



Figura 1. Queratitis en una oveja con agalaxia contagiosa.

Bacterias ácido lácticas: presencia en la glándula mamaria y potencial antibacteriano frente a 'Mycoplasma galactiae'

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo heterogéneo de bacterias, descritas por primera vez en el siglo XIX y en la actualidad incluye más de 30 géneros, incluidos en el filo *Firmicutes* (a excepción del género *Bifidobacterium* que pertenece al filo *Actinobacteria*). El punto en común de todas ellas es la formación de ácido láctico dada su gran capacidad fermentativa y actualmente se consideran BAL aquellos cocos o bacilos Gram positivos, catalasa negativos, no móviles ni formadores de esporas, anaerobios aunque aerotolerantes. Estas bacterias tienen potencial probiótico, lo que indica que, cuando son administrados en cantidad adecuada, pueden ejercer un efecto beneficioso sobre la salud del huésped (FAO-WHO 2001).

Toquet, M¹; Bataller, E¹, Gomis, J¹; Toledo-Perona, R¹; Jiménez Trigos¹, E; Bailón, N¹; González-Peris, E¹, Gómez-Martín, A¹ (angel.gomezmartin@uchceu.es)

¹ Grupo de Investigación Agentes Microbiológicos Asociados a la Reproducción Animal (ProVaginBIO). Departamento de Producción y Sanidad Animal, Salud Pública Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Cardenal Herrera-CEU, CEU Universities, Carrer Tirant lo Blanc, 7, 46115, Alfara del Patriarca, Valencia, España.

Entre los efectos beneficiosos de estos microorganismos, las BAL pueden prevenir la colonización por agentes patógenos y favorecer la flora bacteriana beneficiosa tanto al nivel intestinal (Gan et al. 2023) como vaginal (Mei and Li 2022). Además pueden alterar el metabolismo microbiano modificando la actividad enzimática en el medio y estimulan la respuesta inmunitaria (Vieco-Saiz et al. 2019).

Es por todo ello que prácticas como la administración de BAL con potencial probiótico están dirigidas a alterar las poblaciones microbianas, así como a hacer frente a los problemas que derivan del uso abusivo de los antibióticos, como la generación de antibioresistencias y la producción de disbiosis. Además de su empleo como antimicrobiano, tanto en animales como en humanos, las BAL pueden favorecer la liberación de metabolitos bioactivos que favorecen la mejora del estado de salud (Chenoll et al. 2016) y a los productos que deriven de los animales de producción (leche o queso), nuevos atributos funcionales (Meng et al. 2022).

“No resulta por tanto baladí el posible uso de BAL frente a especies de micoplasmas tan relevantes para el sector de los pequeños rumiantes como *Mycoplasma agalactiae*, principal patógeno de la agalaxia contagiosa”

Dada su capacidad de adaptación a una amplia variedad de condiciones ambientales, las BAL han podido colonizar diversos nichos ecológicos encontrándose presentes en la microbiota del intestino, del tracto reproductivo o la glándula mamaria, entre otros, de los mamíferos. Al margen de las propiedades antimicrobianas frente a patógenos tan relevantes como por ejemplo *Salmonella enterica* Typhimurium (Jimenez-Trigos et al. 2022), las BAL tienen además la capacidad de reducir el pH de su entorno debido a la producción de ácido láctico.

Esta capacidad de modificar el ecosistema en el que habitan influyendo en el pH, supone una barrera natural frente a patógenos que ven impedida su capacidad de proliferar y en consecuencia producir disbiosis que deriven en infecciones que repercutan en la salud y bienestar de animales y personas. Algunos patógenos como los micoplasmas

son sensibles a pH ácidos extracelulares y cambios en el medio debido a que carecen de pared celular (Howard et al., 1978).

En la especie humana por ejemplo, las poblaciones de BAL son abundantes en la vagina y por tanto influyen en el manteniendo un pH naturalmente ácido (Ma et al. 2012). Aumentos anormalmente altos en este pH vaginal de las mujeres han sido reportados como un factor de riesgo que favorece la capacidad infectiva de patógenos como *Mycoplasma genitalium* (Huppert et al. 2013). No resulta por tanto baladí el posible uso de BAL frente a especies de micoplasmas tan relevantes para el sector de los pequeños rumiantes como *Mycoplasma agalactiae*, principal patógeno de la agalaxia contagiosa (AC) ovina y caprina.

Esta enfermedad ocasiona cuantiosas pérdidas económicas en este sector que se exacerban en el caso de los rebaños lecheros (Bergonier et al. 1997; Corrales et al. 2007). Ello se debe a la reducción de la producción lechera en los rebaños crónicamente infectados y brotes clínicos o incluso

en un aumento de recuentos de células somáticas (Corrales et al. 2004; Gonzalo et al. 2005). Ello motiva que la antibioterapia sea una de las principales estrategias empleadas para el control de esta enfermedad, lo que motiva además la necesidad de desechar leche durante los periodos de supresión (Gómez-Martín et al. 2013). La dificultad para eliminar al patógeno del hospedador, la bajada de la susceptibilidad a los antibióticos por parte de diferentes especies de micoplasmas vinculadas a la AC, la generación de antibioresistencias o el riesgo de que residuos de antimicrobianos puedan ser vehiculados a través de la leche comercializada por la explotación, son algunos de los inconvenientes derivados de esta medida de control empleada frente a la AC (Nicholas 2002; Gómez-Martín et al. 2013; Paterna et al. 2013, 2016; Tatay-Dualde et al. 2017a, b, c; Prats-van der Ham et al. 2017; Prats-van Der Ham et al. 2018).

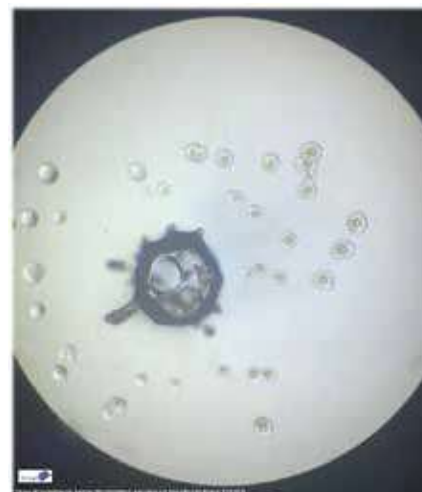


Figura 2. Colonias de *Mycoplasma agalactiae*.

Todos estos antecedentes, unidos a la necesidad de reducir el uso de la antibioterapia, justifican la necesidad de abordar nuevas estrategias antimicrobianas hasta ahora no evaluadas para el control y prevención de la AC, como es el empleo de BAL con potencial probiótico.

Antibioalter: en busca de alternativas a la antibioterapia frente a la agalaxia contagiosa

La necesidad de avanzar en el estudio de nuevas estrategias antibacterianas para evitar la antibioterapia frente a la AC motivó el inicio de una línea de investigación por parte del Grupo de Investigación Pro-VaginBIO de la Universidad CEU Cardenal Herrera de Valencia. Dicha línea, contó en sus inicios con el apoyo de proyectos de investigación otorgados por dicha Universidad con el apoyo del Banco Santander, y contó además inicialmente, con la financiación pública de un proyecto de la Generalitat Valenciana (GVA/2020/026).

Esta línea, fue finalmente consolidada gracias a un proyecto del Ministerio de Ciencia e Innovación (PID2020-119462RA-I00/AEI/10.13039/501100011033) titulado “Antibioalter”, y a la concesión de un contrato Ramón y Cajal (RYC2021-032245-I) de esta mixta entidad que tiene por título “Búsqueda de alternativas a la antibioterapia frente a las micoplasmosis de los rumiantes”. Antibioalter tiene entre otros objetivos, el estudio de la microbiota de la glándula mamaria de los rebaños ovinos y caprinos españoles, así como el de encontrar poblaciones bacterianas con un potencial antibacteriano frente a *Mycoplasma agalactiae*.

Presencia y potencial probiótico de bacterias ácido lácticas en la glándula mamaria de los pequeños rumiantes

Aunque las BAL ofrecen un conjunto de géneros y especies bacterianas susceptibles de ser enfrentadas *in vitro* a *Mycoplasma agalactiae* para evaluar su efecto antimicrobiano, previamente fue necesario analizar si existían evidencias científicas suficientes de que estas bacterias estuvieran naturalmente presentes en la glándula mamaria de los pequeños rumiantes. Esta tarea derivó en la publicación de una revisión bibliográfica Internacional que recopiló la información de microbiota naturalmente presente en la glándula mamaria ovina y caprina (Toquet et al. 2021).

Los estudios de metagenómica disponibles han permitido avanzar en el conocimiento sobre la composición bacteriana en diferentes especies animales mediante la descripción de la microbiota presente en varias localizaciones anatómicas (intestinal, vaginal, bucal, etc.). En este sentido, las BAL como los lactobacilli o enterococci, han sido descritas como uno de los géneros más importante en la microbiota de la leche cruda de ovejas. Su abundante presencia ha sido reportada en varias razas como la oveja manchega, assaf, merino, lacaune o churra (Castro et al. 2019; Esteban-Blanco et al. 2020a,b; Biçer et al. 2021).

Los géneros de BAL *Lactobacillus* y *Streptococcus*, juntos con otros géneros como *Corynebacterium*, *Escherichia/Shigella* y *Staphylococcus*, pertenecen a lo que se denomina “núcleo” de la microbiota de la glándula mamaria en la oveja assaf (Esteban-Blanco et al. 2020b). Sin embargo, su presencia en la leche cruda de cabra no ha sido reportada como muy abundante, al contrario de los observado en calostro (Niyazbekova et al. 2020). Varias BAL aisladas de la leche cruda de pequeños rumiantes han mostrado un potencial probió-



Figura 3. Obtención de muestras de leche en ovejas de raza guirra.

tico por su capacidad de inhibición frente a varios patógenos relevantes en la salud pública como *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, y *Salmonella* spp. (Reuben et al. 2020; Chen et al. 2020).

Aislamiento de bacterias ácido lácticas en la leche de rebaños españoles y primeras evidencias de efectos antibacterianos frente a *Mycoplasma agalactiae*

Las primeras fases de desarrollo del proyecto Antibioalter han permitido elaborar un cepario que alberga numerosas cepas bacterianas procedentes de rebaños ovinos y caprinos de aptitud lechera y cárnica de comunidades autónomas como Castilla La-Mancha, Castilla y León, Andalucía, Comunidad Valenciana, Comunidad de Madrid o Extremadura. Ello ha permitido aislar más de 50 cepas de leche obtenidas de animales sanos, sin indicios clínicos de patologías y negativos al test de california.

“Las BAL han sido descritas como uno de los géneros más importante en la microbiota de la leche cruda de ovejas”

Todas ellas han sido incluidas en un proceso de selección en el que se han descartado cepas con indicios de patogenicidad o escasa capacidad de crecimiento en el laboratorio. Los primeros resultados (Toquet et al. 2023) han permitido seleccionar tres cepas que cumplían dichos requisitos y que pertenecían a dos especies diferentes del género *Enterococcus*, uno de los géneros que forma parte del grupo de BAL. Dos de estas cepas, evidenciaron un efecto bactericida significativo ($P < 0.05$) sobre la viabilidad de *Mycoplasma agalactiae* cuando fueron enfrentadas *in vitro* en leche comercial de cabra UHT tratando así de aproximarse a lo acontecido cuando estas bacterias interaccionan en la glándula mamaria.

El efecto negativo más acusado sobre el patógeno se observó con una cepa (33B) aislada en cabra Murciano-Granadina, que tras 15 horas de cultivo redujo las concentraciones de *Mycoplasma agalactiae* de 7.1 a 1.2 log de CFU/ml y que fue identificada como *Enterococcus mundtii*. Una se-

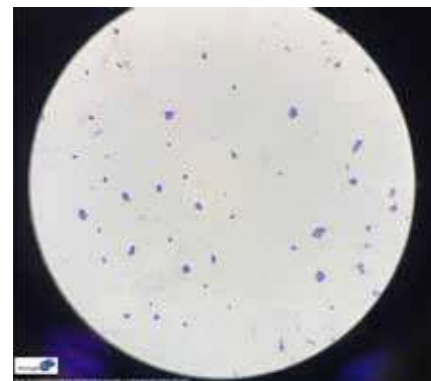


Figura 4. Cocos (Gram positivos) de bacterias ácido-lácticas.

gunda cepa aislada de un rebaño de ovejas manchegas identificada como *Enterococcus hirae* redujo menos la concentración del patógeno, aunque sí de forma estadísticamente significativa (de 6.8 a 6.4 log de CFU/ml). Una tercera cepa de esta misma especie bacteriana aislada de un rebaño de ovejas guirras, raza en peligro de extinción, mostró un efecto bacteriostático, al inhibir el crecimiento exponencial observado de forma natural en este estudio en las condiciones experimentales en las que *Mycoplasma agalactiae* fue cultivado en leche sin la presencia de estas BAL.

Estos resultados suponen la primera descripción a nivel mundial del efecto antibacteriano frente a un agente etiológico de la AC por parte de cepas bacterianas salvajes naturalmente presentes en la leche ovina y caprina. Estudios previos (García-Galán et al. 2020a, b) reportaron el efecto *in vitro* antimicrobiano de un probiótico comercial humano a base de una combinación de *Lactobacillus* spp. (también BAL) frente a *Mycoplasma bovis*, un relevante patógeno del ganado bovino muy próximo genéticamente a *Mycoplasma agalactiae* (99%).

Este mismo probiótico fue empleado, como control positivo, en nuestro estudio en el que *Mycoplasma agalactiae* fue enfrentado a cepas salvajes de BAL con idéntico efecto antimicrobiano (Toquet et al. 2023). No obstante, los efectos adversos sobre este patógeno evidenciados por cepas salvajes ovinas y caprinas de BAL son un paso más a la hora de identificar futuros probióticos de uso comercial en los pequeños rumiantes teniendo en cuenta que es recomendable utilizar cepas bacterianas propias de la especie donde se quiere administrar, para poder conseguir una mayor colonización y eficacia de las bacterias probióticas (Toquet et al. 2021).

Nuevos estudios se están realizando en estos momentos, en el que estas cepas descubiertas están siendo sometidas a pruebas que garanticen su seguridad y eficacia *in vivo*. Estos estudios *in vivo* con modelos ovinos con los que trabaja el grupo de investiga-

cial que contenía tres cepas de *Lactobacillus* spp. y se obtuvieron indicios de efectos beneficiosos sobre la salud de las ovejas administración (Quereda et al. 2020). Estos y otros aspectos serán abordados durante los dos próximos años a través del proyecto

(PID2020-119462RA-I00/ AEI/10.13039/501100011033). Marion Toquet y Nerea Bailón disfrutaron de un contrato predoctoral FPI de la UCH-CEU. Raquel Toledo-Perona disfrutó de un contrato predoctoral FPI de la Generalitat Valenciana. Ángel Gómez Martín es beneficiario de una ayuda Ramón y Cajal del Ministerio de Ciencia e Innovación de España (RYC2021-032245-I).

“Estos resultados suponen la primera descripción a nivel mundial del efecto antibacteriano frente a un agente etiológico de la AC por parte de cepas bacterianas salvajes naturalmente presentes en la leche ovina y caprina”

ción ProVaginBIO, permitirán reforzar los resultados obtenidos en los estudios *in vitro* y nos ayudarán a identificar la mejor BAL candidata a ser utilizada como probiótico. Anteriormente, ProVaginBIO llevó a cabo un estudio preliminar *in vivo* donde se administró, de forma intravaginal, un probiótico comer-

“MIPROLEC”, recientemente concedido por la Generalitat Valenciana (CIGE/2022/135).

Agradecimientos

El proyecto Antibioalter está financiado por un proyecto Retos 2020 del Ministerio de Ciencia e Innovación

Estudiantes colaboradores del grupo ProVaginBIO, pertenecientes al Grado de Veterinaria de la CEU-UCH de Valencia, participan rutinariamente en las tareas científicas vinculadas al grupo.

Agradecimientos especiales a todos los veterinarios, ganaderos y asociaciones del sector de los pequeños rumiantes que nos abren las puertas de sus explotaciones ganaderas y apoyan en la búsqueda de alternativas al uso de antibióticos.

Para consultar las referencias bibliográficas de este artículo, por favor, escriban a: mundoganadero@eumedia.es **MG**

SALA MAQ'23

FERIA DEL SECTOR AGROPECUARIO
34 EXPOSICIÓN INTERNACIONAL
DE GANADO PURO

Del 1 al 5 de septiembre
Recinto Ferial de Salamanca

