



Ciencia Latina
Internacional

Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar, Ciudad de México, México.
ISSN 2707-2207 / ISSN 2707-2215 (en línea), septiembre-octubre 2024,
Volumen 8, Número 5.

https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v8i5

**ALTERNATIVA AL USO DE ANTIBIÓTICOS:
MODELO LACTANTE VÍA ANTISÉPTICOS
INTRADUCTALES EN *Mus musculus***

ALTERNATIVE TO THE USE OF ANTIBIOTICS: INTRADUCTAL
ANTISEPTICS IN *Mus musculus* IN THE LACTATING MODEL

Víctor Rodríguez Hernández

Colegio de Posgraduados, Campus Puebla, México

Pablo Hernández Jauregui

Cyta Labs, México. Blvd. Hermanos Serdán 627, México

Roberto Germano Costa

Universida de Federal da Paraíba, Brasil

Alfredo Báez Simón

Universidad Autónoma de Puebla, México

Conrado Parraguirre Lezama

Universidad Autónoma de Puebla, México

Omar Romero-Arenas

Universidad Autónoma de Puebla, México

DOI: https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v8i5.14689

Alternativa al uso de Antibióticos: Modelo Lactante vía Antisépticos Intraductales en *Mus musculus*

Víctor Rodríguez Hernández¹

rodriguezjv@colpos.mx

Colegio de Posgraduados
Campus Puebla
Puebla México

Roberto Germano Costa

rcqueiroga@uol.com.br

Universidade Federal da Paraíba
Brasil

Conrado Parraguirre Lezama

conrado.parraguirre@correo.buap.mx

<https://orcid.org/0000-0002-8510-5877>

Centro de Agroecología Instituto de Ciencias
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
Puebla-México

Pablo Hernández Jauregui

pablohernandez@cytalabs.com

Cyta Labs, México. Blvd. Hermanos Serdán 627
A Francisco I. Madero Puebla
Puebla México

Alfredo Báez Simón

alfredo.baezsimon@viep.com.mx

Centro de Agroecología Instituto de Ciencias
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
Puebla-México
México

Omar Romero-Arenas

biol.ora@hotmail.com

<https://orcid.org/0000-0003-0076-3609>

Centro de Agroecología Instituto de Ciencias
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
Puebla-México

RESUMEN

Los factores de riesgo para adquirir infecciones en la glándula mamaria son multifactoriales y pueden causar pérdidas millonarias por disminución en la producción de leche o descarte de vacas. La mastitis bovina (MB) es responsable de grandes pérdidas económicas en granjas lecheras a nivel mundial, generalmente causadas por microorganismos como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Los biocidas, como la Isotiazolinona, la Clorhexidina y las soluciones de Superóxido (SSO), tienen actividad biocida y pueden ser una alternativa al uso de antibióticos. El objetivo de este estudio fue determinar la actividad microbicida de tres antisépticos y evaluar los efectos en la glándula N4 izquierda de ratones lactantes *Mus musculus in vitro*. Se empleó la técnica de difusión en disco de agar Kirby-Bauer para determinar la susceptibilidad in vitro de *S. aureus* y *E. coli*, además, cada antiséptico se aplicó individualmente a ratones durante su primera lactancia. La Isotiazolinona presentó un porcentaje de inhibición de 24.60% para *S. aureus* y 23.21% para *E. coli*, superior al de Clorhexidina y SSO a las 24 horas. Además, la Clorhexidina indujo cambios inflamatorios agudos con edema intersticial y sangrado. El SSO no indujo el flujo de células inflamatorias y tuvo una acción inhibidora del crecimiento bacteriano. La Isotiazolinona y SSO Microdacyn 60MR mostraron la formación de vesículas en el citoplasma del epitelio acinar y cambios involutivos en las glándulas con reemplazo de tejido glandular por tejido areolar. Los antisépticos Isotiazolinona y SSO pueden considerarse una estrategia integral para el control de la mastitis en el futuro.

Palabras claves: biocida, salud animal, modelo de ratón, actividad antibacteriana

¹ Autor principal

Correspondencia: biol.ora@hotmail.com

Alternative to the use of antibiotics: Intraductal antiseptics in *Mus musculus* in the lactating model

ABSTRACT

Risk factors for acquiring mammary gland infections are multifactorial and can cause million-dollar losses due to decreased milk production or culling of cows. Bovine mastitis (BM) is responsible for large economic losses in dairy farms worldwide, generally caused by microorganisms such as *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Biocides, such as Isothiazolinone, Chlorhexidine and Superoxide solutions (SSO), have biocidal activity and can be an alternative to the use of antibiotics. The objective of this study was to determine the microbicidal activity of three antiseptics and evaluate the effects on the left N4 gland of lactating *Mus musculus* mice *in vitro*. The Kirby-Bauer agar disk diffusion technique was used to determine the *in vitro* susceptibility of *S. aureus* and *E. coli*, and each antiseptic was applied individually to mice during their first lactation. Isothiazolinone showed an inhibition percentage of 24.60% for *S. aureus* and 23.21% for *E. coli*, higher than that of chlorhexidine and SSO at 24 hours. In addition, Chlorhexidine induced acute inflammatory changes with interstitial edema and bleeding. SSO did not induce inflammatory cell flow and had an inhibitory action on bacterial growth. Isothiazolinone and SSO Microdacyn 60MR showed vesicle formation in the cytoplasm of the acinar epithelium and involutive changes in the glands with replacement of glandular tissue by areolar tissue. Isothiazolinone and SSO antiseptics can be considered as a comprehensive strategy for mastitis control in the future.

Keywords: biocide, animal health, mouse model, antibacterial activity

Artículo recibido 12 septiembre 2024
Aceptado para publicación: 14 octubre 2024



INTRODUCCIÓN

La gestión de la salud animal se centra en mejorar la productividad y prevenir enfermedades en animales dentro de medianas y grandes industrias, reconociendo al mismo tiempo el bienestar animal, la seguridad alimentaria, la salud pública y la sostenibilidad ambiental (Le-Blanc *et al.*, 2006; Selzer y Epe, 2020).

La mastitis bovina (MB) es responsable de pérdidas económicas significativas en los establecimientos lecheros de todo el mundo, debido a la disminución en la producción de leche, el aumento en los costos de atención médica y las elevadas tasas de sacrificio y mortalidad (Khan *et al.*, 2021).

Los estafilococos coagulasa negativos (CoNS) son las bacterias aisladas con mayor frecuencia en las ubres del ganado en muchos países y, pueden describirse como patógenos de mastitis (Walid *et al.*, 2021). El uso de antibióticos ha permitido el control y la eliminación de infecciones causadas por bacterias altamente patógenas y virulentas (Tremblay *et al.*, 2013). Sin embargo, los mecanismos genéticos de resistencia bacteriana limitan la eficacia de los antibióticos y contribuyen a la propagación global a la resistencia a los antimicrobianos (RAM), lo que plantea una crisis significativa de salud pública (Zdole *et al.*, 2016; Lees *et al.*, 2021). La RAM es un problema crítico de salud pública y está estrechamente vinculada a las interacciones entre los animales de granja, los agricultores, el medio ambiente y los alimentos de origen animal (Garipcin *et al.*, 2015). Es conocido que los CoNS son las bacterias más importantes en la mastitis bovina subclínica, junto con *Staphylococcus aureus*, además muchos genotipos presentan resistencia a los agentes antimicrobianos debido a la alta presión antibiótica en la producción lechera convencional (Kalmus *et al.*, 2011; Schnitt *et al.*, 2020).

Las alternativas al uso de antibióticos incluyen estrategias de manejo preventivo, que van desde el control de la propagación de la enfermedad en un grupo definido de animales hasta el tratamiento rutinario de todos los animales durante períodos específicos de estrés (Doidge *et al.*, 2021). La investigación social cualitativa proporciona información sobre las actitudes de los agricultores hacia el uso de antibióticos, especialmente sus percepciones sobre los antibióticos en sus rutinas diarias y sus expectativas con respecto a posibles cambios (Coyne *et al.*, 2019).

Los antisépticos son biocidas diseñados para su aplicación tópica en tejidos vivos, principalmente en la epidermis (Russell *et al.*, 2004). El uso de biocidas tiene como objetivo reducir la carga bacteriana durante el período periparto y puede servir como una estrategia de manejo general (Pyörälä *et al.*, 2009).



En las últimas décadas, se han empleado biocidas de bajo peso molecular, como el Clorhidrato de Fenol y los derivados de Isotiazolona que liberan N-halaminas de cloro, así como sales como el Digluconato y complejos metálicos con Zn y Ag (Seyfriedsberger *et al.*, 2006; Vereshchagin *et al.*, 2021). Reducir la incidencia de enfermedades durante el periodo de transición del secado a la producción puede mejorar la productividad, la fertilidad y la salud general de los animales (Džermeikaitė *et al.*, 2023; Caixeta *et al.*, 2021). El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad microbica (porcentaje de inhibición bacteriana) de *S. aureus* y *E. coli in vitro* de tres antisépticos y sus efectos aplicados a la mucosa de la glándula mamaria en un modelo lactante.

MATERIALES Y MÉTODOS

Antisépticos seleccionados

a) Isotiazolinonas: Son compuestos químicos heterocíclicos con actividad microbica de amplio espectro (Seyfriedsberger *et al.*, 2006). Es un potente conservante que se presenta como una mezcla de 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona (Él *et al.*, 2021). Las Isotiazolinonas no tienen efectos mutagénicos ni cancerígenos y, una concentración de conservante recomendada del 0.05%, equivalente a 7.5 partes por millón (ppm), induce la lisis de hongos y levaduras en las primeras 24 horas (Aerts y Goossens, 2021).

b) Clorhexidina: Es un compuesto catiónico de la bisbiguanida, cuya forma de sal más común es el Digluconato, que es soluble en agua (Fiorillo, 2019). Actúa alterando el equilibrio osmótico y precipitando de la membrana citoplasmática, exhibiendo una amplia actividad contra bacterias tanto grampositivas (+) como gramnegativas (-), bacterias anaeróbicas y aeróbicas facultativas y, en menor medida, contra hongos y levaduras (Butera *et al.*, 2021). La dosis recomendada al 1%, reduce las infecciones por *S. aureus* y exhibe actividad *in vitro* contra virus encapsulados como el VIH, el herpes simple (HSV1) y (HSV2), citomegalovirus, influenza y virus respiratorio sincitial (Batra *et al.*, 2010). Además, la Clorhexidina no es mutagénica ni carcinogénica y se utiliza frecuentemente como desinfectante en la mucosa de la cavidad oral en estomatología debido a su amplia actividad antiséptica (Miyachi y Tsutsui, 2005).

c) Radicales superóxido: Las soluciones de Superoxidación (SSO) son conocidas por su eficacia en la desinfección y esterilización de productos, así como por su utilidad en el tratamiento de infecciones



tisulares. La SSO es una tecnología relativamente reciente, descrita por primera vez en 1996 por Tanaka et al. (1996). Desde su introducción comercial, ha ganado atención significativa por su eficacia contra bacterias, virus, hongos, esporas y micobacterias, así como por su baja toxicidad tisular y facilidad de manipulación, almacenamiento, uso y eliminación (Rudramurthy, 2016). La actividad biocida de la SSO depende de la concentración de cloro y de su potencial de oxidación-reducción, sin embargo, se recomienda a una concentración de cloro libre activo superior a 650 ppm (Alouini y Seux, 1987). Microdacyn 60MR, con un pH neutro, es una solución estable que no es inflamable, corrosiva, mutagénica ni carcinogénica. Presenta actividad microbicida contra virus, levaduras y bacterias grampositivas (+) y gramnegativas (-). En bacterias, Microdacyn 60MR desestabiliza la pared celular a través de un choque osmótico que desnaturaliza las proteínas (Gao *et al.*, 2001; Herrera-Saucedo *et al.*, 2017), por lo que se convierte en una herramienta efectiva en el manejo de una amplia gama de patógenos, destacándose por su estabilidad, seguridad y eficacia.

Evaluación de la actividad antibacteriana

Se empleó la técnica de difusión en disco sobre agar Kirby-Bauer para medir la susceptibilidad *in vitro* de microorganismos patógenos a sustancias con potencial antimicrobiano (Ramzan *et al.*, 2022). Colonias bacterianas de cultivos de 24 horas en placas de agar BHI se suspendieron en solución salina al 0.85% y sus concentraciones se ajustaron a 70×10^8 UFC/mL para *S. aureus* (ATCC 25923) y 89×10^8 UFC/mL para *E. coli* (ATCC 25922) utilizando un tubo McFarland n.º 0.5. El inóculo se extendió sobre la superficie de agar Mueller-Hinton (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) utilizando un asa microbiológica calibrada de 10 μ L en tres direcciones para lograr un crecimiento bacteriano confluyente de ambos microorganismos.

Se impregnaron discos de papel absorbente de 5 mm de diámetro con 10 μ L de los diferentes antisépticos a una concentración de 30 mg/mL. Los discos se colocaron sobre la superficie de placas de agar previamente inoculadas con pinzas estériles y las placas se incubaron aeróbicamente a 37 ± 1 °C durante 24 horas. El control positivo utilizó un disco con Cloranfenicol (10 mg/mL) y el control negativo utilizó agua estéril.

Los diámetros de las zonas de inhibición se midieron utilizando un vernier digital (Truper®. Ciudad de México, México) y las medias de tres mediciones se determinaron a partir del reverso de la placa sobre



un fondo oscuro iluminado con luz reflejada (Rayos-Verdugo *et al.*, 2023). Todas las pruebas se realizaron con cinco repeticiones por tratamiento y el experimento se realizó por duplicado.

Modelo lactante en *Mus musculus*

Entre los animales de laboratorio con similitudes anatómicas con los bovinos, la hembra del ratón de laboratorio, *Mus musculus* presenta datos anatómicos del pezón que se asemejan a los de los bovinos (Chandler, 1970). La aplicación de productos a través del conducto lácteo se ha utilizado desde la década de 1970 para diversos estudios (Anderson, 1975). En este estudio, se utilizaron treinta y cinco ratones de primera lactancia de la cepa CD1 criados en condiciones controladas de acuerdo con los Principios Rectores para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (Garber y Barbee, 2011), libres de patógenos específicos y bajo un permiso de manipulación otorgado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales del bioterio “Claude Bernard” de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP).

Los ratones se dividieron en grupos de siete por tratamiento, incluido un grupo control. Los ratones fueron anestesiados con hidrato de cloral al 10% (0.05 $\mu\text{L/g}$) y se les realizó afeitado y desinfección de la piel abdominal con alcohol al 75%. Se realizó una incisión de 2 mm utilizando tijeras estériles para exponer el conducto mamario de la glándula N4 izquierda. Posteriormente, se realizaron inyecciones intramamarias de 0.10 μL de Isotiazolinona a una concentración de 0.05%, Clorhexidina al 0.12% y SSO Microdacyn 60MR a una concentración de 250 ppm. El grupo control recibió 0.10 μL de solución salina isotónica estéril como placebo. Todas las inyecciones en la glándula mamaria se realizaron con binoculares en los puntos temporales experimentales especificados. Se utilizaron jeringas de tuberculina de 1 mL y agujas romas de calibre 31.

Los ratones fueron sacrificados después de la exposición al cloroformo, mediante dislocación cervical del cráneo 24 horas después de la aplicación. Se recogieron muestras de tejido mamario, se pesaron y se homogeneizaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) en condiciones asépticas. Las glándulas mamarias se analizaron macroscópicamente por secciones, además, diversas muestras se sometieron a procesamiento histológico de rutina e inclusión en parafina. Las secciones (entre 4 y 5 mm) se tiñeron con hematoxilina y eosina y se observaron en 10 campos diferentes utilizando un



objetivo de 40X para contar las células presentes en el lumen alveolar e identificar cualquier cambio o alteración en las muestras (Blaas *et al.*, 2016; Montuenga *et al.*, 2009).

Análisis estadístico

Los valores obtenidos fueron analizados mediante el programa estadístico SPSS versión 17 (Statistical Package for the Social Sciences) para Windows. El análisis incluyó la prueba de homogeneidad de Bartlett seguida de una prueba de comparación de medias de Tukey-Kramer con un nivel de probabilidad de $p \leq 0,05$ para determinar diferencias entre tratamientos. Adicionalmente, se realizó un análisis estadístico multivariado (análisis de componentes principales) para identificar patrones de variabilidad de las variables morfológicas correlacionadas con el modelo lactante de irritabilidad de la glándula mamaria de *Mus musculus* tratada con diferentes antisépticos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los productos antisépticos utilizados en este ensayo produjeron halos de inhibición en el crecimiento de la cepa ATCC 25923S de *S. aureus* (ANOVA de una vía: $F = 462.28$, $p = 0.001$) y la cepa ATCC 25922 de *E. coli* (ANOVA de una vía: $F = 395.81$, $p = 0.048$). Sin embargo, Isotiazolinona exhibió un halo de inhibición mayor que Clorhexidina y SSO Microdacyn 60MR a las 24 horas para ambas cepas (Tabla 1), sin observarse diferencias significativas en el grupo control (Cloranfenicol, 10 mg/mL).

La inmunosupresión se considera un factor importante en la patogénesis de muchas enfermedades infecciosas que afectan al ganado (Roth y Flaming, 2017). En un estudio similar, Madden *et al.* (1994) sugirió que la inhibición del crecimiento microbiano por Isotiazinolonas puede resultar de la exposición a pequeñas cantidades durante un período variable o la exposición a grandes cantidades. Sin embargo, a pesar de las medidas de protección utilizadas en la industria, la sensibilización de las áreas tratadas es común. En esta investigación, no se observó sensibilización en el modelo lactante, donde se aplicó el producto.

La Isotiazolinona es un desinfectante aprobado por la FDA de los Estados Unidos para desinfectar materiales en contacto con frutas debido a su falta de mutagenicidad y carcinogenicidad. Debido a su baja irritabilidad, podría considerarse como un sustituto de soluciones antibióticas en aplicaciones de glándula mamaria (Parish *et al.*, 2003).



Tabla 1. Inhibición de crecimiento de *S. aureus* y *E. coli* con diferentes antisépticos *in vitro*.

Antisépticos	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	
	Crecimiento (mm)*	% Inhibición	Crecimiento (mm)*	% Inhibición
	M ± SE		M ± SE	
Clorhexidina	79.20 ± 0.61 ^b	20.40	77.22 ± 0.61 ^a	22.34
SSO Microdacyn 60MR	92.16 ± 0.60 ^c	7.50	92.25 ± 0.63 ^b	7.23
Isotiazolinonas	76.13 ± 0.46 ^a	24.60	76.26 ± 0.63 ^a	23.21
Cloramfenicol (Control +)	74.26 ± 0.63 ^a	25.20	75.28 ± 0.64 ^a	24.15
Agua esterilizada (Control -)	100 ^d	0.00	100 ^d	0.00

*Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05), M= Media, SE= Error estándar.

La Clorhexidina fue el segundo producto antiséptico que produjo zonas de inhibición en el crecimiento de ambas cepas con diámetros de 79.20 mm para *S. aureus* y 77.22 mm para *E. coli*. La alta efectividad antimicrobiana del gluconato de Clorhexidina se atribuye a su capacidad de alterar la membrana celular, liberando enzimas y organelos al medio externo, lo que desestabiliza las células microbianas (Mungara *et al.*, 2013). Chaiyakunapruk *et al.* (2002) mencionan que concentraciones superiores al 2% de Clorhexidina pueden ser altamente irritantes debido a su ototoxicidad, como se observó en nuestro estudio en el modelo lactante.

SSO Microdacyn 60MR es conocido por su efectividad biocida contra partículas virales, bacterias y levaduras; sin embargo, su impacto fue mínimo en nuestra investigación. Miyachi y Tsutsui (2005), sugieren que la presencia de catalasa en bacterias puede conferir tolerancia a estos compuestos. Díaz-Suárez (2014), explica que la acción de SSO Microdacyn 60MR está relacionada con la interacción entre los radicales libres de hidroxilo y los lípidos presentes en la pared celular bacteriana.

Análisis del modelo lactante para determinar irritación de mucosas en *Mus musculus*

Se empleó el análisis de componentes principales (ACP) para analizar las variables altamente correlacionadas con la glándula mamaria de *Mus musculus* tratada con diferentes antisépticos, ya que proporciona una mejor explicación de la varianza (Tabla 2). El análisis de componentes principales (PC1 y PC2) sugiere que la mayoría de las características de la glándula mamaria, como el color, la textura, los acinos glandulares (tanto limpios como con células sin inflamación), la vacuolización intracitoplasmática generalizada y el intersticio con congestión vascular por lactancia, están altamente correlacionadas con el primer componente principal (PC1), con valores de carga muy cercanos a 0.998. Esto indica que PC1 explica una gran parte de la variabilidad en estas características, reflejando una influencia común. El primer componente principal (PC1) explica el 83.358% de la varianza total, lo que

sugiere que la mayor parte de la variabilidad en las características de la glándula mamaria se puede atribuir a un solo factor dominante. El segundo componente principal (PC2) explica un 15.074% adicional de la varianza, que, aunque significativo, tiene un impacto menor comparado con PC1.

Los acinos glandulares con células inflamadas y el intersticio con congestión vascular por biocidas tienen una correlación negativa con PC1 (-0.998 y -0.597, respectivamente) y una correlación mixta con PC2 (0.049 y 0.742, respectivamente). Esto sugiere que la inflamación y la congestión causada por biocidas podrían estar representando procesos distintos o menos relacionados con las otras características evaluadas, indicando una posible diferenciación en los efectos de los tratamientos sobre la glándula mamaria.

Tabla 2. Análisis de componentes principales de las variables morfológicas correlacionadas con la glándula mamaria de *Mus musculus* a diferentes antisépticos.

Característica de la glándula mamaria	Componente	
	PC1	PC2
Color	0.998	0.049
Textura	0.998	0.049
Acinos glandulares limpios	0.998	0.049
Acinos glandulares con células con inflamación	-0.998	-0.049
Acinos glandulares con células sin inflamación	0.998	0.049
Vacuolización intracitoplasmática generalizada	0.998	0.049
Intersticio con congestión vascular por lactancia	0.998	0.049
Intersticio con congestión vascular por biocidas	-0.597	0.742
Valores propios	5.391	1.036
% Varianza extraída	83.358	15.074

Después de 24 horas de la aplicación intraductal de 0.10 µL de Isotiazolinona no se observaron cambios significativos en términos de tamaño, color y textura en comparación con el grupo control (Figura 1a y T). El estudio histológico reveló acinos glandulares limpios con ausencia de células inflamatorias. El epitelio de revestimiento mostró vacuolización intracitoplasmática generalizada, lo que indica una respuesta a la presencia de Isotiazolinona. Este cambio observado no es destructivo y puede ser reversible.

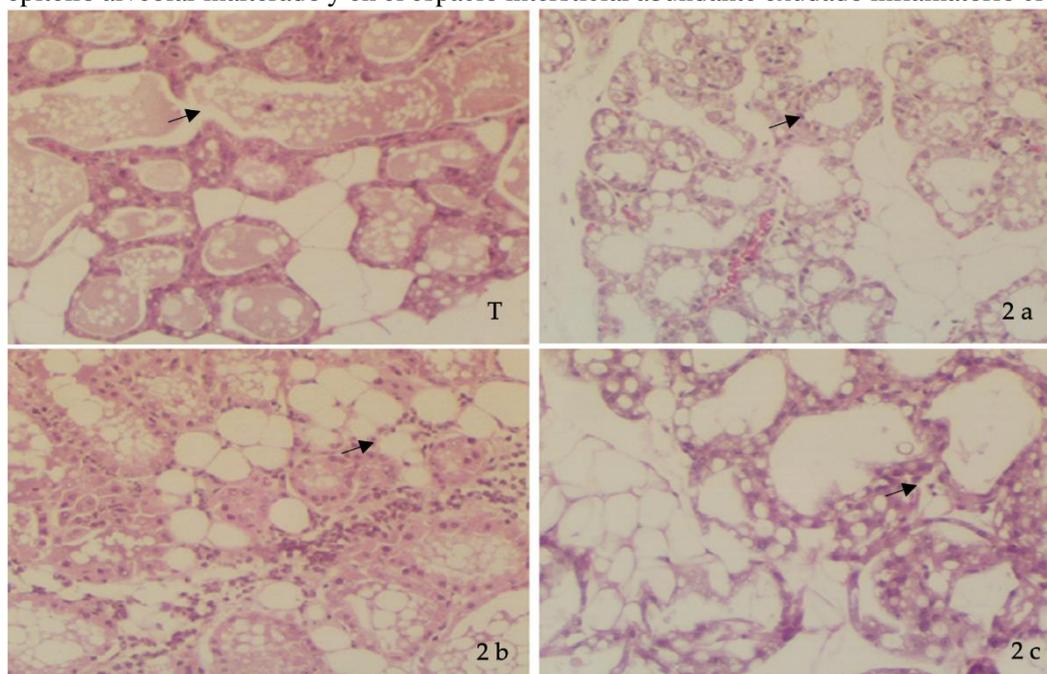
Figura 1. Vista macroscópica de glándulas mamarias de ratones lactantes que recibieron diferentes antisépticos intraductales 24 h después de su aplicación.



También se observó congestión vascular y cambios de involución glandular en el tejido intersticial, probablemente relacionados con la suspensión de la lactancia durante 24 horas (Figura 2a). Para la aplicación intraductal de 0.10 μ L de Clorhexidina al 0.12%, se observaron cambios significativos en el color y la textura en comparación con el grupo control. La glándula que recibió Clorhexidina presentó reducción de tamaño, congestión, hemorragia y edema (Figura 1b).

El estudio histológico reveló cambios inflamatorios agudos, incluyendo edema intersticial, congestión vascular y sangrado en la misma ubicación anatómica. Sin embargo, no se encontraron células inflamatorias ni cambios de vacuolización en el citoplasma del epitelio de revestimiento acinar (Figura 2b).

Figura 2. Histología de la glándula mamaria de *Mus musculus* a 40X. Control (T) con reductos lácteos en la luz acinar y sin cambios en el epitelio de revestimiento. 2a y 2c Isotiazolinona y SSO Microdacyn 60MR, que muestran la formación de vesículas en el citoplasma del epitelio acinar y cambios de involución en las glándulas con sustitución de tejido glandular por LAX areolar. En 2b Clorhexidina el epitelio alveolar inalterado y en el espacio intersticial abundante exudado inflamatorio crónico y edema.



Finalmente, las glándulas que recibieron 0.10 μ L de SSO Microdacyn 60MR mantuvieron su tamaño, color y textura en comparación con el grupo control que recibió 0.10 μ L de solución salina isotónica estéril. El estudio histológico de la glándula N4 mostró un patrón de conservación de la arquitectura histológica en los acinos glandulares, con cambios en el citoplasma del revestimiento epitelial, consistentes en la formación de vacuolas en respuesta al biocida (Figura 1c). El lumen alveolar mostró espacios limpios con restos celulares y proteína de la leche (Figura 2c).

CONCLUSIONES

Los antisépticos Isotiazolinonas y Clorhexidina muestran la mayor eficacia inhibidora contra *S. aureus* y *E. coli*, con porcentajes de inhibición de hasta 24.60% y 23.21% respectivamente. Por otro lado, la solución de superoxidación (SSO Microdacyn 60MR) presenta una menor capacidad inhibidora en comparación con los otros antisépticos, con porcentajes de inhibición de 7.50% y 7.23%. Finalmente, la cepa ATCC 25922 de *E. coli* es más resistente a los antisépticos probados en comparación con la cepa ATCC 25923S de *S. aureus*.

La Isotiazolinona, cuando se aplica intraductalmente en la glándula mamaria, podría servir como un sustituto potencial de las soluciones antibióticas. Su acción demostró una ausencia de células inflamatorias y no se observaron cambios significativos en términos de tamaño, color y textura.

La concentración de Clorhexidina utilizada en este estudio no se recomienda para su aplicación en la glándula mamaria. Sin embargo, se recomienda realizar más investigaciones para determinar diluciones con potencial bactericida y menos efectos secundarios, como inflamación e irritación.

El biocida SSO Microdacyn 60MR induce cambios intracitoplasmáticos, incluida la formación de vacuolas. Es importante destacar que no conduce a una afluencia de células inflamatorias hacia los espacios alveolares. Esto sugiere que puede ser una opción viable para la aplicación intraductal en la glándula mamaria durante el período periparto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aerts, O., & Goossens, A. (2021). Contact allergy to preservatives. *Contact Dermatitis Springer, Cham*. 835-876. https://doi.org/10.1007/978-3-030-36335-2_85
2. Alouini, Z., & Seux, R. (1987). Cinétiques et mécanismes de l'action oxydative de l'hypochlorite sur les acides alfa-amines lors de la désinfection des eaux. *Water Research*. 21, 335-343.
3. Anderson, R.R. (1975). Mammary gland growth in sheep. *Journal of Animal Science*. 41, 118-123.
4. Batra, R., Cooper, B. S., Whiteley, C., Patel, A. K., Wyncoll, D., & Edgeworth, J.D. (2010). Efficacy and limitation of a chlorhexidine-based decolonization strategy in preventing transmission of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in an intensive care unit. *Clinical Infectious Diseases*. 50, 210-217. <https://doi.org/10.1086/648717>



5. Blaas, L., Pucci, F., & Messal, H. (2016). *Lgr6* labels a rare population of mammary gland progenitor cells that are able to originate luminal mammary tumours. *Nat Cell Biol.* 18, 1346-1356. <https://doi.org/10.1038/ncb3434>
6. Butera, A., Gallo, S., Maiorani, C., Molino, D., Chiesa, A., Preda, C., Esposito, F. & Scribante, A. (2021). Probiotic Alternative to Chlorhexidine in Periodontal Therapy: Evaluation of Clinical and Microbiological Parameters. *Microorganisms.* 9, 69e. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010069>
7. Caixeta, L.S., & Omontese, B.O. (2021). Monitoring and improving the metabolic health of dairy cows during the transition period. *Animals.* 11, 352e. <https://doi.org/10.3390/ani11020352>
8. Chaiyakunapruk, N., Veenstra, D., Lipsky, B., & Saint, S. (2002). Chlorhexidine compared with povidone iodine solution for vascular catheter site care: meta-analysis. *Annals of Internal Medicine.* 136, 792-801. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-136-11-200206040-00007>
9. Chandler, R.L. (1970). Experimental bacterial mastitis in the mouse. *Journal of Medical Microbiology.* 3(2), 273-282.
10. Coyne, L. A., Latham, S. M., Dawson, S., Donald, I. J., Pearson, R. B., Smith, R. F., Williams, N. J. & Pinchbeck, G. L. (2019). Exploring Perspectives on Antimicrobial Use in Livestock: A Mixed-Methods Study of UK Pig Farmers. *Frontiers in Veterinary Science.* 6, 1-16. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00257>
11. Díaz-Suárez, J. A. (2014). Secado contra lavado a gran volumen contra microdacyn en peritonitis secundaria, modelo experimental en ratas Wistar. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Centro de Ciencias de la Salud. Pp. 51.
12. Doidge, C., Ferguson, E., Lovatt, F. & Kaler, J. (2021). Understanding farmers' naturalistic decision making around prophylactic antibiotic use in lambs using a grounded theory and natural language processing approach. *Preventive Veterinary Medicine.* 186, 105226e. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105226>
13. Džermeikaitė, K., Bačėninaitė, D., & Antanaitis R. (2023). Innovations in Cattle Farming: Application of Innovative Technologies and Sensors in the Diagnosis of Diseases. *Animals.* 13(5), 780e. <https://doi.org/10.3390/ani13050780>



14. Él, W., Pan, L., Han, W., & Wang, X. (2021). Isothiazolinones as Novel Candidate Insecticides for the Control of Hemipteran Insects. *Antibióticos*. 10, 436e.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics1004043>
15. Fiorillo, L. (2019). Chlorhexidine Gel Use in the Oral District: A Systematic Review. *Gels*. 5, 31e. <https://doi.org/10.3390/gels5020031>
16. Gao, Z., Yin, W., & Han, C. (2001). Observation on the effect of disinfection to HBsAg by electrolyzed oxidizing water. *Zhonghua, L., Xing, B., Xue, Z.* 22, 40-42.
17. Garber, J.C., & Barbee, R.W. (2011). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, 8th ed.; The National Academies Press: Washington, DC, EE.UU.
18. Garipcin, M., & Seker, E. (2015). Nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in cattle and farm workers in Turkey. *Veterinarski arhiv*. 85, 117-129.
<https://doi.org/10.1186/s12879-016-2139-1>
19. Herrera-Saucedo, A., Corona, G. M. A., Vara, P. F. J., Gutiérrez, V. D. & Alavez R. S. (2017). Comparación de la eficacia de los irrigantes OxOral® y NaOCl en la eliminación de *Enterococcus faecalis*. *Revista Odontológica Mexicana*. 21(4), 241-244.
20. Kalmus, P., Aasmäe, B., Kärssin, A., Orro, T., & Kask, K. (2011). Udder pathogens and their resistance to antimicrobial agents in dairy cows in Estonia. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 53, 2-7. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-53-4>
21. Khan, S. M., Kuldeep, D., Ruchi, T., Mudasir, B. G. Mohd-Iqbal, Y., Shailesh, K. P., Mamta, P., Kumaragurubaran, K., Sandip, K. K., Rahul, S.; Bhavani, P., Rajendra, S., Karam, P. S., & Wanpen, C. (2021). Advances in therapeutic and managemental approaches of bovine mastitis: a comprehensive review. *Veterinary Quarterly*. 41(1), 107-136.
<https://doi.org/10.1080/01652176.2021.1882713>
22. Le-Blanc, J., Lissemore, K. D., Kelton, D. F.; Duffield, T. F., & Lesli, K. E. (2006). Population Medicine, Major Advances in Disease Prevention in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*. 89, 1267-1279. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72195-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72195-6)



23. Lees, P., Pelligand, L., Giraud, E., & Toutain, P. L. (2021). A history of antimicrobial drugs in animals: Evolution and revolution. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 44, 137-171. <https://doi.org/10.1111/jvp.12895>
24. Madden, S. D., Thiboutot, D. M., & Marks, J. G. (1994). Occupationally induced allergic contact dermatitis to methychlorosothiazolinone methylisothiazolinone among machinists. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 30, 272-274. [https://doi.org/10.1016/S0190-9622\(08\)81927-5](https://doi.org/10.1016/S0190-9622(08)81927-5)
25. Miyachi, T., & Tsutsui, T. (2005). Ability of 13 chemical agents used in dental practice to induce sister-chromatid exchanges in Syrian hamster embryo cells. *Odontology*. 93, 24-29. <https://doi.org/10.1007/s10266-005-0055-8>
26. Montuenga, B. L., Esteban, R. F., & Calvo, G. A. (2009). *Técnicas en histología y biología celular*. Barcelona, Elsevier Masson.
27. Mungara, J., Dilna, N., Joseph, E., & Reddy, N. (2013). Evaluation of microbial profile in dental unit waterlines and assessment of antimicrobial efficacy of two treating agents. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*. 37(4), 367-71. <https://doi.org/10.17796/jcpd.37.4.l6851n9g01223450>
28. Parish, M. E., Beuchat, L. R., Suslow, T. V., Harris, L. J., Garret, E. H., Farber, J. N., & Busta F. (2003). Methods to reduce eliminate pathogens from fresh and fresh cut produce: Comprehensive Reviews. *Food Science and Food Safety*. 2, 161-173. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00033.x>
29. Pyörälä, S., & Taponen, S. (2009). Coagulase-negative *Staphylococci* emerging mastitis pathogens. *Veterinary microbiology*. 134(1-2), 3-8. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.015>
30. Ramzan, M., Karobari, M. I., Heboyan, A., Mohamed, R. N., Mustafa, M., Basheer, S. N., Desai, V., Batool, S., Ahmed, N., & Zeshan, B. (2022). Synthesis of Silver Nanoparticles from Extracts of Wild Ginger (*Zingiber zerumbet*) with Antibacterial Activity against Selective Multidrug Resistant Oral Bacteria. *Molecules*. 27, 2007e. <https://doi.org/10.3390/molecules27062007>
31. Rayos-Verdugo, J. Y., Rivera-Chaparro, F., Castro-Salazar, G. Y., Ramírez-Álvarez, M., Romero-Quintana, J. G., Loyola-Rodríguez, J. P., Zavala-Alonso, N. V., Avendaño-Félix, M., Soto-Sainz, J. E., & Silva-Benítez J. (2023). Propylene Glycol Potentiates the Inhibitory Action



- of CTZ Paste on Antibiotic-Resistant *Enterococcus faecalis* Isolated from the Root Canal: An In Vitro Study. *Microorganisms*. 11, 2208e. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11092208>
32. Roth, J. A., & Flaming, K. (2017). Model Systems to Study Immunomodulation in Domestic Food Animals. *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine*. 35(19), 21-41. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-039235-3.50008-3>
 33. Rudramurthy, G. R., Swamy, M. K., Sinniah, U. R., & Ghasemzadeh, A. (2016). Nanoparticles: Alternatives Against Drug-Resistant Pathogenic Microbes. *Molecules*. 21, 836e. <https://doi.org/10.3390/molecules21070836>
 34. Russell, A.D. (2004). Factors influencing the efficacy of antimicrobial agents. Edit. Blackwell Publishing Ltd., Massachussets, USA. pp. 98-128.
 35. Schnitt, A., & Tenhagen, B. A. (2020). Risk factors for the occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy herds: an update. *Foodborne pathogens and disease*. 17(10), 585-596. <https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2638>
 36. Selzer, P. M., & Epe, C. (2020). Antiparasitics in Animal Health: Quo Vadis? *Trends Parasitol.* 37, 77-89. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.09.004>
 37. Seyfriedsberger, G., Rametsteiner, K., & Kern, W. (2006). Polyethylene compounds with antimicrobial surface properties. *European Polymer Journal*. 42, 3383-3389. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2006.07.026>
 38. Tanaka, H., Hirakata, Y., Kaku, M., Yoshida, R., Takemura, H., Mizukane, R., Ishida, K., Tomono, K., Koga, H., Kohno, S., & Kamihira, S. (1996). Antimicrobial activity of superoxidized water. *Journal of Hospital Infection*. 34, 43-49. [https://doi.org/10.1016/s0195-6701\(96\)90124-3](https://doi.org/10.1016/s0195-6701(96)90124-3)
 39. Tremblay, Y. D., Lamarche, D., Chever, P., Haine, D., Messier, S., & Jacques, M. (2013). Characterization of the ability of coagulase negative *staphylococci* isolated from the milk of Canadian farms to form biofilms. *Journal of Dairy Science*. 96, 234-46. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5795>
 40. Vereshchagin, A. N., Frolov, N. A., Egorova, K. S., Seitkalieva, M. M., & Ananikov, V.P. (2021). Quaternary Ammonium Compounds (QACs) and Ionic Liquids (ILs) as Biocides: From Simple Antiseptics to Tunable Antimicrobials. *International Journal of Molecular Sciences*. 22, 6793e.



<https://doi.org/10.3390/ijms2213679>

41. Walid, M. S., Salama, A. A., Elnahiriry, S.S., Abdeen, E. E., Hadad, G. A. E., & Abo-Shama, U.H. (2021). Antibiogram and antibiotic resistance genes among coagulase-negative *staphylococci* recovered from bovine mastitis. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*. 9(8), 1267-1274. <https://doi.org/10.17582/journal.aavs/2021/9.8.1267.1274>
42. Zdolec, N., Dobranić, V., Butković, I., Koturić, A., Filipović, I., & Medvid, V. (2016). Antimicrobial susceptibility of milk bacteria from healthy and drug-treated cow udder. *Veterinarski*. 86(2), 163-172.

