. lactis* DPC3147 en comparación con el tratamiento con el antibiótico intramamario synulox.

Vaca n.º	Cuad.	Tratamiento	Día 0		Día 7		Día 12	
			SCC	<i>S. aureus</i>	SCC	<i>S. aureus</i>	SCC	<i>S. aureus</i>
285	LH	5 ml de <i>L. lactis</i> 2 x 24 h	4759	0 ¹	2437	0	6138	0
370	RH	5 ml de <i>L. lactis</i> 2 x 24 h	5227	+ ¹	271	0	2399	0
400	LH	5 ml de <i>L. lactis</i> 2 x 24 h	592	++ ^{1,2}	2892	0	1358	0
598	LF	5 ml de <i>L. lactis</i> 2 x 24 h	2388	0	3954	0	2697	0
1157	LF	5 ml de <i>L. lactis</i> 2 x 24 h	121	0	2094	0	872	0
1170	LF	5 ml de <i>L. lactis</i> 2 x 24 h	3690	++	1568	++	3939	++
1183	LH	5 ml de <i>L. lactis</i> 2 x 24 h	3638	++	859	++	138	++
1658	RF	5 ml de <i>L. lactis</i> 2 x 24 h	5601	+	3143	0	2604	0
1807	LF	5 ml de <i>L. lactis</i> 2 x 24 h	390	0	2325	0	1124	++
1827	RH	5 ml de <i>L. lactis</i> 2 x 24 h	2892	++	1752	0	2998	+
1867	LH	5 ml de <i>L. lactis</i> 2 x 24 h	2057	+++ ¹	1791	+++	2388	+++
1868	LF	5 ml de <i>L. lactis</i> 2 x 24 h	661	0	3631	0	1568	0
285	RF	Synulox 3 x 12 h	7659	+	2721	+	5318	+
370	RF	Synulox 3 x 12 h	761	++	209	0	406	0
400	RH	Synulox 3 x 12 h	1735	++	2001	0	1141	0
598	RF	Synulox 3 x 12 h	2160	+++	2073	+++	2862	+++
1157	RH	Synulox 3 x 12 h	2999	+	2885	++	1539	+
1157	LH	Synulox 3 x 12 h	86	0	109	0	377	0
1170	LH	Synulox 3 x 12 h	428	0	301	0	854	0
1183	LF	Synulox 3 x 12 h	1602	0	450	0	206	0

ES 2 331 650 T3

1807	RH	Synulox 3 x 12 h	3371	+	3456	0	6052	0
1807	LH	Synulox 3 x 12 h	3030	0	1974	+++	2730	+
1867	RH	Synulox 3 x 12 h	1653	+++	1674	++	1885	++
1868	RF	Synulox 3 x 12 h	6684	+	4051	+	4281	++

1. Se procedió al recuento y la puntuación de las bacterias según los criterios siguientes: 0 = ausencia de patógenos + = < 40 cfu 10 µl-1, ++ = 40 - 400 cfu 10 µl-1 y +++ = > 400 cfu 10 µl-1

2. Infección con *Streptococcus uberis*

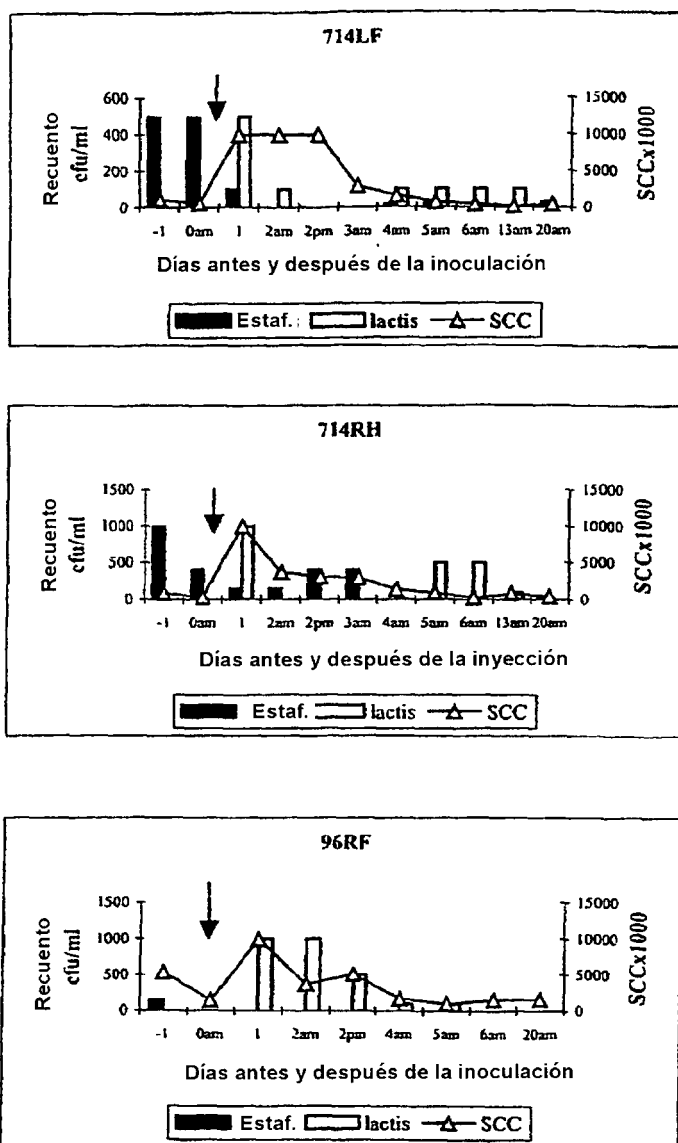


Figura 1A. Valores del recuento de células somáticas y bacteriano en los cuadrantes 714RH, 714LF y 96RF. La flecha negra indica el tiempo de inyección. Se proporcionó arbitrariamente un valor de 10000 x 1000 SCC ml^{-1} a la respuesta clínica. Los recuentos bacterianos se expresan como cfu ml^{-1} . Cuando se encuentran presentes menos de 400 bacterias ml^{-1} , las bacterias se contaron con precisión. A los valores superiores a éste se les asignó un valor arbitrario de 500 ó 1000 (cuando las bacterias resultaban demasiado numerosas para contar) bacterias ml^{-1} .

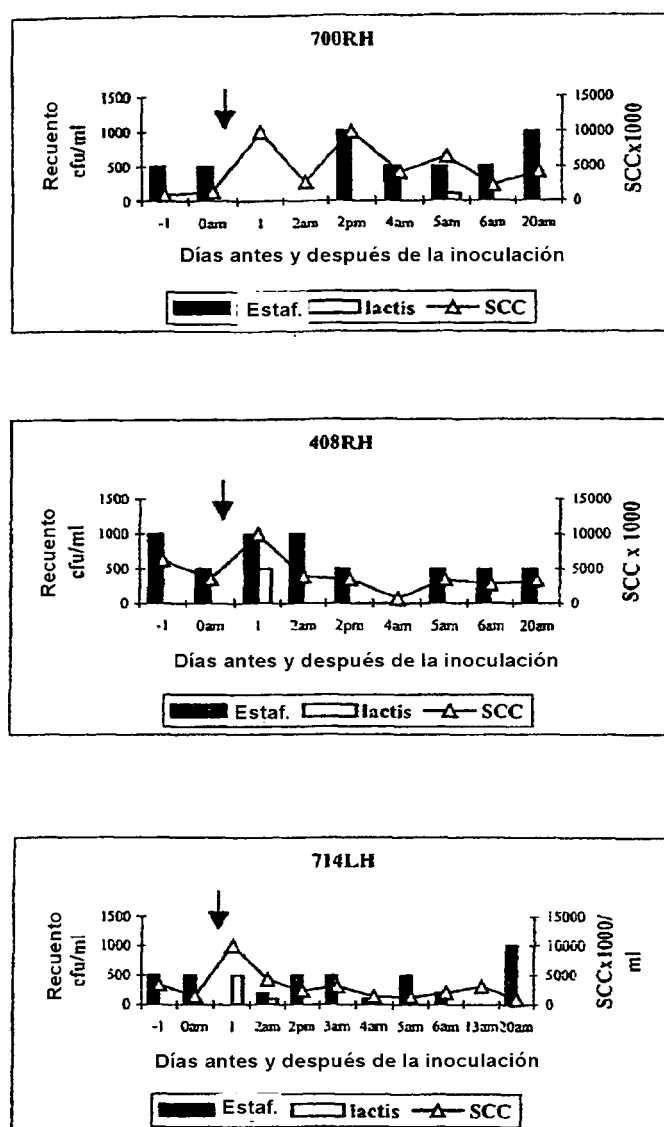


Figura 1B. Valores del recuento de células somáticas y bacteriano en los cuadrantes 700RH, 40SRH y 714LH. La flecha negra indica el tiempo de inyección. Se proporcionó arbitrariamente un valor de 10000 x 1000 SCC ml^{-1} a la respuesta clínica. Los recuentos bacterianos se expresan como cfu ml^{-1} . Cuando se encuentran presentes menos de 400 bacterias ml^{-1} , las bacterias se contaron con precisión. A los valores superiores a éste se les asignó un valor arbitrario de 500 ó 1000 (cuando las bacterias resultaban demasiado numerosas para contar) bacterias ml^{-1} .

Vaca 1154LF. Muestras de leche antes de la inyección (izquierda) y después de la inyección (derecha).



Figura 2A. Aspecto de las muestras de leche procedentes de la vaca 1154LF tomadas antes y después de la inyección con *Lactobacillus lactis* DPC 3147. Las muestras se presentan en el día 0 y 7 días después de la inyección.

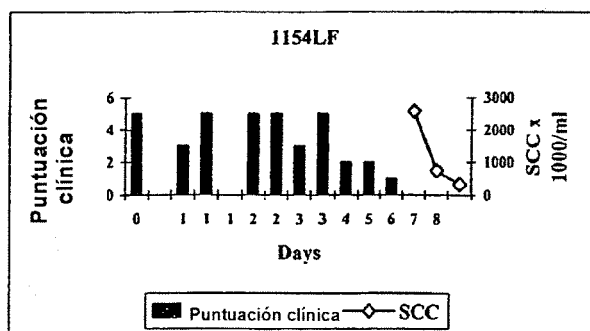


Figura 2B. Gráficos del recuento de células somáticas y la puntuación clínica en la leche de la vaca 1154LF a partir de las muestras tomadas antes y después de la inyección con *L. lactis* DPC 3147.

Vaca 1178LH. Antes de la inyección (día 0) y después de la inyección (día 7).



Figura 3A. Aspecto de las muestras de leche procedentes de la vaca 1178LH tomadas antes y después de la inyección con *Lactococcus lactis* DPC 3147. Las muestras se presentan en el día 0 y 7 días después de la inyección.

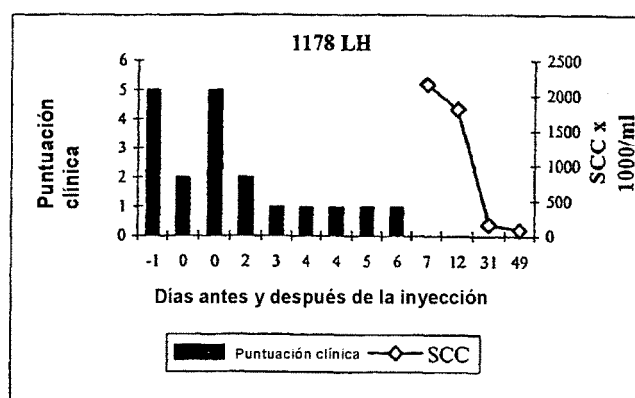


Figura 3B. Gráficos del recuento de células somáticas y la puntuación clínica en la leche de la vaca 1178LH a partir de las muestras tomadas antes y después de la inyección con *L. lactis* DPC 3147.

Vaca 1850RF. Antes de la inyección (día 0) y después de la inyección (día 9).



Figura 4A. Aspecto de las muestras de leche procedentes de la vaca 1850RF tomadas antes y después de la inyección con *Lactococcus lactis* DPC 3147. Las muestras se presentan en el día 0 y 9 días después de la inyección.

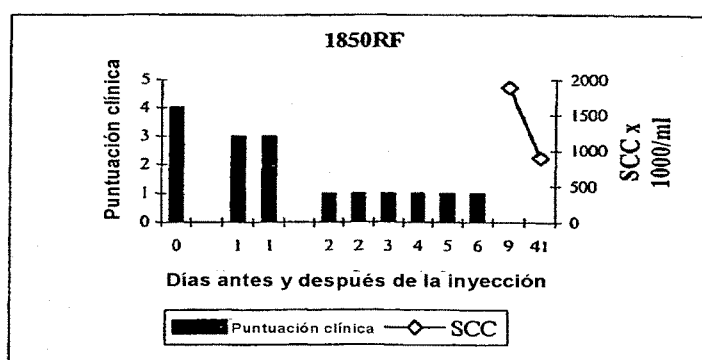


Figura 4B. Gráficos del recuento de células somáticas y la puntuación clínica en la leche de la vaca 1850RF a partir de las muestras tomadas antes y después de la inyección con *L. lactis* DPC 3147.

Vaca 1163RH. Antes de la inyección (día 0) y después de la inyección (día 7).

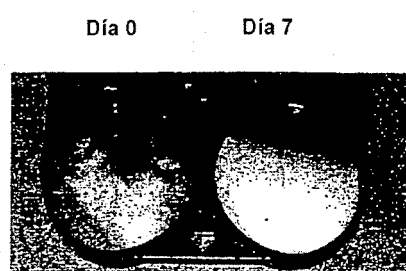


Figura 5A. Aspecto de las muestras de leche procedentes de la vaca 1163RH tomadas antes y después de la inyección con *Lactococcus lactis* DPC 3147. Las muestras se presentan en el día 0 y 7 días después de la inyección.

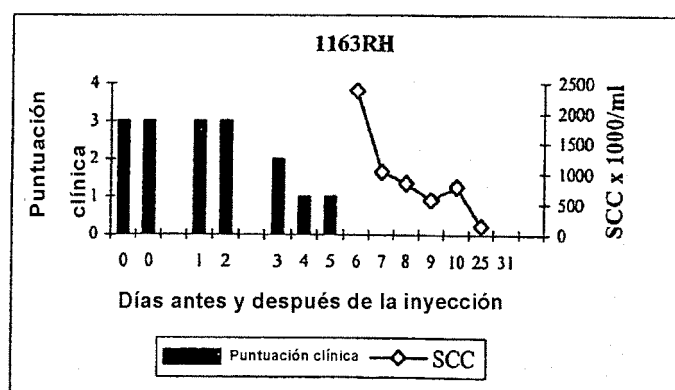


Figura 5B. Gráficos del recuento de células somáticas y la puntuación clínica en la leche de la vaca 1163RH a partir de las muestras tomadas antes y después de la inyección con *L. lactis* DPC 3147.

Vaca 1184RF. Muestras de leche antes de la inyección y después de la inyección.



Figura 6A. Aspecto de las muestras de leche procedentes de la vaca 1184RF tomadas antes y después de la inyección con *Lactococcus lactis* DPC 3147. Las muestras se presentan en el día 0 y 3 días después de la inyección.

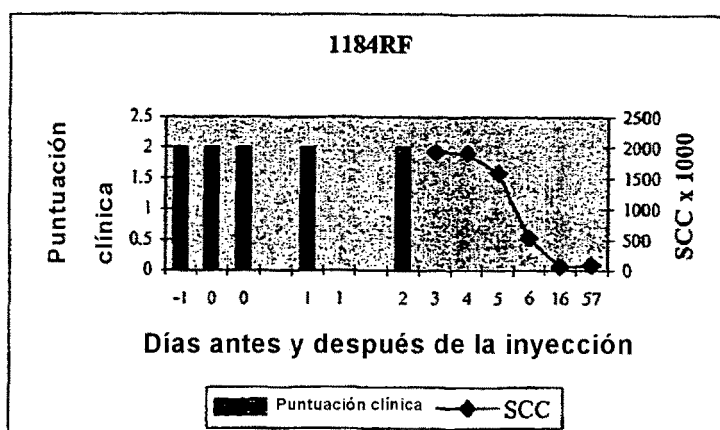


Figura 6B. Gráficos del recuento de células somáticas y la puntuación clínica en la leche de la vaca 1184RF a partir de las muestras tomadas antes y después de la inyección con *L. lactis* DPC 3147.

Vaca 14LH. Muestras de leche antes de la inyección (izquierda) y después de la inyección (derecha)

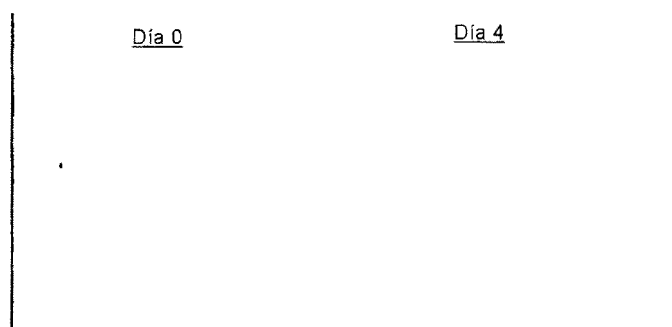


Figura 7A. Aspecto de las muestras de leche procedentes de la vaca 14LH tomadas antes y después de la inyección con *Lactococcus lactis* DPC 3147. Las muestras se presentan en el día 0 y 4 días después de la inyección.

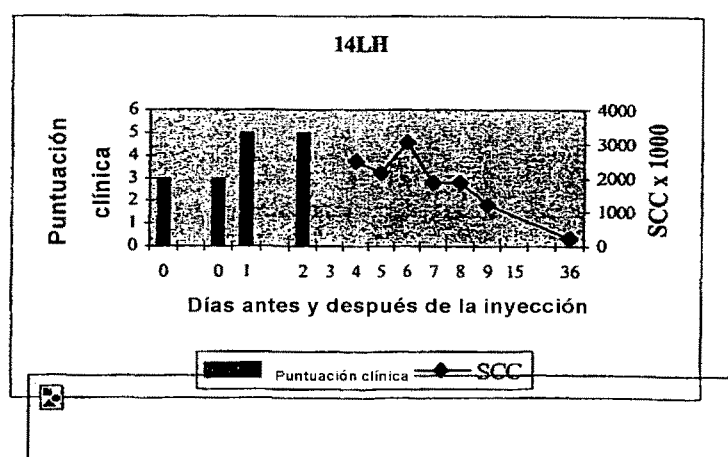


Figura 7B. Gráficos del recuento de células somáticas y la puntuación clínica en la leche de la vaca 14LH a partir de las muestras tomadas antes y después de la inyección con *L. lactis* DPC 3147.

Figura 8A. Aspecto de las muestras de leche procedentes de la vaca 717RF tomadas antes y después de la inyección con *Lactococcus lactis* DPC 3147. Las muestras se presentan en el día 0 y 3 días después de la inyección.

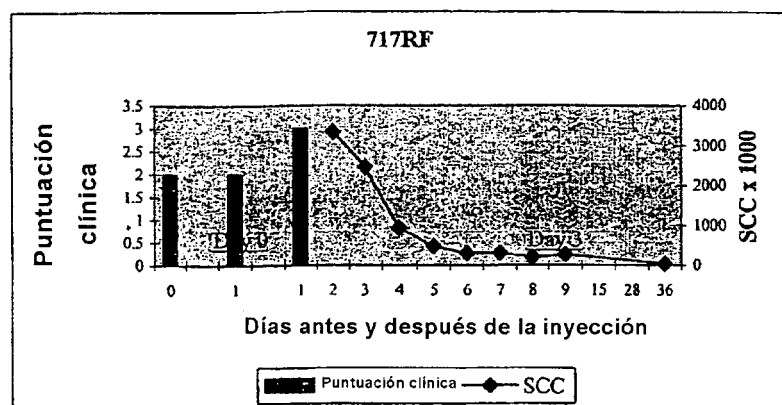


Figura 8B. Gráficos del recuento de células somáticas y la puntuación clínica en la leche de la vaca 717RF a partir de las muestras tomadas antes y después de la inyección con *L. lactis* DPC 3147.

Vaca 264LF. Muestras tomadas el día 0 (antes de la inyección, parte inferior izquierda) y en los días 5, 8 y 12 (después de la inyección, parte inferior derecha y superior derecha e izquierda, respectivamente)



Figura 9A. Aspecto de las muestras de leche procedentes de la vaca 264LF tomadas antes y después de la inyección con *Lactococcus lactis* DPC 3147. Las muestras se presentan en el día 0 y 5, 8 y 12 días después de la inyección.

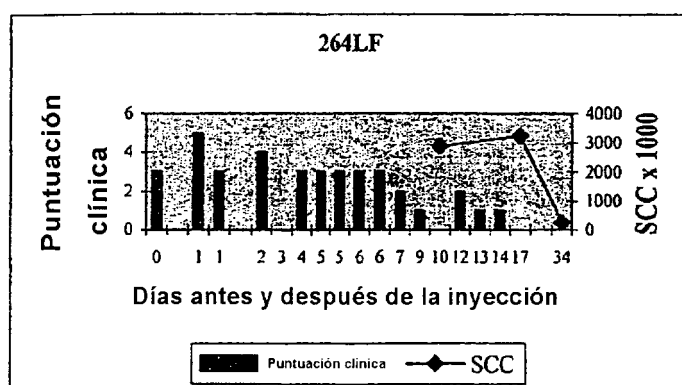


Figura 9B. Gráficos del recuento de células somáticas y la puntuación clínica en la leche de la vaca 264LF a partir de las muestras tomadas antes y después de la inyección con *L. lactis* DPC 3147.

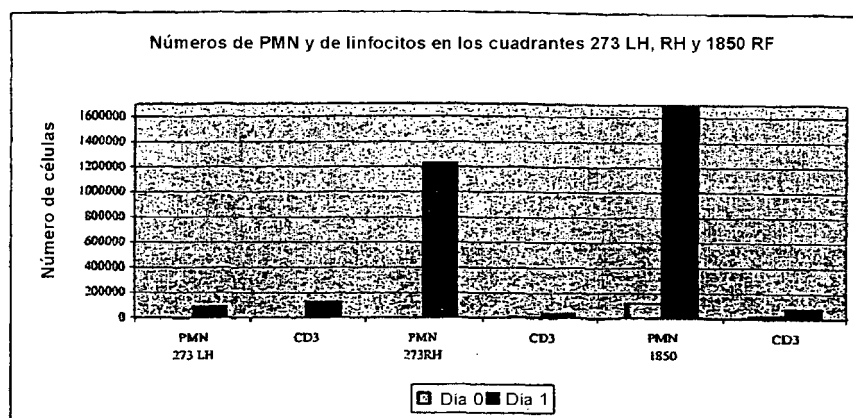


Figura 11. Números de leucocitos en los cuadrantes individuales antes y después del tratamiento con *Lactococcus lactis* DPC3147 (vaca 273RH y vaca 1850RF); o caldo estéril (vaca 273 LH).

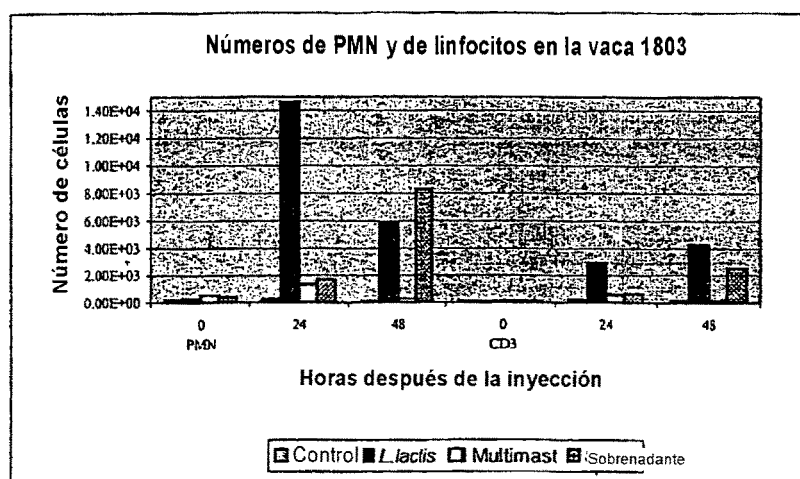


Figura 12. Números de leucocitos en los cuadrantes individuales antes y después del tratamiento con *Lactococcus lactis* DPC3147 (RH); antibiótico (LF); sobrenadante sin células (LH) o control sin tratar (RF).

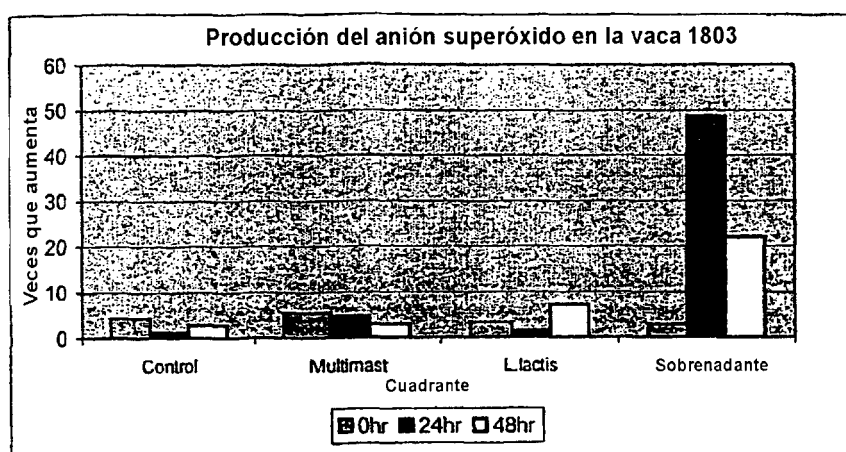


Figura 13A. Producción del anión superóxido por parte de los PMN en cada uno de los cuatro cuadrantes en una vaca (vaca 1803) antes y después del tratamiento con *Lactococcus lactis* DPC3147 (RH); antibiótico (LF); sobrenadante sin células (LH) o control sin tratar (RF).

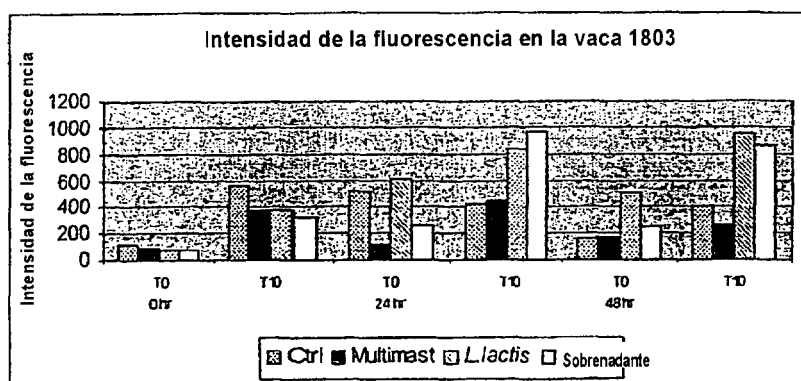


Figura 13B. Niveles de intensidad de la fluorescencia del anión superóxido en cada uno de los cuatro cuadrantes de la vaca 1803 antes y después del tratamiento con *Lactococcus lactis* DPC3147 (RH); antibiótico (LF); sobrenadante sin células (LH) o control sin tratar (RF).

Figura 14. Recuento de células somáticas en los cuatro cuadrantes de la vaca 1803 después de la inyección con *Lactococcus lactis* DPC3147 (RH); antibiótico (LF); sobrenadante sin células (LH) o control sin tratar (RF). Día 0 = antes de la inyección.

