INFORME
FINAL
TÉCNICO Y DE DIFUSIÓN

8 de junio de 2015
Jefe de Proyecto Guillermo Figueroa G

INFORME TECNICO FINAL

Nombre del proyecto	Utilización de cobre antimicrobiano para el control de mastitis en ganado bovino
Código del proyecto	PYT 2013-0030
Nº de informe	FINAL
Período informado	desde el 11 de octubre de 2014 hasta el 30 de abril de 2015
Fecha de entrega	8 de junio de 2015

I. RESUMEN EJECUTIVO

La mastitis bovina (MB) es uno de los principales problemas productivos y económicos que enfrenta la industria lechera a nivel mundial. Esta patología (causada principalmente por bacterias) reduce las utilidades de los productores porque afecta la producción de leche y el precio pagado por esta, además se ven disminuidos su calidad y la de sus productos derivados. El problema identificado es la alta incidencia de la MB que afecta negativamente a la industria lechera y no se dispone de una solución efectiva hasta ahora. Las medidas hoy utilizadas en el control de MB no son suficientes para lograr disminuir la incidencia a un nivel aceptable. En base a esto nace la oportunidad de desarrollo de una innovación tecnológica para el control de la MB. Este proyecto propuso desarrollar y validar un producto tópico en base a cobre que posea actividad antimicrobiana frente a patógenos causales de MB. Esta nueva tecnología demostró en ensayos in vitro que el producto CWR-5 en base a cobre puede controlar la multiplicación de bacterias ambientales y patógenas provenientes de leche de vacas con mastitis clínica y subclínica. Los ensayos *in vivo* demostraron que el producto CWR-5 resulta ser una alternativa al empleo de dipping de yodo para prevenir la mastitis bovina. Este producto logró disminuir “in vivo” la prevalencia de MB y el P75 del Recuento de células somáticas de los animales sometidos a dipping con cobre sin tener efectos adversos en los pezones y cuartos de las vacas. Además el efecto cicatrizante sugerido para CWR-5 a partir de los resultados del estudio de bienestar animal, resulta ser una interesante alternativa que entrega un valor agregado al producto. A nivel de impacto ambiental, el estudio demostró que la aplicación por un año de un dipping de cobre no causa deterioro en el ambiente, entendiéndose por ello que no se detectó aumento en el contenido de cobre en muestras de tierra y agua de las lecherías participantes en el estudio in vivo. La contraparte participante en este proyecto dio inicio a la difusión del producto la cual ha sido muy bien recibida por los productores lecheros quienes reconocen su efectividad aunque todavía los resultados no se publican.

II. INTRODUCCIÓN

La mastitis bovina (MB) es uno de los principales problemas productivos y económicos que enfrenta la industria lechera a nivel mundial *(1)*. Esta patología es de origen multifactorial, donde las bacterias juegan un rol fundamental en la generación de los cuadros de mastitis tanto clínicas como subclínicas. La MB reduce las utilidades de los productores porque afecta la producción de leche y el precio pagado por esta, además se ven disminuidos su calidad y la de sus productos derivados. El problema identificado es la alta incidencia de la MB que afecta negativamente a la industria lechera y que no se dispone de una solución efectiva hasta ahora *(2)*. Actualmente el principal método de prevención usado globalmente es la aplicación de antisépticos post ordeña llamado dipping. A la fecha de la formulación de este proyecto los principales productos comerciales de dipping son el yodo y la clorhexidina, siendo el primero el más utilizado. Sin embargo, su efectividad es discutida por la alta incidencia y prevalencia que sigue presentando esta patología. En este sentido nos parece que el cobre podría ser una nueva alternativa para la prevención de esta enfermedad. Las propiedades antibacterianas del cobre han sido ampliamente reconocidas. El efecto antibacteriano del cobre fue aprobado por primera vez el año 2008 por la Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos (3). Este es el primer estudio científico que demostró las propiedades antimicrobianas de las superficies de cobre y sus aleaciones para eliminar diversos patógenos intrahospitalarios. En Chile, Figueroa y cols. en el INTA (2004) (4), reportaron el efecto antibacteriano de superficies de cobre sobre patógenos de alimentos: *S. entérica* y *C. jejuni*.

De acuerdo a los antecedentes presentados, la hipótesis de nuestro trabajo consistió en probar que el efecto antibacteriano de un producto en base a cobre constituye una alternativa viable para el control de la mastitis bovina.

El objetivo del proyecto fue desarrollar una tecnología innovadora con uno o más productos tópicos en base a cobre que posean actividad antimicrobiana frente a patógenos causantes de mastitis bovina. Esta innovación consideró la investigación, desarrollo y aplicación de productos en base a cobre para el control de la MB.

El proyecto se dividió en dos grandes etapas: 1) Estudio *in vitro* y 2) Estudio *in vivo* y contempló cinco objetivos específicos, a partir de los cuales se elaborará el presente informe con el fin de facilitar la lectura. El desarrollo de cada objetivo incluye la metodología usada, los resultados obtenidos, hitos alcanzados (si es que corresponde) y los problemas que se enfrentaron.

III. DESARROLLO DE OBJETIVOS

1. OBJETIVO. "Aislar e identificar cepas de bacterias causantes de mastitis bovina (diferentes áreas geográficas de Chile) y caracterizarlas en base a su perfil de resistencia a agentes antimicrobianos".

1.1 METODOLOGÍA.

Para el desarrollo y cumplimiento de este objetivo se definieron actividades específicas, dentro de las cuales podemos citar:

a) Recolección de las muestras de leche de vacas con mastitis

Las muestras de leche de vacas con mastitis bovina fueron recolectadas de acuerdo a los protocolos establecidos por Buenas Prácticas Ganaderas en dos áreas de muestreo: Zona Central y Zona Sur (Figura 1), Las muestras recolectadas fueron transportadas en cadena de frio al laboratorio y fueron almacenadas a temperaturas de refrigeración (0-4°C) hasta su procesamiento.

de

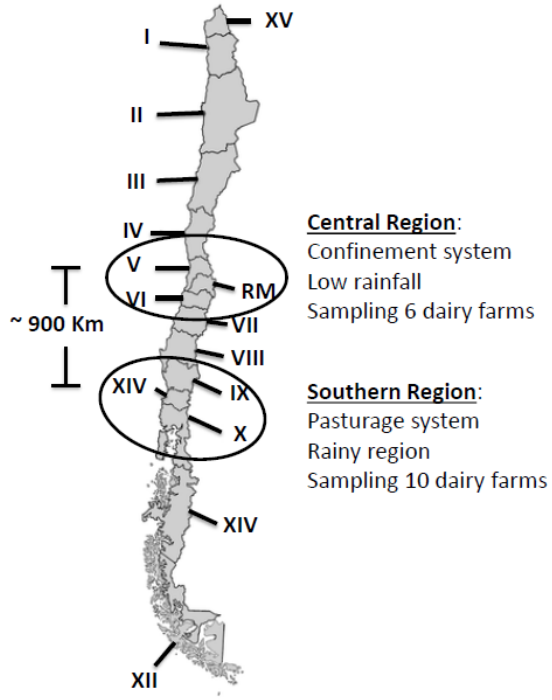


Fig. 1 Zonas definidas para la recolección muestras de leche de vacas con diferente grado de mastitis bovina.

b) *Aislamiento de microorganismos desde muestras de leche*

Una vez recolectadas las muestras de leche se enviaron al Laboratorio de Microbiología del INTA donde fueron procesadas para aislar e identificar los microorganismos presentes. Para esto, se tomó 1 mL de la muestra, que se centrifugó y luego el pellet se sembró en medios de cultivos específicos y selectivos (Figura 2). Luego, se procedió a la identificación de los microorganismos aislados mediante pruebas bioquímicas según protocolos microbiológicos habituales. Los microorganismos identificados en las muestras de leche fueron almacenados a temperatura de congelación (-80°C).

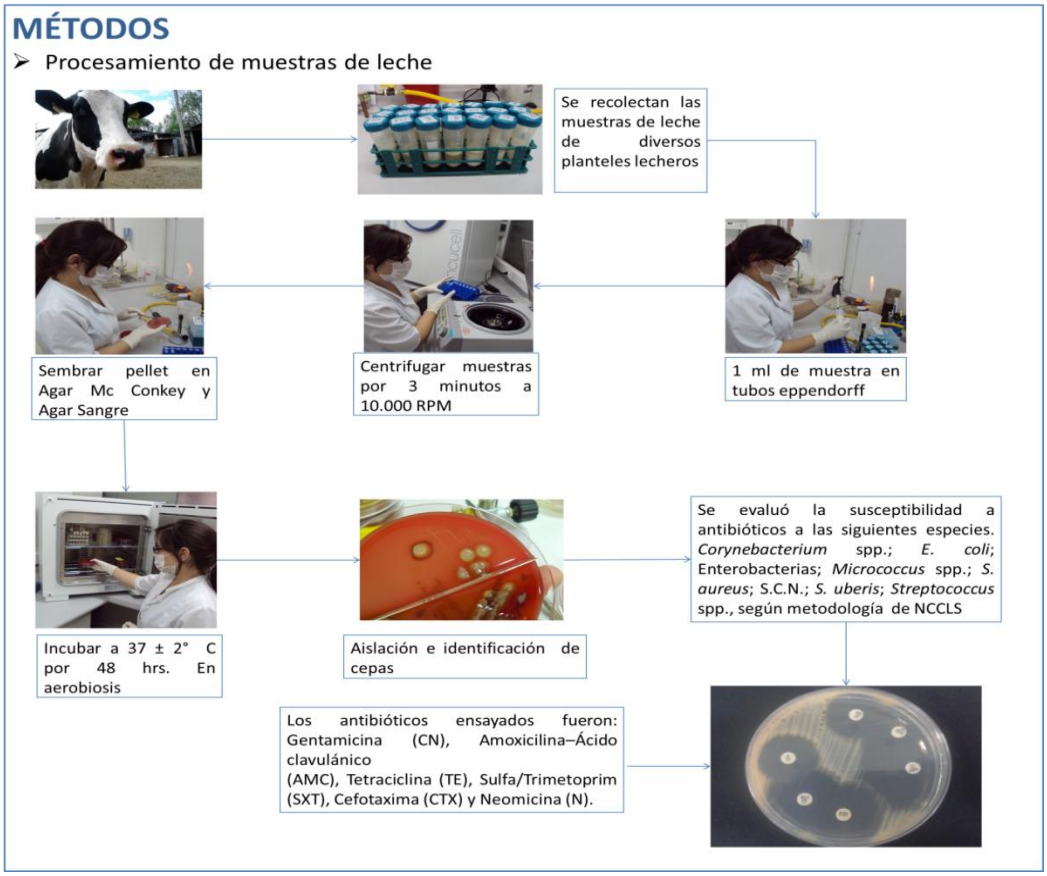


Figura 2. Procesamiento de las muestras de leche para el aislamiento e identificación de los microorganismos presentes.

c) *Tipificación y confirmación molecular (PFGE y PCR) de las bacterias aisladas de la mastitis.*

Durante el procesamiento de las muestras recolectadas en la primera etapa del proyecto se aislaron microorganismos poco comunes como ser *Prototheca*

(alga que puede causar mastitis bovina), *Corynebacterium spp y Nocardia.* Para confirmar su identificación se puso a punto una reacción de PCR para cada uno de estos microorganismos. Se estandarizó un protocolo de extracción de ADN y se diseñaron partidores (cebadores) específicos para *Prototheca* y *Corynebacterium spp.*
Para intentar relacionar el origen de las cepas se usó la metodología de macrorestricción en geles de agarosa de campo pulsado (PFGE). En las cepas de *E. coli* y de *S. aureus* provenientes de la primera etapa de este proyecto se llevaron a cabo ensayos conforme a la metodología recomendada por PulseNet y Turabelidze et al, 2000 (5) para *E. coli* y *S. aureus* respectivamente.

d) *Resistencia de las cepas aisladas de mastitis bovina a los antibiótiticos*

La susceptibilidad de las bacterias aisladas de la mastitis bovina se probó frente a seis agentes antibacterianos. Los ensayo se efectuaron mediante el protocolo establecido para la realización de antibiogramas de la CLSI, 2011 por el método de difusión en disco en agar Mueller Hinton. Las cepas estudiadas fueron: *Corynebacterium spp., E. coli, S. aureus, Micrococcus spp, SCN, S. uberis, Streptococcus spp.* Los antibióticos testeados fueron: Gentamicina (CN), Amoxicilina-Acido clavulánico (AMC), Tetraciclina (TE), Sulfatrimetoprim (SXT), Cefotaxima (CTX) y Neomicina (N) (Figura. 2).

1.2 RESULTADOS DEL OBJETIVO 1.

a) *Recolección de las muestras de leche de vacas con mastitis*

Se recolectaron y procesaron 326 muestras de leche de vacas con MB, 217 de la zona sur y 109 de la zona central. (**Anexo 1:** Muestras Recolectadas Obj 1).

b) *Prevalencia de agentes bacterianos en leche de bovinos con mastitis bovina*

Los agentes de mastitis bovina de mayor prevalencia en ambas regiones fueron *Staphylococcus* coagulasa negativa (SCN) y *S. aureus* con frecuencias por sobre el 15% de la muestras de ambas zonas (Figura 3). Al comparar ambas zonas, se observó que los SCN fueron más prevalentes en la zona sur. En la zona central *E. coli* y *Klebsiella spp.* fueron los más prevalentes. Microorganismos como *S. dysgalactiae* y *S. agalactiae* presentaron una baja prevalencia en ambas zonas estudiadas (Figura 4). En el **Anexo 2** se entrega el detalle de las cepas diagnósticadas durante esta actividad.

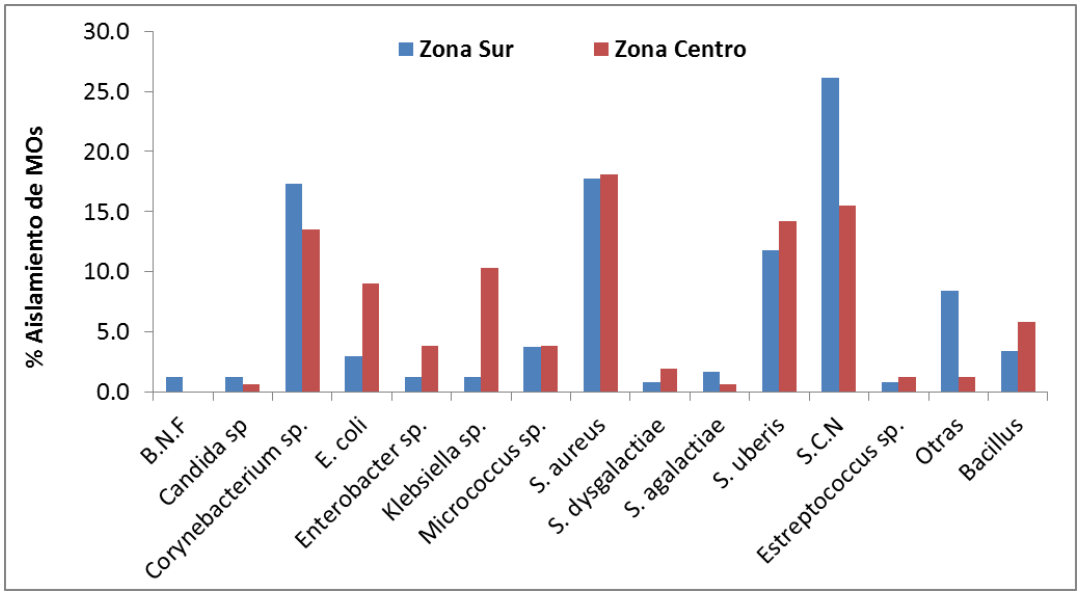


Figura 3. Prevalencia de patógenos causantes de mastitis bovina en dos zonas productivas de Chile.

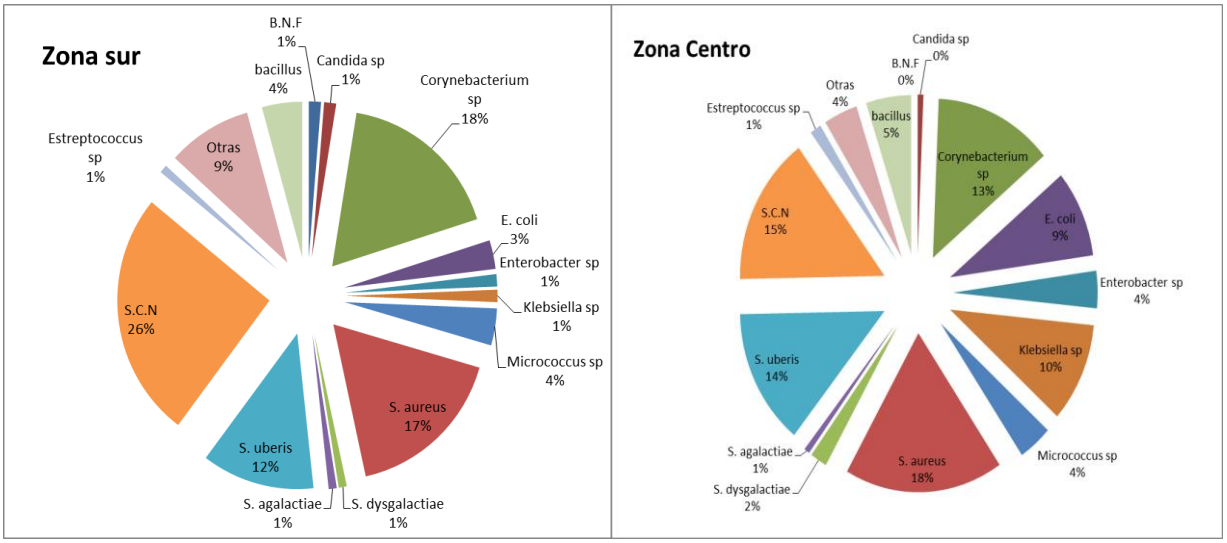


Figura 4. Prevalencia de patógenos causantes de MB en zona sur y zona centro.

c) Identificación y tipificación molecular (PFGE y PCR) de las cepas

Un desafío adicional del estudio fue disponer de nuevas herramientas moleculares para la detección de microorganismos causantes de mastitis bovina. De acuerdo a lo anterior se diseñaron partidores (cebadores) específicos para *Prototheca sp., Corynebacterium spp.* y Nocardia spp. que son de difícil cultivo e identificación mediante técnicas tradicionales. Para llevar a cabo esta aproximación además fue necesario implementar un protocolo de extracción de ADN. Esto se logró mediante un kit comercial (Wizard Genomic DNA purification Promega) y un paso previo de digestión enzimática. Los resultados de estos ensayos permitieron montar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación de los tres agentes mencionados anteriormente. Como ejemplo se presenta en el gel de la Figura 5 la visualización de los amplicones obtenidos para *Prototheca* sp. En el **Anexo 3** se presentan los protocolos desarrollados para la identificación de cada uno de los microorganismos con sus respectivos resultados.

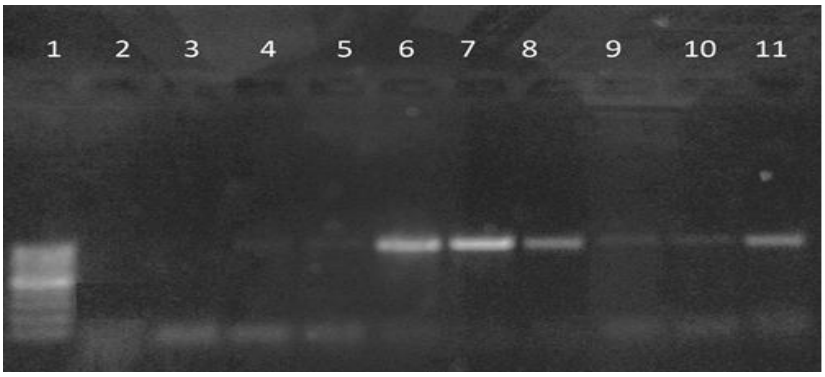


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa 1%. Electroforesis de la amplificación por PCR del gen 18S de *Prototheca*spp. con partidores **PZGT 2-A/F / PZGT 2-A/R.** Estándar MassRuler DNA LadderMix 100 pb (carril 1), Blanco (Carril 2), *Cándida spp.* (Carril 3), aislado 237-1 (Carril 4), aislado 229-1 (Carril 5), aislado 257-1 (Carril 6), aislado 235-1 (Carril 7), aislado 199-2 (Carril 8), aislado 187-1 (Carril 9), aislado 210-1 (Carril 10) y aislado 231-1 (Carril 11). **Se usó Cándida spp. como control negativo.*

Referente al análisis de PFGE se observó que las cepas de *E. coli* presentaron gran variabilidad genética entre ellas (Figura 6). Por el contrario en el caso de las cepas de *S. aureus* de diferentes vacas pero provenientes de un mismo plantel se observó una alta relación clonal (MT-0480 y MT-0500) (Figura 7). En los anexos 4 y 5 se detallan los resultados de la tipificación molecular de *E. coli* y *S. aureus* respectivamente.

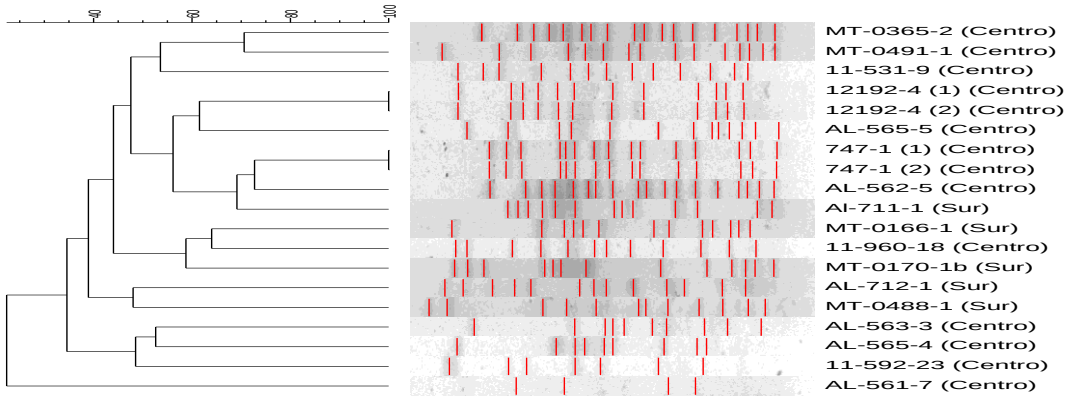


Figura 6. Dendograma de los perfiles de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) del DNA digerido con *XbaI* obtenido de los aislados de *E. coli*. Entre paréntesis se indica la zona de ailsamiento de las cepas.

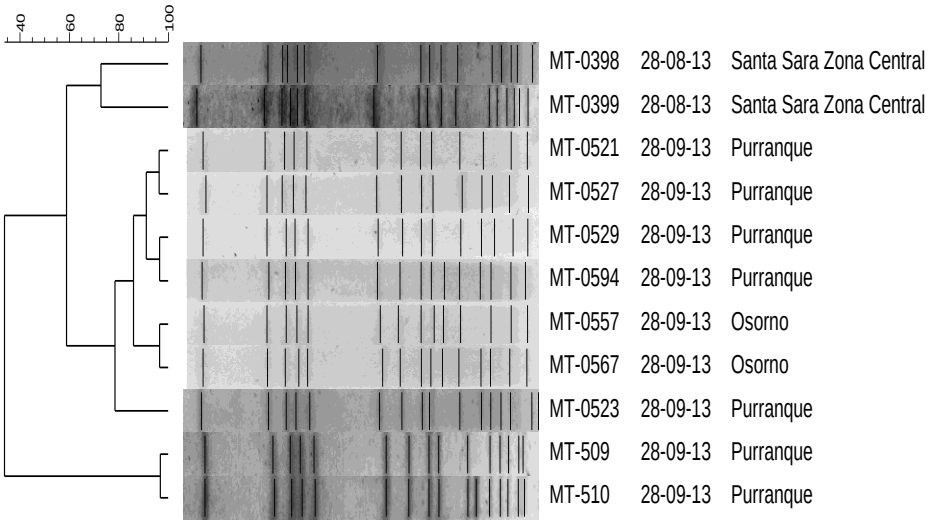


Figura 7. Dendograma de los perfiles de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) del DNA de aislados de *S. aureus* digerido con *SmaI* obtenido. Las cepas MT-0378 y MT-0398 fueron aisladas en la zona centro y las restantes en la zona sur.

d) *Caracterización del perfil de susceptibilidad a antibióticos de las cepas aisladas de leche con mastitis bovina.*

Los resultados mostraron una alta frecuencia de cepas sensibles a todos los antibióticos evaluados. Neomicina fue el antibiótico que presentó menor frecuencia de aislados sensibles (Figura 8).

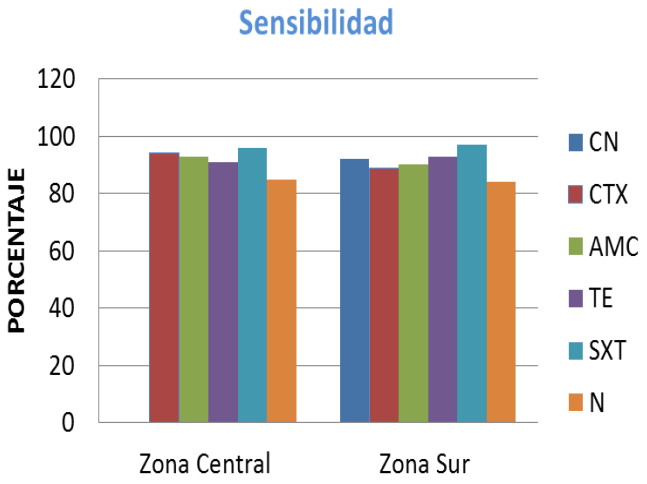


Figura 8. Porcentaje de Sensibilidad de aislados de mastitis bovina provenientes de 2 zonas geográficas en Chile: Zona Central y Zona Sur

Respecto a los resultados observados por especie de microorganismo que mostraron resistencia a uno o más de los antibióticos ensayados se destaca (Figura 9):

- Que los aislados de *Corynebacterium spp*. de ambas zonas geográficas presentaron resistencia a más de un antbiótico simultáneamente.
- Las cepas de SCN aisladas de la Zona Sur presentaron también multirresistencia y las cepas provenientes de la Zona Central presentaron resistencia solo a Tetraciclina.
- En el caso de cepas de *S. uberis* aisladas de la Zona Sur, se observó resistencia a todos los antibióticos testeados en este estudio, a diferencia de lo observado en la Zona Central, donde solo se observó resistencia a la Cefotaxima.

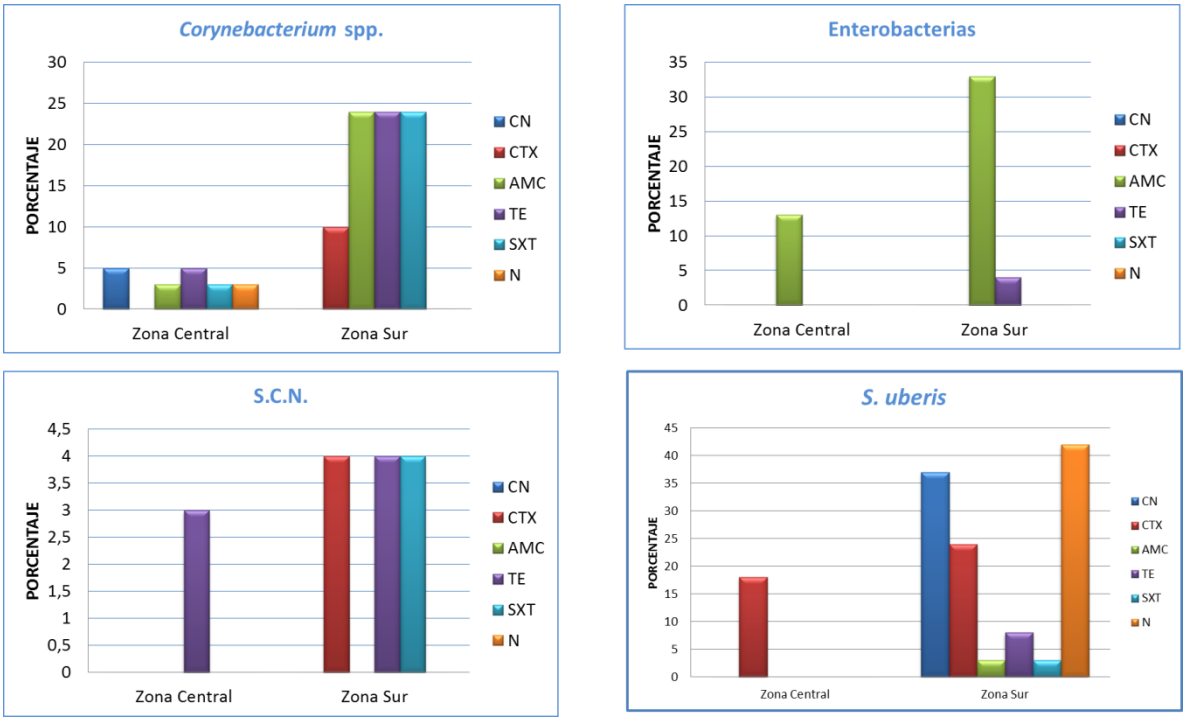


Figura 9. Comparación de la frecuencia de resistencia a los distintos antibióticos de los aislados que fueron detectados en la zona centro como en la sur.

1.3 HITOS LOGRADOS OBJETIVO 1

Dentro de los hitos propuestos para este objetivo fueron el aislamiento de 300 cepas de las muestras de leche de vacas con Mastitis Bovina. Este hito fue cumplido en su totalidad en el mes de Octubre de 2013.

Objetivo	Hitos logrados	Fecha Programado	% Avance	Fecha Cumplimiento
1	300 cepas aisladas de MB	Julio 2013	100	Octubre de 2013

1.4 PROBLEMAS EN LAS ACTIVIDADES Y COMO SE RESOLVIERON

La recolección de las muestras de leche se inició con un mes de retraso por demora en la liberación de fondos. Este retraso se solucionó extendiendo un mes el muestreo.

Los ensayos de identificación y tipificación molecular (PFGE y PCR) de los aislados fueron reprogramados para ser iniciados en el mes de Noviembre del año 2013 (y no en la fecha propuesta en el plan operativo: Mayo-Septiembre 2013). A pesar de lo anteriormente mencionado este cambio no afectó esta actividad que fue completada en su totalidad cumpliendo con el objetivo propuesto.

2. OBJETIVO. "Diseñar formulaciones en base a cobre con efecto antibacteriano"

Para cumplir este objetivo se diseñaron 8 formulaciones en base a diferentes concentraciones de cobre, estas son las siguientes: Cu plus (5000 ppm Cu), B12 (7000 ppm Cu), CWR- 3 (3000 ppm Cu), CW-2000 (2000 ppm Cu), CW- 5000 (5000 ppm Cu), BACHT 9 (5000 ppm Cu), CW- 7000 (7000 ppm Cu) y CWR- 5 (5000 ppm Cu). Aquellas de concentraciones equivalentes varían en la composición del vehículo empleado en la formulación.
Es posible decir la ejecución de esta actividad no presentó desviaciones, y que sólo arrastró el atraso de un mes que como se explicó anteriormente que se debió a un desfase en la fecha real de inicio del proyecto.

Nº RE	Hitos críticos	Fecha Programado	% Avance a la fecha	Fecha Real Cumplimiento
2.1	Producción de producto en base a cobre con actividad anti-patógenos mamarios	Agosto 2013	100	Septiembre 2013

3 OBJETIVO. Evaluar in vitro la actividad de las formulaciones en base a cobre frente a patógenos causantes de mastitis

3.1 METODOLOGÍA

a) Efecto antibacteriano "in vitro" de las formulaciones de cobre
El efecto de las formulaciones de cobre se evaluó *in vitro sobre los agentes bacterianos detectados aplicando* el método de dilución en agar. Para ello se realizaron diluciones seriadas de las formulaciones en base a cobre en placas de agar Mueller Hinton, sobre las cuales se sembró un inóculo estandarizado de las cepas en estudio. Las placas se incubaron durante 24 hrs a 37ºC y se evaluó la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano de los diferentes productos. Para cada formulación se estableció cual es la menor concentración que inhibías el crecimiento bacteriano, lo cual se definió como la concentración mínima inhibitoria (CMI).

3.2 RESULTADOS OBJETIVO 3.

Un total de 339 aislados fueron evaluadas respecto a su susceptibilidad frente a ocho formulaciones en base a cobre: Cu plus, B12, CW-2000, CWR-3, CW-5000, CWR-5, BACHT-9 y CW-7000. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los productos. Se definió como el producto más efectivo aquel que en menor concentración tenga efecto inhibitorio sobre un mayor número de los aislados.

La meta propuesta para este objetivo era que con una formulación al 20% lograra la inhibición de los microorganismos. Los resultados demostraron porcentajes variables de efectividad. La formulación CWR-5 inhibió los diferentes microorganismos en un rango de concentración entre 0.25 a 10%. En base a estos resultados se seleccionó la formulación CWR-5, definida como la de mayor efectividad. Esta formulación fue la evaluada en los estudios de bienestar animal y estudios de efectividad *in vivo*. El detalle de los resultados de las CMI para cada formulación se presenta en el **Anexo 6**.

3.3 HITOS LOGRADOS

Entre los hitos propuestos para el cumplimiento de este objetivo se encontraba la selección de una formulación en base a cobre con mayor efectividad antibacteriana. De ocho formulaciones estudiadas, se seleccionó una con mayor efecto antibacteriano. Por lo tanto este hito fue cumplido en su totalidad en el mes de Diciembre de 2013.

Nº Objetivo	Hitos críticos	Fecha Programado	% Avance	Fecha Cumplimiento
3	Formulación en base a cobre con mayor efectividad antibacteriana	Noviembre de 2013	100	Diciembre de 2013

3.4 PROBLEMAS EN LAS ACTIVIDADES Y COMO SE RESOLVIERON

En el desarrollo de esta actividad no se presentaron problemas y desviaciones.

4 OBJETIVO. “Evaluar in vivo la actividad de las formulaciones en base a cobre en el control de mastitis bovina en lecherías de diferentes áreas geográficas de Chile”.

4.1 METODOLOGÍA

a) Estudio de bienestar animal

Para la realización de este estudio se utilizó la pauta CVM GFI #50 entregada por la FDA, con modificaciones. La experiencia se realizó en dos predios, uno en Melipilla (zona central, Región Metropolitana) y uno en Osorno (zona sur del Región de Los Lagos). La metodología con la que se trabajó fue la siguiente:

i. Selección de los animales

Para el estudio se seleccionaron 16 vacas en distintos estados de lactancia. Cada una de ellas fue identificada con un collarín de distinto color en la pata posterior derecha dependiendo del grupo de estudio, y se le registró la edad, el número de partos, estado de lactancia y producción de leche (en litros)

ii. Periodos de tratamiento: el estudio se realizó en 6 semanas y se dividió en 3 periodos.

- Periodo Pre-tratamiento: que comprendió una semana en que los animales no fueron sometidos a tratamientos de dipping antisépticos de ningún tipo. Durante este periodo se realizaron observaciones basales de los pezones de los animales escogidos y estudio microbiológico de cada cuarto (64 en total). Esto se realizó para evaluar el estado sanitario de la ubre previo al estudio con antisépticos y diferenciar alguna irritación, laceración o edema de los pezones producido por alguna lesión o mastitis, de aquellos causados por efecto de los antisépticos.

- Periodo de Tratamiento: Este se inició la semana 2 y tuvo una duración de 4 semanas en total. Se aplicó una dosis fija (pocillo) de los productos a evaluar (cobre o yodo dependiendo del grupo), en los 4 cuartos de cada animal, todos los días posterior a la ordeña. A lo largo de este periodo se realizaron observaciones diarias de los pezones de los animales en cada ordeña y se registró semanalmente lo observado.

- Periodo Post Tratamiento: Este periodo abarcó la última semana del estudio (semana 6) y tuvo por finalidad evaluar las condiciones finales de los pezones tratados con los antisépticos.

Todo el estudio fue registrado fotográficamente, de modo de poder hacer comparaciones visuales del estado de los pezones a través del tiempo

iii. *Evaluación y registro de la intervención*
La evaluación del estado de los pezones antes, durante y al final del estudio se realizó de manera visual y por medio de palpación, de modo de evaluar dos variables: eritema (enrojecimiento) y edema (hinchazón). Junto con esto se evaluó si la aplicación del antiséptico producía cambios en la temperatura del pezón (al tacto) o lesiones como laceraciones, descamación, etc. Para la evaluación se utilizaron las siguientes escalas:

Eritema y formación de escaras

Evaluación Visual	Calificación
Sin eritema	0
Eritema leve (casi imperceptible)	1
Eritema evidente y definido	2
Eritema moderado a severo	3
Eritema severo (rojo intenso a morado y formación de escaras)	4

Formación de Edema

Evaluación Visual	Calificación
Sin edema	0
Edema leve (casi imperceptible)	1
Edema evidente (de bordes definidos o levantamiento evidente)	2
Edema moderado (levantamiento de aprox 1 mm)	3
Edema severo (levantamiento mayor a 1 mm y que se extiende más allá del área de aplicación del antiséptico)	4

b) ***Estudio de efectividad "in vivo" de una formulación de dipping en base a cobre (CWR-5).***
Para el desarrollo de este ensayo se utilizó el protocolo recomendado por el National Mastitis Council (NMC) 2004 para la comparación de la formulación desarrollada en base a cobre CWR-5 frente a un producto yodado (control). Dicho estudio se llevó a cabo en dos planteles; uno en la zona central (Región Metropolitana, Melipilla) y otro en la zona sur (Región de los Lagos. Osorno), esto debido a las diferencias en los sistemas productivos (confinamiento permanente en la zona central y libre pastoreo en la zona sur) y a los diferentes

microorganismos patógenos causantes de mastitis bovina que afectan el ganado en estas regiones.

El producto en base a cobre se aplicó de manera equivalente al producto yodado y el muestro se realizó de acuerdo a la Figura 10, incluyendo muestras de los cuatro cuartos de 36 vacas por grupo según metodología del NMC. Las muestras mensuales fueron trasladadas al Laboratorio de Microbiología del INTA para su análisis microbiológico.

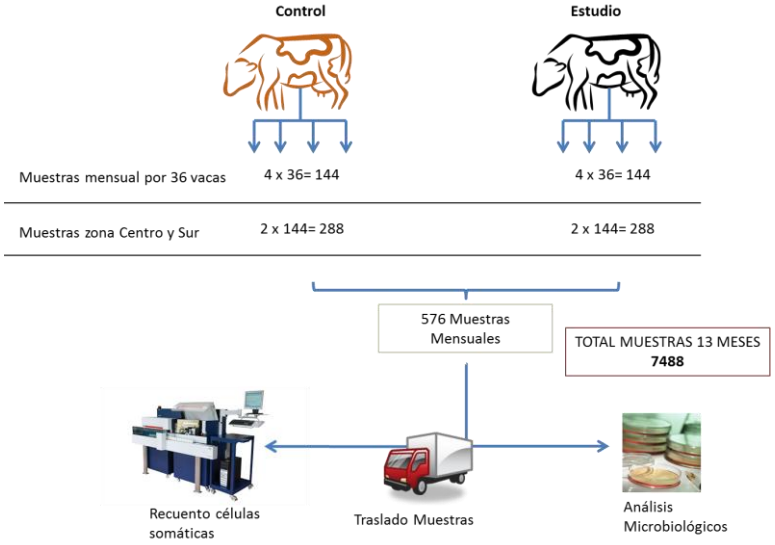


Figura 10. Esquema de muestreo de estudio *in vivo.*

Se programó un total de 13 muestreos, el primero de ellos tuvo como objetivo conocer la condición basal microbiológica de prevalencia de MB y de recuento de células somáticas (RCS) de los animales que ingresaron al estudio, de modo de tener una línea de comparación basal para los resultados de los muestreos posteriores. A partir de entonces se realizaron muestreos mensuales para poder evaluar los efectos sobre la prevalencia de mastitis bovina, el RCS y la condición microbiológica que tiene el tratamiento con dipping de cobre y, junto con esto, comparar su efectividad con la del tratamiento convencional del yodo.

Puntos importantes a destacar acerca de esta metodología son los siguientes:

i. *Identificación* de los animales.

Durante el primer muestreo en cada plantel se escogió a 72 animales en distinto estado de lactancia y se les separó en dos grupos de 36. El primer grupo, el cual se marcó con un collarete azul en la pata posterior izquierda, conformó el grupo en tratamiento con el producto CWR-5 (formulado en base a cobre), mientras que el segundo grupo, marcado con un collarete rojo, fue el grupo control (antiséptico elaborado en base a yodo)

Los animales que participaron en el estudio fueron registrados en una planilla en donde se anotó el grupo al que pertenecían y las muestras que les fueron tomadas.

A medida que se fue avanzando en los muestreos, se observó que el sistema de marcaje con collaretes presentaba unproblema ya que algunos de los animales enganchaban el collarete en malezas y/o distintos objetos que se encuentran en la pradera y en los corrales (alambres, cercas, etc), con lo que o bien se hieren la pata produciendo problemas de manejo y salud general (puede afectar incluso el nivel productivo del animal), o definitivamente pierden el collarete causando confusiones en los ordeñadores acerca de qué tratamiento deben aplicar después de cada ordeña. La misma situación de confusión ocurría cuando debido al barro se hacíae difícil ver el color del collarete que el animal portaba en la pata.

Debido a esto se buscaron sistemas alternativos de marcaje para los animales que permitieran identificar a las vacas en estudio de manera fácil y efectiva. El seleccionado fue la marca con cintas de marcaje de colores que se ponen en la cola y, de acuerdo a nuestra experiencia, estos fueron capaces de resistir al agua, el barro, no se asocian a heridas de ningún tipo y se mantienen por largo tiempo.

ii. *Tamaño* de las muestras

Tal como se especificó en el plan operativo, el número total del estudio se determinó en 72 animales en cada plantel (zona centro y sur), en donde 36 vacas conformarían el grupo en estudio (dipping de cobre) y 36 el grupo control (dipping de yodo).

iii. *Toma de muestra*

En cada muestreo se obtuvo muestras de leche de todos los cuartos de cada animal en volúmenes aproximados de 100 mL. Posteriormente, de los 100mL muestreados, 50mL fueron destinados a análisis de RCS y el resto fue enviado bajo refrigeración (Melipilla) o congelación (Osorno) al Laboratorio del INTA para efectuar los análisis microbiológicos en el INTA

iv. *Análisis* microbiológico: Las muestras de leche recolectadas fueron sembradas en agar selectivo y específico para determinar la carga bacteriana y presencia de patógenos. Las bacterias fueron identificadas de acuerdo a la metodología detallada en el Objetivo 1.

v. *Determinación del perfil de susceptibilidad a antibióticos*.
Un total de 32 aislados fue seleccionado de los muestreos correspondientes a los meses 2, 6 y 10 meses de iniciado el estudio para evaluar su perfil de resistencia a antibióticos. La metodología utilizada es la descrita en el objetivo 1 d).

vi. Determinación de concentración mínima inhibitoria de producto en base a cobre.
Los mismos aislados seleccionados para los ensayos de resistencia a antibióticos mencionados en el punto anterior fueron evaluados en cuanto a su susceptibilidad a la formulación de cobre CWR5. La metodología empleada es la misma empleada en el objetivo 3 a).

c) *Evaluación de la presencia* de residuos de cobre: leche y ambiente.

La presencia de cobre fue determinada además de las muestras de leche en muestras de agua y tierra de las lecherías intervenidas.

El análisis en las muestras de leche se realizaron sobre 10 muestras de vacas tratadas con cobre y 10 animales controles (dipping de yodo) para ambas regiones geográficas. Estas mediciones se hicieron cada dos meses durante la duración del estudio "*in vivo"*.

Las muestras de agua y suelo incluyeron muestras al inicio, a la mitad y al término del estudio *in vivo*. Las muestras ambientales tomadas consistieron en 4 muestras de agua, 2 muestras tomadas en zonas cercanas a la lechería y 2 en zonas lejanas como cursos de agua, canales, etc, y 4 muestras de suelo o tierra que cumplan los mismos criterios que las de agua.

Las muestras de agua fueron tomadas en tubos Falcon de 50 mL, mientras que las de suelo fueron almacenadas en bolsas estériles. Todas las muestras fueron refrigeradas y enviadas al laboratorio del INTA para su análisis.

Las determinaciones de cobre en leche y agua fueron realizadas mediante espectroscopia de absorción atómica en un laboratorio externo. Para ello previo al envío las muestras fueron tratadas mediante digestión ácida. Brevemente, 700 uL de las muestras seleccionadas fueron mezclados cuidadosamente con 700 uL de ácido nítrico ultra puro (Merck). La mezcla fue calentada a 65ºC durante 24 hrs destruir la materia orgánica presente. El contenido de cobre fue determinado por interpolación de la absorbancia frente a una curva estándar.

La determinación de cobre soluble presente en tierra se realizó en el Laboratorio de Servicios de la Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal de la Universidad Católica.

4.2 RESULTADOS DEL OBJETIVO 4.

a) Estudio de bienestar animal.

De acuerdo a lo presentado en el plan operativo, el resultado esperado de este estudio era “Disponer de una formulación en base a cobre con efecto antibacteriano inocuo para la integridad de los pezones de las vacas”.

En términos generales el resultado obtenido coincide con lo esperado, dado que de acuerdo a los resultados de esta etapa, la formulación para dipping en base a cobre CWR-5 no solo resultó ser inocua para la integridad de los pezones, sino que además mostró tener efectos positivos en la calidad de la piel del pezón, y además favoreció la cicatrización de heridas.

A continuación se presentan los resultados del estudio de bienestar animal de manera detallada, de acuerdo a las etapas desarrolladas.

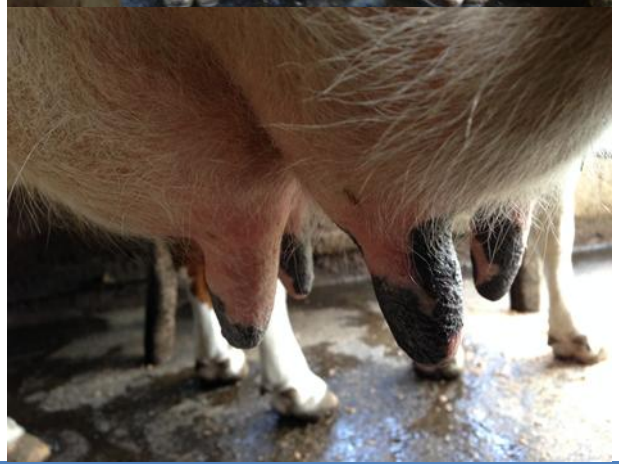
- Evaluación pre-tratamiento: La evaluación inicial de los animales, tanto en la zona centro como en la ZONA SUR, arrojó un buen estado de los cuartos y pezones, obteniendo una calificación de 0 (de acuerdo a la escala presentada anteriormente) para eritema y edema en todos los animales en estudio de la zona sur (Figura 11) y en 10 de los 16 animales de la ZONA CENTRAL (Figura 12). De los 6 restantes, 4 presentaron un edema calificado como 1 (casi imperceptible) en uno de los cuartos, otro presentó edema tipo 1 en los pezones de los 4 cuartos, mientras que otro de los animales presentó edema y eritema tipo 2 en uno de sus pezones, el que además se presentaba caliente al tacto.

  Cabe señalar, que a pesar de que los cuartos se encontraban en buenas condiciones generales en lo que respecta a la evaluación de eritema y edema, se presentaron varios casos de pezones con laceraciones y heridas de variado tipo que obedecían a distintas causas (máquinas de ordeña, rasguños con mallas y cercos, heridas producidas mientras los animales están en la pradera, etc).

Zona Sur: Plantel Osorno

Vaca 4. Los pezones se presentan con diversas heridas y escaras en avanzado estado de cicatrización. Sin embargo, a pesar de esta situación, no se detectó edema o eritema.

Vaca 7. Los pezones se presentan lisos, y sin heridas. No se detectó edema o eritema en ninguno de los cuartos.



Vaca 10. Los pezones se presentan lisos, y sin heridas, suaves al tacto, sin edema ni eritema.

Figura 11. Registro fotográfico evaluación basal vacas plantel Osorno.

Zona Centro: Plantel Melipilla

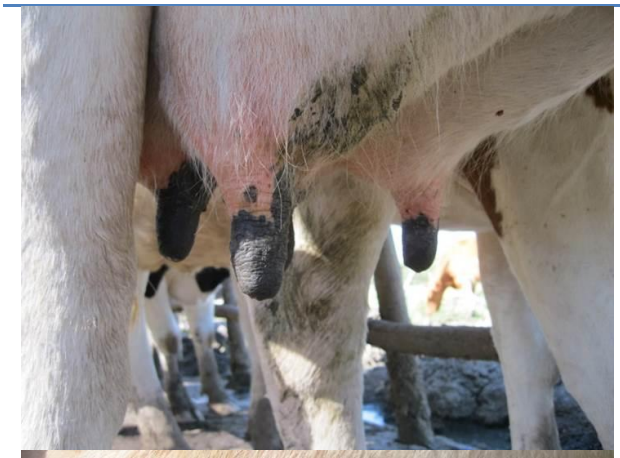
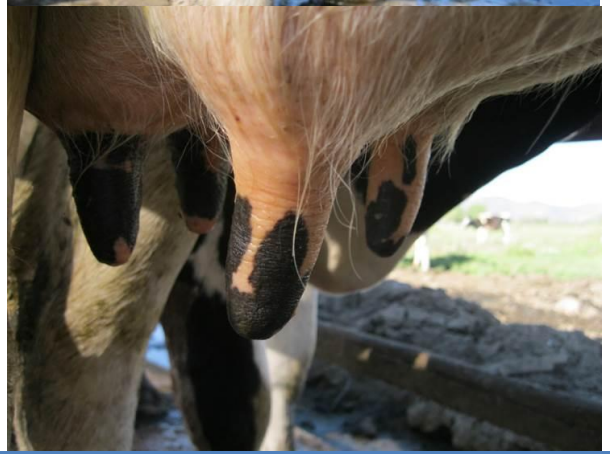
	**Vaca 5**. Los pezones se observaron sin signos de eritema o hinchazón, ni heridas evidentes. Además se presentaron suaves al tacto aunque con rugosidades.
	Vaca 3. Los pezones se presentan con diversas heridas y escaras en distintos estados de cicatrización. Con respecto a la evaluación de eritema y edema, se calificó como tipo 1 para todos los cuartos.
	**Vaca 16**. Los pezones se presentan lisos, y sin heridas. Al momento de realizar palpación se detectó que uno de los pezones se presentaba caliente al tacto y además con edema.

Figura 12. Registro fotográfico evaluación basal vacas plantel Melipilla

Los **análisis microbiológicos**, permitieron aislar microorganismos de la leche de algunos animales, sin embargo no se diagnosticó mastitis clínica en ninguno de ellos, por lo que la aparición de edema o eritema posteriores no podrían haber sido adjudicados a esta causa.

- Evaluación de la aplicación del dipping con cobre: A lo largo de las cuatro semanas en que se desarrolló esta etapa se pudo observar que tanto el dipping formulado en base a cobre en estudio, como el control elaborado en base a yodo que se utiliza normalmente en las lecherías, no produjeron efectos adversos en los pezones de los animales tanto desde el punto de vista de la formación de edema como de eritema. De este modo a lo largo de las cuatro semanas de evaluación se mantuvo la evaluación 0 para ambas variables en todos los animales de la zona sur y en los de la zona central que habían obtenido esa evaluación inicial.
  Por otra parte, los animales con dipping de cobre de la **zona central** que habían obtenido calificación 1 o 2 en eritema o edema, pasaron a tener calificación 0 a medida que avanzó el estudio.

- Evaluación Post Tratamiento: Durante la última semana de estudio se evaluó el estado final de los cuartos de los animales evaluados. En todos los casos (animales de la zona centro y sur) de animales que recibieron dipping con cobre la calificación para el edema y el eritema fue de 0, incluso en aquellos animales que habían presentado hinchazón o enrojecimiento al inicio del estudio.
  Es importante volver a destacar que si bien el estudio se realizó con el fin de comprobar que el producto formulado en base a cobre no produjera efectos colaterales dañinos a los pezones que causen dolor a los animales o condiciones favorables para la ocurrencia de mastitis, se pudo constatar que la utilización de dipping post ordeña no solo no produce daño sino que también, en los animales en estudio, favoreció la cicatrización de las heridas en los pezones, además de mejorar las condiciones generales de la piel de éstos, ya que la piel se presenta más lisa y suave.

  Si bien ambos productos antisépticos (de cobre y yodo) presentaron propiedades similares a este respecto, sobretodo en el plantel de la región metropolitana, es importante mencionar que en la zona sur si existieron diferencias leves en los efectos del producto con cobre y yodo en algunos animales, teniendo el COBRE mejor efecto que el segundo. Por otra parte, de acuerdo a la experiencia de los ordeñadores, quienes están en constante contacto con los animales, el producto en base a cobre se adhiere mejor y permanece más tiempo en los pezones de las vacas, y produciría una mejora en la piel de los pezones más rápida que el producto en base a yodo.

A modo de ejemplo, se presenta el progreso del estado de los cuartos considerando las semanas 1, 3 y 6 de estudio para un animal del grupo sometido al tratamiento con cobre y otro del grupo control de la zona sur y de la zona centro (Figura 13 y 14).

Zona Sur: Plantel Osorno.

Vaca nº4. Grupo cobre	Vaca nº6. Grupo control

Figura 13. Registro fotográfico de la evolución del estado de la ubre de la vaca N°4 (grupo cobre) y Nº6 (grupo control) del plantel de Osorno, en las semanas 1, 3 y 6 de estudio.

Zona Centro. Plantel Melipilla.

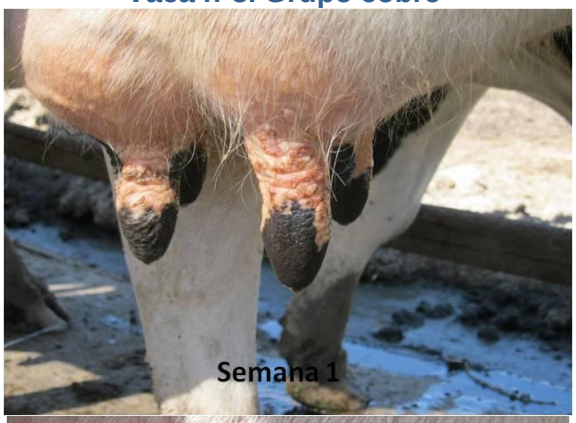
Vaca nº3. Grupo cobre	Vaca nº10. Grupo control
	

Figura 14. Registro fotográfico de la evolución del estado de la ubre de la vaca N°3 (grupo cobre) y Nº10 (grupo control) del plantel de Melipilla, en las semanas 1, 3 y 6 de estudio.

b) Resultado del Estudio de un dipping de COBRE "in vivo"

Se realizaron 13 muestreos en la región metropolitana y 11 muestreos en el sur (esto por la sequía que afectó a la zona en los meses de verano que disminuyó de manera notoria la producción de leche). Sin embargo, y como se mencionó en informes pasados, el número total de animales fue variando en los meses posteriores al inicio del programa, situación que se explica principalmente por el manejo al que son sometidos los rebaños (animales que se secan y deben salir hasta que retomen su productividad), a animales que han sido descartados de la producción (animales viejos o enfermos) y vacas que no pueden ser ordeñadas por diversos motivos.

A pesar de esta situación, se realizaron los manejos necesarios para mantener equiparado el tamaño de cada grupo de modo que los resultados pudieran ser comparables. Así cada animal nuevo que ingresó al estudio, pasó a formar parte del grupo de menor número. Las vacas que reingresaron al sistema luego de haber estado secas, ingresan al mismo grupo al que pertenecían previos al secado.

Uno de los objetivos específicos de este estudio es lograr la reducción de la prevalencia de mastitis bovina en los planteles de la Región Metropolitana y la Zona Sur, mediante la utilización de un producto de dipping en base a cobre (CWR-5). Los diferentes parámetros medidos y calculados se presentan a continuación

- *Determinación de la prevalencia basal de mastitis bovina en los planteles en estudio*

  Para calcular la prevalencia, se definió un parámetro objetivo de MB de acuerdo a los datos de la literatura. Así se consideró un animal con síntomas o signos de MB a aquel que además mostrara en al menos un cuarto un recuento de células somáticas (RCS) mayor a las 250.000 cel/mL

  Una vez definido el parámetro de MB, se calculó la prevalencia con la fórmula:

$$\frac{\text{Casos de MB X100}}{\text{Nº de animales}}$$

  La prevalencia basal de los planteles en estudio se calculó en base a los resultados de RCS obtenidos en el primer muestreo de la región metropolitana y la zona sur (mes de abril). De esta manera, se obtuvo una prevalencia basal de 78% para el plantel en estudio de la región metropolitana, y de 68% para el plantel de la zona sur. Dichos valores, resultaron más altos que lo indicado en la literatura en donde se reportan prevalencias de entre 45 a 50% en predios nacionales.

- *Resultados del efecto del dipping de cobre en la prevalencia de mastitis bovina en vacas*.

Zona centro, Región Metropolitana, Melipilla.

Para la realización del estudio en la zona centro se contactó a diferentes productores con planteles de distintos tamaños. En general fue difícil encontrar predios que estuvieran dispuestos a aceptar una intervención tan larga a sus procesos. Finalmente productores de la localidad de Melipilla accedieron a participar en el estudio. El predio utilizado fue una pequeña explotación lechera con un rebaño de menos de 90 animales, en donde se trabajaba con ordeño mecanizado pero no con gran tecnología. Si bien los ordeñadores de este plantel poseían gran experiencia, prácticamente no existía capacitación en lo que se refiere a buenas prácticas ganaderas y a prácticas de higiene de los manipuladores.

Junto a lo anterior, las vacas pertenecientes al plantel poseían la característica de no haber sido sometidas a ningún tratamiento de dipping previo al estudio (al menos por tres meses) punto importante ya que los efectos observados de los tratamientos aplicados en el grupo estudio y el control no estuvieron sujetos a una respuesta adaptativa a antisépticos usados previamente.

El análisis de nuestros resultados mostré que en la Región Metropolitana la aplicación de **dipping de cobre** permitió reducir la prevalencia de mastitis de manera sostenida hasta enero del 2015, logrando una reducción de un 39% (con respecto a la prevalencia inicial), lo cual está en sintonía con el resultado propuesto de este estudio en donde se esperaba una reducción de al menos un 40% (Figura 15). Sin embargo, luego de esta fecha se produjo un inexplicable y rápido incremento a pesar del uso del dipping, llegando a obtenerse en el mes de abril de 2015 una prevalencia de 70% (esto es una reducción de solo un 11% desde la prevalencia basal de un 78%.

Tal como se observa en la Figura 15, en la primera parte del estudio se observó una disminución progresiva de la prevalencia de MB en el grupo tratado con dipping de cobre. En el mes de julio de 2014 se observó una alza en el valor de la prevalencia, la cual se podría explicar por el “efecto invierno”, en donde la prevalencia de la mastitis bovina aumenta de manera normal debido a la aparición de factores ambientales como son el frío, la humedad y la lluvia. Sin embargo, posterior a este incremento, la prevalencia vuelve a descender, como fue indicado anteriormente.

Las razones para explicar el sorpresivo incremento posterior a este mes, pueden radicar en parte en el ingreso de nuevos animales al estudio (el plantel realizó compra de animales), o incluso en malas prácticas de los manipuladores, sin embargo este fue un hecho fortuito no previsible por los investigadores.

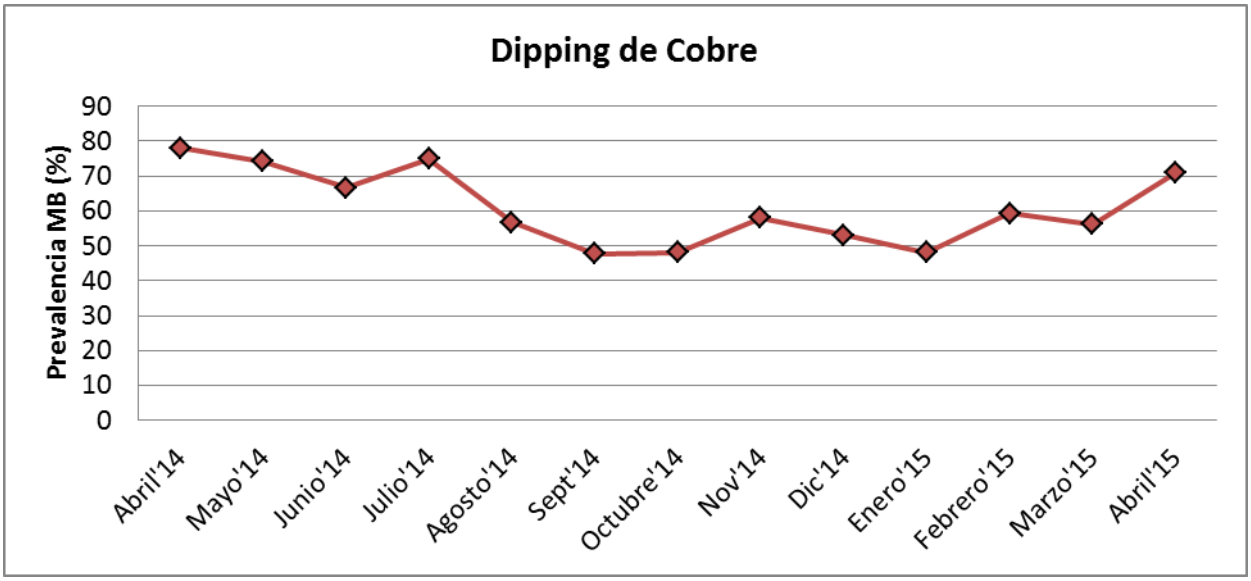


Figura 15. Prevalencia de Mastitis Bovina (MB) en animales tratados con **dipping de cobre**, entre los meses de abril de 2014 y abril de 2015. **Región Metropolitana**

En el caso del **dipping de yodo** (grupo control) se observó de igual manera una tendencia a la baja, especialmente en la primera etapa del estudio (Figura 16). En los meses de agosto y septiembre en la zona centro se observa un mejor efecto del cobre con respecto a yodo, donde la prevalencia para el cobre fue de 55% y 50% respectivamente versus 70 y 60 % en los mismos meses para el dipping de yodo (es decir en el caso del yodo hay una reducción de sólo un 10% con respecto a la prevalencia basal), sin embargo, y tal como queda claro en la figura, en los meses finales del estudio, el dipping de yodo logra mantener una prevalencia de MB cercana al 50%, logrando una reducción de la prevalencia basal de un 25%

Llama la atención el incremento importante de la prevalencia en este grupo control en el mes de octubre, donde superó el 90%. Sin embargo al mes siguiente vuelve a descender para posteriormente estabilizarse, por lo que aquel incremento puede considerarse como sorpresivo, pero no determinante o un reflejo de la situación general del rebaño en el estudio.

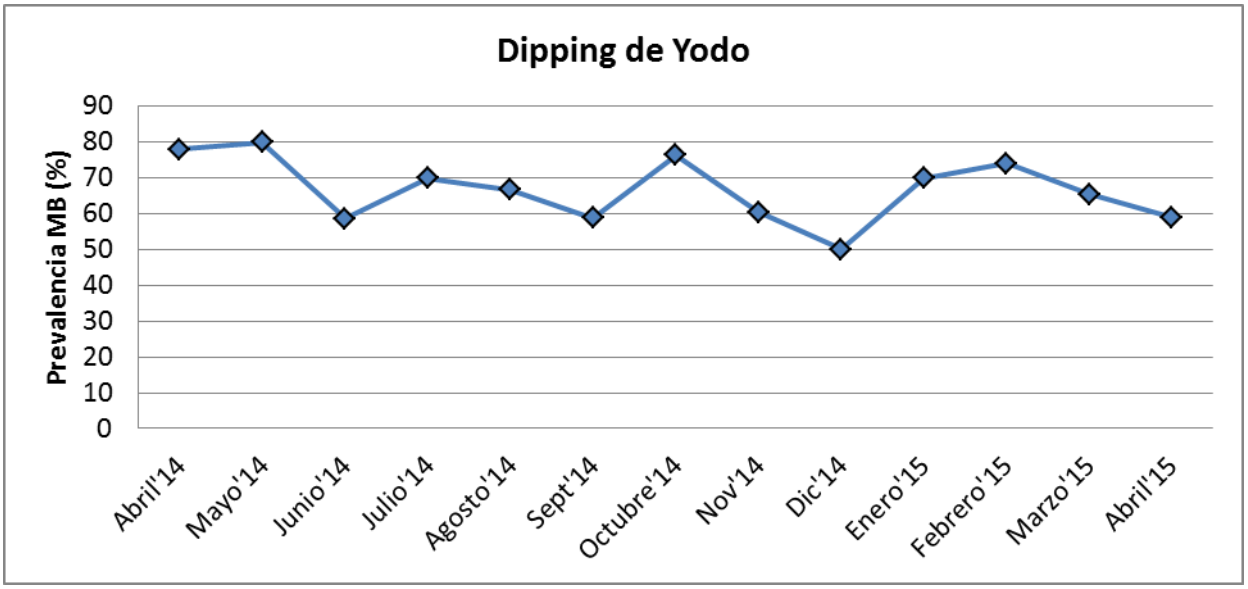


Figura 16. Prevalencia de Mastitis Bovina (MB) en animales tratados con **dipping de yodo** entre los meses de abril de 2014 y abril de 2015. **Región Metropolitana**.

Zona sur. Región de los Lagos. Osorno.

El plantel seleccionado en la zona sur correspondió a un plantel comercial con un gran número de animales que vende leche a grandes industrias que exigen la utilización de dipping de yodo como método de rutina en el control de la mastitis bovina.

El análisis de los resultados muestran que en la zona sur, la aplicación de **dipping de cobre** permitió una muy importante reducción de la prevalencia de mastitis bovina de un 74% al mes de octubre, superando con creces la meta de un 40% propuesta por este estudio (Figura 17). Posteriormente se produjeron aumentos de la prevalencia de mastitis bovina en el rebaño, sin embargo, al momento del último muestreo se obtuvo una prevalencia final de un 34%, lo cual implica una reducción significativa de la prevalencia basal del 50%.

Tal como fue descrito en el caso de la Región Metropolitana, en el mes de junio de 2014 se observó una alza dela prevalencia, la cual se explica por el “efecto invierno”. Se debe considerar que en la zona sur la época de frío y lluvias se adelanta con respecto a la zona centro, por lo cual es natural que el efecto invierno se produzca un mes antes que en la Región Metropolitana. Cabe hacer notar que lo anterior se observó el año 2014 cuando todavía la sequía era menos marcada que el año 2015.

Como se explicó anteriormente, en la zona sur no se pudo realizar muestreos en los meses de enero y febrero del 2015 debido a la sequía que produjo una reducción importante de la leche por animal. Los muestreos se retomaron en el mes de marzo, sin embargo los resultados deben ser analizados considerando que se desconoce los manejos que se realizaron en los meses en que no se muestreó, y que parte del rebaño que reingresó al estudio no era necesariamente el mismo Del inicio del estudio.

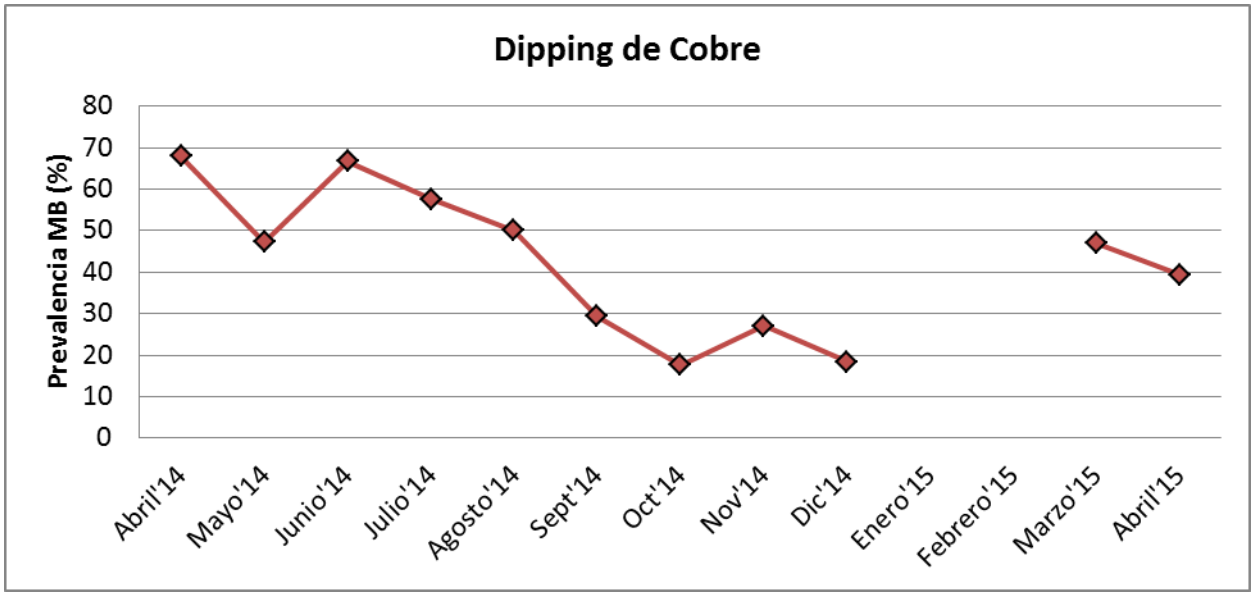


Figura 17. Prevalencia de Mastitis Bovina (MB) en animales tratados con **dipping de cobre**, entre los meses de abril de 2014 y abril de 2015. Región de los Lagos.

En el caso del **dipping de yodo** (grupo control) se observó que la prevalencia, al igual que el grupo de cobre, que experimentó una tendencia a la baja logrando una reducción de la prevalencia basal de un 62% al mes de diciembre de 2015 (Figura 18).

Tal como en el caso anterior, se puede observar que los muestreos de enero y febrero de 2015 no pudieron realizarse, y estos se retomaron para el mes de marzo y abril. En este caso, la prevalencia en estos meses es de 34 y 31% respectivamente, por lo que no se puede decir que el producto haya producido una baja significativa de prevalencia en este corto tiempo, sin embargo al calcular la prevalencia de MB final en el rebaño control, se ve que esta se redujo en un 43% con respecto a la prevalencia basal (Figura 18).

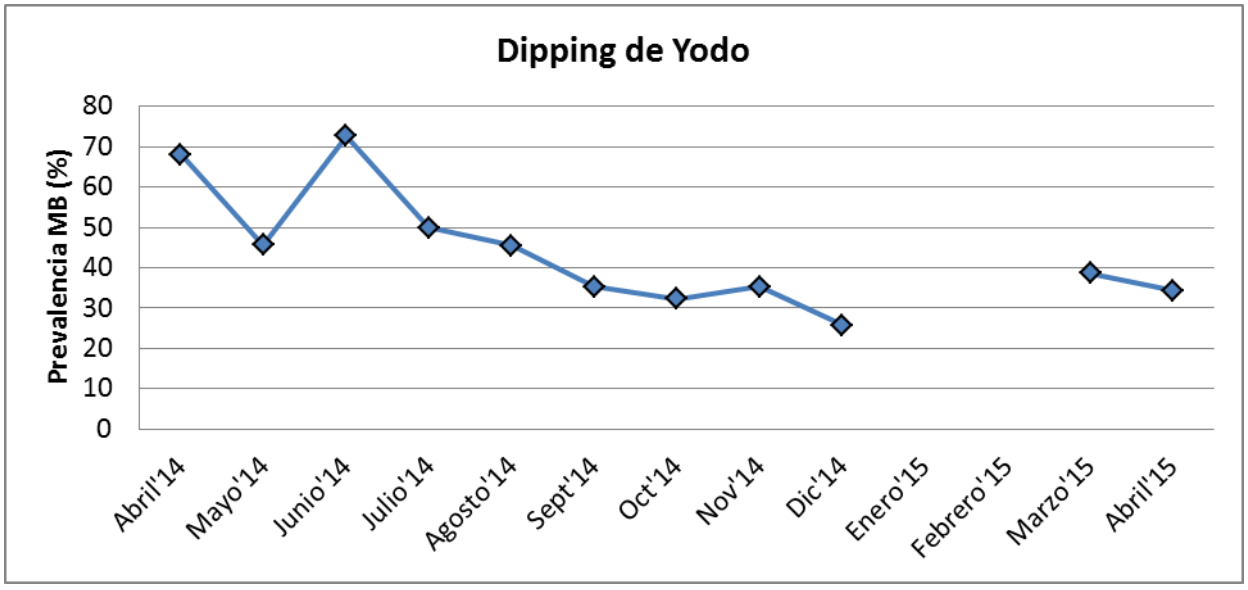


Figura 18. Prevalencia de Mastitis Bovina (MB) en animales tratados con **dipping de yodo**, entre los meses de abril de 2014 y abril de 2015. Región de Los Lagos

- *Efectividad del cobre en la disminución de la mastitis clínica (MC).*

  Aunque en el proyecto no se propone el análisis de la prevalencia de mastitis clínica como parámetro de la eficiencia del dipping de cobre, se decidió incluir ya que la disminución de la mastitis clínica en un plantel implica ganancias económica importantes en términos de menos animales que salen de producción, menor rechazo de leche y menor gasto en utilización de antibióticos para tratar la enfermedad.

  La mastitis clínica (MC), es la manifestación más severa de la mastitis, se define como aquella que produce sintomatología clínica, que incluye edema, inflamación, aumento de temperatura y deterioro de la calidad física y organoléptica de la leche (presencia de pus, flóculos, etc). Para efectos del estudio, se consideró un animal con mastitis clínica a aquel con al menos un cuarto cuya leche posea recuentos de células somáticas (RCS) mayores a 1.000.000 Cel/ml, o bien presentara sintomatología clínica de mastitis.

  Para el cálculo de la incidencia de mastitis clínica se consideró la misma fórmula utilizada anteriormente.

  La prevalencia basal de mastitis clínica de los planteles en estudio se calculó en base a la clínica y a los resultados de RCS obtenidos en el primer muestreo de la región metropolitana y la zona sur (mes de abril). De esta manera, se

obtuvo una incidencia basal de 47% para el plantel en estudio de la región metropolitana, y de 31% para el plantel de la zona sur.

Los resultados del efecto del **dipping de cobre** "in vivo" en la incidencia de mastitis clínica en vacas se presentan a continuación:

Zona centro. Región Metropolitana. Melipilla.

El análisis de los resultados muestra la misma tendencia que en el análisis de la prevalencia de mastitis bovina (Figura 19). En el grupo tratado con dipping de cobre se observó una diminución constante de la prevalencia de mastitis clínica a lo largo de gran parte del estudio, de modo que a enero de 2015 se había logrado una disminución de un 45% con respecto a la incidencia inicial de mastitis clínica. Sin embargo, en los últimos tres meses del estudio, fase crítica de la sequía, se presentó un incremento sostenido de la prevalencia, de modo que en el último muestreo la disminución de la prevalencia de MC es solo de un 11% con respecto a la incidencia basal.

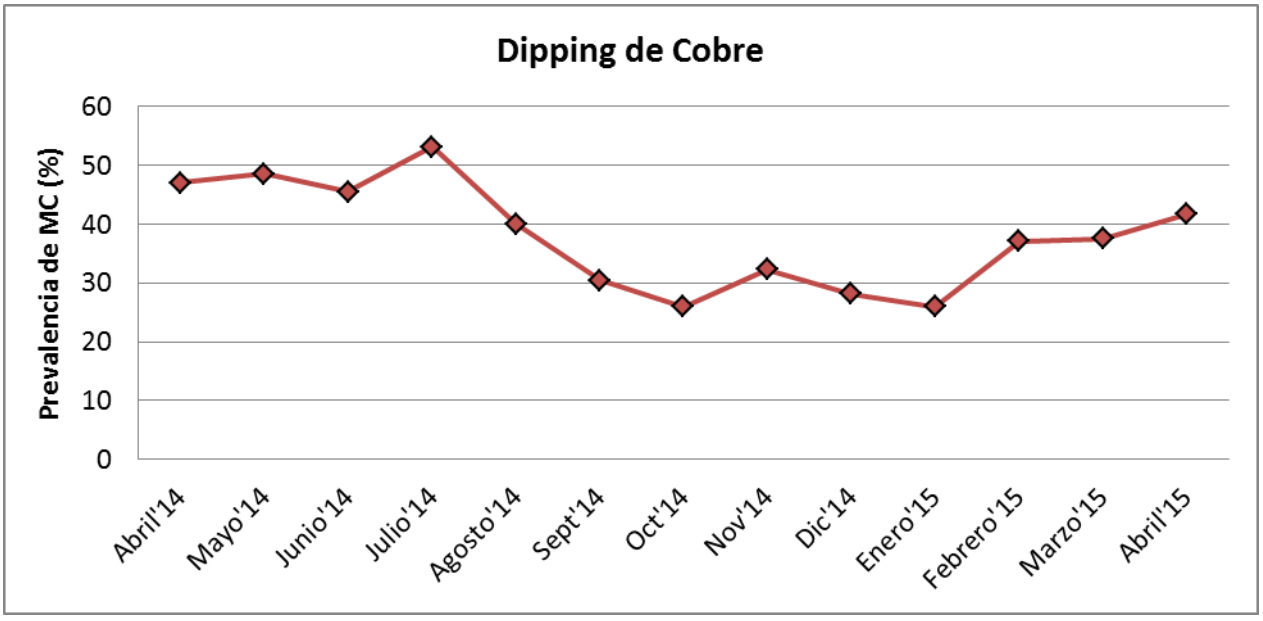


Figura 19. Incidencia de Mastitis Clínica (MC) en animales tratados con **dipping de cobre**, entre los meses de abril de 2014 y abril de 2015. **Región Metropolitana.**

Respecto al grupo tratado con yodo (Figura 20), los resultados muestran fluctuaciones importantes en la incidencia de mastitis clínica, no se observó una caída sostenida como lo descrito para los animales con dipping de cobre.

Al final del estudio la disminución de la incidencia de mastitis clínica con respecto a la prevalencia basal, fue de 11%.

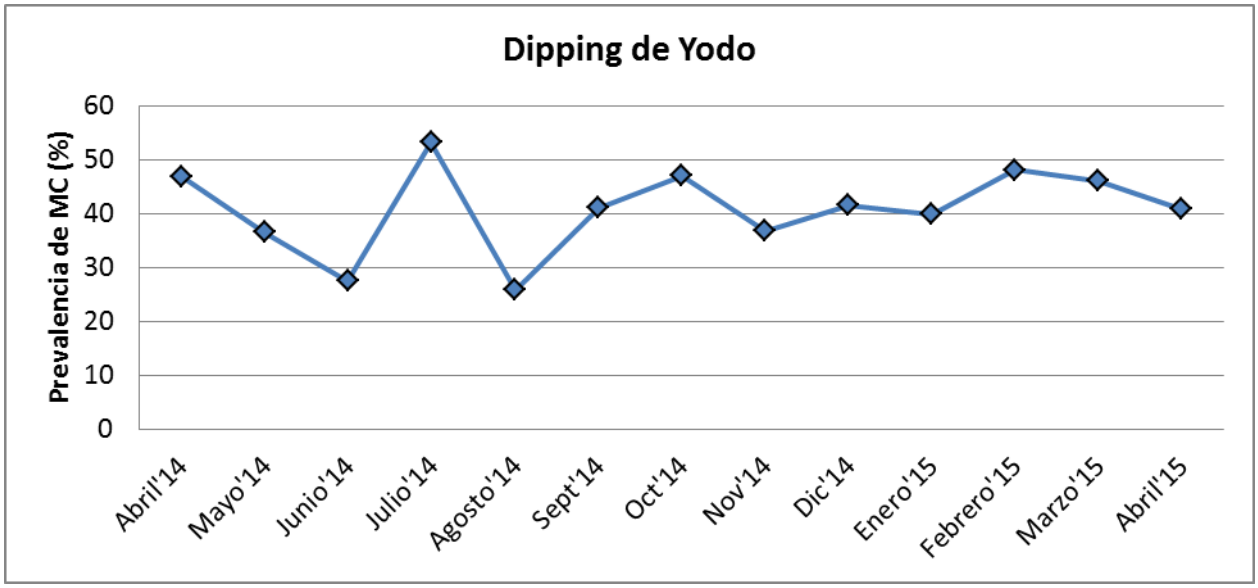


Figura 20. Incidencia de Mastitis Clinica (MC) en animales tratados con **dipping de yodo,** entre los meses de abril de 2014 y abril de 2015. **Región Metropolitana.**

Zona sur. Región de los Lagos. Osorno.

En el caso del plantel de la zona sur, se pudo observar una importante disminución de la prevalencia de mastitis clínica en el grupo con **dipping de cobre** (Figura 21), éste llegó al 90% en el mes de diciembre de 2014, el último mes de muestreo antes de la detención por sequía. Este hallazgo es muy importante debido al impacto que puede significar para un plantel disminuir en 90% las pérdidas asociadas a los animales enfermos que afectan la calidad y el monto de leche producida.

Posteriormente, al retomar los muestreos en el mes de marzo, se observó una prevalencia mayor de MC, que pudo deberse a la falta de manejo con dipping en varios de los animales que salieron de producción.

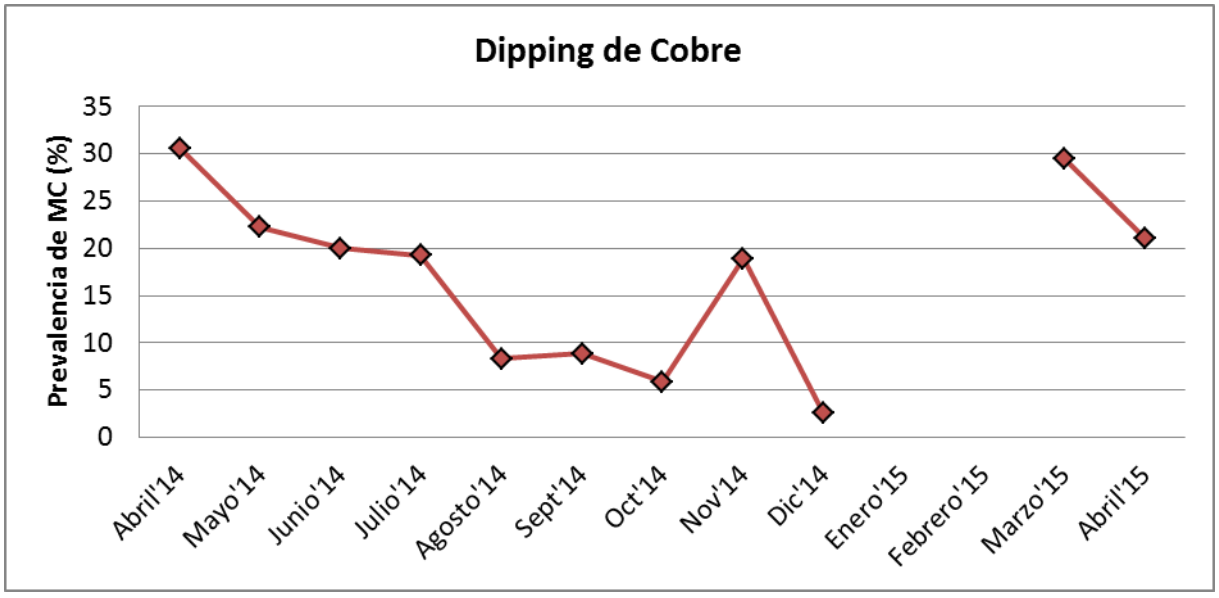


Figura 21. Incidencia de Mastitis Clinica (MC) en animales tratados con **dipping de cobre**, entre los meses de abril de 2014 y abril de 2015. **Región de Los Lagos**.

Al compararlo con los animales tratados con dipping de yodo (Figura 22), se observó que si bien hay reducción de la prevalencia en 46% con respecto al valor basal, esta reducción no se acerca a la magnitud de lo alcanzado en los animales tratados con cobre.

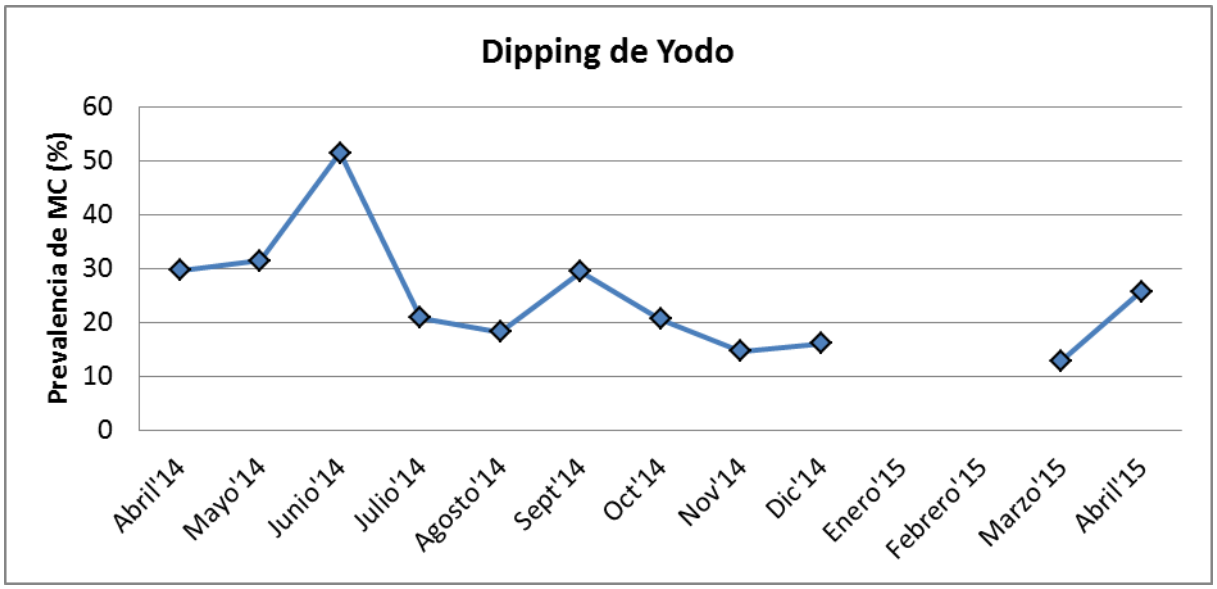


Figura 22. Incidencia de Mastitis Clinica (MC) en animales tratados con **dipping de yodo**, entre los meses de abril de 2014 y abril de 2015. **Región de Los Lagos.**

- ***Efectividad del cobre en la disminución del recuento de células somáticas (RCS).***

  El recuento de células somáticas en leche es una medida universal para determinar el grado de calidad del producto lácteo. Originalmente, de acuerdo a la propuesta, el indicador de resultado de la disminución del RCS debería corresponder a la reducción del promedio de los RCS de la leche de todos los cuartos analizados, sin embargo, la gran dispersión de estos datos entre los animales muestreados nos llevó a proponer un nuevo indicador más representativo y que considerara la heterogeneidad de los datos. A modo de ejemplo en el mes de abril (mes 1) en la región metropolitana en RCS promedio fue de 772.338 ±1.630.783 cel/mL.

  El criterio elegido fue el del percentil 75 (P75) que es una medida estadística no central que permite posicionar un valor con respecto al total de la muestra, esto quiere decir que el P75 es el valor debajo del cual se encuentran el 75% de las observaciones, lo que permite discriminar los valores que escapan de la distribución normal (valores extremos) que crean distorsión de los datos.

  El valor del P75 basal de los planteles en estudio se calculó en base a los resultados de RCS obtenidos en el primer muestreo de la región metropolitana (RM) y la zona sur (abril de 2014). De esta manera, se obtuvo un valor de P75 de 692.000 cel/mL para el plantel en estudio de la región metropolitana, y de 413.000 cel/mL para el plantel de la zona sur.

  De esta forma, el resultado esperado del estudio se estableció en que, la aplicación del dipping de cobre logre disminuir el valor de P75 de los dos planteles a 200.000 cel/mL. Los resultados obtenidos se presentan a continuación:

  Zona centro. Región Metropolitana. Melipilla

  El análisis de los resultados obtenidos a la fecha indica que en la RM la aplicación de **dipping de cobre** permitió reducir el P75 del grupo tratado con cobre desde 692.000 cel/mL, a 470.000 cel/mL en el mes de abril de 2015 (Figura 23).
  Como muestra la Figura 23, este valor ha fluctuado en el tiempo alcanzando su mínimo en octubre de 2014 con cel/mL, para posteriormente incrementarse de manera paulatina hasta alcanzar los 470.000 cel/mL

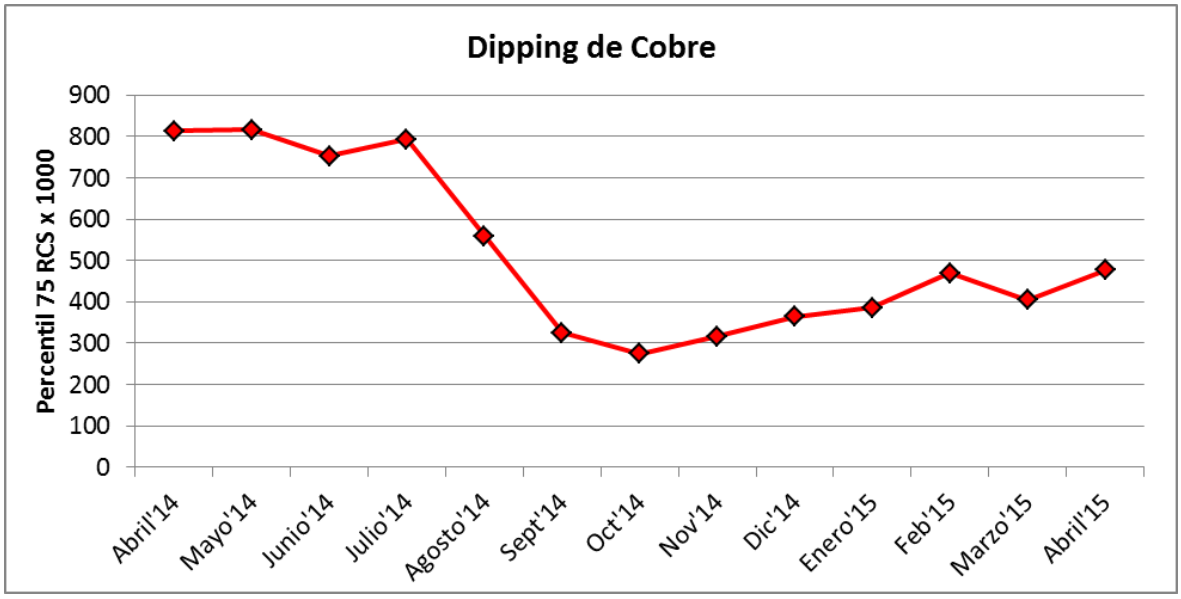


Figura 23. Percentil 75 de RCS (cel/mL) para cuartos de animales tratados con **dipping de cobre**, entre los meses de abril de 2014 y abril de 2015. **Región Metropolitana**

En el caso del **dipping de yodo** (grupo control) se observan fluctuaciones en el tiempo similares a las observadas en el grupo con cobre (Figura 24). Sin embargo, en el mes de febrero se observa un incremento importante del valor de P75, el cual se mantiene hasta el fin del estudio.

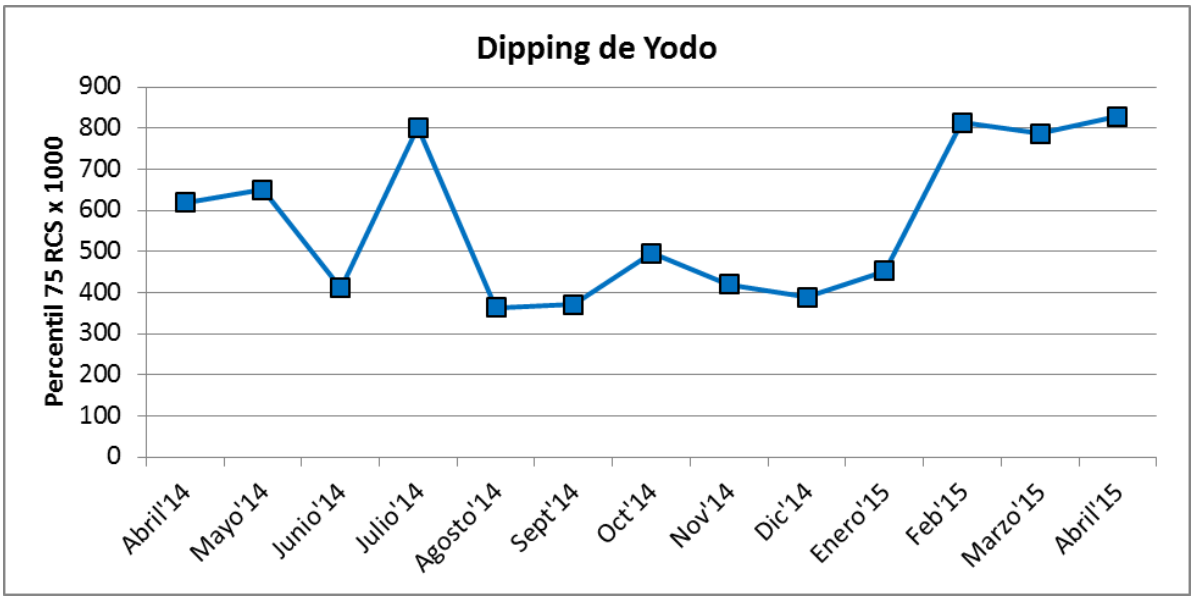


Figura 24. Percentil 75 de RCS para cuartos de animales tratados con **dipping yodo**, entre los meses de abril de 2014 y abril de 2015. **Región Metropolitana.**

Zona Sur. Región de los Lagos. Osorno.

El análisis de los resultados de la zona sur, evidencia que la aplicación de dipping de cobre produjo una importante reducción del P75 de RCS desde 413.000 cel/mL a 65.000 cel/mL, en el mes de diciembre (antes de que suspendiera el estudio por la sequía) (Figura 25). Posteriormente, al retomar el estudio, se observa un incremento en el P75 el cual termina con un valor de 187.000 cel/mL

En particular, en el mes de junio se observa un alza importante en el valor del P75, la cual se explica por el "efecto invierno" ya que posterior a dicho incremento, los valores descienden nuevamente, lográndose obtener un valor de P75 inferior a la meta propuesta en el proyecto de 200.000 cel/mL.

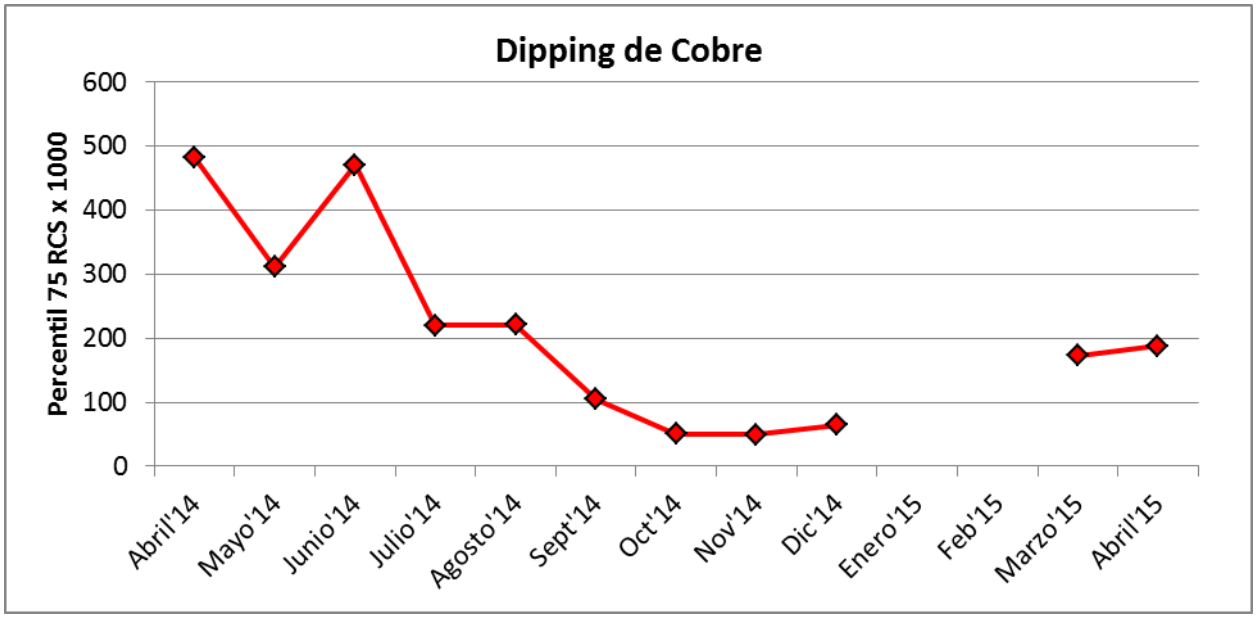


Figura 25. Percentil 75 de RCS para cuartos de animales tratados con **dipping de cobre**, entre los meses de abril de 2014 y abril de 2015. **Región de Los Lagos.**

En el caso del dipping de yodo (grupo control), al igual que en el grupo en tratamiento con cobre se observa un importante aumento en el P75 de RCS en el mes de junio (efecto invierno), y el resto de los meses mostró una tendencia a la baja, de manera muy parecida a lo observado con el dipping de cobre (Figura 26).

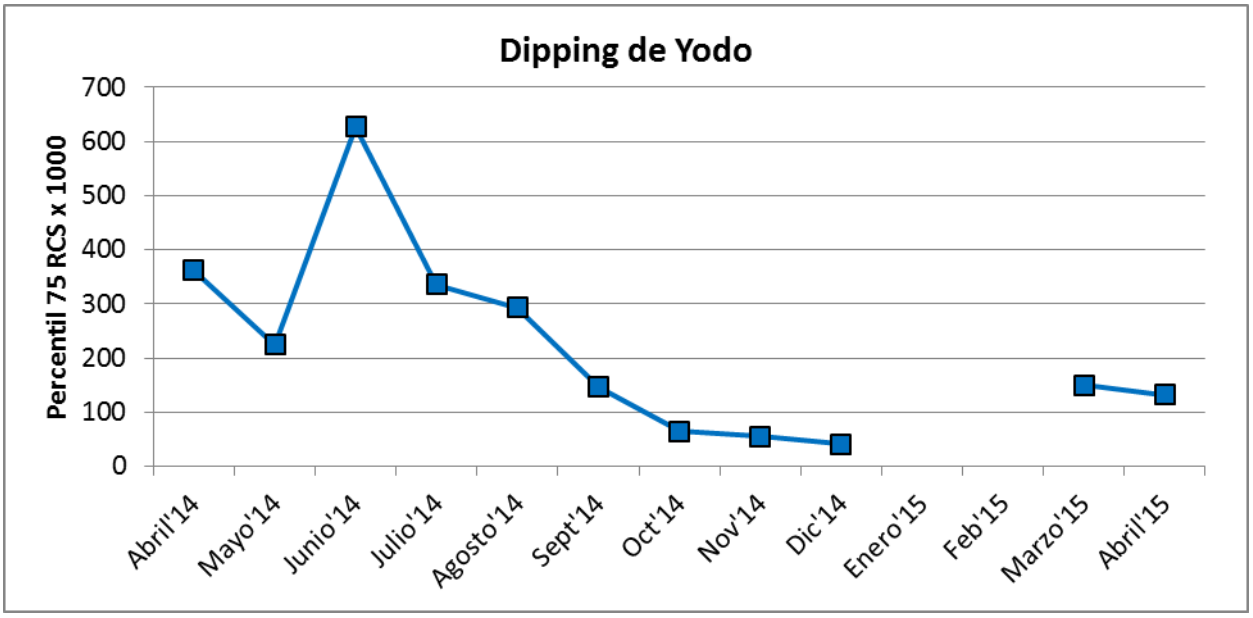


Figura 26. Percentil 75 de RCS para cuartos de animales tratados con **dipping yodo**, entre los meses de abril de 2014 y abril de 2015. **Región de los Lagos.**

- ***Prevalencia de Microorganismos en leche.***

  Se determinó la prevalencia de los microorganismos ambientales y contagiosos en muestras de leche recolectadas en el estudio *in vivo*.
  Para este análisis se consideró aquellos microorganismos que en el análisis microbiológico resultaron tener una abundancia relativa alta y que fueran aislados de muestras de leche donde al menos un cuarto tuviera un RCS >250.000 cel /mL.
  Los microorganismos identificados fueron clasificados en ambientales y contagiosos.
  Los microorganismos ambientales son aquellos agentes cuyo hábitat es el medio ambiente que circunda a los animales confinados en sistemas de producción cerrados. Estos se encuentran distribuidos en la sala de ordeña, camas y en el suelo de los corrales donde pueden alcanzar la ubre[1]. Los microorganismos considerados ambientales son básicamente *E. coli*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Prototheca zopfii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*, *Pseudomona aeruginosa*, *Nocardia asteroides* y *Clostridium perfringens*[2].

[1] Concha, C., *Mastitis bovina: nuevos aspectos de diagnóstico, tratamiento y control.* Publicación Técnico Ganadera, Facultad de Cs Agronómicas, Universidad de Chile, 2007. **33**.
[2] Gasque, R., in *Enciclopedia Bovina*. 2008. p. 182 - 187

La presencia de *microorganismos contagiosos* en la leche se asocia a sistemas de explotación animal en praderas y son producidas por microorganismos cuyo hábitat principal es el canal del pezón o la piel externa de la ubre. El contagio ocurre fundamentalmente durante la ordeña a través de las manos de los operarios y los equipos. Entre los microorganismos involucrados en este tipo de mastitis se encuentran, *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus* coagulasa negativa (SCN), *Mycoplasma bovis* y *Corynebacterium bovis*[3].

A continuación se presenta los resultados de prevalencia de los microorganismos por región:

Zona centro. Región Metropolitana. Melipilla.

Los resultados de prevalencia de microorganismos ambientales y contagiosos se presentan en la Figuras 27 y 28 respectivamente. Se observa que el número de microorganismos ambientales identificados es menor con respecto a los contagiosos. Los microorganismos ambientales no presentan grandes diferencias al contrastar los dos tratamientos aplicados, es posible describir una tendencia a la baja a medida que avanza el tiempo, sin embargo hay meses en que el número de estos microorganismos aumenta, en particular noviembre de 2014 para las muestras de cobre y los meses de mayo y octubre de 2014 para el yodo (Figura 27).
Con respecto al número de los microorganismos contagiosos se observa que el dipping de cobre presenta una tendencia a la baja de este tipo de agentes más pronunciada que lo observado en el dipping de yodo (Figura 28). En este sentido es posible decir que el dipping de cobre favorece a la reducción de microorganismos contagiosos en las ubres bajo este tipo de tratamiento.

[3] De Vliegher, S., et al., *Invited review: Mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control.* J Dairy Sci, 2012. **95**(3): p. 1025-40

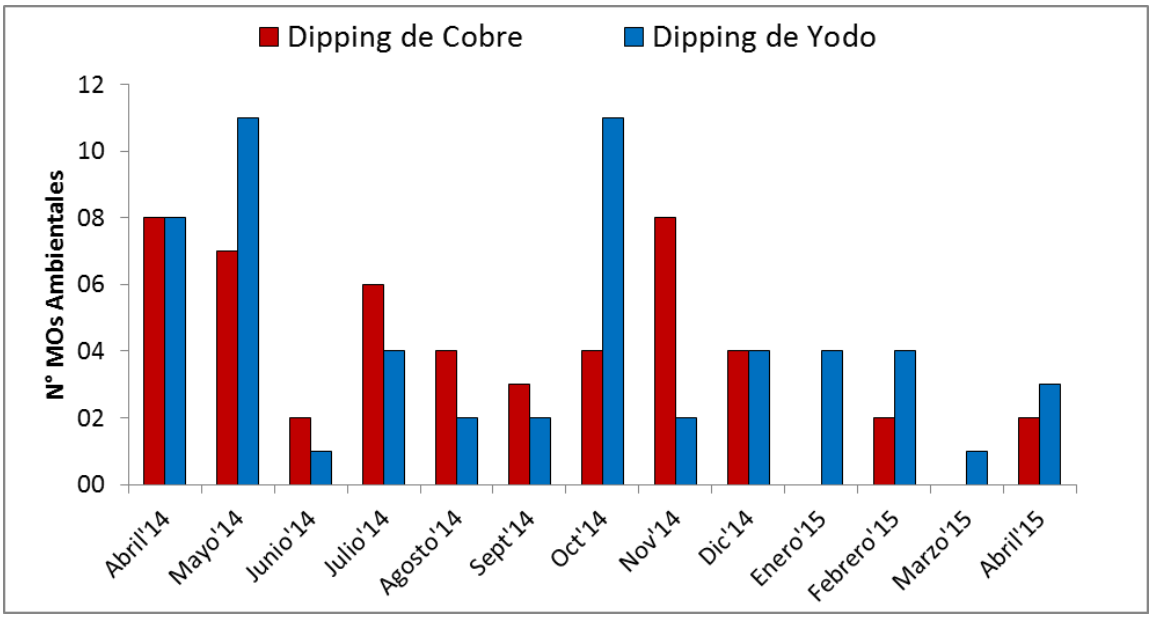


Figura 27. Detección de microorganismos ambientales causantes de mastitis bovina en muestras de leches recolectadas de vacas provenientes con cobre (grupo en estudio) y yodo (grupo control). **Región Metropolitana.**

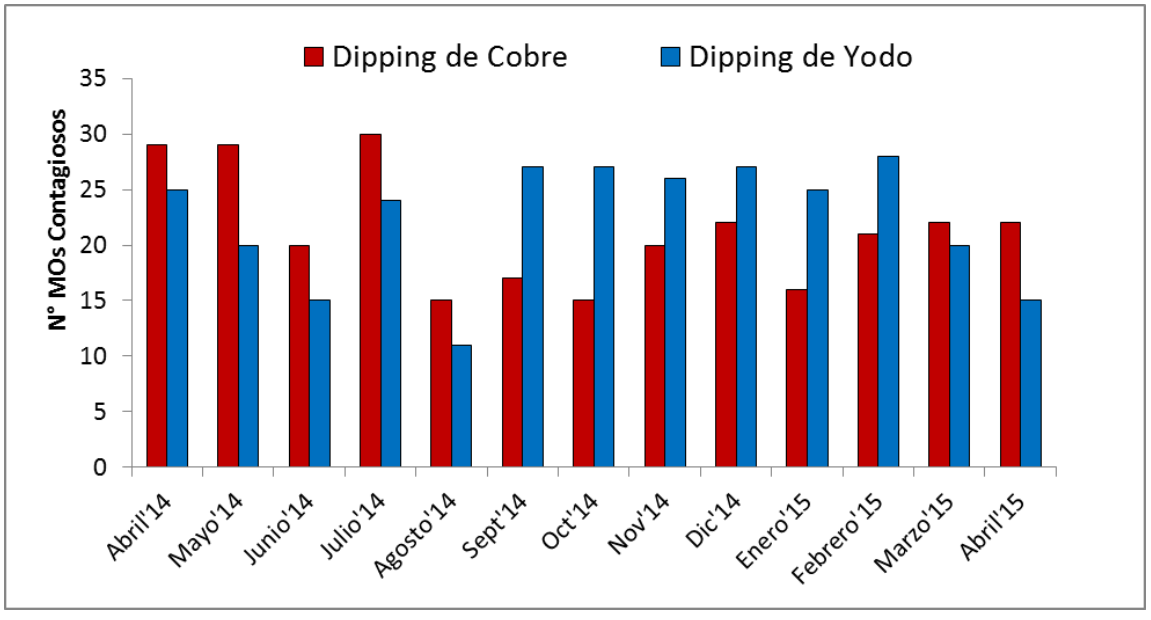


Figura 28. Detección de microorganismos contagiosos en muestras de leches recolectadas de vacas provenientes con cobre (grupo en estudio) y yodo (grupo control). **Región Metropolitana.**

Zona Sur. Región de Los Lagos. Osorno

Los resultados de prevalencia de microorganismos ambientales y contagiosos se presentan en la Figuras 29 y 30.

Se observa que en la zona sur la aplicación de un dipping de cobre produjo una baja apreciable en la presencia de microorganismos ambientales, que si bien se observa con el dipping de yodo, la magnitud del descenso con el tratamiento con cobre es mayor (Figura 29).

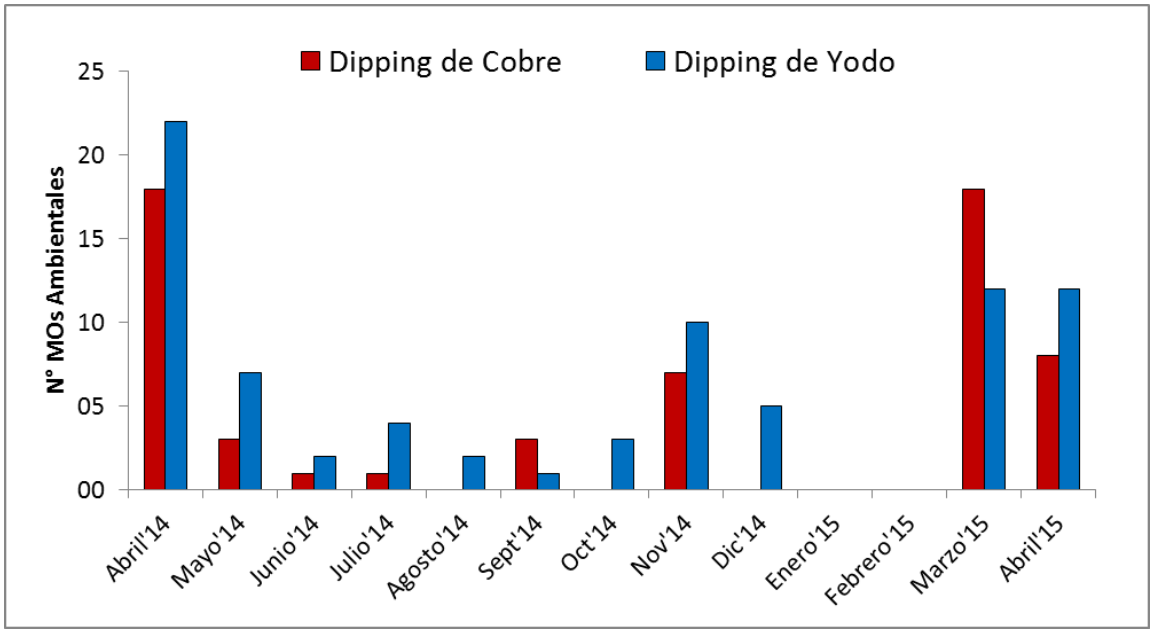


Figura 29. Detección de microorganismos ambientales causantes de mastitis bovina en muestras de leches recolectadas de vacas provenientes con cobre (grupo en estudio) y yodo (grupo control). **Región de los Lagos.**

Los microorganismos contagiosos identificados en las muestras provenientes de la zona sur presentan una tendencia a la baja con el tratamiento con cobre mayor a la observada con yodo y más sostenida en el tiempo (Figura 30).

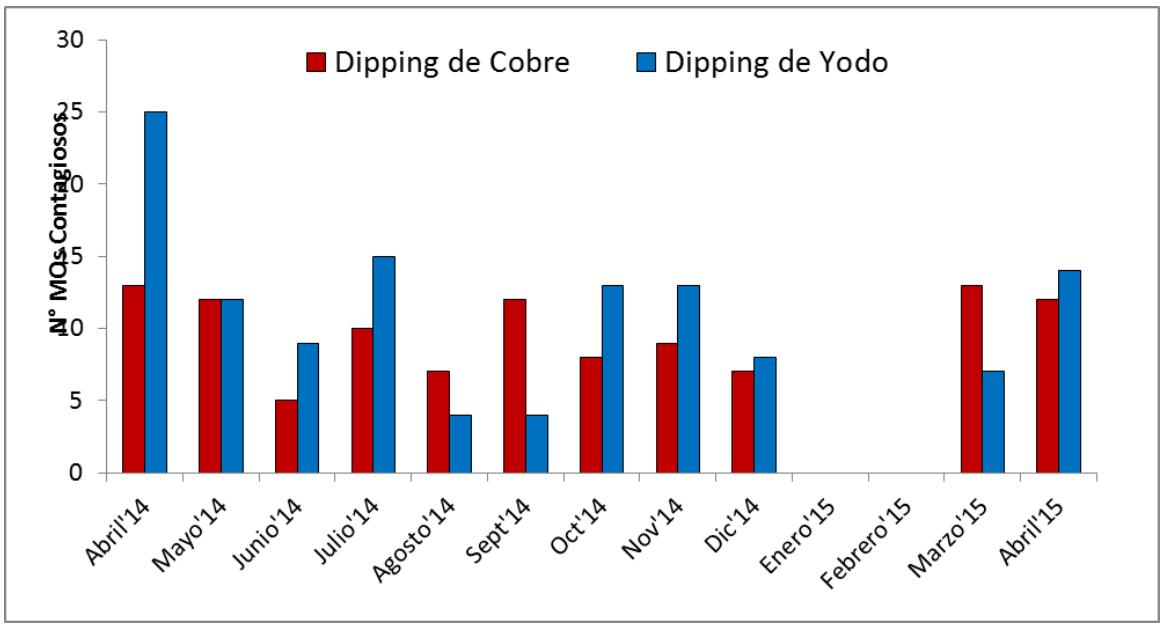


Figura 30. Detección de microorganismos contagiosos en muestras de leches recolectadas de vacas provenientes con cobre (grupo en estudio) y yodo (grupo control) **Región de los Lagos.**

En el **Anexo 7** se presenta un listado que detalla las especies de microrganismos ambientales y contagiosos identificados en el presente estudio en la etapa *in vivo*, para la Región Metropolitana y la de Los Lagos.

- ***Caracterización del perfil de susceptibilidad a antibióticos en cepas recolectadas en diferentes tiempos.***

Zona centro. Región Metropolitana. Melipilla.

Se evaluó la susceptibilidad a 6 antibióticos en un subgrupo de los aislados recolectados a diferentes tiempos. Este análisis pretendió evaluar si la susceptibilidad a los antibióticos presenta cambios en el tiempo y si es así como se relacionan con el dipping aplicado.
Para los aislados del dipping de cobre los resultados mostraron una alta sensibilidad (cercana al 100%) de estos a casi todos los antibióticos evaluados en los diferentes meses (Figura 31). Después de casi un año de estudio (en el mes de enero'15), tetraciclina presentó una leve caída de las cepas sensibles a un 86%.

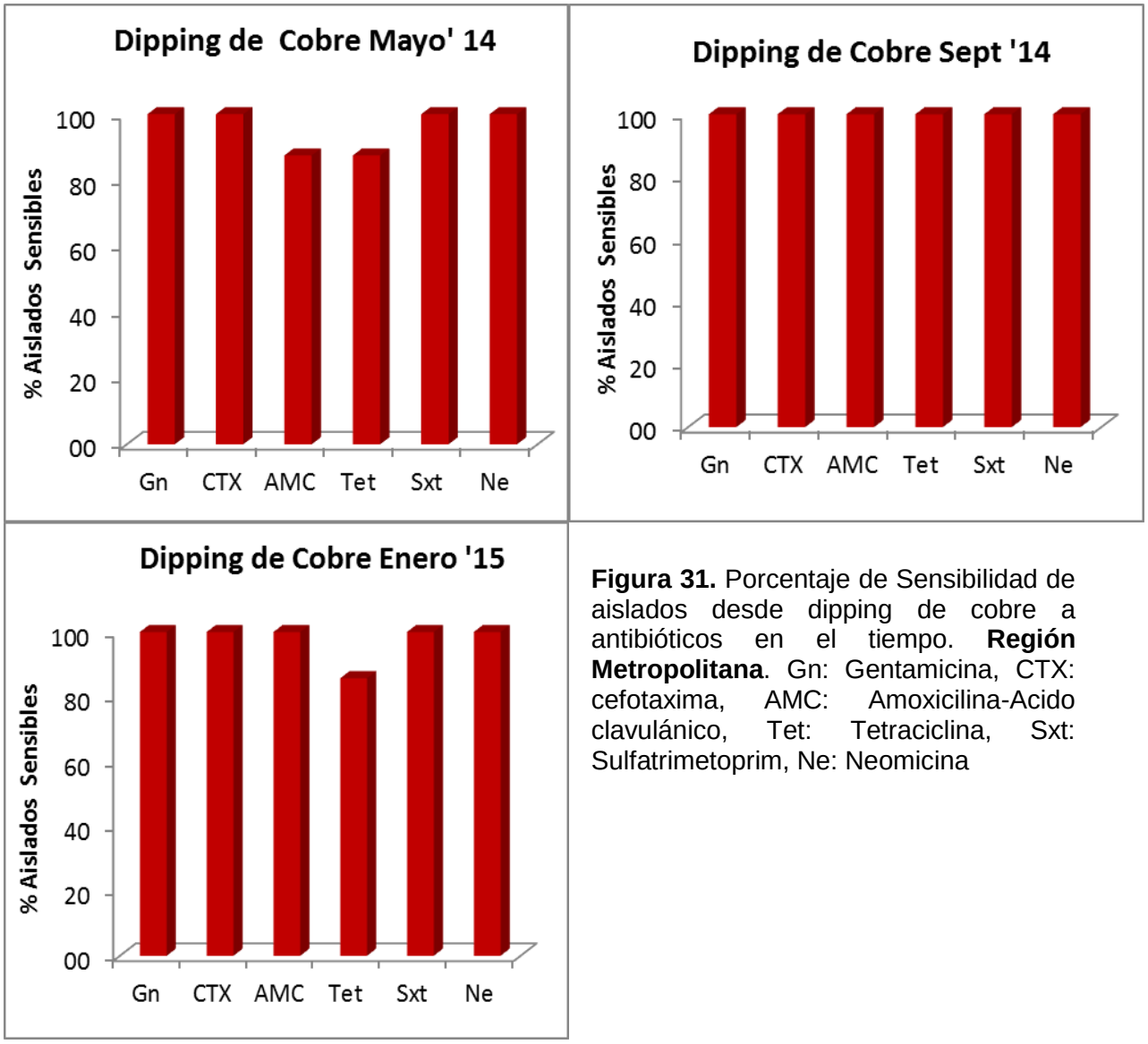


Figura 31. Porcentaje de Sensibilidad de aislados desde dipping de cobre a antibióticos en el tiempo. **Región Metropolitana**. Gn: Gentamicina, CTX: cefotaxima, AMC: Amoxicilina-Acido clavulánico, Tet: Tetraciclina, Sxt: Sulfatrimetoprim, Ne: Neomicina

Con respecto al análisis de susceptibilidad a antibióticos de los aislados desde dipping de yodo (Figura 32), estos también presentaron una alta sensibilidad a los agentes evaluados y no se observaron cambios mayores en el tiempo.

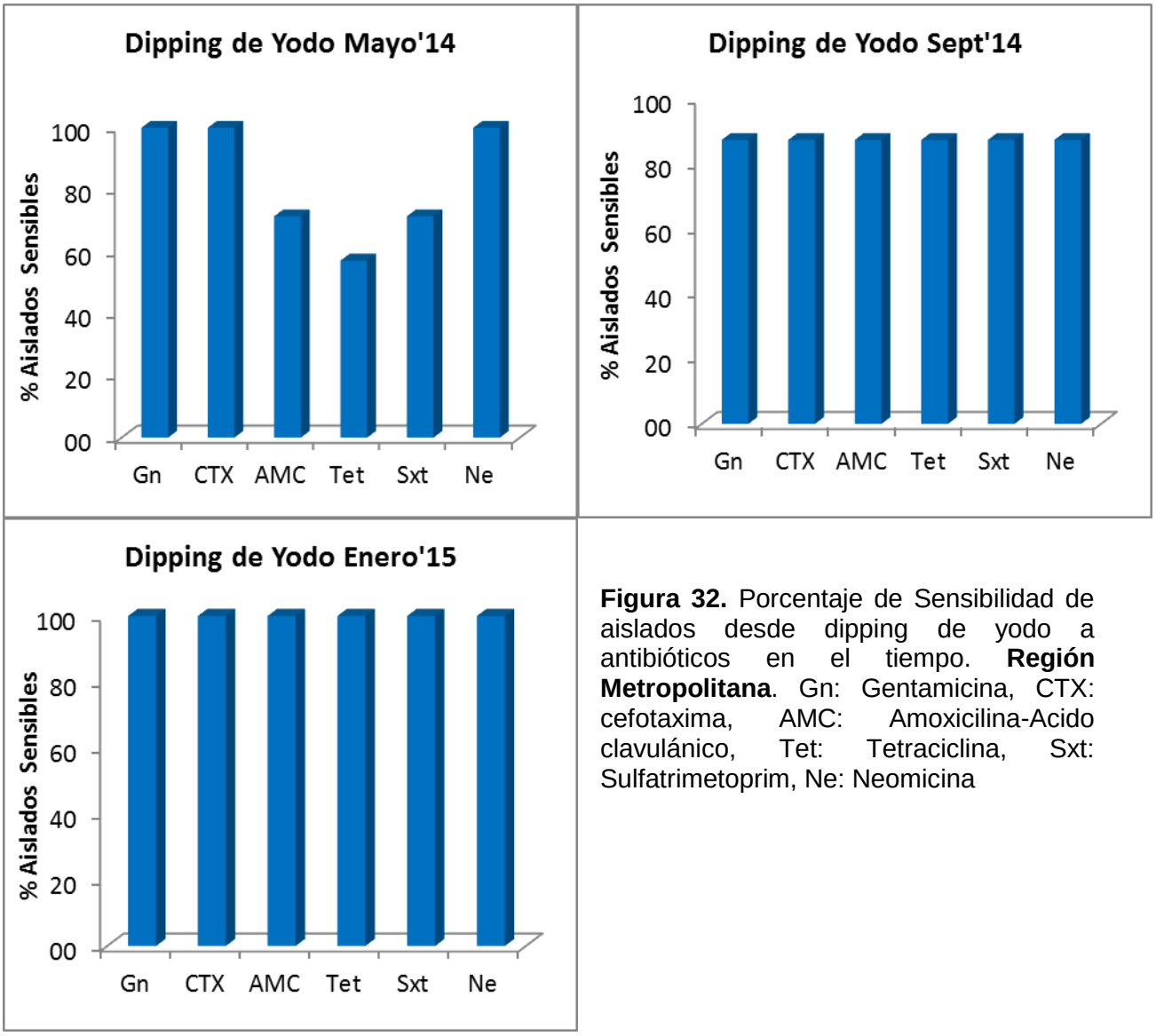


Figura 32. Porcentaje de Sensibilidad de aislados desde dipping de yodo a antibióticos en el tiempo. **Región Metropolitana**. Gn: Gentamicina, CTX: cefotaxima, AMC: Amoxicilina-Acido clavulánico, Tet: Tetraciclina, Sxt: Sulfatrimetoprim, Ne: Neomicina

Zona sur. Región de los Lagos. Osorno.

Los antibiogramas de los microorganismos aislados del grupo con dipping de cobre mostraron una alta frecuencia de susceptibilidad a los antibióticos evaluados (cercana al 100%). En particular aislados de este grupo presentaron una frecuencia mayor de resistencia (29%) para el antibiótico Amoxicilina-Acido clavulánico en los meses de mayo y septiembre. Sin embargo, los aislados del mes de diciembre fueron todos sensibles a este agente antibacteriano.

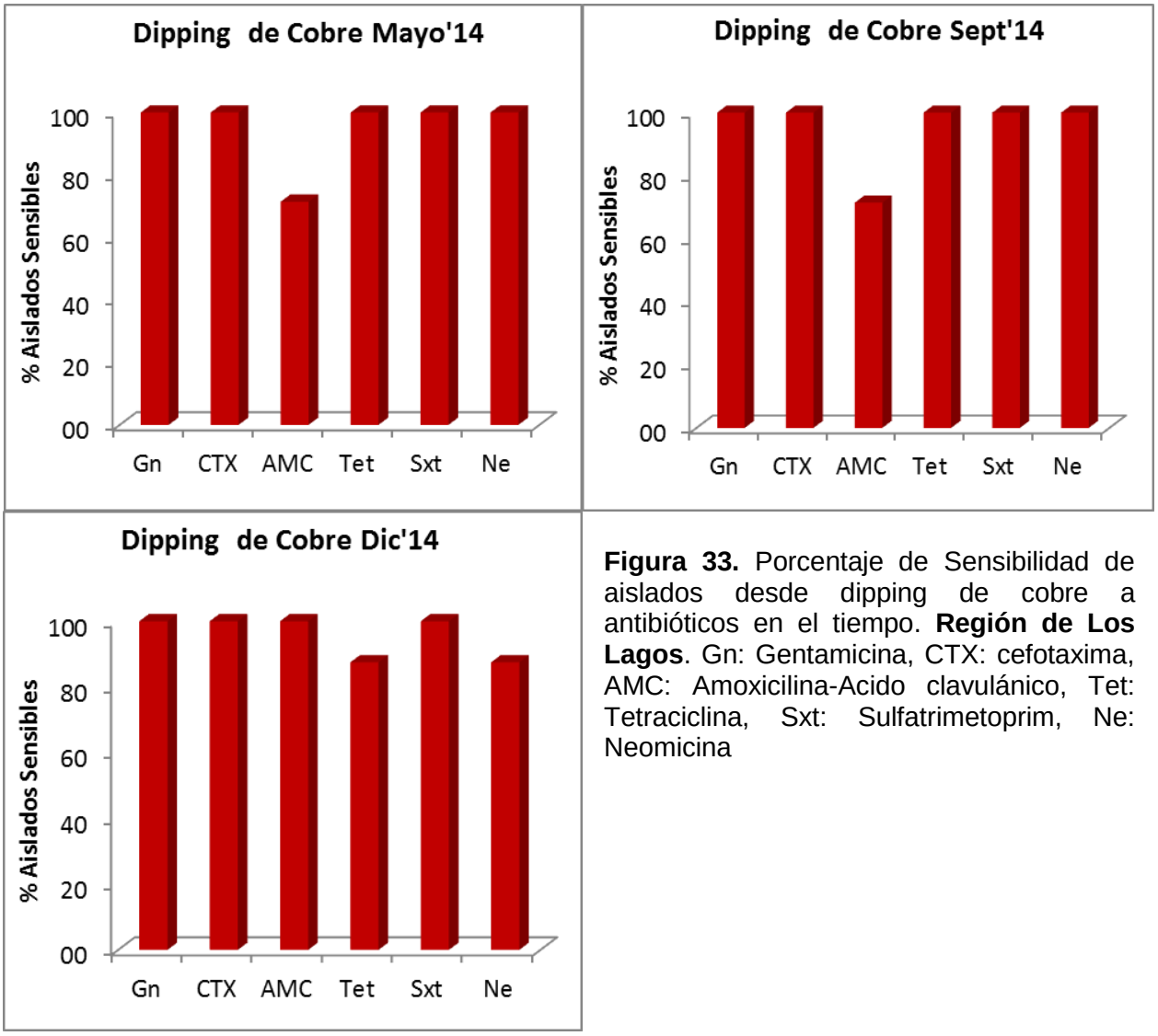


Figura 33. Porcentaje de Sensibilidad de aislados desde dipping de cobre a antibióticos en el tiempo. **Región de Los Lagos**. Gn: Gentamicina, CTX: cefotaxima, AMC: Amoxicilina-Acido clavulánico, Tet: Tetraciclina, Sxt: Sulfatrimetoprim, Ne: Neomicina

Para los aislados del tratamiento con yodo se observan resultados de susceptibilidad a antibióticos semejantes a lo observado con cobre en la misma región (Figura 34).

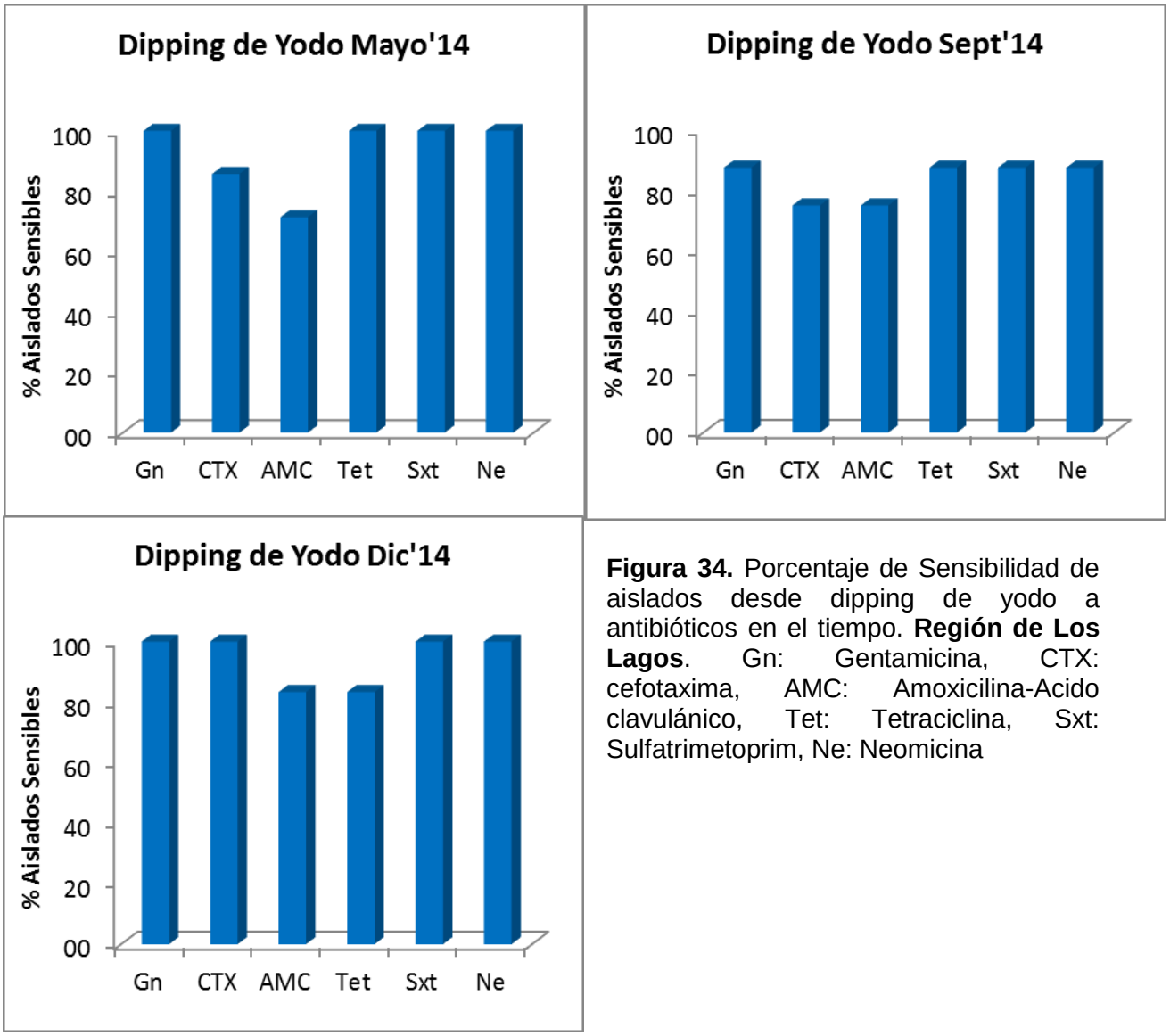


Figura 34. Porcentaje de Sensibilidad de aislados desde dipping de yodo a antibióticos en el tiempo. **Región de Los Lagos**. Gn: Gentamicina, CTX: cefotaxima, AMC: Amoxicilina-Acido clavulánico, Tet: Tetraciclina, Sxt: Sulfatrimetoprim, Ne: Neomicina

En conclusión el estudio temporal de la susceptibilidad a antibióticos reflejó resultados independientes del tratamiento (dipping de cobre o yodo) y además se detectó una alta frecuencia de aislados sensibles a los antibióticos testeados.

- ***<u>Susceptibilidad a CWR-5 (formulación en base a cobre) de cepas recolectadas en diferentes tiempos.</u>***

  Con el fin de evaluar si es que la aplicación de dipping en base a cobre puede favorecer la selección de cepas resistentes a este metal es que se decidió evaluar los niveles de CMI-CWR5 en cepas aisladas en diferentes tiempos de la intervención *in vivo*. Los resultados se contrastan con lo observado para los aislados provenientes con dipping de yodo.
  Para la Región Metropolitana (Figura 35) y la Región de los Lagos (Figura 36) no se detectó un aumento en los niveles de la CMI-CWR5 para los aislados provenientes del dipping con cobre. Cabe destacar que la CMI-CWR5 mas alta detectada fue de 2.5 % a diferencia de lo identificado en las muestras del estudio *in vitro* donde para este producto se detectó CMI tan alta como 10% y fue considerado como el más eficiente (ver anexo 6). En conclusión la aplicación de un dipping en base a cobre no afecta a susceptibilidad bacteriana a este metal.

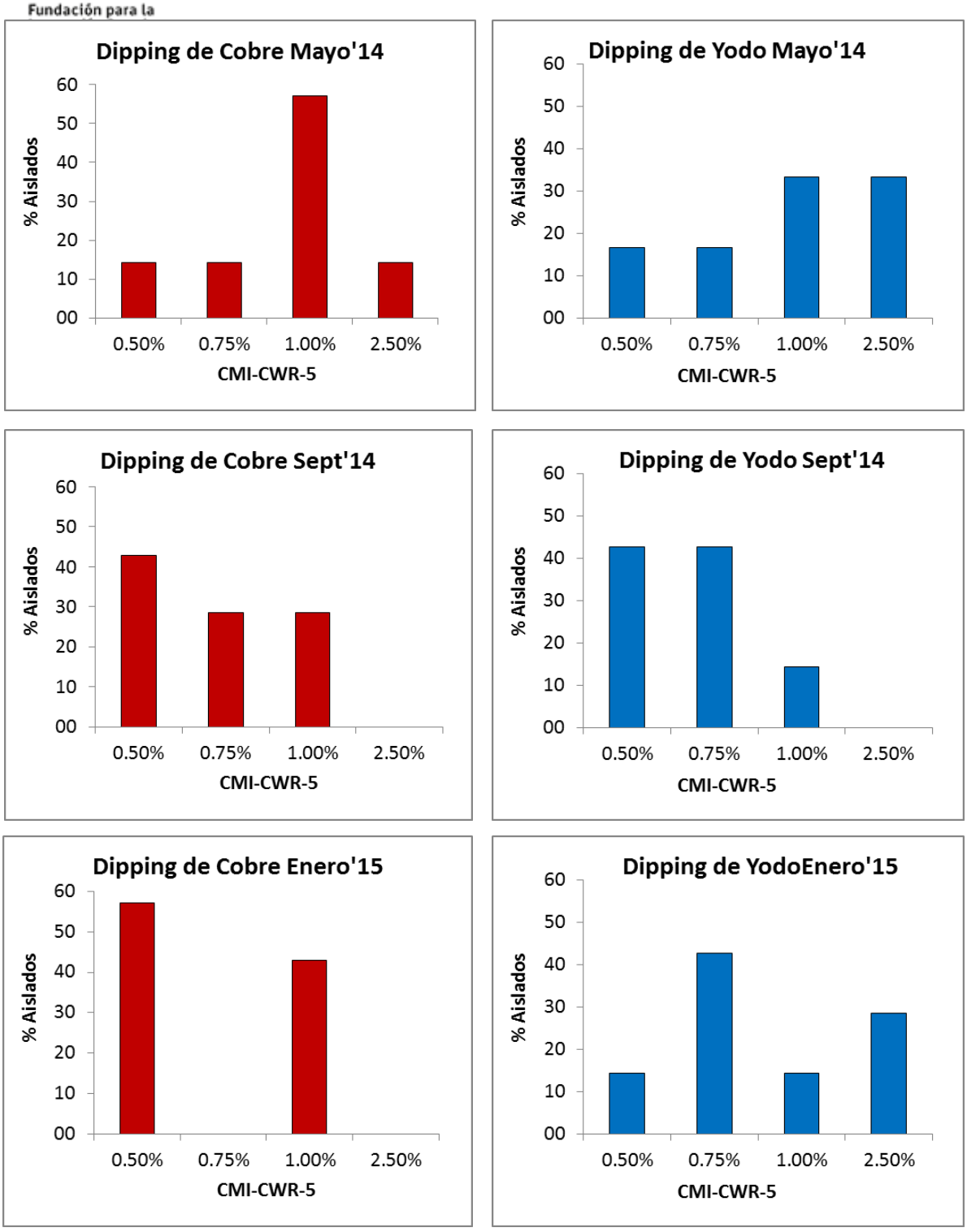


Figura 35. Frecuencia de aislados con respecto a sus valores de CMI-CWR5 en el tiempo. Se comparan aislados desde muestras con dipping de cobre y de yodo. **Región Metropolitana.**

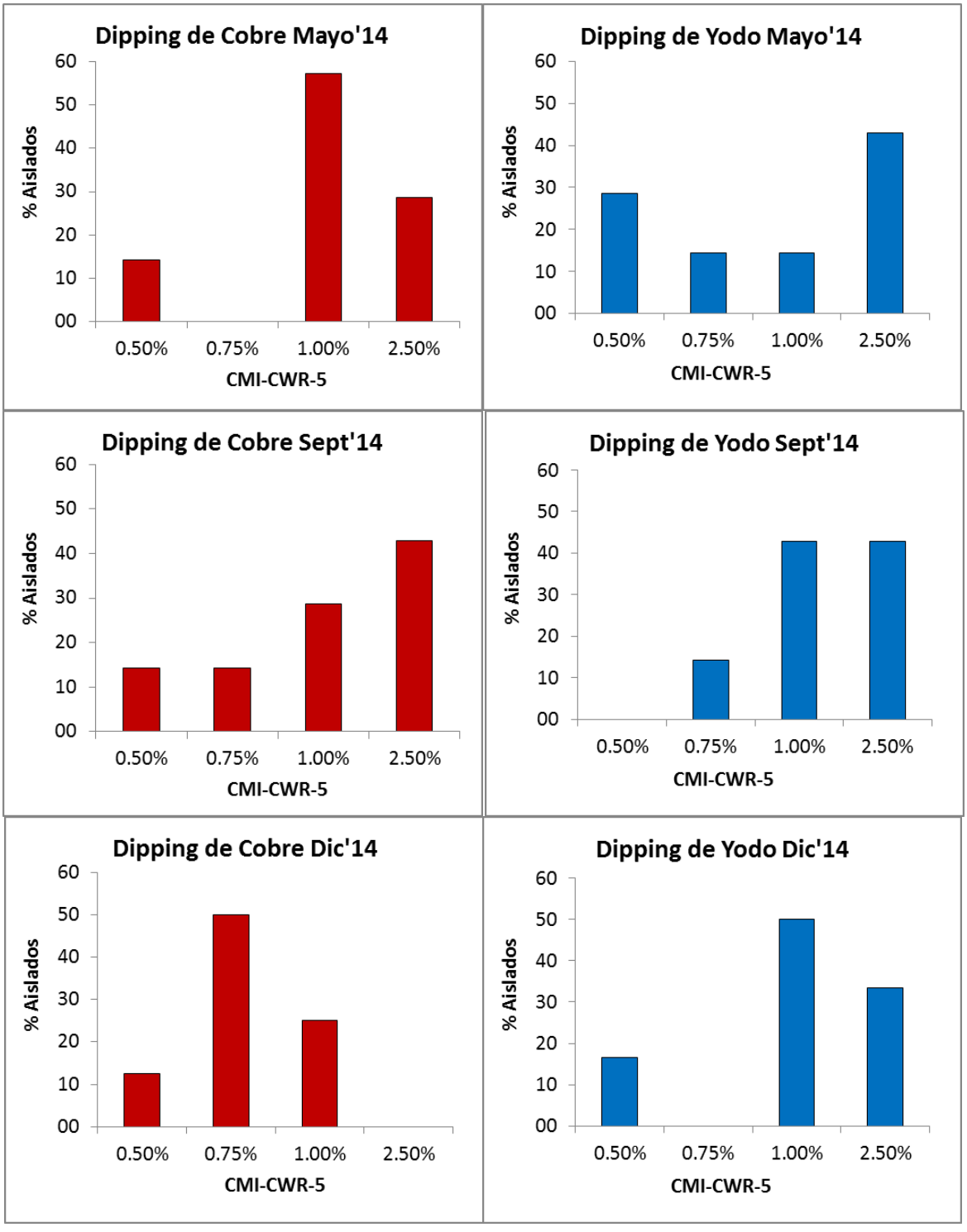


Figura 36. Frecuencia de aislados con respecto a sus valores de CMI-CWR5 en el tiempo. Se comparan aislados desde muestras con dipping de cobre y de yodo. **Región de Los Lagos.**

- ***<u>Contenido de cobre en muestras de leche y ambiente de muestras recolectadas en diferentes tiempos.</u>***

  Con el fin de evaluar el impacto de la aplicación del dipping de cobre sobre el contenido residual del cobre se determinó la cantidad de este metal en leche y muestras ambientales a través del tiempo.
  Las muestras de leche correspondientes a la Región Metropolitana y la Región de Los Lagos no presentan mayores fluctuaciones en el contenido de metal y están significativamente por debajo de la meta establecida en el proyecto que es de 0.5 mg/kg de leche (Figuras 37 y 38) . Este punto de corte se estableció de acuerdo a lo estipulado en Reglamento Sanitario de los Alimentos para la presencia de metales en leche.

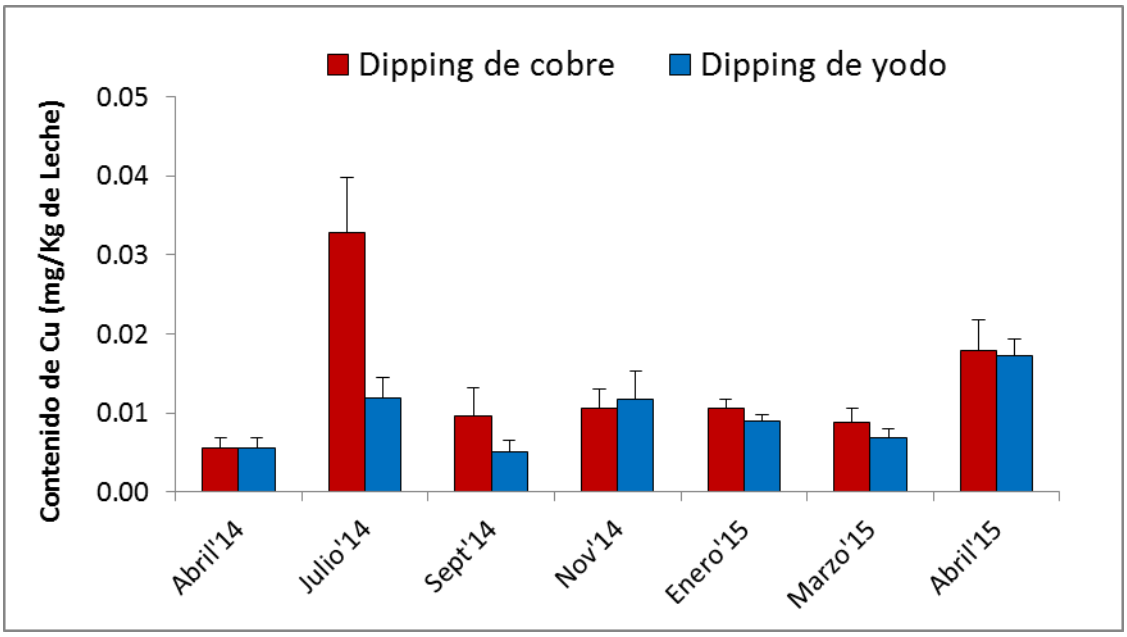


Figura 37. Contenido de cobre en muestras de leche en el periodo del estudio *in vivo*. **Región Metropolitana**. El valor establecido por el RSA es de 0.5 mg/Kg de leche.

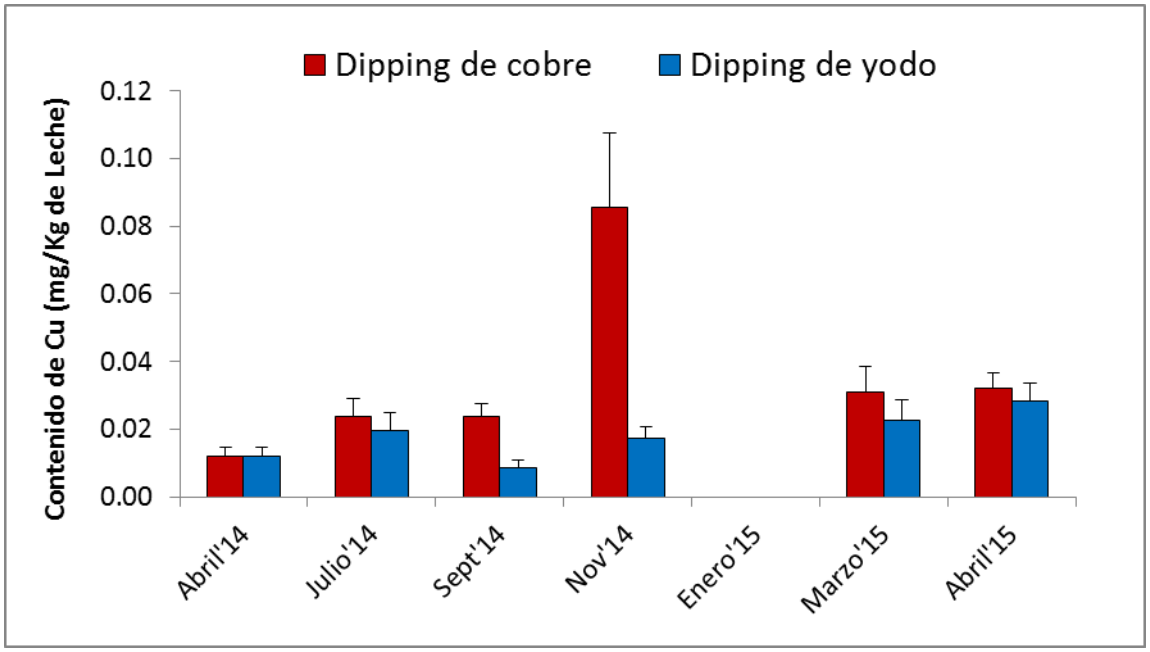


Figura 38. Contenido de cobre en muestras de leche en el periodo del estudio *in vivo*. **Región de los Lagos**. El valor establecido por el RSA es de 0.5 mg/Kg de leche.

Referente al impacto de la aplicación de dipping de cobre en el ambiente los resultados de las determinaciones de cobre en tierra demostraron leves fluctuaciones en el tiempo pero con valores significativamente menores a lo establecido bajo condiciones normales en suelo. Según Galan y Romero el cobre puede fluctuar entre 0.1 y 250 ppm dependiendo del tipo de suelo.

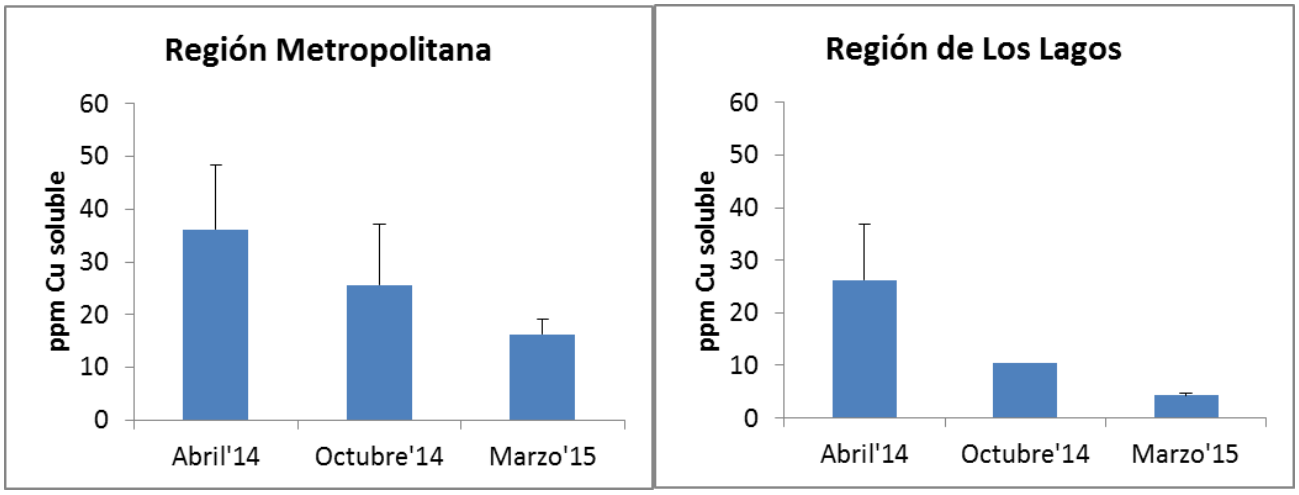


Figura 39. Contenido de cobre en suelos. Las muestras fueron tomadas desde suelos de las lecherías participantes en el estudio.

Los valores del contenido de cobre en muestras de agua de las respectivas lecherías tampoco superaron lo establecido por la norma. El contenido de cobre promedió para las muestras de la zona centro en 4.03 ±2.0 ppm y en las muestras de la zona sur de 27.0±10 ppm.

4.3 HITOS LOGRADOS

Para este objetivo en la propuesta se estableció un solo Hito Crítico "Validación in vivo del producto seleccionado", el cual pudo ser alcanzado, logrando validarse en terreno la efectividad del producto CWR-5, tanto para disminuir la prevalencia de MB y sobre todo la prevalencia de mastitis clínica, como el percentil 75. Los resultados fueron más favorables en la zona sur, donde se concentra la mayor cantidad de productores lecheros del país.

4.4 PROBLEMAS EN LAS ACTIVIDADES REALIZADAS

La realización de este objetivo presentó diversos problemas que tuvieron que ir siendo solucionados a medida que avanzaba el estudio. Estos se presentaron tanto en la región metropolitana como en la zona sur y tuvieron consecuencias que variaron desde cambios menores en la realización de actividades, hasta tener que realizar una reprogramación en la etapa final del estudio.

La descripción de dichos problemas, sus consecuencias y los ajustes realizados para poder resolverlos se describen a continuación.

a) **Problema 1**: Hubo problemas iniciales tanto en la zona sur como centro para comprometer planteles lecheros que contaran con las condiciones necesarias para el trabajo, número de animales en lactancia y aprobación de los productores.

Consecuencias: Atraso de un mes en el inicio del estudio "*in vivo*" Este se sumó al atraso de un mes en el inicio del estudio (año 2013), con lo cual la ejecución del proyecto se desfasó 2 meses con lo planificado en la propuesta original.

Ajustes realizados: Se mantuvo el programa de muestreo (1 muestreo mensual) para dar término al estudio "in vivo" en el mes de marzo de 2015.

b) **Problema 2**: No se pudo realizar muestreos en la zona sur durante los meses de enero y febrero. Esto debido a la sequía que afectó a la región de Los Lagos durante los meses de verano, la cual disminuyó la cantidad de alimento disponible para los animales (por el sistema de alimentación con pastoreo) afectando directamente a la cantidad de leche producida.

Consecuencias: En la zona sur se realizaron menor cantidad de muestreos que los estipulados en el programa y el plan operativo. Con esto se analizaron menos muestras de las planificadas en la zona sur.

Ajustes realizados: Se tuvo que retrasar el desarrollo del estudio in vivo en un mes más. Con esto se logró recuperar uno de los meses perdidos en la zona sur. Junto con esto, para no disminuir de manera importante el número de muestras procesadas y analizadas, se decidió aumentar a un muestreo más a la región metropolitana. De este modo se realizaron 11 muestreos en el sur, y 13 en la zona centro, logrando realizarse los 24 muestreos propuestos originalmente.

c) **Problema 3**: El número total de animales propuestos para el estudio fue 72 en la zona sur y 72 en la zona central (36 grupo control y 36 en estudio) Este número presentó fluctuaciones debido al manejo de los rebaños (animales que se secan y salen hasta que retoman su productividad), o a animales que se descartan (animales viejos o enfermos) y animales que no se pueden ordeñar

Consecuencias: Los grupos de estudio han resultado ser más pequeños a lo propuesto (pero no menos del 80 % de lo planificado), con lo cual el número de muestras analizadas por mes resultó ser menor a la que originalmente se había planificado.

Ajustes realizados: A pesar de la disminución de animales en estudio, se ha logrado mantener equiparado el número en cada grupo. De este modo los resultados de prevalencia de MB y percentil 75 de RCS pueden ser comparados. Así cada animal nuevo que ingresaba al estudio pasaba a formar parte del grupo con menor cantidad de animales.

d) **Problema 4**: Originalmente se planificó marcar a los animales con collarines de colores en las patas, sin embargo este demostró ser un mal sistema dado que el collarín se enganchaba fácilmente y se pierde, e incluso en algunos casos producía daño a los animales. Esta situación llevó a retirar los collarines y buscar nuevas estrategias de marcaje de animales.

Consecuencias: Confusión de animales y el grupo al que pertenecen durante el ordeño y la aplicación del dipping.

Ajustes realizados: Este problema se detectó tempranamente por lo que se estudiaron otros sistemas de marcaje de animales. Se optó por utilizar de manera conjunta una cinta de marcaje de colores en la cola de los animales, lo que probó ser un método eficiente, que no daña a los animales y duradero (resiste el barro, el agua y no se engancha) y el marcaje con lápiz de color. Este último, si bien hay que re-aplicarlo semanalmente, hizo más simple la labor de los ordeñadores.

e) **Problema 5**: Se realizó una re-itemización de dinero para poder contar con fondos para poder fidelizar a los ordeñadores del plantel de la zona sur (plantel comercial), quienes se encargan de la aplicación diaria de los dipping de cobre y yodo, del marcaje de los animales, y colaboran con la toma de muestra de leche mensual.

Consecuencias: El pago a dos ordeñadores del plantel de Osorno permitió la fidelización de estos trabajadores. Dado que estos son los encargados directos de la aplicación de los tratamientos y colaboran cercanamente en la toma de muestras, pareció esencial que estén comprometidos con el proyecto.

Ajustes realizados: Re-itemización desde el fondo de gastos de imprevistos hacia el pago de remuneraciones.

5 OBJETIVO. "Difundir y Comercializar el producto validado".

Para la realización de este objetivo, se planificaron distintas actividades de difusión orientadas a dar a conocer el producto para así impulsar y facilitar su comercialización.

Estas actividades fueron planificadas y llevadas a cabo en su mayoría por el asociado del proyecto Biogenesis Animal Health Chile y se dividen en 4 grupos:

1. Desarrollo de seminarios informativos para dar a conocer el producto de dipping formulado en base a cobre (cuyo nombre comercial es Cow Guard).
2. Asesorías directas en terreno a productores lecheros acerca de las propiedades y la manera correcta de utilización del producto formulado.
3. Contacto directo con vendedores intermediarios.
4. Publicidad y posicionamiento comercial del producto a través de la página web de Biogénesis Animal Health Chile.

A continuación se describen en mayor detalle las actividades realizadas en cada uno de los puntos.

1. Desarrollo de seminarios informativos.

Se realizaron diversos seminarios y charlas informativos donde se presentaron los resultados parciales del estudio, además de participar en jornadas productivas donde se pudo exponer las características del producto y sus propiedades. Estas actividades se realizaron principalmente en la zona sur (VIII, X y XIV regiones) debido a que la mayor producción lechera y por lo tanto la mayor concentración de potenciales compradores se encuentra en estos lugares.

a) **II Jornada de Innovación en Producción Nacional. Los Angeles. Chile. 29 de agosto de 2014**. En el marco de las jornadas se realizó la presentación "Uso del cobre en prevención de mastitis" en donde el profesor Guillermo Figueroa expuso los resultados que hasta la fecha se tenían y la proyección de estos. No es posible contar con la lista de participantes debido a que es información confidencial de los organizadores de las jornadas. El programa de las charlas totales que se presentaron se encuentran en el Anexo 8

b) **Seminario con productores de Nestlé Chile. X Región. Osorno. Chile. Diciembre de 2014**. En esta ocasión se invitó a productores lecheros de Nestlé planta Osorno a conocer el producto y sus propiedades. La charla fue dada por el Profesor Guillermo Figueroa con el nombre "Uso del Cobre para el control de la Mastitis". Asistieron 55 productores de toda la región. Tal como en la ocasión anterior se presentaron los avances del estudio hasta la fecha, con la promesa de hacer una nueva presentación al momento de que el estudio estuviera terminado. (Material visual de la presentación en Anexo 8)

c) **Seminario en Hotel Sonesta. X Región. Osorno. Chile. Enero 2015**. La estrategia utilizada por Biogénesis Animal Health Chile para atraer agricultores fue desde un principio hacer invitaciones en conjunto con las plantas procesadoras de leche que reciben el acopio de los productores lecheros. Es así que en este seminario se contó con la participación y respaldo de las Plantas de procesamiento de Leche de Soprole de Osorno, Nestle Osorno /Llanquihue y Los Ángeles, así como también la Planta de leche COLUN. Todas las empresas se preocuparon de invitar e incentivar la asistencia de los productores que les proveen leche. El objetivo de este seminario fue hacer la presentación formal del cobre como elemento alternativo para el control de mastitis, en donde se presentaron los resultados parciales de la investigación llevada a cabo por el INTA con el auspicio de FIA. En total asistieron 150 productores lecheros. El apoyo de imágenes del seminario se encuentra en el Anexo 8

d) **Charla a Productores de COLUN. XIV Región. La Unión. Chile. Marzo 2015**. En esta oportunidad la empresa COLUN invitó a productores lecheros que les proveen de materias primas a conocer los avances y resultados de la utilización de cobre como controlador de mastitis bovina. Participaron 215 productores de toda la región. Se presentaron los resultados del estudio *in vivo* procesados hasta la fecha con la promesa de hacer una nueva presentación con los resultados finales. El apoyo de imágenes del seminario se encuentra en el Anexo 8.

e) **Seminario a Productores Lecheros Osorno. X Región. Osorno. Chile. Marzo 2015**. Tal como se había realizado en el mes de Enero, las distintas

empresas lecheras invitaron a los productores lecheros que les proveen de leche a conocer el producto para dipping formulado en base a cobre para el control de mastitis. La asistencia total de fue de 150 productores. (Material visual de la presentación en Anexo 8)

2. Asesorías directas en terreno

Las asesorías en terreno de forma directa a los productores en sus planteles se han realizado de manera permanente por médicos veterinarios de Biogénesis Animal Health Chile, e involucran tanto al dueño de la lechería, como a los médicos veterinarios encargados y asesores y al personal de ordeña. Este tipo de trabajo es lento pero es el más seguro en relación a la transmisión de la información de "boca a boca"que es la única manera de generar confianza en el uso de una nueva alternativa para controlar mastitis a través del uso de un gel cosmético que protege la piel de los pezones y que contiene cobre.

En las asesorías se presentó el producto, se dejaron muestras para ser utilizadas en los animales, y se aplicó directamente a los animales.

Dichas actividades se han realizado a diversos planteles de la zona sur desde la VIII región hasta la X, que es donde están concentradas la mayoría de las empresas lecheras del país.

En el Anexo 8 se presenta material visual de dichas actividades.

3. Contacto directo con vendedores intermediarios.

Los canales de comercialización están orientados básicamente a mantener un stock mínimo de producto, con una promoción a través de pendones (ver anexo), en cada sucursal, entrenamientos de los dependientes de farmacia y charlas técnicas a grupos de productores. Esta situación se está llevando a cabo con la COLUN, y CALS de Santiago. Actualmente las ventas anuales del producto solo alcanzan a 120 toneladas anuales de un mercado potencial de 4.500 toneladas año.

Además se presentó el producto en un stand de la Feria Ganadera de Osorno en Marzo de 2015 de la SAGO (Sociedad Agrícola y Ganadera de Osorno), para darlo a conocer a empresas y productores de la X región y del país. (Imágenes en Anexo 8)

4. Publicidad y posicionamiento comercial del producto a través de la página web de Biogénesis Animal Health Chile.

La publicidad y posicionamiento comercial del producto se masificará una vez que esté terminado el estudio de investigación llevado a cabo por el INTA y se tenga los

resultados finales del producto. Esto porque la gran mayoría de los médicos veterinarios y productores preguntan por los resultados de la investigación antes de tomar una decisión acerca del producto.

De todas formas, ya ha sido puesta publicidad del producto en la página web de Biogénesis Animal Health Chile y se han recibido consultas acerca de sus propiedades (Imágenes en anexo)

IV. CONCLUSIONES.

- El cobre demostró “in vitro” que puede controlar la multiplicación de bacterias ambientales y patógenas provenientes de leche de vacas con mastitis clínica y subclínica

- El producto para dipping en base a cobre antimicrobiano (CWR-5) ha probado ser una alternativa al empleo de dipping de yodo para prevenir la mastitis bovina.

- El producto logró disminuir “in vivo” la prevalencia de mastitis bovina y el P75 de los animales sometidos a dipping con cobre sin tener efectos adversos en los pezones y cuartos.

- El efecto cicatrizante sugerido a partir de los resultados del estudio de bienestar animal, es una interesante alternativa que entrega un valor agregado al producto.

- La resistencia a antibióticos detectados en los patógenos asociados a mastitis bovina hacen muy atractivo el uso de cobre antimicrobiano.

- El cobre no causa deterioro ambiental, durante el estudio no se detectó aumento en el contenido de cobre en muestras de tierra y agua.

- El dipping de cobre no tiene actividad tóxica para los consumidores, en efecto éste no altera el nivel basal de este metal en la leche de vacas que reciben dipping de cobre.

- La difusión del producto ha sido muy bien recibida por los productores lecheros quienes reconocen su efectividad aunque todavía los resultados no se publican.

- En este momento existen interesados en varios países por conocer y utilizar el dipping de cobre. Entre ellos se cuenta grandes laboratorios internacionales,

productores de leche y organismos estatales de países con alta masa ganadera.

V. OTROS

A continuación se mencionan otros productos adicionales generados en este proyecto

- ***Tesis de Pregrado:***
  Alumno: Álvaro Baeza: "Evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano de dos formulaciones antisépticas tópicas mamarias en base a cobre sobre patógenos aislados de Mastitis Bovina". Carrera Medicina Veterinaria.

- ***Tesis de Magister:***
  Alumno Enrique Zúñiga: "Identificación de determinantes genéticos implicados en la formación de biofilms en aislados de *Staphylococcus aureus* de mastitis bovina. Magister en Nutrición y Alimentos, Mención Alimentos Saludables, INTA Universidad de Chile.

- ***Unidades de Investigación:*** N=3

- ***Presentaciones a Congreso:***

  Peralta MJ., Baeza A., Cordero N., Castillo E., Reyes-Jara A. Estudio de la Resistencia a Antibióticos de Cepas Bacterianas Aisladas de Mastitis Bovina. XXV Congreso Chileno de Microbiología (SOMICH) Marbella, 26-30 de noviembre de 2013.

  Baeza, A., Cordero N., Peralta MJ., Castillo E., Troncoso M., Reyes-Jara A., Figueroa G. Prevalencia de bacterias aisladas desde leches de ganado con mastitis bovina en Chile. XXV Congreso Chileno de Microbiología (SOMICH) Marbella, 26-30 de noviembre de 2013.

- ***Artículos Científicos***

  Reyes-Jara, A., Cordero, N., Troncoso, M., Aguirre, J., Figueroa, G. In vitro study of the antibacterial effect of copper and their potential use in the control of bovine mastitis. Enviado a la Revista Frontiers in Microbiology.

VI. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA.

1. Thompson-Crispi K, Atalla H, Miglior F, Mallard BA. 2014. Bovine mastitis: frontiers in immunogenetics. Front Immunol. 7;5:493.

2. Green M, Bradley A (2013) The changing face of mastitis control. Vet Rec 173:517-521

3. EPA. 2008. Prevention, pesticides and toxic substances (7508P). Reregistration Eligibility Decision (RED) for Coppers. EPA 738-R-06-020:1-98.

4. Faúndez G, Troncoso M, Navarrete P, Figueroa G. 2004. Antimicrobial activity of copper surfaces against suspensions of *Salmonella enterica* and *Campylobacter jejuni.* BMC Microbiol. 30;4:19.

5. Turabelidze. D, Kotetishvili. M, Kreger. M. JR. A, J. G, Sulakvelidze.A. 2000. Improved Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Typing Vancomycin-Resistant Enterococci. Journal of Clinical Microbiology. 38 (11): 4242–4245.

El presente anexo incluye las muestras de leche con mastitis bovina que fueron recepcionadas en el Laboratorio de Microbiología y Probióticos del INTA y analizadas. A cada muestra se le asignó un número interno. Se registró la procedencia de la muestra, la zona y la fecha de la toma de muestra. Cuando la información estuvo disponible se registró además, el número de vaca y el cuarto afectado (ver detalle al final de la tabla). Se observa que 112 muestras proviene de la zona centro y 214 de la zona sur

Anexo 1: Registro de toma de muestras de leche con mastitis

N° Muestras	n° interno	N° vaca	Cuarto afectado	Procedencia	Zona del país	Cuadro	Fecha
1	AL 561	--	--	Fundo Santa Inez	Zona Central	Clínica	03.05.13
2	AL 562	--	--	Fundo Santa Inez	Zona Central	Clínica	03.05.13
3	AL 563	--	--	Fundo Santa Inez	Zona Central	Clínica	03.05.13
4	AL 565	--	--	Fundo Santa Inez	Zona Central	Clínica	03.05.13
5	AL 489	--	--	Lechería Chiloe	Zona Sur	Clínica	07.05.13
6	AL 491	--	--	Lechería Chiloe	Zona Sur	Clínica	07.05.13
7	AL 492	--	--	Lechería Chiloe	Zona Sur	Clínica	07.05.13
8	AL 698	--	--	Purranque	Zona Sur	Clínica	07.05.13
9	AL 699	--	--	Purranque	Zona Sur	Clínica	07.05.13
10	AL 700	--	--	Purranque	Zona Sur	Clínica	07.05.13
11	AL 702	--	--	Purranque	Zona Sur	Clínica	07.05.13
12	AL 703	--	--	Purranque	Zona Sur	Clínica	07.05.13
13	AL 704	--	--	Purranque	Zona Sur	Clínica	07.05.13
14	AL 705	--	--	Purranque	Zona Sur	Clínica	07.05.13
15	AL 706	--	--	Purranque	Zona Sur	Clínica	07.05.13
16	AL 707	--	--	Purranque	Zona Sur	Clínica	07.05.13
17	AL 708	--	--	Purranque	Zona Sur	Clínica	07.05.13
18	AL 709	--	--	Purranque	Zona Sur	Clínica	07.05.13
19	AL 711	--	--	talagante , lampa	Zona Central	Clínica	09.05.13
20	AL 712	--	--	talagante , lampa	Zona Central	Clínica	09.05.13
21	AL 715	--	--	talagante , lampa	Zona Central	Clínica	09.05.13
22	AL 719	--	--	talagante , lampa	Zona Central	Clínica	09.05.13
23	AL 720	--	--	talagante , lampa	Zona Central	Clínica	09.05.13
24	11706	--	--	Fundo Santa Inez	Zona Central	Clínica	09.05.13
25	11962	--	--	Fundo Santa Inez	Zona Central	Clínica	09.05.13
26	11531	--	--	Fundo Santa Inez	Zona Central	Clínica	09.05.13
27	1812	--	--	Fundo Santa Inez	Zona Central	Clínica	09.05.13
28	12192	--	--	Fundo Santa Inez	Zona Central	Clínica	09.05.13
29	12011	--	--	Fundo Santa Inez	Zona Central	Clínica	09.05.13
30	11960	--	--	Fundo Santa Inez	Zona Central	Clínica	09.05.13
31	12247	--	--	Fundo Santa Inez	Zona Central	Clínica	09.05.13
32	p113159	--	--	Fundo Santa Inez	Zona Central	Clínica	09.05.13
33	11592	--	--	Fundo Santa Inez	Zona Central	Clínica	09.05.13
34	11266	--	--	Fundo Santa Inez	Zona Central	Clínica	09.05.13
35	12781	--	--	Fundo Santa Inez	Zona Central	Clínica	09.05.13
36	12711	--	--	Fundo Santa Inez	Zona Central	Clínica	09.05.13
37	12089	--	--	Fundo Santa Inez	Zona Central	Clínica	09.05.13
38	10024	--	--	Fundo Santa Inez	Zona Central	Clínica	09.05.13
39	10115A1	--	--	JG	Zona Sur	Clínica	09.05.13
40	535 pb	--	--	JG	Zona Sur	Clínica	09.05.13
41	27119	--	--	JG	Zona Sur	Clínica	09.05.13
42	2118640A1	--	--	JG	Zona Sur	Clínica	09.05.13
43	2877	--	--	JG	Zona Sur	Clínica	09.05.13
44	2781	--	--	JG	Zona Sur	Clínica	09.05.13
45	2670587A1	--	--	JG	Zona Sur	Clínica	09.05.13
46	209939	--	--	JG	Zona Sur	Clínica	09.05.13
47	24	--	--	JG	Zona Sur	Clínica	09.05.13
48	24148	--	--	JG	Zona Sur	Clínica	09.05.13
49	1188267PD	--	--	JG	Zona Sur	Clínica	09.05.13
50	24119	--	--	JG	Zona Sur	Clínica	09.05.13
51	248976CAIADI	--	--	JG	Zona Sur	Clínica	09.05.13
52	10028AD	--	--	JG	Zona Sur	Clínica	09.05.13
53	747	--	--	Los Nogales	Zona Central	Clínica	09.05.13
54	MT- 0154	11493	--	Predio Santa ines	Zona Central	Clínica	31.05.13
55	MT- 0155	12577	--	Predio Santa ines	Zona Central	Clínica	31.05.13
56	MT- 0156	11338	--	Predio Santa ines	Zona Central	Clínica	31.05.13
57	MT- 0157	11499	--	Predio Santa ines	Zona Central	Clínica	31.05.13
58	MT- 0158	12657	--	Predio Santa ines	Zona Central	Clínica	31.05.13
59	MT- 0159	12946	--	Predio Santa ines	Zona Central	Clínica	31.05.13
60	MT- 0160	11165	--	Predio Santa ines	Zona Central	Clínica	31.05.13
61	MT- 0161	12352	--	Predio Santa ines	Zona Central	Clínica	31.05.13
62	MT- 0162	12671	--	Predio Santa ines	Zona Central	Clínica	31.05.13
63	MT- 0163	11902	--	Predio Santa ines	Zona Central	Clínica	31.05.13
64	MT- 0164	10068	--	Predio Santa ines	Zona Central	Clínica	31.05.13
65	MT- 0165	92087	--	Predio Santa ines	Zona Central	Clínica	31.05.13
66	MT- 0166	12615	--	Predio Santa ines	Zona Central	Clínica	31.05.13
67	MT- 0167	10620	--	Predio Santa ines	Zona Central	Clínica	31.05.13
68	MT- 0168	12213	--	Predio Santa ines	Zona Central	Clínica	31.05.13
69	MT- 0169	12159	--	Predio Santa ines	Zona Central	Clínica	31.05.13
70	MT- 0170	11922	--	Predio Santa ines	Zona Central	Clínica	31.05.13
71	MT- 0171	13247	--	Predio Santa ines	Zona Central	Clínica	31.05.13
72	MT- 0172	11223	--	Predio Santa ines	Zona Central	Clínica	31.05.13
73	MT- 0173	11662	--	Predio Santa ines	Zona Central	Clínica	31.05.13
74	MT- 0174	11484	--	Predio Santa ines	Zona Central	Clínica	31.05.13
75	MT- 0175	10474	--	Predio Santa ines	Zona Central	Clínica	31.05.13
76	MT- 0176	11521	--	Predio Santa ines	Zona Central	Clínica	31.05.13
77	MT- 0177	11611	--	Predio Santa ines	Zona Central	Clínica	31.05.13
78	MT- 0178	11858	--	Predio Santa ines	Zona Central	Clínica	31.05.13
79	MT- 0179	11601	--	Predio Santa ines	Zona Central	Clínica	31.05.13
80	MT- 0180	12328	--	Predio Santa ines	Zona Central	Clínica	31.05.13
81	MT- 0181	11242	--	Predio Santa ines	Zona Central	Clínica	31.05.13
82	MT- 0182	10890	--	Predio Santa ines	Zona Central	Clínica	31.05.13
83	MT- 0183	12470	--	Predio Santa ines	Zona Central	Clínica	31.05.13
84	MT- 0184	10068	--	Predio Santa ines	Zona Central	Clínica	31.05.13
85	MT- 0185	11323	--	Predio Santa ines	Zona Central	Clínica	31.05.13
86	MT- 0186	12755	--	Predio Santa ines	Zona Central	Clínica	31.05.13
87	MT- 0308	440778	--	Mafil	Zona Sur	Clínica	17.07.13
88	MT- 0309	440896	--	Mafil	Zona Sur	Clínica	17.07.13
89	MT- 0310	440921	--	Mafil	Zona Sur	Clínica	17.07.13
90	MT- 0311	264002	--	Mafil	Zona Sur	Clínica	17.07.13
91	MT- 0312	441071	--	Mafil	Zona Sur	Clínica	17.07.13
92	MT- 0313	440805	--	Mafil	Zona Sur	Clínica	17.07.13
93	MT- 0314	440528	--	Mafil	Zona Sur	Clínica	17.07.13
94	MT- 0315	440955	--	Mafil	Zona Sur	Clínica	17.07.13
95	MT- 0316	4E+06	--	Mafil	Zona Sur	Clínica	17.07.13
96	MT- 0317	6917	--	Mafil	Zona Sur	Clínica	17.07.13
97	MT- 0318	440411	--	Mafil	Zona Sur	Clínica	17.07.13
98	MT- 0319	269088	--	Mafil	Zona Sur	Clínica	17.07.13
99	MT- 0320	1E+06	--	Mafil	Zona Sur	Clínica	17.07.13
100	MT- 0321	269121	--	Mafil	Zona Sur	Clínica	17.07.13
101	MT- 0322	6E+06	--	Mafil	Zona Sur	Clínica	17.07.13
102	MT- 0323	440173	--	Mafil	Zona Sur	Clínica	17.07.13
103	MT- 0324	296928	--	Mafil	Zona Sur	Clínica	17.07.13
104	MT- 0325	440648	--	Mafil	Zona Sur	Clínica	17.07.13
105	MT- 0326	2E+06	--	Mafil	Zona Sur	Clínica	17.07.13
106	MT- 0327	440877	--	Mafil	Zona Sur	Clínica	17.07.13
107	MT- 0328	9982	--	Futrono	Zona Sur		17.07.13
108	MT- 0329	3165	--	Futrono	Zona Sur		17.07.13
109	MT- 0330	00.49	--	Futrono	Zona Sur		17.07.13
110	MT- 0331	5810	--	Futrono	Zona Sur		17.07.13
111	MT- 0332	5547	--	Futrono	Zona Sur		17.07.13
112	MT- 0333	9203	--	Futrono	Zona Sur		17.07.13
113	MT- 0334	3506	--	Futrono	Zona Sur		17.07.13
114	MT- 0335	9163	--	Futrono	Zona Sur		17.07.13
115	MT- 0336	6671	--	Futrono	Zona Sur		17.07.13
116	MT- 0337	00.15	--	Futrono	Zona Sur		17.07.13
117	MT- 0338	9204	--	Futrono	Zona Sur		17.07.13
118	MT- 0339	9198	--	Futrono	Zona Sur		17.07.13
119	MT- 0340	8450	--	Futrono	Zona Sur		17.07.13
120	MT- 0341	9166	--	Futrono	Zona Sur		17.07.13
121	MT- 0342	6104	--	Futrono	Zona Sur		17.07.13
122	MT- 0343	9635	--	Futrono	Zona Sur		17.07.13
123	MT- 0344	9210	--	Futrono	Zona Sur		17.07.13
124	MT- 0345	3532	--	Futrono	Zona Sur		17.07.13
125	MT- 0346	1053	--	Futrono	Zona Sur		17.07.13
126	MT- 0350	4146	AD, PI , PD	Rio Bueno	Zona Sur	Clínica	22.08.13
127	MT- 0351	2610	PD	Rio Bueno	Zona Sur	Clínica	22.08.13
128	MT- 0352	4253	AI, AD, PI	Rio Bueno	Zona Sur	Clínica	22.08.13
129	MT- 0353	1424	AI, AD, PI, PD	Rio Bueno	Zona Sur	Clínica	22.08.13
130	MT- 0354	4201	AI, PI	Rio Bueno	Zona Sur	Clínica	22.08.13
131	MT- 0355	2615	PD	Rio Bueno	Zona Sur	Clínica	22.08.13
132	MT- 0356	1531	AD, PI , PD	Rio Bueno	Zona Sur	Clínica	22.08.13
133	MT- 0357	1769	AD	Rio Bueno	Zona Sur	Clínica	22.08.13
134	MT- 0358	2524	AI, AD, PI, PD	Rio Bueno	Zona Sur	Clínica	22.08.13
135	MT- 0359	2546	PD	Rio Bueno	Zona Sur	Clínica	22.08.13
136	MT- 0360	1511	PI	Rio Bueno	Zona Sur	Clínica	22.08.13
137	MT- 0361	1473	PI	Rio Bueno	Zona Sur	Clínica	22.08.13
138	MT- 0362	2586	AD, PI , PD	Rio Bueno	Zona Sur	Clínica	22.08.13
139	MT- 0363	1488	AD,PI	Rio Bueno	Zona Sur	Clínica	22.08.13
140	MT- 0364	7635	PD	Rio Bueno	Zona Sur	Clínica	22.08.13
141	MT- 0365	2633	PI	Rio Bueno	Zona Sur	Clínica	22.08.13
142	MT- 0366	2820	AI, PI	Rio Bueno	Zona Sur	Clínica	22.08.13
143	MT- 0367	7584	AI, PI	Rio Bueno	Zona Sur	Clínica	22.08.13
144	MT- 0368	1469	AD	Rio Bueno	Zona Sur	Clínica	22.08.13
145	MT- 0369	3002	PD	Rio Bueno	Zona Sur	Clínica	22.08.13
146	MT- 0370	2656	AD	Rio Bueno	Zona Sur	Clínica	22.08.13
147	MT- 0371	1441	AI, AD	Rio Bueno	Zona Sur	Clínica	22.08.13
148	MT- 0372	1682	AI	Rio Bueno	Zona Sur	Clínica	22.08.13
149	MT- 0373	1514	AD, PD	Rio Bueno	Zona Sur	Clínica	22.08.13
150	MT- 0374	1646	PI	Rio Bueno	Zona Sur	Clínica	22.08.13
151	MT- 0375	5298	AI	Santa Sara	Zona Central	Clínica	28.08.13
152	MT- 0376	5298	AD, PI , PD	Santa Sara	Zona Central	Subclínica	28.08.13
153	MT- 0377	5582	PI	Santa Sara	Zona Central	Clínica	28.08.13
154	MT- 0378	5582	AI, AD, PI, PD	Santa Sara	Zona Central	Subclínica	28.08.13
155	MT- 0379	5589	AI, AD, PI	Santa Sara	Zona Central	Subclínica	28.08.13
156	MT- 0380	5589	PD	Santa Sara	Zona Central	Clínica	28.08.13
157	MT- 0381	4640	AI, AD, PI, PD	Santa Sara	Zona Central	Subclínica	28.08.13
158	MT- 0382	4178	AI, AD, PI, PD	Santa Sara	Zona Central	Subclínica	28.08.13
159	MT- 0383	794	AI, AD, PI, PD	Santa Sara	Zona Central	Subclínica	28.08.13
160	MT- 0384	4308	AI, AD, PI, PD	Santa Sara	Zona Central	Subclínica	28.08.13
161	MT- 0385	4710	AI, AD, PI, PD	Santa Sara	Zona Central	Subclínica	28.08.13
162	MT- 0386	4545	AI, AD, PI, PD	Santa Sara	Zona Central	Subclínica	28.08.13
163	MT- 0387	4736	AD	Santa Sara	Zona Central	Clínica	28.08.13
164	MT- 0388	4736	AI, PI, PD	Santa Sara	Zona Central	Subclínica	28.08.13
165	MT- 0389	4784	AI, AD, PI, PD	Santa Sara	Zona Central	Subclínica	28.08.13
166	MT- 0390	4252	AI, AD, PI, PD	Santa Sara	Zona Central	Subclínica	28.08.13
167	MT- 0391	4378	AI, AD, PI, PD	Santa Sara	Zona Central	Subclínica	28.08.13
168	MT- 0392	784	AI, AD, PI, PD	Santa Sara	Zona Central	Subclínica	28.08.13
169	MT- 0393	892	AI, AD, PI, PD	Santa Sara	Zona Central	Subclínica	28.08.13
170	MT- 0394	801	AI, PI, PD	Santa Sara	Zona Central	Subclínica	28.08.13
171	MT- 0395	3982	AI, AD, PD	Santa Sara	Zona Central	Subclínica	28.08.13

172	MT- 0396	3982	PI	Santa Sara	Zona Central	Clínica	28.08.13
173	MT- 0397	1805	AI, AD, PD	Santa Sara	Zona Central	Subclínica	28.08.13
174	MT- 0398	4353	AI, AD, PI	Santa Sara	Zona Central	Subclínica	28.08.13
175	MT- 0399	4426	AI, AD, PI, PD	Santa Sara	Zona Central	Subclínica	28.08.13
176	MT- 0400	4085	AI, AD, PI, PD	Santa Sara	Zona Central	Subclínica	28.08.13
177	MT- 0401	4332	AI, AD, PI, PD	Santa Sara	Zona Central	Subclínica	28.08.13
178	MT- 0402	4395	AI, AD, PI, PD	Santa Sara	Zona Central	Subclínica	28.08.13
179	MT- 0403	3884	AI, AD, PI, PD	Santa Sara	Zona Central	Subclínica	28.08.13
180	MT- 0404	3729	AI, AD, PI, PD	Santa Sara	Zona Central	Subclínica	28.08.13
181	MT- 0405	4290	AI, AD, PI, PD	Santa Sara	Zona Central	Subclínica	28.08.13
182	MT- 0406	790	PI, PD	Los Cipreces	Zona Central	Subclínica	11.09.13
183	MT- 0407	754	AI, AD, PI, PD	Los Cipreces	Zona Central	Subclínica	11.09.13
184	MT- 0408	825	AI, AD, PI, PD	Los Cipreces	Zona Central	Subclínica	11.09.13
185	MT- 0409	990	PI, PD	Los Cipreces	Zona Central	Subclínica	11.09.13
186	MT- 0410	990	AI, AD, PI, PD	Los Cipreces	Zona Central	Subclínica	11.09.13
187	MT- 0411	936	AI, AD, PI, PD	Los Cipreces	Zona Central	Subclínica	11.09.13
188	MT- 0412	992	AI, AD, PI, PD	Los Cipreces	Zona Central	Subclínica	11.09.13
189	MT- 0413	997	AI, PI	Los Cipreces	Zona Central	Subclínica	11.09.13
190	MT- 0414	1028	AI, AD, PI, PD	Los Cipreces	Zona Central	Subclínica	11.09.13
191	MT- 0415	1074	AI, AD, PI, PD	Los Cipreces	Zona Central	Subclínica	11.09.13
192	MT- 0416	1087	AD, PD	Los Cipreces	Zona Central	Subclínica	11.09.13
193	MT- 0417	1095	AI, AD, PI, PD	Los Cipreces	Zona Central	Subclínica	11.09.13
194	MT- 0418	1099	AD	Los Cipreces	Zona Central	Subclínica	11.09.13
195	MT- 0419	1099	PI	Los Cipreces	Zona Central	Subclínica	11.09.13
196	MT- 0420	1131	AI, AD, PI, PD	Los Cipreces	Zona Central	Subclínica	11.09.13
197	MT- 0421	1137	AI, AD, PI, PD	Los Cipreces	Zona Central	Subclínica	11.09.13
198	MT- 0422	1138	AI, AD, PI, PD	Los Cipreces	Zona Central	Subclínica	11.09.13
199	MT- 0423	1142	AI, AD, PI, PD	Los Cipreces	Zona Central	Subclínica	11.09.13
200	MT- 0424	1144	AI, AD, PI, PD	Los Cipreces	Zona Central	Subclínica	11.09.13
201	MT- 0425	1188	AI, AD, PI, PD	Los Cipreces	Zona Central	Subclínica	11.09.13
202	MT- 0426	1198	AI, AD, PI, PD	Los Cipreces	Zona Central	Subclínica	11.09.13
203	MT- 0427	1210	AI, AD, PI, PD	Los Cipreces	Zona Central	Subclínica	11.09.13
204	MT- 0428	1287	AI, AD, PI, PD	Los Cipreces	Zona Central	Subclínica	11.09.13
205	MT- 0429	5969	AI	Lago Ranco	Zona Sur	Subclínica	28.09.13
206	MT- 0430	5620	AD	Lago Ranco	Zona Sur	Subclínica	28.09.13
207	MT- 0431	4961	PI	Lago Ranco	Zona Sur	Subclínica	28.09.13
208	MT- 0432	4969	AI	Lago Ranco	Zona Sur	Subclínica	28.09.13
209	MT- 0433	4996	PI	Lago Ranco	Zona Sur	Subclínica	28.09.13
210	MT- 0434	4959	AI	Lago Ranco	Zona Sur	Subclínica	28.09.13
211	MT- 0435	5427	PI	Lago Ranco	Zona Sur	Subclínica	28.09.13
212	MT- 0436	4960	AD	Lago Ranco	Zona Sur	Subclínica	28.09.13
213	MT- 0437	6049	AD	Lago Ranco	Zona Sur	Subclínica	28.09.13
214	MT- 0438	9775	PI	Lago Ranco	Zona Sur	Subclínica	28.09.13
215	MT- 0439	7790	PD	Lago Ranco	Zona Sur	Subclínica	28.09.13
216	MT- 0440	5954	PI	Lago Ranco	Zona Sur	Subclínica	28.09.13
217	MT- 0441	4978	PI	Lago Ranco	Zona Sur	Subclínica	28.09.13
218	MT- 0442	4959	AD	Lago Ranco	Zona Sur	Subclínica	28.09.13
219	MT- 0443	5654	AI	Lago Ranco	Zona Sur	Subclínica	28.09.13
220	MT- 0444	5620	PI	Lago Ranco	Zona Sur	Subclínica	28.09.13
221	MT- 0445	5954	AD	Lago Ranco	Zona Sur	Subclínica	28.09.13
222	MT- 0446	5894	PI	Lago Ranco	Zona Sur	Subclínica	28.09.13
223	MT- 0447	4977	AI	Lago Ranco	Zona Sur	Subclínica	28.09.13
224	MT- 0448	9780	AI	Lago Ranco	Zona Sur	Subclínica	28.09.13
225	MT- 0449	4956	PI	Lago Ranco	Zona Sur	Subclínica	28.09.13
226	MT- 0450	5681	AD	Lago Ranco	Zona Sur	Subclínica	28.09.13
227	MT- 0451	4957	AD	Lago Ranco	Zona Sur	Subclínica	28.09.13
228	MT- 0452	4996	PD	Lago Ranco	Zona Sur	Subclínica	28.09.13
229	MT- 0453	5943	AD	Lago Ranco	Zona Sur	Subclínica	28.09.13
230	MT- 0454	5934	PD	Lago Ranco	Zona Sur	Subclínica	28.09.13
231	MT- 0455	5616	AI	Lago Ranco	Zona Sur	Subclínica	28.09.13
232	MT- 0456	2722	Sin determinar	Lago Ranco	Zona Sur	Subclínica	28.09.13
233	MT- 0457	4957	PD	Lago Ranco	Zona Sur	Subclínica	28.09.13
234	MT- 0458	5927	PD	Lago Ranco	Zona Sur	Subclínica	28.09.13
235	MT- 0459	4949	PD	Lago Ranco	Zona Sur	Subclínica	28.09.13
236	MT- 0460	5616	PI	Lago Ranco	Zona Sur	Subclínica	28.09.13
237	MT- 0461	4930	AD	Los Angeles	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
238	MT- 0462	4906	AI, AD, PI, PD	Los Angeles	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
239	MT- 0463	4846	AI, AD, PI, PD	Los Angeles	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
240	MT- 0464	5371	AI, AD, PI, PD	Los Angeles	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
241	MT- 0465	5332	PD	Los Angeles	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
242	MT- 0466	4754	AI, AD, PI, PD	Los Angeles	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
243	MT- 0466	4754	AI, AD, PI, PD	Los Angeles	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
244	MT- 0467	4894	--	Los Angeles	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
245	MT- 0468	5038	AI	Los Angeles	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
246	MT- 0469	5226	AI, AD, PI, PD	Los Angeles	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
247	MT- 0470	5220	AI, AD, PI, PD	Los Angeles	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
248	MT- 0471	5302	PD	Los Angeles	Zona Sur	Clínico	28.09.13
249	MT- 0472	5730	--	Los Angeles	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
250	MT- 0473	5030	AD	Los Angeles	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
251	MT- 0474	5778	AI	Los Angeles	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
252	MT- 0475	5144	PI	Los Angeles	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
253	MT- 0476	5074	AD	Los Angeles	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
254	MT- 0477	V5001	PD	Los Angeles	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
255	MT- 0478	4970	AI	Los Angeles	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
256	MT- 0479	5045308	AD	Los Angeles	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
257	MT- 0480	4973	PI	Los Angeles	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
258	MT- 0481	5081	AD	Los Angeles	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
259	MT- 0482	5001	AI	Los Angeles	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
260	MT- 0483	5124	PI	Los Angeles	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
261	MT- 0484	5023	AD	Los Angeles	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
262	MT- 0485	5144	PD	Los Angeles	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
263	MT- 0486	4877	AI	Los Angeles	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
264	MT- 0487	5126	AI	Los Angeles	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
265	MT- 0488	5153	PI	Los Angeles	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
266	MT- 0489	5080	AI	Los Angeles	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
267	MT- 0490	5308	AD	Los Angeles	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
268	MT- 0491	5045331	PI	Los Angeles	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
269	MT- 0492	5153	AI	Los Angeles	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
270	MT- 0493	5080	AI	Los Angeles	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
271	MT- 0494	5237	AI	Los Angeles	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
272	MT- 0495	5371	PI	Los Angeles	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
273	MT- 0496	5096	PI	Los Angeles	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
274	MT- 0497	4876	AD	Los Angeles	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
275	MT- 0498	5023	AD	Los Angeles	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
276	MT- 0499	5223	AD	Los Angeles	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
277	MT- 0500	5124	PI	Los Angeles	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
278	MT- 0501	4896	PD	Los Angeles	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
279	MT- 0502	5153	AD	Los Angeles	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
280	MT- 0503	5088	--	Los Angeles	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
281	MT- 0504	4905	--	Los Angeles	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
282	MT- 0505	3E+06	AI, AD, PI, PD	Purranque	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
283	MT- 0506	3574	--	Purranque	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
284	MT- 0507	5931	AI, AD, PI, PD	Purranque	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
285	MT- 0508	5E+06	--	Purranque	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
286	MT- 0509	3266	--	Purranque	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
287	MT- 0510	3357	--	Purranque	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
288	MT- 0511	3E+06	AI, AD, PI, PD	Purranque	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
289	MT- 0512	3E+06	AI, AD, PI, PD	Purranque	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
290	MT- 0513	3034	--	Purranque	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
291	MT- 0514	3581	--	Purranque	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
292	MT- 0515	3E+06	AI, AD, PI, PD	Purranque	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
293	MT- 0516	3E+06	--	Purranque	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
294	MT- 0517	3689	--	Purranque	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
295	MT- 0518	5744	--	Purranque	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
296	MT- 0519	3E+06	AI, AD, PI, PD	Purranque	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
297	MT- 0520	3700	--	Purranque	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
298	MT- 0521	3388	--	Purranque	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
299	MT- 0522	3473	--	Purranque	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
300	MT- 0523	3730	--	Purranque	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
301	MT- 0524	3518	--	Purranque	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
302	MT- 0525	3106	--	Purranque	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
303	MT- 0526	3272	AI, AD, PI, PD	Purranque	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
304	MT- 0527	3827	AI, AD, PI, PD	Purranque	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
305	MT- 0527	3827	AI, AD, PI, PD	Purranque	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
306	MT- 0528	3146	--	Purranque	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
307	MT- 0529	3E+06	--	Purranque	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
308	MT- 0530	3804	--	Purranque	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
309	MT- 0531	274377	AI, AD, PI, PD	Purranque	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
310	MT- 0532	3504	AI, AD, PI, PD	Purranque	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
311	MT- 0533	3066	AI	Purranque	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
312	MT- 0534	275488	--	Purranque	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
313	MT- 0535	3495	--	Purranque	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
314	MT- 0536	2E+06	AI, AD, PI, PD	Purranque	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
315	MT- 0537	5800	AI, AD, PI, PD	Purranque	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
316	MT- 0537	5800	AI, AD, PI, PD	Purranque	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
317	MT- 0538	111	--	Purranque	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
318	MT- 0539	7502	--	Purranque	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
319	MT- 0540	3293	--	Purranque	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
320	MT- 0541	3E+06	AI, AD, PI, PD	Purranque	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
321	MT- 0542	6609	--	Purranque	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
322	MT- 0543	3437	--	Purranque	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
323	MT- 0544	3468	--	Purranque	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
324	MT- 0545	3E+06	--	Purranque	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
325	MT- 0546	120	--	Purranque	Zona Sur	Subclínico	28.09.13
326	MT- 0546	120	--	Purranque	Zona Sur	Subclínico	28.09.13

AI cuarto anterior izquierdo
AD cuarto anterior derecho
PI cuarto posterior izquierdo
PD cuarto posterior derecho
-- No identificado

Anexo 2. Cepas Diagnosticadas desde muestras de leche con Mastitis

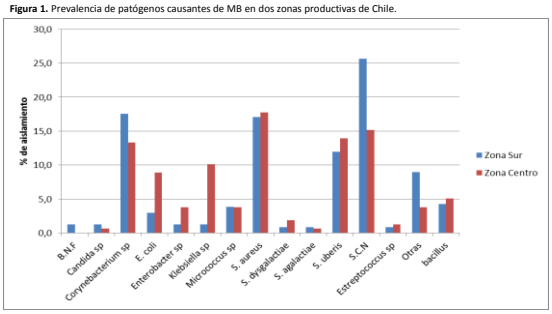
N° Muestras	Zona del país	n° Interno	Codigo cepa	Dignóstico
1	Zona Central	AL 561	AL 561- 7	E. coli
2	Zona Central	AL 562	AL 562- 5	E. coli
3	Zona Central	AL 563	AL 563- 3	E. coli
4	Zona Central	AL 565	AL 565- 5	E. coli
5	Zona Central	AL 565	AL 565- 4	E. coli
6	Zona Central	AL 489	AL 489- 1	S. aureus
7	Zona Central	AL 491	AL 491- 1	S. aureus
8	Zona Central	AL 492	AL 492- 1	S. aureus
9	Zona Central	AL 698	AL 698- 1	S.aureus
10	Zona Central	AL 699	AL 699- 1	S.aureus
11	Zona Central	AL 700	AL 700- 1	S. aureus
12	Zona Central	AL 702	AL 702- 1	S. aureus
13	Zona Central	AL 702	AL 702- 3	S. uberis
14	Zona Central	AL 702	AL 702- 4	S. aureus
15	Zona Central	AL 702	AL 702- 5	Micrococcus sp
16	Zona Central	AL 703	AL 703- 4	S. aureus
17	Zona Central	AL 704	AL 704- 1	S. aureus
18	Zona Central	AL 704	AL 704- 4	S. aureus
19	Zona Central	AL 704	AL 704- 3	S. aureus
20	Zona Central	AL 705	AL 705- 1	S. aureus
21	Zona Sur	AL 705	AL 705- 4	S. aureus
22	Zona Sur	AL 705	AL 705- 5	S. aureus
23	Zona Sur	AL 706	AL 706- 3	S.C.N
24	Zona Sur	AL 707	AL 707- 5	S.C.N
25	Zona Sur	AL 707	AL 707- 6	S.C.N
26	Zona Sur	AL 707	AL 707- 7	S.C.N
27	Zona Sur	AL 708	AL 708- 3	S. aureus
28	Zona Sur	AL 708	AL 708- 4	S. uberis
29	Zona Sur	AL 708	AL 708- 7	S. aureus
30	Zona Sur	AL 709	AL 709- 1	S. aureus
31	Zona Sur	AL 709	AL 709- 3	S. aureus
32	Zona Sur	AL 711	AL 711- 1	E. coli
33	Zona Sur	AL 712	AL 712- 1	E. coli
34	Zona Central	AL 712	AL 712- 3	S.C.N
35	Zona Central	AL 715	AL 715- 1	S. disgalactiae
36	Zona Central	AL 715	AL 715- 2	Enterobacteriaceae sp.
37	Zona Central	AL 719	AL 719- 1	S.C.N
38	Zona Central	AL 720	AL 720- 1	Enterobacter sp.
39	Zona Central	AL 720	AL 720- 2	Enterobacter sp.
40	Zona Central	11962	11962- 6	S. uberis
41	Zona Central	11531	11531- 9	E. coli
42	Zona Central	1812	1812- 3	Corynebacterium
43	Zona Central	12192	12192- 4	E. coli
44	Zona Central	11960	11960- 2	E. coli
45	Zona Central	12247	12247- 4	S. uberis
46	Zona Central	12247	12247- 1	S.C.N
47	Zona Central	p113159	p113159- 2	S.C.N
48	Zona Central	11592	11592- 3	Corynebacterium
49	Zona Central	11592	11592- 5	E. coli
50	Zona Central	11266	11266- 1	SCN
51	Zona Central	11266	11266- 3	Corynebacterium
52	Zona Central	12781	12781- 2	Bacillus
53	Zona Central	12711	12711- 1	Corynebacterium
54	Zona Central	12089	12089- 3	Corynebacterium
55	Zona Central	10024	10024- 1	SCN
56	Zona Central	10115A1	10115A1- 3B	S. uberis
57	Zona Central	535 pb	535 pb- 6B	S. aureus
58	Zona Central	27119	27119- 7B	S. aureus
59	Zona Central	2118640A1	2118640A1- 8B	S. uberis
60	Zona Central	2877	2877- 9B	S. aureus
61	Zona Central	2781	2781- 10B	S. aureus
62	Zona Central	2670587A1	2670587A1- 1B	S. uberis
63	Zona Central	209939	209939- 2B	S. uberis
64	Zona Central	24	24- 1B	S. uberis
65	Zona Central	24148	24148- 3B	S. aureus
66	Zona Central	1188267PD	1188267PD- 1	S. uberis
67	Zona Central	24119	24119- 1	S. aureus
68	Zona Central	248976CAIADI	248976CAIADI- 1	S. uberis
69	Zona Central	10028AD	10028AD- 2	E. coli
70	Zona Central	747	747- 3	E. coli
71	Zona Sur	MT- 0159	MT- 0159- 1	Rhodotorula murcilaginosa 2
72	Zona Sur	MT- 0163	MT- 0163- 1	S.C.N
73	Zona Sur	MT- 0164	MT- 0164- 1	Corynebacterium sp
74	Zona Sur	MT- 0165	MT- 0165- 1	S.C.N
75	Zona Sur	MT- 0165	MT- 0165- 3	Corynebacterium sp
76	Zona Sur	MT- 0166	MT- 0166- 1	E. coli
77	Zona Sur	MT- 0169	MT- 0169- 1	S.C.N
78	Zona Sur	MT- 0170	MT- 0170- 2	Corynebacterium sp
79	Zona Sur	MT- 0170	MT- 0170- 1b	E. coli
80	Zona Sur	MT- 0170	MT- 0170- 1A	B.N.F
81	Zona Sur	MT- 0171	MT- 0171- 1	B.N.F
82	Zona Sur	MT- 0171	MT- 0171- 4	B.N.F
83	Zona Sur	MT- 0176	MT- 0176- 1	S.C.N
84	Zona Sur	MT- 0179	MT- 0179- 1	S.C.N
85	Zona Sur	MT- 0180	MT- 0180- 2	S.C.N
86	Zona Sur	MT- 0180	MT- 0180- 1	Micrococcus sp
87	Zona Sur	MT- 0180	MT- 0180- 3	Micrococcus sp
88	Zona Sur	MT- 0183	MT- 0183- 1	S. dysgalactiae
89	Zona Sur	MT- 0308	MT- 0308- 3	S.C.N
90	Zona Sur	MT- 0308	MT- 0308- 2	Corynebacterium sp
91	Zona Sur	MT- 0309	MT- 0309- 2A	Pantoea sp
92	Zona Sur	MT- 0309	MT- 0309- 1	Streptococcus sp
93	Zona Sur	MT- 0310	MT- 0310- 1	Corynebacterium sp
94	Zona Sur	MT- 0310	MT- 0310- 2	Klebsiella Pneumoniae
95	Zona Sur	MT- 0311	MT- 0311- 2	S.C.N
96	Zona Sur	MT- 0311	MT- 0311- 1	Pantoea sp
97	Zona Sur	MT- 0312	MT- 0312- 3	Serratia fonticola
98	Zona Sur	MT- 0313	MT- 0313- 1	Aeromona sp
99	Zona Sur	MT- 0313	MT- 0313- 2	Pantoea sp
100	Zona Sur	MT- 0314	MT- 0314- 2	Pantoea sp
101	Zona Sur	MT- 0314	MT- 0314- 2F	Klebsiella ozaenae
102	Zona Sur	MT- 0315	MT- 0315- 2	S.C.N
103	Zona Sur	MT- 0316	MT- 0316- 3	S. uberis
104	Zona Sur	MT- 0316	MT- 0316- 1	Klebsiella ozaenae
105	Zona Sur	MT- 0317	MT- 0317- 2	S. uberis
106	Zona Sur	MT- 0318	MT- 0318- 2	Micrococcus sp
107	Zona Sur	MT- 0318	MT- 0318- 1	Yersinia enterocolitica
108	Zona Sur	MT- 0319	MT- 0319- 2	S. uberis
109	Zona Sur	MT- 0319	MT- 0319- 1	Hafnia alvei
110	Zona Sur	MT- 0320	MT- 0320- 2	S.C.N
111	Zona Sur	MT- 0321	MT- 0321- 1	Yersinia enterocolitica
112	Zona Sur	MT- 0322	MT- 0322- 2	B(+) cat (+) y esc (+)
113	Zona Sur	MT- 0323	MT- 0323- 1	S.C.N
114	Zona Sur	MT- 0323	MT- 0323- 2	Corynebacterium sp
115	Zona Sur	MT- 0324	MT- 0324- 1	Corynebacterium sp
116	Zona Sur	MT- 0325	MT- 0325- 1	Corynebacterium sp
117	Zona Sur	MT- 0325	MT- 0325- 2	Corynebacterium sp
118	Zona Sur	MT- 0326	MT- 0326- 1	Serratia sp
119	Zona Sur	MT- 0327	MT- 0327- 2	S. uberis
120	Zona Sur	MT- 0328	MT- 0328- 1	Pantoea sp
121	Zona Sur	MT- 0329	MT- 0329- 2	B(+) cat (-) esc (+)
122	Zona Sur	MT- 0330	MT- 0330- 1	Yersinia sp
123	Zona Sur	MT- 0331	MT- 0331- 3	B(+) cat (-) y esc (+)
124	Zona Sur	MT- 0332	MT- 0332- 2	S. uberis
125	Zona Sur	MT- 0333	MT- 0333- 2	S. dysgalactiae
126	Zona Sur	MT- 0333	MT- 0333- 1	Hafnia alvei
127	Zona Sur	MT- 0334	MT- 0334- 1	Corynebacterium sp
128	Zona Sur	MT- 0334	MT- 0334- 2	B(+) cat (-) y esc (+)
129	Zona Sur	MT- 0335	MT- 0335- 3	S.C.N
130	Zona Sur	MT- 0336	MT- 0336- 3	Hafnia alvei
131	Zona Sur	MT- 0336	MT- 0336- 1	B(+) cat (-) y esc (+)
132	Zona Sur	MT- 0336	MT- 0336- 2	B(+) cat (-) y esc (+)
133	Zona Sur	MT- 0337	MT- 0337- 2	B(+) cat (-) y esc (+)

La tabla del anexo 2 detalla las especies bacterianas aisladas desde cada una de las muestras de MB analizadas

Tabla Resumen. Esta tabla presenta el número de microrganismos aislados de leche de MB por zona.

Diagnóstico	Zona Sur	% Zona Sur	Zona Centro	% Zona Centro
B.N.F	3	1,3	0	0,0
Candida sp	3	1,3	1	0,6
Corynebacter	41	17,5	21	13,3
E. coli	7	3,0	14	8,9
Enterobacter	3	1,3	6	3,8
Klebsiella sp	3	1,3	16	10,1
Micrococcus s	9	3,8	6	3,8
S. aureus	42	17,1	28	17,7
S. dysgalactia	2	0,9	3	1,9
S. agalactiae	4	0,9	1	0,6
S. uberis	28	12,0	22	13,9
S.C.N	61	25,6	24	15,2
Estreptococc	2	0,9	2	1,3
Otras	21	9,0	6	3,8
bacillus	10	4,3	8	5,1
Total	239	100,0	158	100

Figura 1. Prevalencia de patógenos causantes de MB en dos zonas productivas de Chile.



El agente de mastitis bovina de mayor prevalencia en ambas regiones fue *Staphylococcus* coagulasa negativa (SCN) y S. aureus los cuales fueron aislados en mas de un 15% de la muestras de ambas zonas.

Al comparar ambas zonas, se observa que *SCN fue mas prevalente en la zona sur.*

En la zona central E. coli y Klebsiella son mas prevalentes
Patógenos como *S. dysgalactiae* y *S. agalactiae* presentaron una baja prevalencia en ambas zonas estudiadas.

Conclusiones

1. El ingreso de microorganismos emergentes como *S.C.N, Corynebacterium sp, Micrococcus sp,* entre otras. Están desplazando a los que comúnmente afectaban a bovinos lecheros.
2. El incremento en la prevalencia de los SCN, Corynebacterium y Micrococcus sobre las bacterias históricamente aisladas da cuenta de las adaptaciones y resistencia que tienen estas bacterias en forma transversal en diferentes sistemas productivos.
3. Existe una diferencia en el tipo de microorganismo causante de la mastitis bovina dependiendo de la zona estudiada, lo que se relaciona con los diferentes sistemas productivos y las condiciones climáticas de estas zonas.
4. El disponer de información actualizada con respecto a la etiología de la mastitis bovina en nuestro país permite a los entes participantes en la industria láctea tomar medidas preventivas para controlar el desarrollo de esta patología.
5. La utilización de buenas prácticas ganaderas y de higiene, durante todo el ciclo productivo debería ayudar a bajar las elevadas tasas de mastitis que existen hoy en día en la industria láctea.

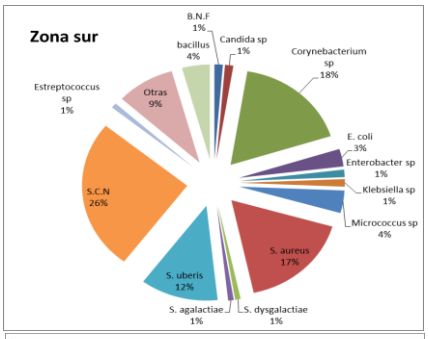


Figura 2. Prevalencia de patógenos causantes de MB en zona Sur.

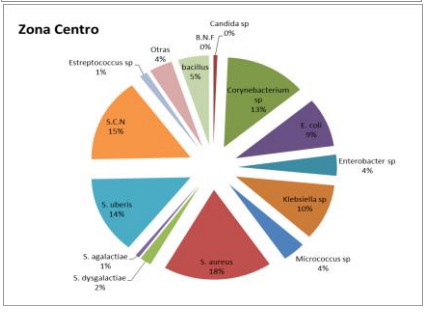


Figura 3. Prevalencia de patógenos causantes de MB en zona Sur.

134	Zona Sur	MT- 0338	MT- 0338- 1	S. uberis
135	Zona Sur	MT- 0339	MT- 0339- 3	Enterobacter amnigenus
136	Zona Sur	MT- 0340	MT- 0340- 1	B(+) cat (-) y esc (+)
137	Zona Sur	MT- 0341	MT- 0341- 4	Rhanella aquatilis
138	Zona Sur	MT- 0341	MT- 0341- 1	Enterobacter aerogenes
139	Zona Sur	MT- 0341	MT- 0341- 3	Aeromona sp
140	Zona Sur	MT- 0342	MT- 0342- 1	S. uberis
141	Zona Sur	MT- 0342	MT- 0342- 2	Yersinia enterocolitica
142	Zona Sur	MT- 0343	MT- 0343- 3	Candida kefyr
143	Zona Sur	MT- 0343	MT- 0343- 2	Yersinia enterocolitica
144	Zona Central	MT- 0343	MT- 0343- 1	B(+) cat (-) y esc (+)
145	Zona Central	MT- 0344	MT- 0344- 1	B(+) cat (-) y esc (+)
146	Zona Central	MT- 0344	MT- 0344- 2	B(+) cat (-) y esc (+)
147	Zona Central	MT- 0345	MT- 0345- 1	B(+) cat (-) y esc (+)
148	Zona Central	MT- 0346	MT- 0346- 1	B(+) cat (-) y esc (+)
149	Zona Central	MT- 0346	MT- 0346- 2	B(+) cat (-) y esc (+)
150	Zona Central	MT- 0350	MT- 0350- 1	S.C.N
151	Zona Central	MT- 0350	MT- 0350- 2	S. uberis
152	Zona Central	MT- 0353	MT- 0353- 3	Proteus sp
153	Zona Central	MT- 0353	MT- 0353- 2	Klebsiella Ozaenae
154	Zona Central	MT- 0354	MT- 0354- 2	S.C.N
155	Zona Central	MT- 0354	MT- 0354- 1	S. aureus
156	Zona Central	MT- 0355	MT- 0355- 1	S.C.N
157	Zona Central	MT- 0356	MT- 0356- 1	S.C.N
158	Zona Central	MT- 0356	MT- 0356- 2	S. aureus
159	Zona Central	MT- 0357	MT- 0357- 1	S. uberis
160	Zona Central	MT- 0358	MT- 0358- 1	S.C.N
161	Zona Central	MT- 0359	MT- 0359- 1	S. aureus
162	Zona Central	MT- 0360	MT- 0360- 1	S. uberis
163	Zona Central	MT- 0361	MT- 0361- 1	S. uberis
164	Zona Central	MT- 0362	MT- 0362- 1	S.C.N
165	Zona Central	MT- 0363	MT- 0363- 1	S. aureus
166	Zona Central	MT- 0365	MT- 0365- 2	E. coli
167	Zona Central	MT- 0365	MT- 0365-1	S. dysgalactiae
168	Zona Central	MT- 0366	MT- 0366- 1	S.C.N
169	Zona Central	MT- 0366	MT- 0366- 2	S. uberis
170	Zona Central	MT- 0367	MT- 0367- 1	S. aureus
171	Zona Central	MT- 0368	MT- 0368- 1	S. uberis
172	Zona Central	MT- 0369	MT- 0369- 1	Corynebacterium sp
173	Zona Central	MT- 0369	MT- 0369- 2	S. uberis
174	Zona Central	MT- 0370	MT- 0370- 1	S.C.N
175	Zona Central	MT- 0371	MT- 0371- 1	S. uberis
176	Zona Central	MT- 0371	MT- 0371- 2	S. aureus
177	Zona Central	MT- 0372	MT- 0372- 1	Micrococcus sp
178	Zona Central	MT- 0373	MT- 0373- 1	S.C.N
179	Zona Central	MT- 0375	MT- 0375- 1	Corynebacterium sp
180	Zona Central	MT- 0376	MT- 0376- 1	B(+) cat (+) y esc (+)
181	Zona Central	MT- 0377	MT- 0377- 1	Corynebacterium sp
182	Zona Central	MT- 0378	MT- 0378- 1	S. aureus
183	Zona Central	MT- 0380	MT- 0380- 2	Corynebacterium sp
184	Zona Central	MT- 0380	MT- 0380- 1	Streptococcus sp
185	Zona Central	MT- 0381	MT- 0381- 1	Enterobacter cloacae
186	Zona Central	MT- 0381	MT- 0381- 3	Klebsiella Pneumoniae
187	Zona Central	MT- 0383	MT- 0383- 2	Corynebacterium sp
188	Zona Central	MT- 0383	MT- 0383- 1	Klebsiella Pneumoniae
189	Zona Central	MT- 0384	MT- 0384- 1	Corynebacterium sp
190	Zona Central	MT- 0384	MT- 0384- 2	Corynebacterium sp
191	Zona Central	MT- 0385	MT- 0385- 2	Klebsiella Pneumoniae
192	Zona Central	MT- 0386	MT- 0386- 1	S. uberis
193	Zona Central	MT- 0386	MT- 0386- 3	Enterobacter cloacae
194	Zona Central	MT- 0386	MT- 0386- 2	Klebsiella Pneumoniae
195	Zona Central	MT- 0387	MT- 0387- 1	Micrococcus sp
196	Zona Central	MT- 0388	MT- 0388- 3	Corynebacterium sp
197	Zona Central	MT- 0388	MT- 0388- 2	Corynebacterium sp
198	Zona Central	MT- 0388	MT- 0388- 1	Micrococcus sp
199	Zona Central	MT- 0389	MT- 0389- 1	S.C.N
200	Zona Central	MT- 0390	MT- 0390- 3	Klebsiella Pneumoniae
201	Zona Central	MT- 0390	MT- 0390- 2	Serratia marcescens
202	Zona Central	MT- 0390	MT- 0390- 1	Corynebacterium sp
203	Zona Central	MT- 0391	MT- 0391- 2	Corynebacterium sp
204	Zona Central	MT- 0391	MT- 0391- 3	Klebsiella Pneumoniae
205	Zona Central	MT- 0392	MT- 0392- 2	Corynebacterium sp
206	Zona Central	MT- 0392	MT- 0392- 1	Klebsiella Pneumoniae
207	Zona Central	MT- 0393	MT- 0393- 1	B(+) cat (-) y esc (+)
208	Zona Central	MT- 0394	MT- 0394- 1	Micrococcus sp
209	Zona Central	MT- 0395	MT- 0395- 1	S.C.N
210	Zona Central	MT- 0395	MT- 0395- 4	Klebsiella oxytoca
211	Zona Central	MT- 0395	MT- 0395- 2	Klebsiella oxytoca
212	Zona Central	MT- 0395	MT- 0395- 3	Klebsiella oxytoca
213	Zona Central	MT- 0396	MT- 0396- 1	S.C.N
214	Zona Central	MT- 0397	MT- 0397- 2	Enterobacter aglomerans
215	Zona Central	MT- 0397	MT- 0397- 1	Klebsiella oxytoca
216	Zona Central	MT- 0398	MT- 0398- 2	S. aureus
217	Zona Central	MT- 0398	MT- 0398- 1	S.C.N
218	Zona Central	MT- 0398	MT- 0398- 3	Klebsiella oxytoca
219	Zona Central	MT- 0399	MT- 0399- 2	S. aureus
220	Zona Central	MT- 0400	MT- 0400- 1	Klebsiella oxytoca
221	Zona Central	MT- 0401	MT- 0401- 2	Klebsiella oxytoca
222	Zona Central	MT- 0402	MT- 0402- 3	S. uberis
223	Zona Central	MT- 0402	MT- 0402- 2	S.C.N
224	Zona Central	MT- 0403	MT- 0403-1	Streptococcus sp
225	Zona Central	MT- 0403	MT- 0403- 2	Klebsiella oxytoca
226	Zona Central	MT- 0404	MT- 0404- 2	S. uberis
227	Zona Central	MT- 0404	MT- 0404- 3	S.C.N
228	Zona Central	MT- 0404	MT- 0404- 5	S.C.N
229	Zona Central	MT- 0404	MT- 0404- 1	Micrococcus sedentarios
230	Zona Central	MT- 0406	MT- 0406- 1	E. coli
231	Zona Central	MT- 0406	MT- 0406- 2	S. dysgalactiae
232	Zona Central	MT- 0407	MT- 0407- 1	Corynebacterium sp
233	Zona Central	MT- 0408	MT- 0408- 1	S. uberis
234	Zona Central	MT- 0409	MT- 0409- 2	Corynebacterium sp
235	Zona Central	MT- 0410	MT- 0410- 2	S.C.N
236	Zona Central	MT- 0410	MT- 0410- 3	E. coli
237	Zona Central	MT- 0411	MT- 0411- 1	Corynebacterium sp
238	Zona Central	MT- 0411	MT- 0411- 2	Corynebacterium sp
239	Zona Central	MT- 0411	MT- 0411- 3	S. agalactiae
240	Zona Central	MT- 0412	MT- 0412- 1	S.C.N
241	Zona Central	MT- 0412	MT- 0412- 2	Levadura
242	Zona Sur	MT- 0412	MT- 0412- 3	Corynebacterium sp
243	Zona Sur	MT- 0412	MT- 0412- 4	Candida sp
244	Zona Sur	MT- 0413	MT- 0413- 1	S.C.N
245	Zona Sur	MT- 0413	MT- 0413- 2	Corynebacterium sp
246	Zona Sur	MT- 0413	MT- 0413- 3	Corynebacterium sp
247	Zona Sur	MT- 0414	MT- 0414- 2	Corynebacterium sp
248	Zona Sur	MT- 0415	MT- 0415- 2	Enterococcus faecium
249	Zona Sur	MT- 0416	MT- 0416- 1	Micrococcus sp
250	Zona Sur	MT- 0416	MT- 0416- 2	S.C.N
251	Zona Sur	MT- 0416	MT- 0416- 3	S. uberis
252	Zona Sur	MT- 0416	MT- 0416- 4	S.C.N
253	Zona Sur	MT- 0416	MT- 0416- 5	S.C.N
254	Zona Sur	MT- 0416	MT- 0416- 6	Streptococcus sp
255	Zona Sur	MT- 0417	MT- 0417- 1	Corynebacterium sp
256	Zona Sur	MT- 0417	MT- 0417- 2	S.C.N
257	Zona Sur	MT- 0418	MT- 0418- 1	Micrococcus sp
258	Zona Sur	MT- 0418	MT- 0418- 2	Corynebacterium sp
259	Zona Sur	MT- 0419	MT- 0419- 1	Corynebacterium sp
260	Zona Sur	MT- 0419	MT- 0419- 3	Micrococcus sp
261	Zona Sur	MT- 0420	MT- 0420- 2	Corynebacterium sp
262	Zona Sur	MT- 0420	MT- 0420- 3	S.C.N
263	Zona Sur	MT- 0421	MT-0421- 1	Corynebacterium sp
264	Zona Sur	MT- 0421	MT-0421- 2	Corynebacterium sp
265	Zona Sur	MT- 0421	MT-0421- 3	S.C.N
266	Zona Sur	MT- 0422	MT- 0422- 1	Corynebacterium sp
267	Zona Sur	MT- 0422	MT- 0422- 2	Corynebacterium sp
268	Zona Sur	MT- 0423	MT- 0423- 1	S.C.N

269	Zona Sur	MT- 0423	MT- 0423- 2	S. uberis
270	Zona Sur	MT- 0424	MT- 0424 - 1	S.C.N
271	Zona Sur	MT- 0424	MT- 0424 - 2	S. uberis
272	Zona Sur	MT- 0425	MT- 0425- 1	S.C.N
273	Zona Sur	MT- 0426	MT- 0426- 1	S. uberis
274	Zona Sur	MT- 0426	MT- 0426- 3	Corynebacterium sp
275	Zona Sur	MT- 0426	MT- 0426- 4	Serratia rubidaea
276	Zona Sur	MT- 0427	MT- 0427- 1	Corynebacterium sp
277	Zona Sur	MT- 0427	MT- 0427- 2	Corynebacterium sp
278	Zona Sur	MT- 0427	MT- 0427- 3	Corynebacterium sp
279	Zona Sur	MT- 0428	MT- 0428- 1	S. uberis
280	Zona Sur	MT- 0428	MT- 0428- 2	Micrococcus sp
281	Zona Sur	MT- 0430	MT- 0430- 1	S. uberis
282	Zona Sur	MT- 0431	MT- 0431- 2	S.C.N
283	Zona Sur	MT- 0431	MT- 0431- 3	S.C.N
284	Zona Sur	MT- 0434	MT- 0434- 2	S.C.N
285	Zona Sur	MT- 0435	MT- 0435- 1	Corynebacterium sp
286	Zona Sur	MT- 0436	MT- 0436- 1	S.C.N
287	Zona Sur	MT- 0436	MT- 0436- 3	S. uberis
288	Zona Sur	MT- 0441	MT- 0441- 1	S. aureus
289	Zona Sur	MT- 0443	MT- 0443- 1	Corynebacterium sp
290	Zona Sur	MT- 0443	MT- 0443- 2	S.C.N
291	Zona Sur	MT- 0446	MT- 0446	Corynebacterium sp
292	Zona Sur	MT- 0448	MT- 0448- 1	Corynebacterium renale
293	Zona Sur	MT- 0451	MT- 0451- 1	Corynebacterium sp
294	Zona Sur	MT- 0452	MT- 0452- 2	Corynebacterium sp
295	Zona Sur	MT- 0455	MT- 0455- 1	S. aureus
296	Zona Sur	MT- 0455	MT- 0455- 2	S. uberis
297	Zona Sur	MT- 0457	MT- 0457- 3	Corynebacterium pseudodiphteriticum
298	Zona Sur	MT- 0458	MT- 0458- 2	Corynebacterium renale
299	Zona Sur	MT- 0459	MT- 0459- 4	S. aureus
300	Zona Sur	MT- 0460	MT- 0460- 1	S. aureus
301	Zona Sur	MT- 0461	MT- 0461- 2	Micrococcus sp
302	Zona Sur	MT- 0463	MT- 0463- 1	E. coli
303	Zona Sur	MT- 0464	MT- 0464- 1	Candida sp
304	Zona Sur	MT- 0466	MT- 0466- 2	S. uberis
305	Zona Sur	MT- 0466	MT- 0466- 1	Corynebacterium sp
306	Zona Sur	MT- 0467	MT- 0467- 1	S.C.N
307	Zona Sur	MT- 0468	MT- 0468- 1	S.C.N
308	Zona Sur	MT- 0471	MT- 0471- 1	Corynebacterium sp
309	Zona Sur	MT- 0472	MT- 0472- 1	S. uberis
310	Zona Sur	MT- 0475	MT- 0475- 1	Corynebacterium sp
311	Zona Sur	MT- 0476	MT- 0476- 1	Corynebacterium sp
312	Zona Sur	MT- 0476	MT- 0476- 2	Micrococcus sp
313	Zona Sur	MT- 0480	MT- 0480-1	S. aureus
314	Zona Sur	MT- 0480	MT- 0480-2	S. aureus
315	Zona Sur	MT- 0481	MT- 0481- 1	S. uberis
316	Zona Sur	MT- 0483	MT- 0483- 1	S. aureus
317	Zona Sur	MT- 0484	MT- 0484- 1	S.C.N
318	Zona Sur	MT- 0486	MT- 0486- 1	S. uberis
319	Zona Sur	MT- 0488	MT- 0488- 1	E. coli
320	Zona Sur	MT- 0489	MT- 0489- 1	S. uberis
321	Zona Sur	MT- 0491	MT- 0491- 1	E. coli
322	Zona Sur	MT- 0493	MT- 0493- 1	S. uberis
323	Zona Sur	MT- 0494	MT- 0494- 1	S. uberis
324	Zona Sur	MT- 0494	MT- 0494- 2	S.C.N
325	Zona Sur	MT- 0496	MT- 0496- 1	S. uberis
326	Zona Sur	MT- 0500	MT- 0500- 1	S. aureus
327	Zona Sur	MT- 0503	MT- 0503- 1	S. uberis
328	Zona Sur	MT- 0505	MT- 0505- 1	S. uberis
329	Zona Sur	MT- 0505	MT- 0505- 2	S.C.N
330	Zona Sur	MT- 0505	MT- 0505- 3	S.C.N
331	Zona Sur	MT- 0505	MT- 0505- 4	S. uberis
332	Zona Sur	MT- 0506	MT- 0506- 1	S. aureus
333	Zona Sur	MT- 0506	MT- 0506- 2	S. aureus
334	Zona Sur	MT- 0507	MT- 0507- 1	S.C.N
335	Zona Sur	MT- 0507	MT- 0507- 2	S.C.N
336	Zona Sur	MT- 0508	MT- 0508- 1	S.C.N
337	Zona Sur	MT- 0508	MT- 0508- 2	S.C.N
338	Zona Sur	MT- 0509	MT- 0509- 1	S. aureus
339	Zona Sur	MT- 0510	MT- 0510- 1	S.C.N
340	Zona Sur	MT- 0510	MT- 0510- 2	S. aureus
341	Zona Sur	MT- 0510	MT- 0510- 3	S.C.N
342	Zona Sur	MT- 0511	MT- 0511- 1	Corynebacterium sp
343	Zona Sur	MT- 0512	MT- 0512- 1	S. aureus
344	Zona Sur	MT- 0512	MT- 0512- 2	S. aureus
345	Zona Sur	MT- 0513	MT- 0513- 1	S. aureus
346	Zona Sur	MT- 0514	MT- 0514- 1	S.C.N
347	Zona Sur	MT- 0515	MT- 0515- 1	Corynebacterium sp
348	Zona Sur	MT- 0516	MT- 0516- 1	S. aureus
349	Zona Sur	MT- 0517	MT- 0517- 1	S.C.N
350	Zona Sur	MT- 0517	MT- 0517- 2	S.C.N
351	Zona Sur	MT- 0519	MT- 0519- 1	S.C.N
352	Zona Sur	MT- 0521	MT- 0521- 1	S. aureus
353	Zona Sur	MT- 0521	MT- 0521- 2	S. aureus
354	Zona Sur	MT- 0522	MT- 0522- 1	S.C.N
355	Zona Sur	MT- 0523	MT- 0523- 1	S. aureus
356	Zona Sur	MT- 0524	MT- 0524- 1	S.C.N
357	Zona Sur	MT- 0524	MT- 0524- 2	S. agalactiae
358	Zona Sur	MT- 0524	MT- 0524- 3	S. aureus
359	Zona Sur	MT- 0525	MT- 0525- 1	S.C.N
360	Zona Sur	MT- 0525	MT- 0525- 2	S.C.N
361	Zona Sur	MT- 0526	MT- 0526- 1	Corynebacterium sp
362	Zona Sur	MT- 0527	MT- 0527- 1	S.C.N
363	Zona Sur	MT- 0527	MT- 0527- 2	S. aureus
364	Zona Sur	MT- 0528	MT- 0528- 1	S. aureus
365	Zona Sur	MT- 0528	MT- 0528- 2	S.C.N
366	Zona Sur	MT- 0528	MT- 0528- 3	S. aureus
367	Zona Sur	MT- 0529	MT- 0529- 1	S. aureus
368	Zona Sur	MT- 0530	MT- 0530- 2	S. aureus
369	Zona Sur	MT- 0530	MT- 0530- 3	S.C.N
370	Zona Sur	MT- 0531	MT-0531- 1	S. aureus
371	Zona Sur	MT- 0533	MT- 0533- 1	S.C.N
372	Zona Sur	MT- 0535	MT- 0535- 1	S.C.N
373	Zona Sur	MT- 0535	MT- 0535- 2	S. uberis
374	Zona Sur	MT- 0535	MT- 0535- 3	S.C.N
375	Zona Sur	MT- 0536	MT- 0536- 1	S. aureus
376	Zona Sur	MT- 0536	MT- 0536- 2	S.C.N
377	Zona Sur	MT- 0537	MT- 0537- 1	S. aureus
378	Zona Sur	MT- 0538	MT- 0538- 1	S.C.N
379	Zona Sur	MT- 0539	MT- 0539- 2	S.C.N
380	Zona Sur	MT- 0540	MT- 0540- 1	S. aureus
381	Zona Sur	MT- 0541	MT- 0541- 1	S. aureus
382	Zona Sur	MT- 0543	MT- 0543- 1	S. aureus
383	Zona Sur	MT- 0544	MT- 0544- 1	S. aureus
384	Zona Sur	MT- 0545	MT- 0545- 1	S. agalactiae
385	Zona Sur	MT- 0545	MT- 0545- 2	S. aureus
386	Zona Sur	MT- 0546	MT- 0546- 2	S. aureus
387	Zona Sur	MT- 0602	MT- 0602- 1	S. aureus
388	Zona Sur	MT- 0602	MT- 0602- 2	S. agalactiae
389	Zona Sur	MT- 0596	MT- 0596- 1	S. agalactiae
390	Zona Sur	MT- 0596	MT- 0596- 2	S.C.N
391	Zona Sur	MT- 0596	MT- 0596- 3	S. aureus
392	Zona Sur	MT- 0601	MT- 0601- 1	S.C.N

Identificación molecular de cepas de *Prototheca*, *Corynebacterium sp. y Nocardia sp.* mediante PCR, presentes en la mastitis bovina.

OBJETIVOS

Objetivos específicos

- Identificación molecular de cepas de *Prototheca* spp. mediante PCR, presente en la mastitis bovina.
- Extracción de DNAg de aislados de *Corynebacterium sp y Nocardia sp* provenientes de muestras de leche de vaca que presentan mastitis bovina.
- Diseño y validación de partidores de bibliografía para la identificación molecular de aislados de *Corynebacterium sp y Nocardia sp.*

1. PCR para *Prototheca* spp.

Prototheca es un alga que puede causar mastitis en el ganado bovino. Durante el procesamiento de las muestras recibidas en la primera etapa del proyecto se aislaron microorganismos con características de *Prototheca*. Para confirmar su identificación se puso a punto una reacción de PCR. Para ello fue necesario estandarizar un protocolo de extracción de ADN de estos microrganismos y contar con partidores (cebadores) específicos para *Prototheca*.

La extracción de DNAgde *Prototheca* se llevó a cabo con el kit "Wizard Genomic DNA purification" de acuerdo a las recomendaciones del proveedor y con pequeñas modificaciones que incluyeron: cultivar el inóculo a 30°C, 120 rpm por 72 horas en caldo Sabouraud, re-suspensión del pellet celular en buffer EDTA-Sor (EDTA 0,1 M (pH=7,5); Sorbitol 0,9 M) y la rehidratación del DNA genómico en agua libre de nucleasas.

Referente a la reacción de PCR se dispuso de cinco parejas de partidores (Ver tabla 1) de las cuales sólo funcionó una pareja (PZGT 2-A/F y PZGT 2-A/R). En la figura 1 se muestra como ejemplo un gel de agarosa donde se presentan los amplificados obtenidos mediante la reacción de PCR.

Tabla 1. Partidores para identificación molecular de *Prototheca* spp.

NOMBRE	SECUENCIA	TM°C	TAMAÑO	REFERENCIAS
PROTO18S_SC1_F PROTO18S_SC2_R	5'- AGGCTTACCAAGCCAAAGAT -3' 5'- CCGAAGAGCTTTACAACCAA -3'	60	179 pb	Diseñado en este estudio
PZGT 1-A/F PZGT 1-A/R	5'- CGCGCAAATTACCCAATCC -3' 5'- GCCAAGGCCCCCCGAAG -3'	60	853 pb	(1)
PZGT 2-A/F PZGT 2-A/R	**5'- CGCGCAAATTACCCAATCC -3' 5'- GTCGGCGGGGCAAAAGC -3'**	**60**	**946 pb**	**(1)**
P 1 F P 2 R	5'-TGCTGCAGTTAAAAAGCTCGT-3' 5'-TCCAAGAATTTCACCTCTGACA-3'	52	313 pb	(2)
P 3 F P 4 R	5'-AGCCTGCGGCTTAATTTGAC-3' 5'-CGGCCCAGAACATCTAAGG-3'	56	290 pb	(2)

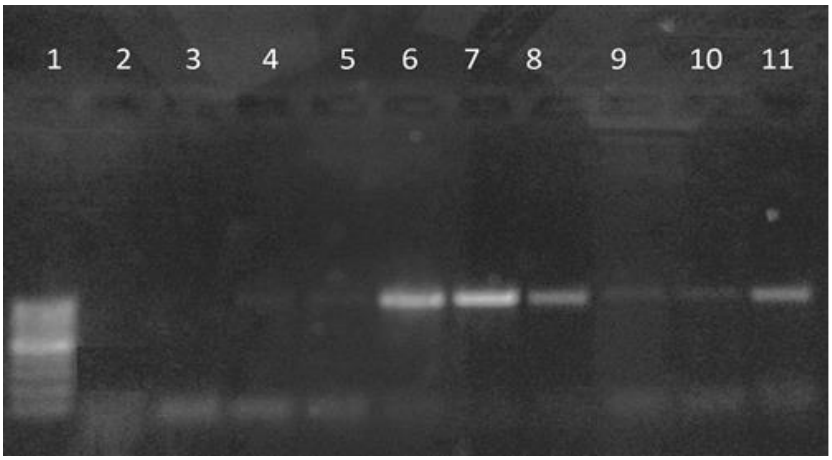


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa 1%. Electroforesis de la amplificación por PCR del gen 18S de *Prototheca*spp.con partidores **PZGT 2-A/F / PZGT 2-A/R**
Estándar MassRuler DNA LadderMix 100 pb (carril 1), Blanco (Carril 2), *Cándida spp.* (Carril 3), aislado 237-1 (Carril 4), aislado 229-1 (Carril 5), aislado 257-1 (Carril 6), aislado 235-1 (Carril 7). aislado 199-2 (Carril 8), aislado 187-1 (Carril 9), aislado 210-1 (Carril 10) y aislado 231-1 (Carril 11).
**Se usó Cándida spp. como control negativo.*

2. Extracción de DNAg de cepas de *Corynebacterium sp y Nocardia sp*.

Se obtuvieron 56 aislados de *Corynebacterium sp* provenientes de muestras de leches de bovinos que presentaban mastitis de los cuales solo 5 aislados fueron identificados por API (Tabla 2) y 3 aislados sospechosos de *Nocardia sp* de muestras de leche de bovinos del sur de Chile.

La extracción de DNAg para aislados de *Corynebacterium sp* fue hecha según el protocolo de Pacheco y cols (2007) seguido por la igualación de concentración de este a 200 ng/uL para la prueba de los partidores. La extracción DNAg de los aislados de *Nocardia sp* se realizó mediante ebullición en el mismo Mix de PCR.

Tabla 2. Resultados del API para cepas de *Corynebacterium sp.*

Aislado	Resultado API
448- 1	Corynebacterium renale
457- 3	Corynebacterium pseudodiphteriticum
458- 2	Corynebacterium renale
515- 1	Corynebacterium genitalium
526- 1	Corynebacterium genitalium

3. Identificación de *Corynebacterium sp.*

Al comenzar la identificación mediante PCR se utilizaron las parejas de partidores diseñadas en este estudio y obtenidas del trabajo de Dole y cols (2013) (Tabla 3). Se utilizó el Mix estándar utilizado en el laboratorio para estas reacciones con programa creado para dichos partidores (Tabla 4 y 5).

Tabla 3. Secuencias de partidores para identificación de *Corynebacterium spp.*

Nombre	Secuencia	Tamañao	TM °C	REFERENCIAS
CORYN16S9F CORYN16S1399R	5'- GATCCTGGCTCAGGACGAAC -3' 5'- GTTACCAACTTTCATGACGTGAC -3'	1393 pb	64	(1)
CORYNgyrBF CORYNgyrBR	5'- ATGATGCAGCGGCAAATC -3' 5'- GGTCCAGTTGAACCGATGTA -3'	386 pb	58	Diseñado en este estudio
CORYN16S_SC1F CORYN16S_SC2R	5'- GTGTGCGGTGGAAAGTTTTT -3' 5'- GTGCAATATTCCCCACTGCT -3'	174 pb	60	Diseñado en este estudio
CORYN16S_SC3F CORYN16S_SC4R	5'- GTGTGCGGTGGAAAGTTTTT -3' 5'- AAGGGGTTTACAACCCGAAG -3'	240 pb	60	Diseñado en este estudio

Tabla 4. Mix PCR.

MIX PCR	1x **µ**L
Go Taq	10
Primer F (10^3nM**)**	0,5 (250 nM)
Primer R (10^3nM)	0,5 (250 nM)
H20	7
DNA	2
Total	20

Tabla 5. Programa PCR "*Coryne30seg"*.

Temperatura ºC	Tiempo	Ciclos
94	5 min	1
94	30 seg	30
Tm	30 seg	
72	30 seg	

72	7 min	1
4	∞	1

Los resultados mostraron que las cuatro parejas de partidores (tabla 3) no fueron específicos para la detección de *Corynebacterium*, ya que no se observó amplicon. Esto se debe a que el diseño de estos partidores no fue el correcto, ya que los aislados que se utilizaron para la prueba de estos partidores fueron los previamente identificados por API. (Resultados no mostrados)

- **Búsqueda de nuevos partidores para *Corynebacterium sp.***

  En la búsqueda se obtuvo 6 parejas de primers, de las 4 eran especificas para el gen ribosomal 16S, 1 para el gen de la sub unidad B de la Gyrasa y otro para el Gen rpoB. (Tabla 6).

  Solamente 5 de las parejas fueron diseñadas mediante el programa gratuito PRIMER 3 a partir del gen 16S de *Corynebacterium sp*. Se realizó un estudio bioinformático en el software *BLAST* a las parejas para cerciorarse de que eran específicos para el microorganismo a identificar, indicando que estas eran especificas. La pareja C2700RPOB_F/ C3130RRPOB_R fue obtenida del trabajo de Pacheco y cols (2007).

  Las Tms para cada pareja de partidores se calculó según la fórmula AT= 2°C y GC=4°C.

Tabla 6. Secuencias de nuevos partidores para identificación de *Corynebacterium sp.*

Nombre	Secuencia	Tamaño	TM °C	Referencia
Coryn16S_SCG_1F Coryn16S_SCG_2R	5'- AAGCACCGGCTAACTACGTG-3' 5'- CCTCCTGATATCTGCGCATT-3'	218 pb	60	Diseñado en este estudio
Coryn16S_SCG_3F coryn16S_SCG_4R	5'- AGCTCGTAGGTGGTTTGTCG-3' 5'- CTGTTCGCTACCCATGCTTT-3'	211 pb	60	Diseñado en este estudio
Coryn16S_SCG_3F **Coryn16S_SCG_2R**	**5'- AGCTCGTAGGTGGTTTGTCG-3'** **5'- CCTCCTGATATCTGCGCATT-3'**	**137 pb**	**60**	**Diseñado en este estudio**
CorynGyrB_SCG_5F CorynGyrB_SCG_6R	5'- CACCGGTACCAAGATTCGTT-3' 5'- TTTTTGCGGCGTTTCTTATC-3'	302 pb	60	Diseñado en este estudio
Coryn16S_SCG_7F Coryn16S_SCG_8R	5'- AGCTTGTTGGTGGGGTAATG-3' 5'- CTGTTCGCTACCCATGCTTT-3'	520 pb	60	Diseñado en este estudio
C2700RPOB_F **C3130RRPOB_R**	**5'- CGTATGAACATCGGCCAGGT-3'** **5'- TCCATTTCGCCGAAGCGCTG-3'**	**446 pb**	**60**	**(2)**

- **Resultados de PCR de Corynebacterium sp.**

Luego de la reconstitución del stock de los *primers*, se realizaron reacciones de PCR para cada parejas de partidores. Se utilizó el programa detallado en la tabla 7.

Tabla 7. Programa PCR "*Coryne2"*.

Temperatura ºC	Tiempo	Ciclos
94	5 min	1
94	30 seg	30
Tm	30 seg	
72	1 min	
72	7 min	1
4	∞	1

Para la prueba de estos partidores se usaron los DNAg de las cepas previamente identificadas por API. Los resultados arrojaron que las parejas (Coryn16S_SCG_1F/ Coryn16S_SCG_2R; Coryn16S_SCG_3F/ Coryn16S_SCG_4R; CorynGyrB_SCG_5F/ CorynGyrB_SCG_6R y Coryn16S_SCG_7F/ Coryn16S_SCG_8R) si bien, se observó amplicon para cepas de *Corynebacterium,* también amplificaron para el control negativo, lo que llevó a descartarlas (Resultados no mostrados). Sin embargo las parejas **C2700RPOB_F/ C3130RRPOB_R y Coryn16S_SCG_3F/ Coryn16S_SCG_2R** amplificaron específicamente para los aislados de *Corynebacterium* (Figura 2, Carril 4,5,6 y Figura 3, Carriles 4,5,6). Estas parejas de partidores fueron las seleccionadas para los ensayos posteriores.

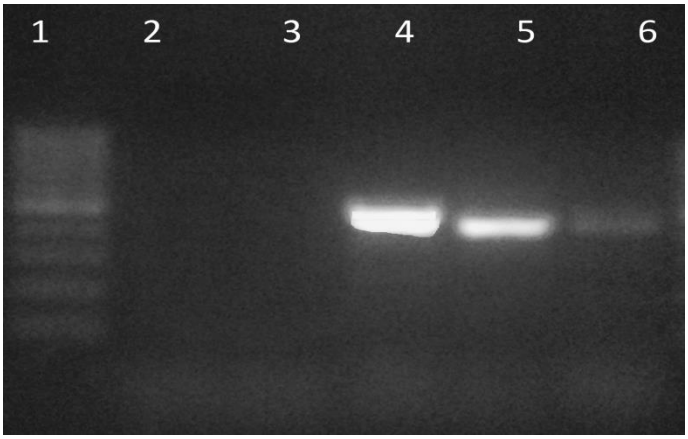


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa 1,8% prueba de partidores C2700RPOB_F/C3130RRPOB_R. Electroforesis de la amplificación, por PCR de un fragmento de 446 pb del gen rpob de *Corynebacterium* a una TM de 60°C. Estándar massruler DNA Ladder Mix 100 pb (carril 1),*Listeria sp* (Carril 2), Blanco (Carril 3). Aislado 515-1 (Carril 4), aislado 526-1 (Carril 5), aislado 448-1 (Carril 6). Amplicon de 446 pb, en carril 4,5,6.

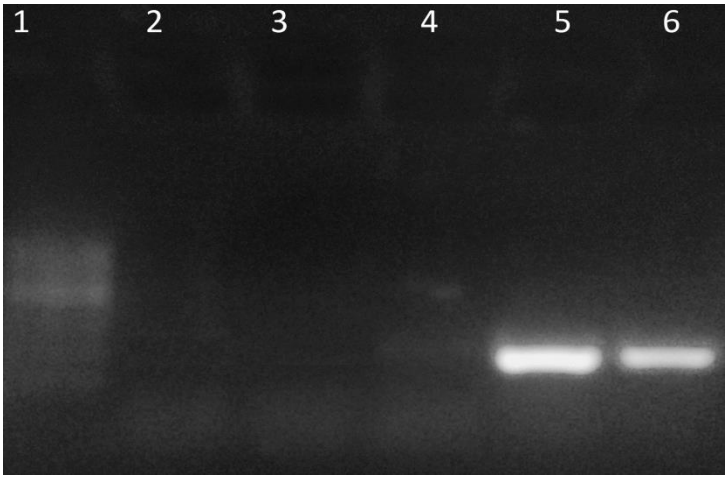


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa 1,8% prueba de partidores Coryn16S_SCG_3F/ Coryn16S_SCG_2R. Electroforesis de la amplificación, por PCR de fragmento de 137 pb del gen 16S *de Corynebacterium* a una **TM de 60°C** Estándar MassRuler DNA Ladder Mix 100 pb (carril 1),*Listeria sp* (Carril 2), Blanco (Carril 3). Aislado 515-1 (Carril 4), aislado 526-1 (Carril 5), aislado 448-1 (Carril 6). Amplicon de 137 pb, en carril 4,5,6.

- **Prueba de PCR Multiplex y extracción de DNAg por ebullición de aislados de *Corynebacterium* sp.**

Ya teniendo 2 parejas de partidores seleccionadas se evaluó la posibilidad de utilizar ambas parejas de partidores simultáneamente en un PCR Multiplex y si es posible utilizar el protocolo de ebullición para la obtención de DNAg, esto se traduce en mayor rapidez del ensayo y menor costo.

La reacción se basó según el Mix y el programa PCR según los requerimientos de esta. (Tabla 8 y 9).

Tabla 8. Mix PCR Multiplex

MIX PCR	1x **µ**L
Go Taq	10
Coryn16S_SCG_3F (10^3nM**)**	0,5 (250 nM)
Coryn16S_SCG_2R (10^3nM)	0,5 (250 nM)
C2700RPOB_F (10^3nM)	0,5 (250 nM)
C3130RRPOB_R (10^3nM)	0,5 (250 nM)
H20	6
DNA	2
Total	20

Tabla 9. Programa PCR "*Coryne30seg*".

Temperatura ºC	Tiempo	Ciclos
94	5 min	1
94	30 seg	30
60	30 seg	
72	30 seg	
72	7 min	1
4	∞	1

La reacción de PCR múltiple mostro 2 bandas (137 pb y 446 pb) correspondiente a cada amplicon de cada pareja de partidores esperada (Figura 4, carril 4,5,6,7,8 y 9), lo que indica que es factible realizar un PCR multiplex para la identificación de *Corynebacterium sp,* también estos resultados despejan la duda si realmente se puede realizar la extracción mediante ebullición para la identificación de este patógeno.

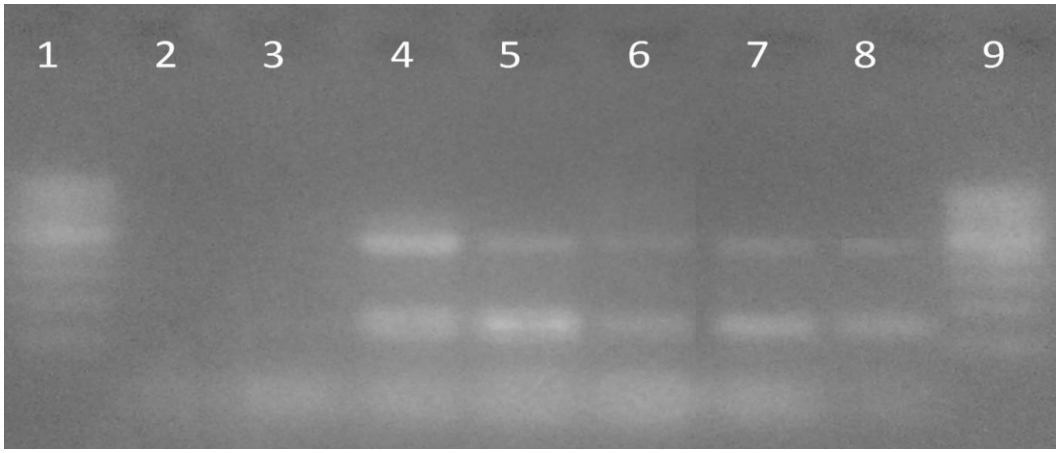


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa 1,8% prueba de PCR Multiplex, partidores Coryn16S_SCG_3F/ Coryn16S_SCG_2R y C2700RPOB_F/C3130RRPOB_R
Electroforesis de la amplificación, por PCR de fragmento de 137 pb del gen 16S y de 446 pb del gen rpoB *de Corynebacterium* a una **TM de 60°C** Estándar MassRuler DNA Ladder Mix 100 pb (carril 1),*Listeria sp* (Carril 2), Blanco (Carril 3). Aislado 515-1 (Carril 4), aislado 526-1 (Carril 5), aislado 448-1 (Carril 6), aislado 457-3 (Carril 7), asilado 308-2 (Carril 8) y Estándar MassRuler DNA Ladder Mix 100 pb (carril 9). Amplicones de 137 pb y 446 pb, en carriles 4, 5,6.7,8 y 9.

- **Identificación, mediante PCR Multiplex, de aislados de *Corynebacterium* obtenidos de muestras de leche de vaca que presentaban mastitis bovina**

Luego la elección de *primers* específicos, protocolo de extracción y reacción se procedió a identificar los 56 aislados sospechosos de *Corynebacterium sp.*

Las reacciones se llevaron a cabo según el Mix detallado en la tabla 8 y programa detallado en tabla 9.

En los resultados se obtuvieron amplicones de 446 pb y 137 pb en 50 de 56 cepas. (Tabla 10)

Tabla 10. Resultado de identificación de *Corynebacterium*

Cepa	C2700RPOB_F C3130RRPOB_R	Coryn16S_SCG_3F Coryn16S_SCG_2R	Diagnostico
MT- 0164- 1	-	-	
MT- 0165- 3	+	+	Corynebacterium sp
MT- 0170- 2	+	+	Corynebacterium sp
MT- 0308- 2	+	+	Corynebacterium sp
MT- 0310- 1	+	+	Corynebacterium sp
MT- 0323- 2	+	+	Corynebacterium sp
MT- 0324- 1	+	+	Corynebacterium sp
MT- 0325- 1	-	-	
MT- 0325- 2	-	-	
MT- 0334- 1	+	+	Corynebacterium sp
MT- 0369- 1	+	+	Corynebacterium sp
MT- 0375- 1	-	-	
MT- 0377- 1	+	+	Corynebacterium sp
MT- 0380- 2	+	+	Corynebacterium sp
MT- 0383- 2	+	+	Corynebacterium sp
MT- 0384- 1	+	+	Corynebacterium sp
MT- 0384- 2	+	+	Corynebacterium sp
MT- 0388- 3	+	+	Corynebacterium sp
MT- 0388- 2	-	-	
MT- 0390- 1	+	+	Corynebacterium sp
MT- 0391- 2	+	+	Corynebacterium sp
MT- 0392- 2	+	+	Corynebacterium sp
MT- 0407- 1	+	+	Corynebacterium sp
MT- 0409- 2	+	+	Corynebacterium sp
MT- 0411- 1	+	+	Corynebacterium sp
MT- 0411- 2	+	+	Corynebacterium sp
MT- 0412- 3	+	+	Corynebacterium sp
MT- 0413- 2	+	+	Corynebacterium sp
MT- 0413- 3	+	+	Corynebacterium sp
Cepa	C2700RPOB_F C3130RRPOB_R	Coryn16S_SCG_3F Coryn16S_SCG_2R	Diagnostico
MT- 0414- 2	+	+	Corynebacterium sp

MT- 0417- 1	+	+	Corynebacterium sp
MT- 0418- 2	+	+	Corynebacterium sp
MT- 0419- 1	+	+	Corynebacterium sp
MT- 0420- 2	+	+	Corynebacterium sp
MT-0421- 1	+	+	Corynebacterium sp
MT-0421- 2	+	+	Corynebacterium sp
MT- 0422- 1	+	+	Corynebacterium sp
MT- 0422- 2	+	+	Corynebacterium sp
MT- 0426- 3	+	+	Corynebacterium sp
MT- 0427- 1	-	-	
MT- 0427- 2	+	+	Corynebacterium sp
MT- 0427- 3	+	+	Corynebacterium sp
MT- 0435- 1	+	+	Corynebacterium sp
MT- 0443- 1	+	+	Corynebacterium sp
MT- 0446- 1	+	+	Corynebacterium sp
MT- 0448- 1	+	+	**Corynebacterium renale**
MT- 0451- 1	+	+	Corynebacterium sp
MT- 0452- 2	+	+	Corynebacterium sp
MT- 0457- 3	+	+	**Corynebacterium pseudodiphteriticum**
MT- 0458- 2	+	+	Corynebacterium renale
MT- 0466- 1	+	+	Corynebacterium sp
MT- 0471- 1	+	+	Corynebacterium sp
MT- 0475- 1	+	+	Corynebacterium sp
MT- 0476- 1	+	+	Corynebacterium sp
MT- 0515- 1	+	+	**Corynebacterium genitalium**
MT- 0526- 1	+	+	**Corynebacterium genitalium**

4. Identificación mediante PCR de aislados de *Nocardia sp* obtenidos de muestras de leche de vaca del sur de Chile que presentaban mastitis bovina.

Al comenzar la identificación mediante PCR se utilizaron las parejas de partidores diseñadas en este estudio y obtenidas del trabajo de Rodríguez-Nava y cols (2006) (Tabla 11). Para cada reacción se utilizó el Mix estándar utilizado en el laboratorio (Tabla 4) y al programa PCR se le modifico la temperatura de "Desnaturalización" a 10 min, ya que se realizó la extracción de DNAg de este microorganismo en el mismo termociclador (PCR en Colonia) (Tabla 12).

Los aislados sospechosos de *Nocardia sp* a identificar (9091, 7773, 8085) fueron obtenidos de muestras de leche de vaca del sur de Chile que presentaban mastitis.

Tabla 11. Partidores para la identificación de *Nocardia sp.*

Nombre	Secuencia	Tamaño	TM°C	Referencia
Noc16s_SC_1F Noc16s_SC_2R	5'- CGGAATTACTGGGCGTAAAG -3' 5'- TCGCTTCTCAGCGTCAGTTA-3'	211 pb	60	Diseñado en este estudio
Noc16S_SC_3F **Noc16S_SC_4R**	**5'- AGAGATGTAGGCCCCCTTGT-3'** **5'- AAGGGGCATGATGACTTGAC-3'**	**199 bp**	**60**	**Diseñado en este estudio**
Noc16S_SC_5F Noc16S_SC_6R	5'- GCCGTAAACGGTGGGTACTA-3' 5'- ACAAGGGGGCCTACATCTCT-3'	226 pb	60	Diseñado en este estudio
TB11 **TB12**	**5'- ACCAACGATGGTGTGTCCAT-3'** **5'- CTTGTCGAACCGCATACCCT-3'**	**441pb**	**55**	**(3)**

.**Tabla 12.** Programa PCR "*Nocard"*

Temperatura ºC	Tiempo	Ciclos
94	10 min	1
94	30 seg	30
Tm	30 seg	
72	30 seg	
72	7 min	1
4	∞	1

Para confirmar la especificidad de estos partidores, se utilizó como control positivo una cepa de *Nocardia beijingensis* obtenida del ISP, y como control negativo una cepa de *Corynebacterium genitalium* previamente identificada por PCR en este mismo estudio.

Los resultados arrojaron que solo 2 parejas de partidores fueron especificas para la identificación de este microorganismo siendo estas **Noc16S_SC_3F/ Noc16S_SC_4R.**

(Figura 5, Carril 5,6,7,8) **TB11/TB12** (Figura 6, Carril 5,6,7,8). Las demás parejas no amplificaron el control positivo, por ende fueron descartas (Resultados no mostrados).

También, se identificó las cepas sospechosas de *Nocardia sp,* correspondiendo estas efectivamente a *Nocardia sp.* (Figura 3 y 4).

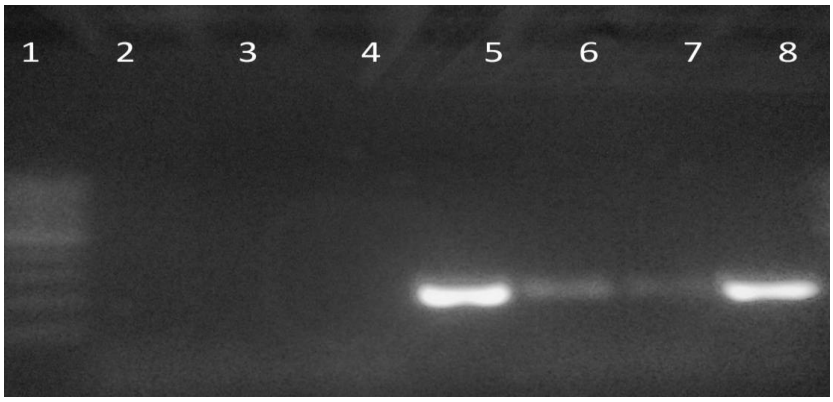


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa 1,8% prueba de partidores Noc16S_SC_3F/ Noc16S_SC_4R. Electroforesis de la amplificación, por PCR de un fragmento de 199 pb del gen 16S de *Nocardia sp* a una TM de 60°C. Estándar MassRuler DNA Ladder Mix 100 pb (carril 1),*Listeria sp* (Carril 2), *Corynebcterium genitalium* (Carril 3). Blanco (Carril 4), *Nocardia Beijingensis* (Carril 5), aislado 8085 (Carril 6).aislado 7377 (Carril 7) y aislado 9091 (Carril 8). Amplicon de 199 pb, en carril 4,5,6. **Se utilizó como control negativo Listeria sp y Corynebacterium genitalium.*Se utilizó como control positivo Nocardia Beijingensis.*

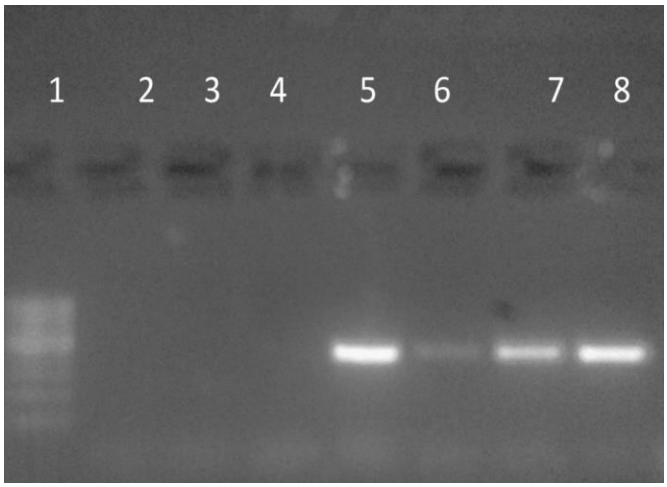


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa 1,8% prueba de partidores TB11/TB12. Electroforesis de la amplificación, por PCR de un fragmento de 441 pb del gen que codifica para hsp70 de *Nocardia sp* a una TM de 55°C. Estándar MassRuler DNA Ladder Mix 100 pb (carril 1),*Listeria sp* (Carril 2), *Corynebcterium genitalium* (Carril 3). Blanco (Carril 4), *Nocardia Beijingensis* (Carril 5), aislado 8085 (Carril 6).aislado 7377 (Carril 7) y aislado 9091 (Carril 8). Amplicon de 441 pb, en carril 4,5,6. **Se utilizó como control negativo Listeria sp y Corynebacterium genitalium. *Se utilizó como control positivo Nocardia Beijingensis.*

5. CONCLUSIONES

- Se dispone de un PCR para la identificación de Prototheca *spp*.

- Los *primers (*C2700RPOB_F/C3130RRPOB_R)*,* utilizados por Zaini et al (2012) y Coryn16S_SCG_3F/ Coryn16S_SCG_2R, los cuales se diseñaron en este estudio, fueron los indicados para la identificación específica de *Corynebacterium sp,* Coco-bacilo presente en la mastitis bovina.

- Los 50 de 56 aislados sospechosos de *Corynebacterium sp* provenientes de muestras de leche de vacas con mastitis bovina corresponden efectivamente a *Corynebacterium sp.*

- Los *primers (*TB11/TB12)*,* utilizados por Rodríguez-Nava y cols (2006) y Noc16S_SC_3F/ Noc16S_SC_4R, los cuales se diseñaron en este estudio, fueron los indicados para la identificación específica de *Nocardia sp.*

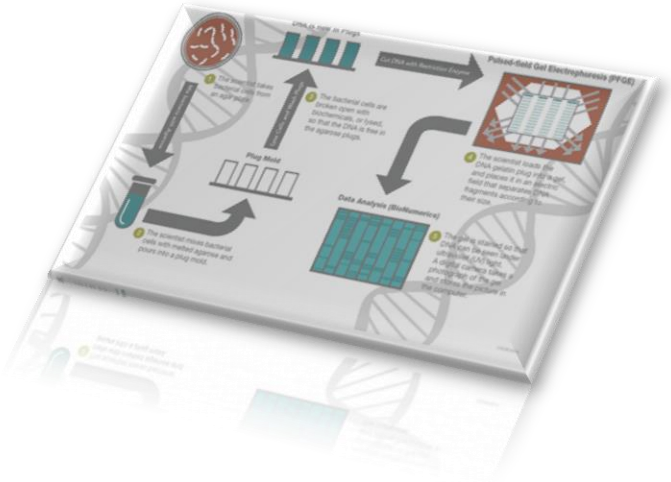
- Los 3 aislados sospechosos de *Nocardia sp* provenientes de muestras de leche de vacas del sur de Chile con mastitis bovina corresponden efectivamente a *Nocardia sp.*

.

6. Bibliografía

1. Cremonesi,P., Pozzi, F., Ricchi, M., Castiglioni, B., Luini, M., & Chessa, S. (2012). Identification of Prototheca species from bovine milk samples by PCR-single strand conformation polymorphism.*Journal of dairy science*, *95*(12), 6963-6968.
2. Zaini, F ., Kanani, A., Falahati, M., Fateh, R., Salimi-Asl, M., Saemi, N. & Nazeri, M. (2012). Identification of Prototheca zopfii from Bovine Mastitis.*Iranian J Publ Health*, *41*(8), 84-88.
3. Pacheco, L. G., Pena, R. R., Castro, T. L., Dorella, F. A., Bahia, R. C., Carminati, R. &Azevedo, V. (2007). Multiplex PCR assay for identification of Corynebacteriumpseudotuberculosis from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. *Journal of medical microbiology*, *56*(4), 480-486.
4. Dole, V. S., Henderson, K. S., Fister, R. D., Pietrowski, M. T., Maldonado, G., & Clifford, C. B. (2013). Pathogenicity and Genetic Variation of 3 Strains of Corynebacterium bovis in Immunodeficient Mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS*, *52*(4), 458.
5. Rodríguez-Nava, V., Couble, A., Devulder, G., Flandrois, J. P., Boiron, P., & Laurent, F. (2006). Use of PCR-restriction enzyme pattern analysis and sequencing database for hsp65 gene-based identification of Nocardia species.*Journal of clinical microbiology*, *44*(2), 536-546.

TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE *Escherichia coli* AISLADAS DE UBRES CON MASTITIS EN LA ZONA CENTRO Y SUR DEL PAÍS



1. INTRODUCCIÓN

Este estudio fue conducido para monitorear diversos aislados *Escherichia coli* provenientes de casos de mastitis bovina del centro y sur del país ha habido conocimiento que la inflamación causada por esta bacteria alrededor del parto y en la lactancia conduce a importantes pérdidas económicas. La tipificación genética de los distintos aislados será el sustento del epidemiológico que permita relacionar cada aislado con una zona geográfica.

Entre las técnicas moleculares que conducen a la caracterización y agrupación de microorganismos basadas en atributos genotípicos ha adquirido importante relevancia la aplicación de endonucleasas de restricción debido a la capacidad discriminatoria que aportan por medio de la hidrólisis de enlaces fosfodiester del ADN. La polaridad de los fragmentos resultantes de la acción enzimática permite separarlos por electroforesis en gel decampo pulsado.

Teniendo como marco de acción los procedimientos protocolizados en *Pulse Net,* los registros fotográficos de la fragmentación del ADN en gel de agarosa permiten agrupar los aislados mediante análisis computacional y compararlos con perfiles obtenidos en otros estudios.

Adicionalmente, la implementación de una guía práctica que aborde la esencia del análisis computacional será parte fundamental del trabajo.

2. OBJETIVO GENERAL

Tipificación de aislados de *Escherichia coli* provenientes de ubres con mastitis de la zona centro y sur del país mediante electroforesis en gel de campo pulsado.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Recuperar y comprobar pureza de aislados de *E. coli* provenientes de ubres con mastitis.
2) Tipificar mediante electroforesis de gel en campo pulsado (PFGE) aislados de *E. coli* provenientes de ubres con mastitis.
3) Generar un protocolo para el análisis de PFGE mediante el programa computacional Bionumerics 7.1.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Cepas bacterianas

El estudio se realizó sobre 18 aislados de *E. coli* obtenidos desde ubres con mastitis obtenidos en la zona centro y sur del país (Tabla 1).

Tabla 1. Cepas de *E. coli* incluidas en el estudio.

Cepas Zona Central	Cepas Zona Sur
AL -561-7	AL 711-1
11592-23	AL 712-1
MT-0365-2	MT-0463-1
AL -562-5	MT-0166-1
747-1	MT-0488-1
AL 563-3	MT-0170-1b
11531-9	MT-0491-1
AL 565-5	AL 565-4
12192-4	11960-18

4.2. Extracción de ADN bacteriano

4.2.1. Recuperación de cepas

Los aislados de *E. coli* almacenados en leche -20ºC se recuperaron mediante cultivo en placas de medio selectivo agar EMB (Eosina Azul de Metileno) a 37º C durante 18 horas. Las colonias fueron luego traspasadas a placas de medio crecimiento agar TSA (Triptosa Soya Agar) donde se cultivaron durante 18 horas a 37ºC para ulterior detección.

4.2.2. Elaboración de Plugs

Suspensiones Bacterianas

Los inóculos deben ser suspendidos y la densidad óptica debe ser estandarizada.

Cada cepa fue suspendida en 2mL de buffer TE (anexo 1) a partir de las respectivas placas de agar TSA. Cada suspensión fue ajustada a una DO_{600nm} de 1.0.

4.2.3. Moldeado de Plugs

Las suspensiones bacterianas se fijan en agarosa formando dos plugs por cada cepa. El uso de agarosa SeaKem Gold aporta gran resistencia a los plugs frente al potencial daño que pueden causar los procesos de lisis y lavado.
Las suspensiones bacterianas y la subsiguiente elaboración de plugs deben ser realizadas en el menor tiempo posible para minimizar la lisis celular prematura.

a) Preparación de agarosa SeaKem Gold 1% en buffer TE.
   En un frasco de tapa rosca se disolvieron 0.1 gr de agarosa SeaKem Gold, en 10 ml de buffer TE.
   Con la tapa del frasco suelta la agarosa se disuelve mediante sucesivos pasos en horno microondas, manteniéndola fluida hasta transferirla a los moldes para plugs.
b) En la barra de moldes para plugs se rotularon 2 por cada número del cepa y fueron sellados en el fondo con cinta adhesiva.
c) Con micropipeta se transfirieron a cada tubo 400 µl de la suspensión bacteriana homogenizada.
d) Se agregaron 20 µl de solución de proteinasa K 20 mg/mL (Anexo 2) a cada tubo sumergiendo la punta en la suspensión, y se mezcló suavemente y vertiendo varias veces. La solución de proteinasa K se mantuvo en hielo durante la operación.
e) Un volumen de 400 µl de agarosa SeaKem Gold1%, fundida a 50ºC (Tº tolerable al tacto) fue adicionado a cada tubo, mezclando suavemente con pipeta.
f) Inmediatamente cada mezcla se vertió en dos moldes de plugs por cada número de cultivo, evitando la formación de burbujas, y se dejó solidificar a Tº ambiente durante 15 minutos.

4.2.4. Lisis de Células Bacterianas en los Plugs de Agarosa

La pared bacteriana debe ser digerida para exponer el material genético. Esto se logra con la capacidad detergente de Sarcocyl y de proteinasa K para la remoción de nucleasas en el medio quelante de metales aportado por EDTA.

a) Se verificó el funcionamiento del baño de agua con agitación, se cargó con suficiente cantidad de agua y se reguló a una temperatura de 52ºC.
b) Se rotularon los tubos con el número de cada cepa y se adicionaron 500 µl de proteinasa K (20 mg/ml) y luego 5 ml de buffer de lisis (anexo 3).
c) Cada plug fue depositado en la solución correspondiente empujándolo cuidadosamente con espátula hacia el fondo cada tubo, verificando que quedarán inmersos en la mezcla
f) Luego en gradillas apropiadas los tubos se pusieron en baño de agua con agitación y se incubaron a 52ºC durante 2 horas.

.

4.2.5. Lavado de Plugs

a) El drenaje de la mezcla se realiza cuidadosamente evitar el daño o pérdida de plugs (tapa cribada).
b) Cada tubo con sus respectivos 2 plugs fue adicionado de 15 ml de agua dd precalentada a 52 ºC, y se incubaron en baño de agua agitado por 10 minutos. El proceso se realizó 3 veces.
c) Luego se practicaron 4 lavados en 10 ml de buffer TE.
g) Eliminado el buffer del cuarto lavado, cada tubo fue adicionado nuevamente con 10 ml de buffer TE y cuidando de cubrir completamente los plugs, se refrigeraron a 4ºC hasta comenzar la etapa de digestión.

4.3. Digestión de ADN con *Xba*I

Los plugs son seccionados en pequeñas rebanadas para someterlas a la acción enzimática endonucleasa. La enzima XbaI es utilizada como enzima primaria de corte para E. coli.
Por recomendación de Pulse Net se considera el uso de albúmina bovina sérica para minimizar la incidencia de restricción incompleta.
El uso de enzimas secundarias y terciarias es de utilidad en situaciones en las que los patrones obtenidos con la enzima primaria no son satisfactorios para discriminar entre dos o más aislados.

La digestión se realizó en dos instancias. La primera consideró 8 aislados y la segunda 12. La descripción tiene validez para ambos casos, con la salvedad que en el primer caso para el estándar de Salmonella ser. Braenderup H9812 se utilizaron 2 líneas y para el segundo 3.

4.3.1. Incubación pre-restricción

a) Se rotularon tubos de microcentrifuga de 1,5 ml, 8 para las cepas y 2 para es estándar de *Salmonella* ser. Braenderup H9812.
b) En cada tubo se alicuotaron 200 µl de buffer de pre-restricción 1X (anexo 4)

c) A cada plug se le practicaron rebanadas de 2 mm aproximadamente. Los plugs remanentes y las rebanadas sin utilizar se depositaron en los respectivos tubos con buffer TE y se refrigeraron.
d) Dos rebanadas de cada plug fueron transferidas al respectivo tubo de 1,5 ml de microcentrifuga, asegurando que quedaran inmersas en el buffer de pre-restricción diluido.
e) Los tubos de microcentrifuga se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos.
f) Con micropipeta de 200 µl se removió el buffer teniendo especial cuidado de no dañar ni aspirar las muestras.

4.3.2. Restricción enzimática

a) A cada tubo con su respectivo plug se agregaron 200 µl de la mezcla de restricción enzimática (anexo 5) cerciorándose que los plugs quedaran sumergidos.
b) Los tubos se incubaron en termobloque de calor seco a 37ºC durante 2 horas.

4.4. Electroforesis

Durante el periodo de incubación de las muestras en la mezcla de restricción enzimática se prepara el buffer y gel de corrida. La incorporación de ácido bórico al buffer permite obtener más resolución al permitir la separación en pequeños fragmentos la molécula de ADN.

4.4.1. Preparación del gel de Agarosa al 1%.

a) Para moldear el gel de corrida se diluyó 1 gr de Agarosa SeaKem Gold (SKG) en 100 ml de buffer TBE 0,5X (anexo 6)
b) Mientras se disuelve la agarosa, se armó el marco para moldear el gel.
c) Una vez fundida, la agarosa se vertió en el marco, reservando un volumen aprox. de 2 ml para sellar los pocillos una vez cargados con las muestras. Se dejó solidificar el gel, por alrededor de 30 minutos.
d) Se cargó la cámara de electroforesis con 2500 ml de buffer TBE 0.5X, se calibró para un flujo de 1 litro/min. y se hizo funcionar durante 30 minutos a 14ºC antes de cargar el gel.

4.4.2. Carga del Gel

a) Retirados del termobloque después del periodo de incubación, se removió la mezcla de restricción enzimática de cada tubo con micropipeta y se adicionaron 200 µl de TBE 0.5X, dejando incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.

b) Cuidadosamente se remueve el buffer TBE 0.5X, se retiran las rebanadas desde los tubos y se depositan en los pocillos del gel cuidando de no dejar espacios ni dañar las muestras.
c) Con micropipeta de 200 µl cargada con agarosa fundida del remanente de 2 ml, se selló cada uno de los 10 pocillos evitando la formación de burbujas.
d) Habiendo solidificado la agarosa de sellado, se retiró el gel desde el molde, y cuidadosamente fue depositado en el marco de la cámara de electroforesis.
f) La cámara se cerró y se programaron las condiciones de corrida.

4.4.3. Condiciones de Electroforesis

La corrida se realizó según lo indicado en las condiciones de electroforesis del estándar de operaciones de *Pulse Net* para PFGE de *E. coli* No-O157 con enzima de restricción *XbaI* y según el equipo modelo CHEF DR-III.

Tiempo Inicial	**6,7 segundos**
Tiempo Final	35,3 segundos
Voltaje	6 volts
Ángulo	120º
Tiempo de Corrida	19 horas

4.4.4. Tinción del gel de agarosa de PFGE

Considerando lo extenso del periodo de electroforesis la tinción se practica una vez ésta ha concluido. Una vez sensibilizados por transiluminación de luz ultravioleta, los agentes intercalantes unidos a las moléculas de ADN, permiten visualizar las bandas en el gel.

a) La solución de tinción se preparó en un recipiente apropiado al tamaño del gel, diluyendo 40µl de GelRed en 200 ml de agua destilada.
b) Retirando cuidadosamente el gel desde la cámara de electroforesis, se sumergió en la solución de tinción durante 20 minutos.
c) Posteriormente el gel se traspasó a otro recipiente idéntico al anterior conteniendo un volumen de 200 ml de agua destilada para lavar por 20 minutos.
d) Después del lavado se fotografió el gel.

4.4.5. Procesamiento de la imagen

La imagen fue analizada con el software Bionumerics 7.1 cuyo proceso se detalla en el **Manual Bionumerics 7.1**

5. RESULTADOS

La discriminación entre las distintas bandas presentes en un gel depende de la correcta aplicación de la técnica y la utilización de la endonucleasa apropiada. Las bandas obtenidas por restricción con la enzima *XbaI* en los dos experimentos representados en la figura 1, muestran los perfiles de restricción para las diferentes cepas analizadas. En particular la cepa MT-0461-1 (carril 6 gel A) presentó una degradación del DNA, por lo que esta muestra no fue incluida en el análisis posterior. El gel B presenta en dos casos repetición de la misma cepa (4 - 5) y (7 - 8) que se interpretaron como una ratificación de la correcta aplicación de la técnica.

Tanto la cepa número 6 del primer gel, como una de cada repetición del segundo no fueron consideradas en el posterior análisis computacional.

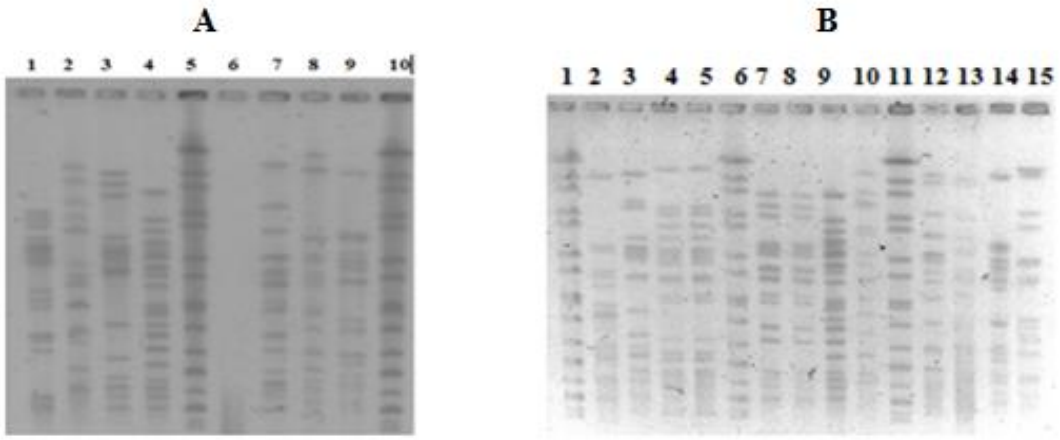
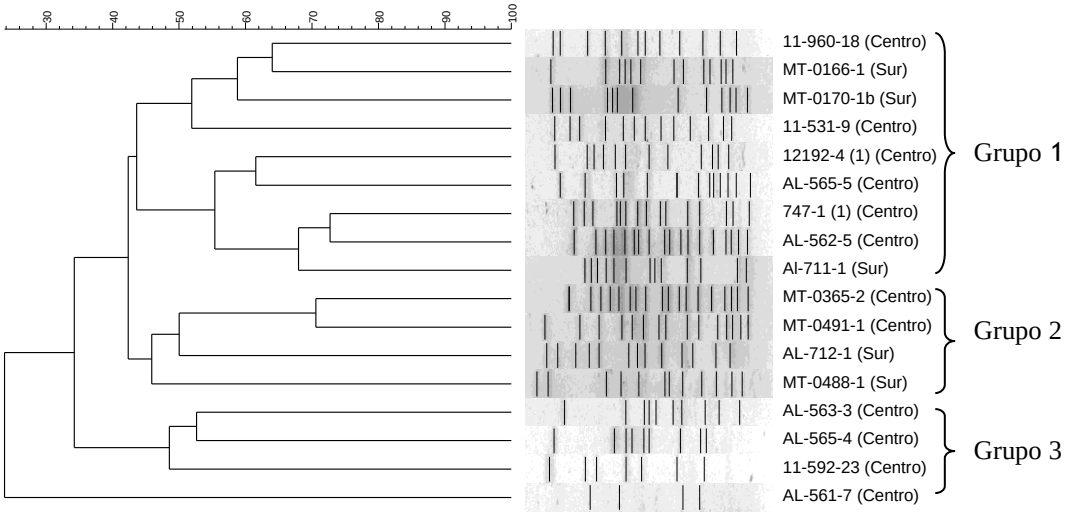


Figura 1. Electroforesis en campo pulsado de aislados de E. coli con la enzima de restricción *Xba*I. **Gel A:** Al-711-1 (Carril 1), Al-712-1 (Carril 2), MT-0170-1b (Carril 3), MT-0365-2 (Carril 4), estándar Salmonella ser. Braenderup (Carril 5), MT-0461-1 (Carril 6), MT-0491-1 (Carril 7), MT-0488-1 (Carril 8), MT-0166-1 (Carril 9) y estándar Salmonella ser. Braenderup (Carril 11). **Gel B:** Estándar S. ser Braenderup (carril 1), AL-563-3 (Carril 2), AL-565-5 (Carril 3), 12192-4 (1) (Carril 4), 12192-4 (2) (Carril 5), estándar Salmonella ser. Braenderup (Carril 6), 747-1 (1) (Carril 7). 747-1 (2) (Carril 8), Al-562-5 (Carril 9), 11-531-9 (Carril 10), estándar Salmonella ser. Braenderup (Carril 11), 11-960-18 (Carril 12), Al-561-7 (Carril 13), Al-565-4 (Carril 14) y 11-592-23 (Carril 15)

El tamaño estimado de cada banda se encuentra dentro del rango de pesos moleculares del estándar de Salmonella ser. Braenderup H9812, exhibiendo una resolución de PFGE de aproximadamente 15 fragmentos, lo que permitió una satisfactoria capacidad de discriminación entre 20.5 y 668.9.

Los perfiles PFGE fueron comparados entre sí usando el coeficiente de Dice 1% de tolerancia y fueron agrupadas usando UPGMA para obtener el agrupamiento de las cepas (Figura 2)

Figura 2.



El agrupamiento de los perfiles muestra una amplia dispersión llegando en el mejor de los casos una similitud menor al 80% descartando el origen común de las cepas entre las del centro entre sí como las del sur entre sí. No obstante, se observan 3 agrupamientos de los perfiles de restricción. En particular el grupo 3 reunió solo aislados de la zona central a diferencia de lo observado en los grupos 1 y 2 que reunieron cepas de ambas zonas geográficas.

6. DISCUSIÓN

Relacionar aislados a nivel de cepas tiene gran importancia para verificar si un conjunto de microorganismos está clonalmente relacionado. Sustentado en el principio de que el hallazgo de cepas clones implica un común origen genético, la tipificación molecular permite lucubrar sobre importantes aspectos epidemiológicos.

Los patrones de restricción obtenidos en el presente estudio ratifican la conocida sensiblidad y capacidad discriminatoria de PFGE que lo han covertido en una potente herramienta para indagar en la clonalidad de diversos aislados. Las resolución observada entre las distintas bandas permite visualmente relacionar la escasa similitud entre los aislados. Apoyado en esto, PFGE demostró potencia para diferenciar entre las cepas escogidas, donde ningún agrupamiento genotípico supero el 72,7 % de similitud.

Las observaciones permiten concluir la nula clonalidad entre las mismas y por consecuencia el diverso origen entre los aislados.

7. REFERENCIAS

1. **Badri. S, Fassouane. A, Filliol.I, Hassar. M, Cohen. N.** 2009. Clonal analysis of *Escherichia coli* strains isolated from food by pulsed-field gel electrophoresis**.**Internet Journal of Food Safety.**Vol.11**: 44-49.

2. **Burvenich. Ch, Van Merris.V, Mehrzad.J, Diez-Frailes.A, Duchateau. L.** 2003. Review article. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors.34:521.

3. **Ejrnaes, K, Sandvang, D, Lundgren, B, Ferry. S, Holm. S, Monsen. Tor, Lundholm. R, and Frimodt-Moller, Niels.** 2006. Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of *Escherichia coli* Strains from Samples Collected before and after Pivmecillinam or Placebo Treatment of Uncomplicated Community-Acquired Urinary Tract Infection in Women. Journal of Clinical Microbiology **44.5**.1776–1781.

4. **Hunter. S. B, Vauterin. P, Lambert-Fair. M. A, VanDuyne. M. S, Kubota. Kristy, Graves. L, Wrigley. D, Barrett. T, andRibot. E.** 2005. Establishment of a Universal Size Standard Strain for Use with the PulseNet Standardized Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols: Converting the National Databases to the New Size Standard. Journal of Clinical Microbiology **43.3.**1045–1050.

5. **Johnson. J. R., Urban. Carl, Weissman. S. J, Jorgensen. J. H, Lewis. J. S II, Hansen. Glen, Edelstein. P. H, Robicsek. A, Cleary.T, Adachi. J, Paterson. D, Quinn. J, Hanson. N. D, Johnston. B. D, Clabots. C, Kuskowski. M. A. and AMERECUS Investigators.** 2012. Molecular Epidemiological Analysis of *Escherichia coli* Sequence Type ST131 (O25:H4) and *bla*CTX-M-15 among Extended-Spectrum-Lactamase-Producing *E. coli* from the United States, 2000 to 2009. Antimicrob Agents Chemoter**56(5):**2364-70.

6. **R. A. Blackwood, C. K. Rode, C. L. Pierson and C. A. Bloch.** 1997 Pulsed-field gel electrophoresis genomic fingerprinting of hospital *Escherichia coli* bacteraemiaisolates.J. Med. Microbiol. **46**: 506-510.

ANEXOS

Anexo 1 Buffer TE.

Se obtiene mediante la solución de 2 componentes.
Tris 1M pH 8.0: actúa como buffer de pH.
Se obtiene diluyendo 12,11 grs. en un volumen total de 100 ml de agua dd.

EDTA0,5 M pH 8.0: actúa como quelante de cationes Mg**.**
Se obtiene diluyendo 93,05 grs. de EDTA hasta obtener 500 ml en agua dd, y regulando hasta pH 8.0 añadiendo paulatinamente perlas de NaOH hasta obtener la transparencia total de la solución (56 perlas)

Buffer TE: Se obtiene diluyendo 10 ml de Tris 1M, y 2 ml de EDTA 0,5M pH 8.0 hasta completar 1000 ml en agua dd.
Luego se rotula, esteriliza y se mantiene refrigerado asépticamente hasta su uso.

Anexo 2 Solución Stock de ProteinasaK (20 mg/ml)

Considerando que la solución de proteinasa K fue requerida para el moldeado de plugs y para la lisis de las células bacterianas se elaboró un volumen stock para ambas etapas.
Para obtener el volumen de proteinasa K (20 mg/ml) requerida para el moldeado (20 µl/ tubo) y para la mezcla de lisis (25 µl/ tubo) se preparó un total de 1000 µl, considerando 100 µl extras.

Volumen de Proteinasa K Stock	
Tris 1M	50 µl
Ca Cl_2 1M	100 µl
Proteinasa K	20 mg
Agua Libre de Nucleasas	940 µl
Volumen Total	1000 ml

Anexo 3 Buffer de lisis.

Se calculó un volumen proporcional considerando un volumen de la solución de 5 ml por cada uno de los 20 tubos.

Buffer de Lisis para 100 ml

Tris 1M	5 ml
EDTA 0,5M	10 ml
Sarcosyl 10%	10 ml
Agua dd	75 ml
Total	100

Anexo 4 Buffer de pre-restricción 1X

Se preparó una dilución 1:10 en agua dd considerando un volumen para 2 muestras más por precaución.

Buffer de pre-restricción diluido (1X)	
Buffer de restricción 10 X	200 µl
Agua dd	1800 µl
Volumen total	2000

Anexo 5 Mezcla de Restricción

Los mismos tubos de microcentrifuga usados en la pre-restricción se utilizaron para la restricción enzimática.

Mezcla de Restricción	
Buffer de restricción 10 X	200 µl
Albúmina Bovina Sérica (10 mg/ml)	20 µl
XbaI (10 U/ µl)*	50 µl
Agua dd	1730 µl
Volumen Total	2000 µl

*mantener en hielo cuando está en uso, y a -20ºC en almacenamiento.

Anexo 6 Buffer TBE 5X (Tris, Borato, EDTA)

Volumen stock de buffer TBE 5X	
Tris 1M pH 8.0	54 gr
Ácido Bórico	27,5 gr
Agua dd.	900 ml

Una vez diluido el Tris y el borato se adicionan 20 ml de EDTA 0,5M (pH 8.0) y con agua dd se lleva a 1000 ml.
En estas condiciones puede guardarse a temperatura ambiente hasta el momento de uso en 0,5X diluyendo 1:10 desde el stock.

Buffer TBE 0,5X

Se calculó un volumen de 2600 ml considerando la elaboración del gel (100 ml) y el buffer de electroforesis (2500 ml).

Volumen de TBE 0,5X	
Buffer TBE 5X stock	260 ml
Agua dd.	2340 ml
Volumen total	2600 ml

Resultados de electroforesis en campo pulsado (PFGE) tipificación molecular de aislados de *S. aureus*

Tipificación de aislados de *Staphylococcus aureus* de mastitis bovina mediante electroforesis en gel en campo pulsado (PFGE).

Mediante PFGE se han tipificado 53 cepas de *S. aureus* aisladas de MB provenientes de leche de planteles pertenecientes a la zona central y a la zona sur, con el fin de evaluar la clonalidad de estos aislados. Este trabajo forma parte de las Actividad 1.1 programada en la propuesta que quedó pendiente de concluir en esta etapa del proyecto. Para llevar a cabo estos ensayos se siguió la metodología recomendada Turabelidze et al 2000 (1) para *S. aureus*.

En las figuras 1 y 2 se presentan los resultados de la PFGE. La figura 1 muestra un gel de PFGE para 11 aislados de *S. aureus* provenientes de MB obtenidos de muestras de leche de la zona centro y sur del país. De acuerdo al análisis del gel, se puede observar que aislados de *S. aureus* de diferentes vacas provenientes de dos planteles de la zona sur (Purranque y Osorno), presentan una alta relación clonal entre los aislados de esta especie bacteriana (mayor de un 85% de identidad genética). Los aislados de la zona central (MT-0398 Y MT-0399) presentan una relación clonal cercana al 75% entre si y estos a la vez son genéticamente diferentes con respecto a los obtenidos de la zona sur.

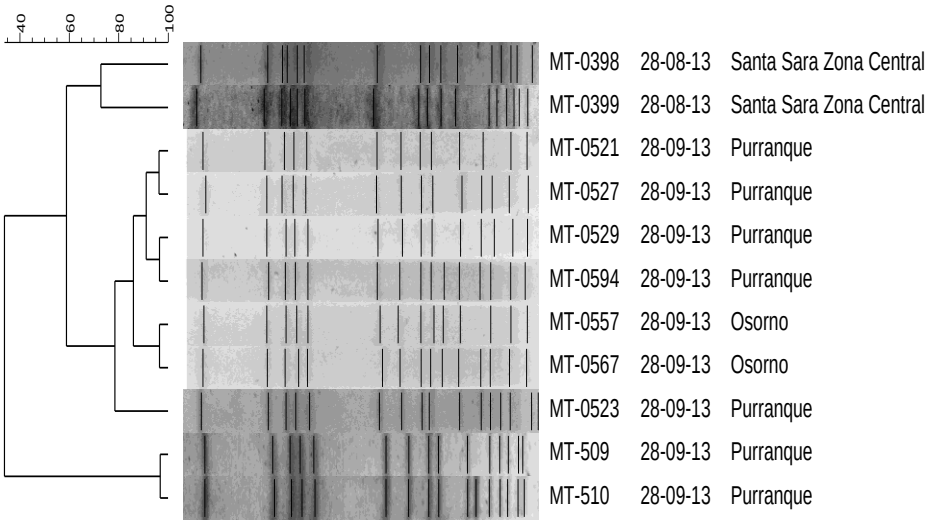


Figura 1. Dendograma de los perfiles de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) del DNA digerido con *SmaI* obtenido de los aislados de *S. aureus*. Las cepas MT-0398 y MT-0399 fueron aisladas en la zona centro y las restantes en la zona sur.

Como se puede observar en la figura 2, aislados de *S. aureus* de diferentes vacas pero provenientes de un mismo plantel presentan una alta relación clonal entre los aislados de esta especie bacteriana (MT-0455 y MT-0460) pertenecientes al plantel de Lago Ranco en la zona sur y (MT-288 Y MT-299) provenientes de otro plantel de la zona sur. Esto nos permite sugerir la existencia de una contaminación cruzada entre los animales, probablemente asociada a las malas prácticas ganaderas en estos planteles.

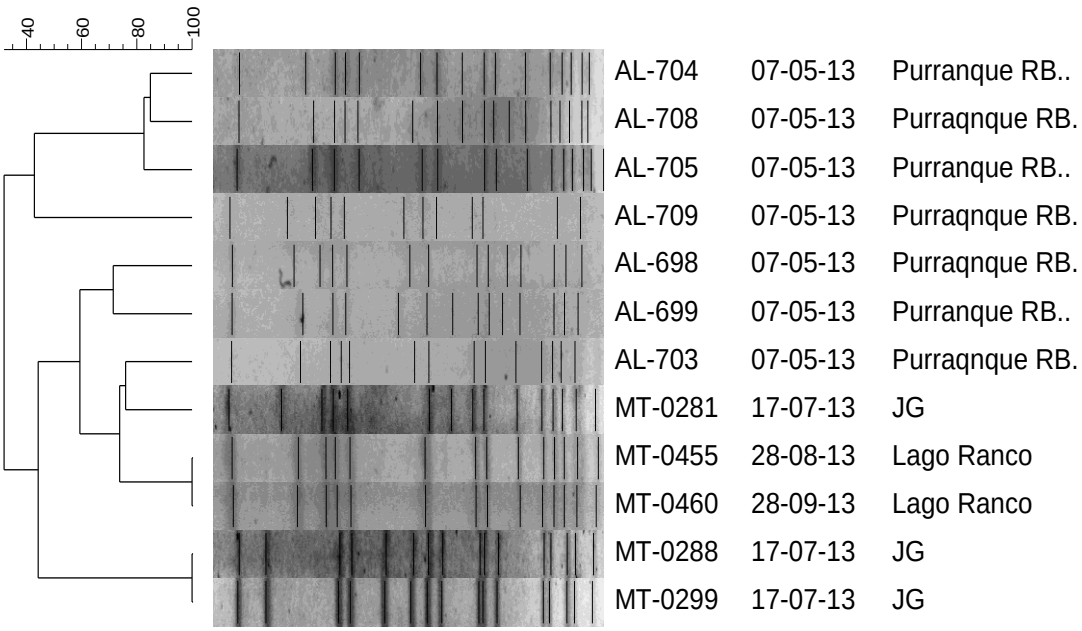


Figura 2. Dendograma de los perfiles de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) del DNA digerido con *SmaI* obtenido de los aislados de *S. aureus*, provenientes de la zona sur.

Referencias

1. Turabelidze. D, Kotetishvili. M, Kreger. M. JR. A, J. G, Sulakvelidze.A. 2000. Improved Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Typing Vancomycin-Resistant Enterococci. Journal of Clinical Microbiology. 38 (11): 4242–4245.

N° Muestras	Codigo cepa	Dignóstico	Zona del país	CWR-5 (%)
1	MT- 0163- 1	S.C.N	Zona Central	2,50%
2	MT- 0164- 1	Corynebacterium sp	Zona Central	2,50%
3	MT- 0165- 1	S.C.N	Zona Central	2,50%
4	MT- 0165- 2	CB (-)	Zona Central	2,50%
5	MT- 0165- 3	Corynebacterium sp	Zona Central	2,50%
6	MT- 0169- 1	S.C.N	Zona Central	2,50%
7	MT- 0170- 2	Corynebacterium sp	Zona Central	2,50%
8	MT- 0171- 1	B.N.F	Zona Central	2,50%
9	MT- 0171- 4	B.N.F	Zona Central	2,50%
10	MT- 0176- 1	S.C.N	Zona Central	2,50%
11	MT- 0180- 3	Micrococcus sp	Zona Central	0,50%
12	MT- 0183- 1	S. dysgalactiae	Zona Central	2,50%
13	MT- 0309- 1	Streptococcus sp	Zona Sur	5,00%
14	MT- 0314- 2F	Klebsiella ozaenae	Zona Sur	2,50%
15	MT- 0318- 1	Yersinia enterocolitica	Zona Sur	2,50%
16	MT- 0319- 1	Hafnia alvei	Zona Sur	5,00%
17	MT- 0320- 2	S.C.N	Zona Sur	2,50%
18	MT- 0321- 1	Yersinia enterocolitica	Zona Sur	2,50%
19	MT- 0322- 2	B(+) cat (+) y esc (+)	Zona Sur	2,50%
20	MT- 0323- 1	S.C.N	Zona Sur	5,00%
21	MT- 0323- 2	Corynebacterium sp	Zona Sur	2,50%
22	MT- 0324- 1	Corynebacterium sp	Zona Sur	2,50%
23	MT- 0325- 1	Corynebacterium sp	Zona Sur	2,50%
24	MT- 0325- 2	Corynebacterium sp	Zona Sur	2,50%
25	MT- 0326- 1	Serratia sp	Zona Sur	2,50%
26	MT- 0327- 2	S. uberis	Zona Sur	2,50%
27	MT- 0328- 1	Pantoea sp	Zona Sur	2,50%
28	MT- 0329- 2	B(+) cat (-) esc (+)	Zona Sur	1,00%
29	MT- 0330- 1	Yersinia sp	Zona Sur	2,50%
30	MT- 0331- 3	B(+) cat (-) y esc (+)	Zona Sur	1,00%
31	MT- 0332- 2	S. uberis	Zona Sur	1,00%
32	MT- 0333- 2	S. dysgalactiae	Zona Sur	2,50%
33	MT- 0333- 1	Hafnia alvei	Zona Sur	1,00%
34	MT- 0334- 1	Corynebacterium sp	Zona Sur	5,00%
35	MT- 0334- 2	B(+) cat (-) y esc (+)	Zona Sur	5,00%
36	MT- 0335- 3	S.C.N	Zona Sur	1,00%
37	MT- 0336- 3	Hafnia alvei	Zona Sur	2,50%
38	MT- 0336- 1	B(+) cat (-) y esc (+)	Zona Sur	1,00%
39	MT- 0338- 1	S. uberis	Zona Sur	2,50%
40	MT- 0339- 3	Enterobacter amnigenus	Zona Sur	2,50%
41	MT- 0340- 1	B(+) cat (-) y esc (+)	Zona Sur	1,00%
42	MT- 0341- 4	Rhanella aquatilis	Zona Sur	7,50%
43	MT- 0341- 1	Enterobacter aerogenes	Zona Sur	5,00%
44	MT- 0341- 3	Aeromona sp	Zona Sur	2,50%
45	MT- 0342- 1	S. uberis	Zona Sur	2,50%
46	MT- 0342- 2	Yersinia enterocolitica	Zona Sur	2,50%
47	MT- 0343- 3	Candida kefyr	Zona Sur	7,50%
48	MT- 0343- 2	Yersinia enterocolitica	Zona Sur	2,50%

49	MT- 0344- 1	B(+) cat (-) y esc (+)	Zona Sur	1,00%
50	MT- 0344- 2	B(+) cat (-) y esc (+)	Zona Sur	1,00%
51	MT- 0345- 1	B(+) cat (-) y esc (+)	Zona Sur	2,50%
52	MT- 0346- 1	B(+) cat (-) y esc (+)	Zona Sur	1,00%
53	MT- 0346- 2	B(+) cat (-) y esc (+)	Zona Sur	5,00%
54	MT- 0350- 1	S.C.N	Zona Sur	1,00%
55	MT- 0350- 2	S. uberis	Zona Sur	2,50%
56	MT- 0353- 2	Klebsiella Ozaenae	Zona Sur	5,00%
57	MT- 0354- 2	S.C.N	Zona Sur	5,00%
58	MT- 0354- 1	S. aureus	Zona Sur	5,00%
59	MT- 0355- 1	S.C.N	Zona Sur	5,00%
60	MT- 0356- 1	S.C.N	Zona Sur	2,50%
61	MT- 0356- 2	S. aureus	Zona Sur	2,50%
62	MT- 0357- 1	S. uberis	Zona Sur	2,50%
63	MT- 0358- 1	S.C.N	Zona Sur	2,50%
64	MT- 0359- 1	S. aureus	Zona Sur	2,50%
65	MT- 0360- 1	S. uberis	Zona Sur	2,50%
66	MT- 0361- 1	S. uberis	Zona Sur	2,50%
67	MT- 0362- 1	S.C.N	Zona Sur	2,50%
68	MT- 0363- 1	S. aureus	Zona Sur	2,50%
69	MT- 0365- 2	E. coli	Zona Sur	2,50%
70	MT- 0365-1	S. dysgalactiae	Zona Sur	1,00%
71	MT- 0366- 1	S.C.N	Zona Sur	2,50%
72	MT- 0366- 2	S. uberis	Zona Sur	2,50%
73	MT- 0367- 1	S. aureus	Zona Sur	5,00%
74	MT- 0368- 1	S. uberis	Zona Sur	2,50%
75	MT- 0369- 1	Corynebacterium sp	Zona Sur	5,00%
76	MT- 0369- 2	S. uberis	Zona Sur	2,50%
77	MT- 0370- 1	S.C.N	Zona Sur	5,00%
78	MT- 0371- 1	S. uberis	Zona Sur	2,50%
79	MT- 0371- 2	S. aureus	Zona Sur	5,00%
80	MT- 0372- 1	Micrococcus sp	Zona Sur	2,50%
81	MT- 0373- 1	S.C.N	Zona Sur	5,00%
82	MT- 0375- 1	Corynebacterium sp	Zona Central	10,00%
83	MT- 0377- 1	Corynebacterium sp	Zona Central	10,00%
84	MT- 0378- 1	S. aureus	Zona Central	5,00%
85	MT- 0380- 2	Corynebacterium sp	Zona Central	2,50%
86	MT- 0380- 1	Streptococcus sp	Zona Central	2,50%
87	MT- 0381- 1	Enterobacter cloacae	Zona Central	5,00%
88	MT- 0381- 3	Klebsiella Pneumoniae	Zona Central	10,00%
89	MT- 0383- 2	Corynebacterium sp	Zona Central	2,50%
90	MT- 0383- 1	Klebsiella Pneumoniae	Zona Central	10,00%
91	MT- 0384- 1	Corynebacterium sp	Zona Central	5,00%
92	MT- 0384- 2	Corynebacterium sp	Zona Central	5,00%
93	MT- 0385- 2	Klebsiella Pneumoniae	Zona Central	10,00%
94	MT- 0386- 1	S. uberis	Zona Central	2,50%
95	MT- 0386- 3	Enterobacter cloacae	Zona Central	10,00%
96	MT- 0386- 2	Klebsiella Pneumoniae	Zona Central	10,00%
97	MT- 0387- 1	Micrococcus sp	Zona Central	2,50%
98	MT- 0388- 3	Corynebacterium sp	Zona Central	2,50%

99	MT- 0388- 2	Corynebacterium sp	Zona Central	2,50%
100	MT- 0388- 1	Micrococcus sp	Zona Central	5,00%
101	MT- 0389- 1	S.C.N	Zona Central	5,00%
102	MT- 0390- 3	Klebsiella Pneumoniae	Zona Central	10,00%
103	MT- 0390- 2	Serratia marcescens	Zona Central	10,00%
104	MT- 0390- 1	Corynebacterium sp	Zona Central	5,00%
105	MT- 0391- 2	Corynebacterium sp	Zona Central	5,00%
106	MT- 0391- 3	Klebsiella Pneumoniae	Zona Central	10,00%
107	MT- 0392- 2	Corynebacterium sp	Zona Central	5,00%
108	MT- 0392- 1	Klebsiella Pneumoniae	Zona Central	2,50%
109	MT- 0394- 1	Micrococcus sp	Zona Central	2,50%
110	MT- 0395- 1	S.C.N	Zona Central	5,00%
111	MT- 0395- 4	Klebsiella oxytoca	Zona Central	10,00%
112	MT- 0395- 2	Klebsiella oxytoca	Zona Central	10,00%
113	MT- 0395- 3	Klebsiella oxytoca	Zona Central	10,00%
114	MT- 0396- 1	S.C.N	Zona Central	2,50%
115	MT- 0397- 2	Enterobacter aglomerans	Zona Central	10,00%
116	MT- 0397- 1	Klebsiella oxytoca	Zona Central	10,00%
117	MT- 0398- 2	S. aureus	Zona Central	5,00%
118	MT- 0398- 1	S.C.N	Zona Central	10,00%
119	MT- 0398- 3	Klebsiella oxytoca	Zona Central	10,00%
120	MT- 0399- 2	S. aureus	Zona Central	5,00%
121	MT- 0400- 1	Klebsiella oxytoca	Zona Central	10,00%
122	MT- 0401- 2	Klebsiella oxytoca	Zona Central	10,00%
123	MT- 0402- 3	S. uberis	Zona Central	5,00%
124	MT- 0402- 2	S.C.N	Zona Central	2,50%
125	MT- 0403-1	Streptococcus sp	Zona Central	2,50%
126	MT- 0403- 2	Klebsiella oxytoca	Zona Central	10,00%
127	MT- 0404- 2	S. uberis	Zona Central	5,00%
128	MT- 0404- 3	S.C.N	Zona Central	2,50%
129	MT- 0404- 5	S.C.N	Zona Central	2,50%
130	MT- 0404- 1	Micrococcus sedentarios	Zona Central	2,50%
131	MT- 0406- 1	E. coli	Zona Central	2,50%
132	MT- 0406- 2	S. dysgalactiae	Zona Central	2,50%
133	MT- 0407- 1	Corynebacterium sp	Zona Central	0,50%
134	MT- 0408- 1	S. uberis	Zona Central	1,00%
135	MT- 0409- 2	Corynebacterium sp	Zona Central	1,00%
136	MT- 0410- 2	S.C.N	Zona Central	1,00%
137	MT- 0410- 3	E. coli	Zona Central	0,75%
138	MT- 0411- 1	Corynebacterium sp	Zona Central	0,50%
139	MT- 0411- 2	Corynebacterium sp	Zona Central	0,75%
140	MT- 0411- 3	S. agalactiae	Zona Central	2,50%
141	MT- 0412- 1	S.C.N	Zona Central	0,75%
142	MT- 0412- 2	Candida kruseii	Zona Central	5,00%
143	MT- 0412- 3	Corynebacterium sp	Zona Central	0,50%
144	MT- 0412- 4	Candida kruseii	Zona Central	5,00%
145	MT- 0413- 1	S.C.N	Zona Central	1,00%
146	MT- 0413- 2	Corynebacterium sp	Zona Central	0,50%
147	MT- 0413- 3	Corynebacterium sp	Zona Central	0,50%
148	MT- 0414- 2	Corynebacterium sp	Zona Central	1,00%

149	MT- 0415- 2	Enterococcus faecium	Zona Central	2,50%
150	MT- 0416- 1	Micrococcus sp	Zona Central	0,75%
151	MT- 0416- 2	S.C.N	Zona Central	1,00%
152	MT- 0416- 3	S. uberis	Zona Central	0,50%
153	MT- 0416- 4	S.C.N	Zona Central	0,50%
154	MT- 0416- 5	S.C.N	Zona Central	2,50%
155	MT- 0416- 6	Streptococcus sp	Zona Central	0,50%
156	MT- 0417- 1	Corynebacterium sp	Zona Central	0,75%
157	MT- 0417- 2	S.C.N	Zona Central	0,75%
158	MT- 0418- 1	Micrococcus sp	Zona Central	1,00%
159	MT- 0418- 2	Corynebacterium sp	Zona Central	2,50%
160	MT- 0419- 1	Corynebacterium sp	Zona Central	2,50%
161	MT- 0419- 3	Micrococcus sp	Zona Central	0,75%
162	MT- 0420- 2	Corynebacterium sp	Zona Central	0,50%
163	MT- 0420- 3	S.C.N	Zona Central	0,75%
164	MT-0421- 1	Corynebacterium sp	Zona Central	0,75%
165	MT-0421- 2	Corynebacterium sp	Zona Central	1,00%
166	MT-0421- 3	S.C.N	Zona Central	2,50%
167	MT- 0422- 1	Corynebacterium sp	Zona Central	1,00%
168	MT- 0422- 2	Corynebacterium sp	Zona Central	0,50%
169	MT- 0423- 1	S.C.N	Zona Central	2,50%
170	MT- 0423- 2	S. uberis	Zona Central	2,50%
171	MT- 0424 - 1	S.C.N	Zona Central	2,50%
172	MT- 0424 - 2	S. uberis	Zona Central	2,50%
173	MT- 0425- 1	S.C.N	Zona Central	5,00%
174	MT- 0426- 1	S. uberis	Zona Central	1,00%
175	MT- 0426- 3	Corynebacterium sp	Zona Central	0,75%
176	MT- 0426- 4	Serratia rubidaea	Zona Central	5,00%
177	MT- 0427- 1	Corynebacterium sp	Zona Central	0,75%
178	MT- 0427- 2	Corynebacterium sp	Zona Central	0,75%
179	MT- 0427- 3	Corynebacterium sp	Zona Central	0,75%
180	MT- 0428- 1	S. uberis	Zona Central	2,50%
181	MT- 0428- 2	Micrococcus sp	Zona Central	0,50%
182	MT- 0430- 1	S. uberis	Zona Sur	2,50%
183	MT- 0431- 2	S.C.N	Zona Sur	2,50%
184	MT- 0431- 3	S.C.N	Zona Sur	2,50%
185	MT- 0434- 2	S.C.N	Zona Sur	1,00%
186	MT- 0435- 1	Corynebacterium sp	Zona Sur	0,50%
187	MT- 0436- 1	S.C.N	Zona Sur	2,50%
188	MT- 0436- 3	S. uberis	Zona Sur	2,50%
189	MT- 0441- 1	S. aureus	Zona Sur	2,50%
190	MT- 0443- 1	Corynebacterium sp	Zona Sur	2,50%
191	MT- 0443- 2	S.C.N	Zona Sur	2,50%
192	MT- 0446- 1	Corynebacterium sp	Zona Sur	0,50%
193	MT- 0448- 1	Corynebacterium renale	Zona Sur	0,75%
194	MT- 0451- 1	Corynebacterium sp	Zona Sur	2,50%
195	MT- 0452- 2	Corynebacterium sp	Zona Sur	2,50%
196	MT- 0455- 1	S. aureus	Zona Sur	2,50%
197	MT- 0455- 2	S. uberis	Zona Sur	1,00%
198	MT- 0457- 3	Corynebacterium pseudodiphteriticum	Zona Sur	2,50%

199	MT- 0458- 2	Corynebacterium renale	Zona Sur	2,50%
200	MT- 0459- 4	S. aureus	Zona Sur	2,50%
201	MT- 0460- 1	S. aureus	Zona Sur	2,50%
202	MT- 0461- 2	Micrococcus sp	Zona Sur	0,75%
203	MT- 0463- 1	E. coli	Zona Sur	1,00%
204	MT- 0464- 1	Candida sp	Zona Sur	2,50%
205	MT- 0466- 2	S. uberis	Zona Sur	2,50%
206	MT- 0466- 1	Corynebacterium sp	Zona Sur	2,50%
207	MT- 0467- 1	S.C.N	Zona Sur	2,50%
208	MT- 0468- 1	S.C.N	Zona Sur	2,50%
209	MT- 0471- 1	Corynebacterium sp	Zona Sur	2,50%
210	MT- 0472- 1	S. uberis	Zona Sur	2,50%
211	MT- 0475- 1	Corynebacterium sp	Zona Sur	2,50%
212	MT- 0476- 1	Corynebacterium sp	Zona Sur	2,50%
213	MT- 0480-1	S. aureus	Zona Sur	2,50%
214	MT- 0480-2	S. aureus	Zona Sur	1,00%
215	MT- 0481- 1	S. uberis	Zona Sur	1,00%
216	MT- 0483- 1	S. aureus	Zona Sur	1,00%
217	MT- 0484- 1	S.C.N	Zona Sur	2,50%
218	MT- 0486- 1	S. uberis	Zona Sur	2,50%
219	MT- 0488- 1	E. coli	Zona Sur	2,50%
220	MT- 0489- 1	S. uberis	Zona Sur	2,50%
221	MT- 0491- 1	E. coli	Zona Sur	2,50%
222	MT- 0493- 1	S. uberis	Zona Sur	1,00%
223	MT- 0494- 1	S. uberis	Zona Sur	1,00%
224	MT- 0494- 2	S.C.N	Zona Sur	2,50%
225	MT- 0496- 1	S. uberis	Zona Sur	1,00%
226	MT- 0500- 1	S. aureus	Zona Sur	1,00%
227	MT- 0503- 1	S. uberis	Zona Sur	2,50%
228	MT- 0505- 1	S. uberis	Zona Sur	0,75%
229	MT- 0505- 2	S.C.N	Zona Sur	2,50%
230	MT- 0505- 3	S.C.N	Zona Sur	2,50%
231	MT- 0505- 4	S. uberis	Zona Sur	2,50%
232	MT- 0506- 1	S. aureus	Zona Sur	5,00%
233	MT- 0506- 2	S. aureus	Zona Sur	5,00%
234	MT- 0507- 1	S.C.N	Zona Sur	2,50%
235	MT- 0507- 2	S.C.N	Zona Sur	2,50%
236	MT- 0508- 1	S.C.N	Zona Sur	2,50%
237	MT- 0508- 2	S.C.N	Zona Sur	2,50%
238	MT- 0509- 1	S. aureus	Zona Sur	5,00%
239	MT- 0510- 1	S.C.N	Zona Sur	2,50%
240	MT- 0510- 2	S. aureus	Zona Sur	2,50%
241	MT- 0510- 3	S.C.N	Zona Sur	2,50%
242	MT- 0511- 1	Turicella otitidis	Zona Sur	5,00%
243	MT- 0512- 1	S. aureus	Zona Sur	2,50%
244	MT- 0512- 2	S. aureus	Zona Sur	2,50%
245	MT- 0513- 1	S. aureus	Zona Sur	2,50%
246	MT- 0513- 2	S. capitis	Zona Sur	0,75%
247	MT- 0514- 1	S.C.N	Zona Sur	2,50%
248	MT- 0515- 1	Corynebacterium genitalium	Zona Sur	5,00%

249	MT- 0516- 1	S. aureus	Zona Sur	2,50%
250	MT- 0517- 1	S.C.N	Zona Sur	2,50%
251	MT- 0517- 2	S.C.N	Zona Sur	2,50%
252	MT- 0519- 1	S. capitis	Zona Sur	1,00%
253	MT- 0521- 1	S. aureus	Zona Sur	2,50%
254	MT- 0521- 2	S. aureus	Zona Sur	5,00%
255	MT- 0522- 1	S.C.N	Zona Sur	2,50%
256	MT- 0523- 1	S. aureus	Zona Sur	5,00%
257	MT- 0524- 1	S.C.N	Zona Sur	0,50%
258	MT- 0524- 2	S. agalactiae	Zona Sur	0,50%
259	MT- 0524- 3	S. aureus	Zona Sur	5,00%
260	MT- 0525- 1	S.C.N	Zona Sur	2,50%
261	MT- 0525- 2	S.C.N	Zona Sur	1,00%
262	MT- 0526- 1	Corynebacterium genitalium	Zona Sur	0,75%
263	MT- 0527- 1	S.C.N	Zona Sur	0,75%
264	MT- 0527- 2	S. aureus	Zona Sur	5,00%
265	MT- 0528- 1	S. aureus	Zona Sur	5,00%
266	MT- 0528- 2	S.C.N	Zona Sur	1,00%
267	MT- 0528- 3	S. aureus	Zona Sur	2,50%
268	MT- 0529- 1	S. aureus	Zona Sur	5,00%
269	MT- 0529- 2	Streptococcus sp	Zona Sur	0,75%
270	MT- 0530- 2	S. aureus	Zona Sur	5,00%
271	MT- 0530- 3	S.C.N	Zona Sur	0,50%
272	MT-0531- 1	S. aureus	Zona Sur	5,00%
273	MT- 0533- 1	S.C.N	Zona Sur	0,75%
274	MT- 0535- 1	S.C.N	Zona Sur	0,75%
275	MT- 0535- 2	S. uberis	Zona Sur	2,50%
276	MT- 0535- 3	S.C.N	Zona Sur	0,75%
277	MT- 0536- 1	S. aureus	Zona Sur	5,00%
278	MT- 0536- 2	S.C.N	Zona Sur	1,00%
279	MT- 0537- 1	S. aureus	Zona Sur	5,00%
280	MT- 0537- 2	S.C.N	Zona Sur	0,75%
281	MT- 0538- 1	S.C.N	Zona Sur	0,75%
282	MT- 0539- 1	Micrococcus sp	Zona Sur	0,50%
283	MT- 0539- 2	S.C.N	Zona Sur	2,50%
284	MT- 0540- 1	S. aureus	Zona Sur	5,00%
285	MT- 0541- 1	S. aureus	Zona Sur	5,00%
286	MT- 0541- 2	Streptococcus sp	Zona Sur	2,50%
287	MT- 0543- 1	S. aureus	Zona Sur	5,00%
288	MT- 0544- 1	S. aureus	Zona Sur	5,00%
289	MT- 0545- 2	S. aureus	Zona Sur	2,50%
290	MT- 0545- 3	Streptococcus sp	Zona Sur	2,50%
291	MT- 0546- 1	Streptococcus sp	Zona Sur	2,50%
292	MT- 0546- 2	S. aureus	Zona Sur	5,00%
293	MT- 0547- 1	S. aureus	Zona Sur	2,50%
294	MT- 0547- 2	Micrococcus sp	Zona Sur	0,75%
295	MT- 0548- 2	S. aureus	Zona Sur	2,50%
296	MT- 0550- 1	Streptococcus sp	Zona Sur	1,00%
297	MT- 0550- 2	S. aureus	Zona Sur	2,50%
298	MT- 0551- 1	S. aureus	Zona Sur	2,50%

299	MT- 0552- 1	S.C.N	Zona Sur	1,00%
300	MT- 0553- 1	S.C.N	Zona Sur	0,75%
301	MT- 0554- 1	S. aureus	Zona Sur	2,50%
302	MT- 0555- 1	S. aureus	Zona Sur	2,50%
303	MT- 0555- 2	S. dysgalactiae	Zona Sur	0,50%
304	MT- 0556- 1	S. aureus	Zona Sur	2,50%
305	MT- 0557- 1	S. aureus	Zona Sur	2,50%
306	MT- 0558- 1	S. aureus	Zona Sur	2,50%
307	MT- 0559- 1	Micrococcus sp	Zona Sur	1,00%
308	MT- 0559- 3	S.C.N	Zona Sur	1,00%
309	MT- 0560- 1	S. uberis	Zona Sur	1,00%
310	MT- 0560- 2	S.C.N	Zona Sur	1,00%
311	MT- 0560- 3	S.C.N	Zona Sur	0,75%
312	MT- 0561- 1	S. uberis	Zona Sur	1,00%
313	MT- 0562- 1	S. uberis	Zona Sur	2,50%
314	MT- 0563- 1	S.C.N	Zona Sur	0,50%
315	MT- 0566- 1	S. aureus	Zona Sur	2,50%
316	MT- 0567- 1	S. aureus	Zona Sur	2,50%
317	MT- 0567- 2	S.C.N	Zona Sur	0,50%
318	MT- 0568- 1	S.C.N	Zona Sur	1,00%
319	MT- 0569- 1	Micrococcus sp	Zona Sur	0,50%
320	MT- 0571- 1	S. aureus	Zona Sur	2,50%
321	MT- 0572- 1	S. aureus	Zona Sur	2,50%
322	MT- 0575- 1	S. aureus	Zona Sur	5,00%
323	MT- 0575- 2	S.C.N	Zona Sur	2,50%
324	MT- 0576- 2	Micrococcus sp	Zona Sur	2,50%
325	MT- 0577- 1	S. aureus	Zona Sur	5,00%
326	MT- 0578- 1	Micrococcus sp	Zona Sur	2,50%
327	MT- 0580- 1	S.C.N	Zona Sur	2,50%
328	MT- 0581- 2	S.C.N	Zona Sur	2,50%
329	MT- 0584- 1	S. aureus	Zona Sur	5,00%
330	MT- 0585- 1	S.C.N	Zona Sur	2,50%
331	MT- 0586- 1	S. uberis	Zona Sur	2,50%
332	MT- 0587- 1	S.C.N	Zona Sur	5,00%
333	MT- 0588- 1	S.C.N	Zona Sur	2,50%
334	MT- 0589- 1	S.C.N	Zona Sur	2,50%
335	MT- 0590- 2	S. aureus	Zona Sur	5,00%
336	MT- 0591- 1	S. aureus	Zona Sur	5,00%
337	MT- 0595- 1	S. aureus	Zona Sur	5,00%
338	MT- 0600- 2	Micrococcus sp	Zona Sur	2,50%
339	MT- 0600- 4	S.C.N	Zona Sur	2,50%

CMI- CWR-5: es la menor concentración del producto que inhibe el crecimiento bacteria
CMI. Concentración
mínima inhibitoria

Tabla Resumen de CMI CWR-5 por especie bacteriana.

Microorganismos	CMI - CWR-5						
	0,50%	0,75%	1,00%	2,50%	5,00%	7,50%	10,00%
E. coli	--	1	1	4	--	--	--
Klebsiella sp	--	--	--	2	1	--	14
Micrococcus sp	4	4	2	7	1	--	--
S.C.N	5	11	13	46	9	--	1
S. uberis	1	1	10	26	2	--	--
Corynebacterium sp	9	9	4	22	8	--	2
S. aureus	--	--	3	29	30	--	--
Streptococcus sp	1	1	1	5	1	--	--
S. dysgalactiae	1	--	1	3	--	--	--
S. agalactiae	1	--	--	1	--	--	--
Otras	--	1	9	17	9	2	3
Total	**22**	**28**	**44**	**162**	**61**	**2**	**20**
	6,49	8,26	12,98	47,79	17,99	0,59	5,90

La tabla indica el número de cepas con los diferentes valores de CMI por especi
En gris oscuro se indican los valores de CMI mas altos (sobre 10,0 %)
Un 5,8 % de las cepas muestra ina CMI mayor o igual a 10 % del producto.
En especial se observa que las cepas de Klebsiella fueron inhibidas a mas altas concentra
De manera interesante este producto no presentó cepas con mayores niveles de CMI.
Basándonos en estos resultados se definió a CWR-5 como producto de mayor eficacia y

ano.

> 10%
--
--
--
--
--
--
--
--
--
--
--
0

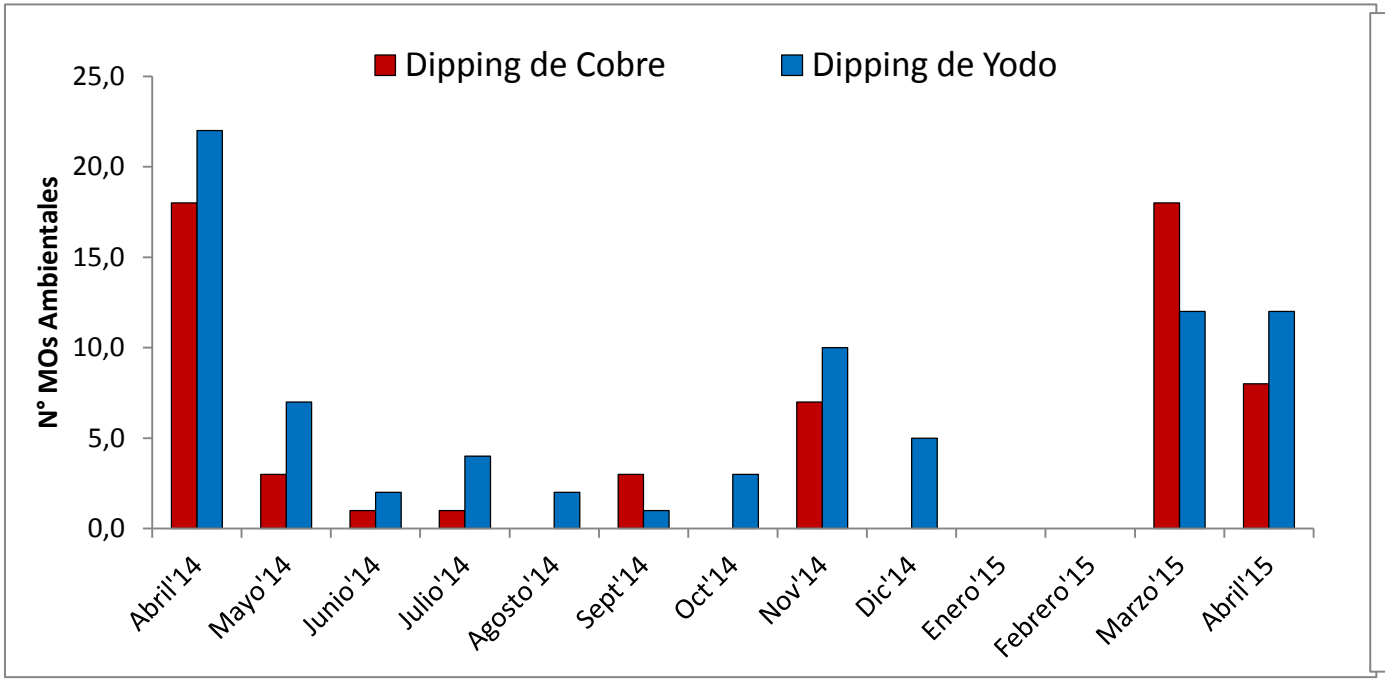
e bacteriana

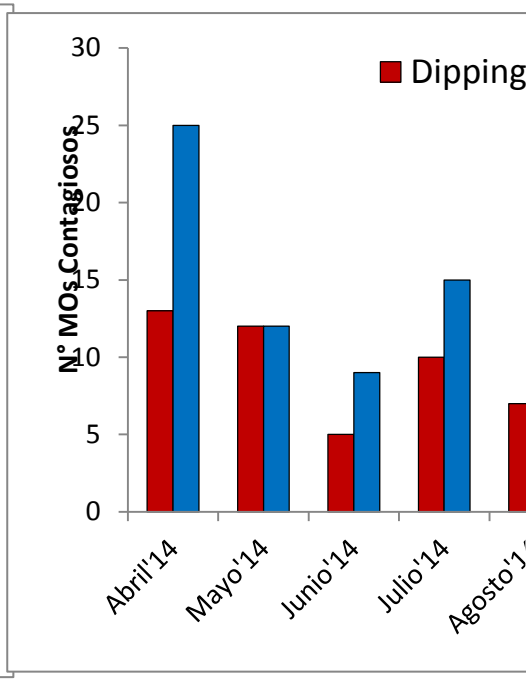
aciones del producto.

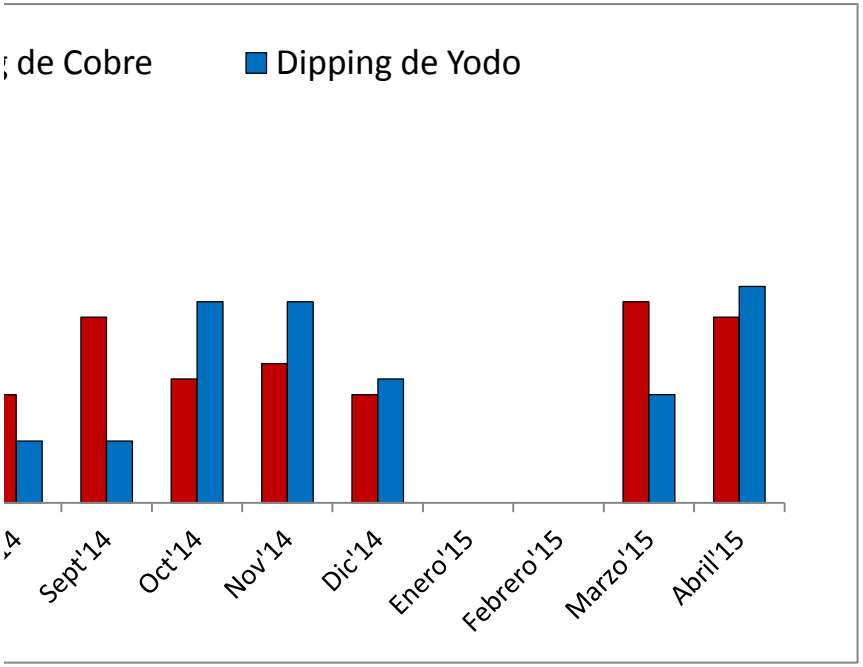
se seleccionó para los estudios in vivo.

		B.N.F	Candida sp.	Citrobacter sp.	Enterobacter sp	E. coli	Klebsiella sp.	Micrococcus sp.	S. dysgalactiae	S. uberis	Streptococcus s	S. agalactiae	S. aureus	S.C.N	Corynebacteriur	N MO amb	N MO inf	% amb	% inf
COBRE	Abril'14				1	2	1		4				4	1	7	18	13	58,1	41,9
	Mayo'14						6						4	1	4	3	12	20,0	80,0
	Junio'14							1					1	1	3	1	5	16,7	83,3
	Julio'14										1		6	2	2	1	10	9,1	90,9
	Agosto'14												3	2	2	0	7	0,0	100,0
	Sept'14					2		1					6	5	1	3	12	20,0	80,0
	Oct'14												6	1	1	0	8	0,0	100,0
	Nov'14		3			4							6	2	1	7	9	43,8	56,3
	Dic'14												5		2	0	7	0,0	100,0
	Enero'15															0	0		
	Febrero'15															0	0		
	Marzo'15	4		1	6	3	4						7	2	4	18	13	58,1	41,9
	Abril'15	5			1	1	1						7	2	3	8	12	40,0	60,0
YODO	Abril'14				1					21			6	5	14	22	25	46,8	53,2
	Mayo'14					1	5			1			4	3	5	7	12	36,8	63,2
	Junio'14								1	1			6		3	2	9	18,2	81,8
	Julio'14								1	2	1		6	5	4	4	15	21,1	78,9
	Agosto'14							1		1			1		3	2	4	33,3	66,7
	Sept'14										1		2	1	1	1	4	20,0	80,0
	Oct'14		1		1	1							9	4		3	13	18,8	81,3
	Nov'14		1			8				1			8	4	1	10	13	43,5	56,5
	Dic'14	1				2	2						5		3	5	8	38,5	61,5
	Enero'15															0	0		
	Febrero'15															0	0		
	Marzo'15	1			2	5	4						4	1	2	12	7	63,2	36,8
	Abril'15	4			2	2	2			2			9	2	3	12	14	46,2	53,8

	N ambientales		N contagiosos	
	Dipping de Co	Dipping de Yodo	Dipping de Co	Dipping de Yodo
Abril'14	18,0	22	13	25
Mayo'14	3,0	7	12	12
Junio'14	1,0	2	5	9
Julio'14	1,0	4	10	15
Agosto'14	0,0	2	7	4
Sept'14	3,0	1	12	4
Oct'14	0,0	3	8	13
Nov'14	7,0	10	9	13
Dic'14	0,0	5	7	8
Enero'15	0,0	0	0	0
Febrero'15	0,0	0	0	0
Marzo'15	18,0	12	13	7
Abril'15	8,0	12	12	14


Dipping de Cobre
Dipping de Yodo
N° MOs Ambientales
25,0
20,0
15,0
10,0
5,0
0,0
Abril'14
Mayo'14
Junio'14
Julio'14
Agosto'14
Sept'14
Oct'14
Nov'14
Dic'14
Enero'15
Febrero'15
Marzo'15
Abril'15


Dipping
N° MOs Contagiosos
30
25
20
15
10
5
0
Abril'14
Mayo'14
Junio'14
Julio'14


de Cobre
Dipping de Yodo
Sept'14
Oct'14
Nov'14
Dic'14
Enero'15
Febrero'15
Marzo'15
Abril'15

Anexo 8

Actividades de Difusión

1.- Programa de la II Jornada de Innovación en Producción Animal. 29 de Agosto de 2014. Los Ángeles. VIII región

Programa

El Programa para la II JIPA, sujeto a modificaciones, es el siguiente:

Hora	1º Bloque
8:30 - 9:00	Acreditaciones e Instalación de Stand
9:00 - 9:10	Bienvenida
9:10 - 9:30	"Herramientas de Información y Líneas de Financiamiento del Sector Público a la innovación" - FIA
9:30 - 10:10	El desafío de Innovar. *Dr. Claus Köbrich*
10:10 - 10:50	Producción de Pérdices. *Dr. Alberto Matthei*
10:50 - 11:10	Descanso
11:10 - 11:50	Uso del Cobre en Prevención de Mastitis. *Sr. Guillermo Figueroa*
11:50 - 12:30	Innovación en Vacunas. *Dr. Leonardo Sáenz*
12:30 -14:00	Acuiponía. *Dr. Germán Merino*
14:00 - 15:00	Almuerzo

Hora	2º Bloque
15:00 - 15:40	Unidad de Faena Móvil.Producción de carne natural de aves y cerdos. *Dra. Patty English*
15:40 -16:20	Cultivo del Camaron de Vega. *Sra. Rosa Caniumil*
16:20 - 17:00	Acero inoxidable... ¿aún?: nuevas oportunidades para máquinas de ordeña. *Sr. Alberto Nuñez*
17:00 -17:20	Descanso
17:20 -18:00	Producción Orgánica y Valor Agregado a la Leche de Cabra. *Dra. Natalie Vásquez*
18:00 - 18:40	Control Homeopático de la Varroa. *Dr. Alejandro Montero*
18:40 - 19:20	Las 5 Leyes de la Innovación. *Dr. Alex Arancibia*
19:20 - 20:00	Cierre

2.- Seminario con productores de Nestle. X región. Osorno. Diciembre 2014

	La empresa Biogenesis Animal Health organizó una charla informativa para presentar el producto Cow Guard a productores lecheros de las X región.

3. Seminario en Hotel Sonesta, X Región. Osorno. Chile. Enero 2015

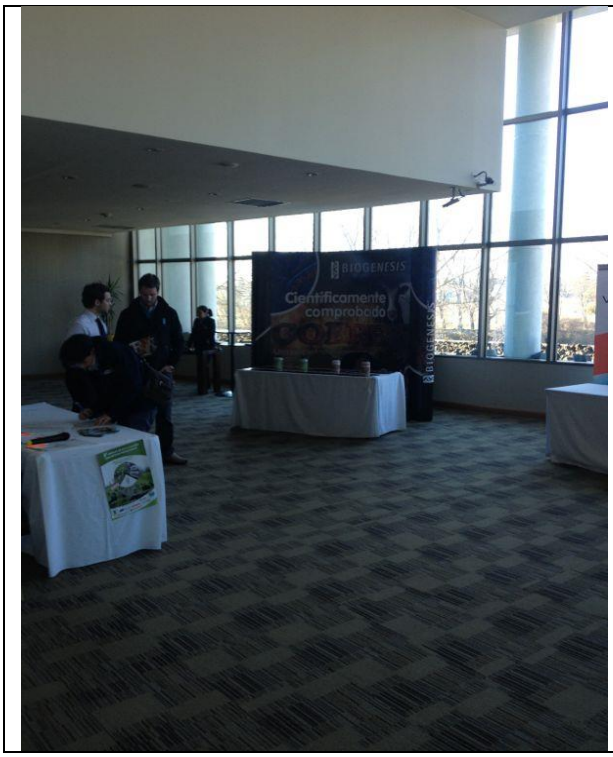
	Seminario en Hotel Sonesta con una asistencia de 150 productores de leche invitados por las plantas Soprole, Nestlé y Colún. Presentación de producto para control de mastitis en base a cobre.

	Presentación de resultados parciales de la utilización de producto de dipping en base a Cobre para el control de mastitis.
	Productores en seminario de Hotel Sonesta. Presentación producto de dipping en base a Cobre

4. Charla a productores de COLUN. XIV Región. La Unión. Chile. Marzo 2015

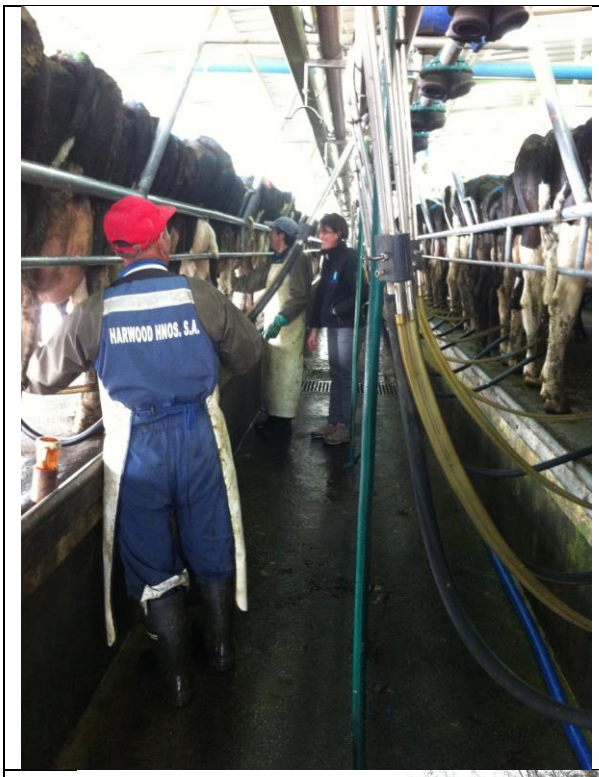
	Presentación del producto Dipping formulado en base a cobre en la XIV región a productores que entregan leche a la planta COLUN.

5. Seminario a Productores Lecheros Osorno. X Región. Osorno. Chile. Marzo 2015.

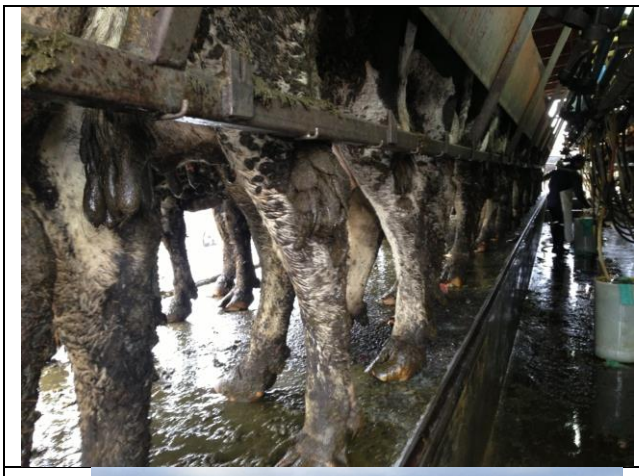
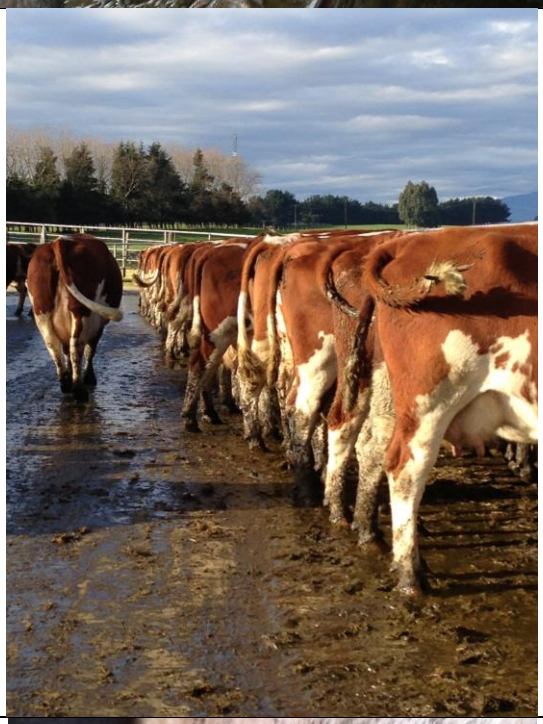
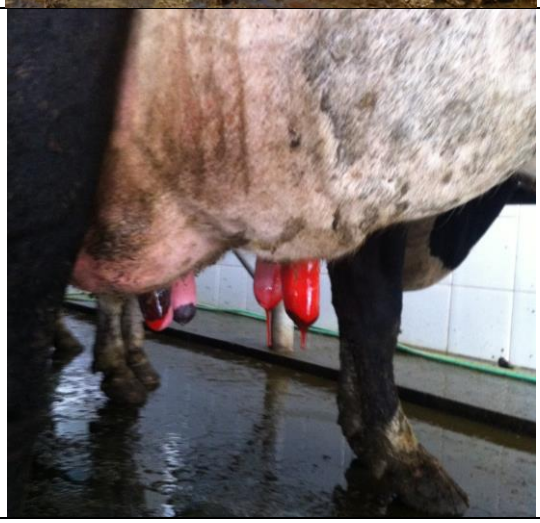
	Seminario a Productores Lecheros. Asistencia de 150 productores.

6. Asesorías en terreno para la presentación del producto de dipping en base a cobre.

	Producto Dipping en base a Cobre en lechería de Valdivia.

	Asesoría de para la utilización de dipping en base a cobre en lechería de Valdivia.
	Rebaño plantel Valdivia utilizando producto para dipping en base a cobre Cow Guard

	Asesoría para la utilización de producto en base a cobre en lechería de Los Angeles.
	Asesoría para la utilización de producto en base a cobre en lechería de Los Angeles. Como se observa, el plantel presentaba condiciones que favorecen la presentación de MB.

	Utilización de producto en base a cobre en sala de ordeña en plantel de Los Ángeles,
	Asesoría en plantel de vacas lecheras de Llanquihue.
	Producto en glándula mamaria. Plantel Llanquihue.

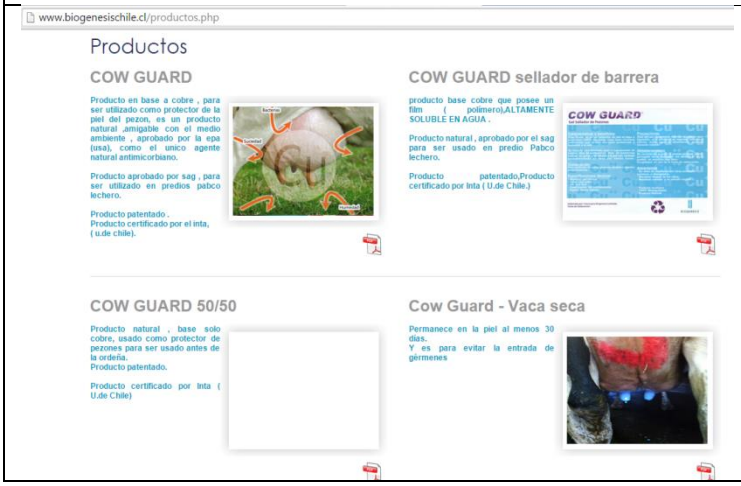
	Utilización de Dipping de cobre de manera experimental. Lechería de Osorno.

7. Contacto directo con vendedores intermediarios

	Stand en Feria Ganadera SAGO de Osorno.

	Exposición en locales de venta COLUN en sus 4 sucursales. (La Unión, Río Bueno, Paillaco, Futrono).

8. Publicidad y posicionamiento comercial del producto a través de la página web de Biogénesis Animal Health Chile.

	Página Biogénesis Chile con publicidad e información del producto.
	Productos de dipping formulados en base a cobre presentados en la página de Biogénesis Chile.