

**UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE
APURÍMAC**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**ACTIVIDAD TERAPÉUTICA DEL PROPÓLEO EN EL
TRATAMIENTO DE MASTITIS CLÍNICA BOVINA EN EL
ESTABLO LECHERO SAN ISIDRO, CAÑETE 2011-2012.**

TESIS

Para optar el título de Médico Veterinario y Zootecnista.

AUTOR

Isaí Ochoa Pumaylle

Abancay, Abril del 2012

PERÚ

UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURIMAC	
CÓDIGO	MFN
T MVZ O 2012	BIBLIOTECA CENTRAL
FECHA DE INGRESO:	18 OCT. 2012
Nº DE INGRESO:	00265

ACTIVIDAD TERAPÉUTICA DEL PROPÓLEO EN EL
TRATAMIENTO DE MASTITIS CLÍNICA BOVINA EN EL
ESTABLO LECHERO SAN ISIDRO, CAÑETE 2011-2012.

UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE
APURÍMAC

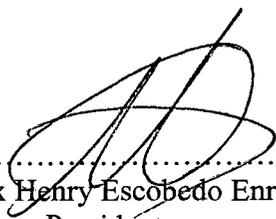
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA.

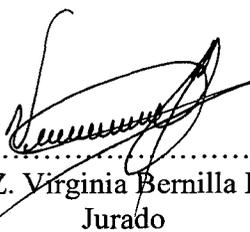
ACTIVIDAD TERAPÉUTICA DEL PROPÓLEO EN EL TRATAMIENTO
DE MASTITIS CLÍNICA BOVINA EN EL ESTABLO SAN ISIDRO

CAÑETE 2011 – 2012.

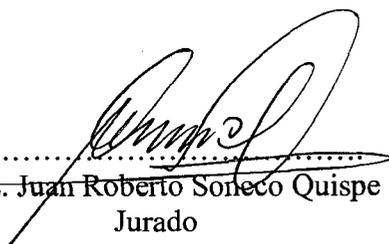
Jurado calificador integrado por:



.....
MVZ Max Henry Escobedo Enríquez.
Presidente



.....
Mag. M.V.Z. Virginia Bernilla De La Cruz.
Jurado



.....
MVZ. Juan Roberto Sorlecó Quispe
Jurado

UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE
APURÍMAC

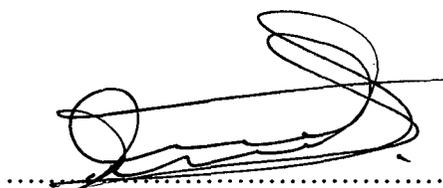
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA.

ACTIVIDAD TERAPÉUTICA DEL PROPÓLEO EN EL TRATAMIENTO
DE MASTITIS CLÍNICA BOVINA EN EL ESTABLO SAN ISIDRO

CAÑETE 2011 – 2012.

Asesores integrado por:



.....
MVZ Víctor Raúl Cano Fuentes.
Asesor

.....
Mag. M.V.Z. Ulises Sandro Quispe Gutiérrez
Asesor

.....
Ing. Edwar Illasaca Cahuata
Asesor

DEDICATORIA

A Dios por estar conmigo cada día de mi vida
A mi madre, padre, hermano y amigos por estar a mi
lado incluso cuando las exigencias de la profesión
hicieron que el tiempo que les dedicara fuera escaso.

AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, por todo lo brindado y en especial a toda la familia de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- A los docentes de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por todos los conocimientos impartidos.
- A mis asesores Víctor R. Cano Fuentes y Ulises S. Quispe Gutiérrez docentes de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por su apoyo en todas las etapas de ejecución de este trabajo de tesis.
- A la Dirección de investigación de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac por apoyar económicamente en la ejecución de esta tesis.
- A la empresa Biokawsay S.A.C por financiar los costos en la ejecución de la tesis.
- Al MV. Víctor Sinchitullo Mendoza administrador del establo lechero de Agroindustrias San Isidro S.A. por brindarme acceso a las instalaciones del establo y permitir la ejecución de las pruebas *In Vivo*.
- Al ingeniero Edwar Ilasaca Cahuata, por ayudarme con la parte estadística del presente trabajo de tesis.
- A mis padres Alfonzo Ochoa Mitma y Yeny Pumaylle Espejo, por brindarme su apoyo incondicional en la realización de esta meta.
- A mi hermano Kiev Ochoa Pumaylle, por colaborarme en todas la etapas de ejecución de la tesis.

INDICE DE CONTENIDOS

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	MARCO TEÓRICO	3
	2.1. Antecedentes.	3
	2.2. Mastitis Bovina	5
	2.2.1. Definición de la mastitis bovina	5
	2.2.2. Clasificación de mastitis bovina.	7
	2.2.3. Microorganismos que causan mastitis.	10
	2.2.4. Desarrollo de la mastitis	18
	2.2.5. Mecanismo de defensa de la glándula mamaria.	21
	2.2.6. Resistencia bacteriana a los antibióticos.	23
	2.2.7. Diagnóstico de la mastitis clínica.	24
	2.2.8. Prevención y control.	26
	2.2.9. Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina.	29
	2.3. Propóleos.	32
	2.3.1. Composición química.	33
	2.3.2. Mecanismo de acción	34
	2.3.3. Composición según zona geográfica	34
	2.3.4. Propiedades antimicrobianas.	37
	2.3.5. Métodos de extracción de propóleos	38
	2.3.6. Toxicología del propóleo.	40
	2.4. Definición de términos	40

III.	MATERIALES Y MÉTODOS	43
3.1.	Materiales	43
3.1.1.	Material biológico	43
3.1.2.	Del terapéutico.	45
3.1.3.	Cepas bacterianas pruebas <i>In Vitro</i>	45
3.1.4.	De laboratorio.	46
3.1.5.	De campo	47
3.2.	Medios de cultivo	48
3.3.	Equipos.	48
3.4.	Métodos	50
3.5.	Diseño experimental	57
3.6.	Procesamiento estadístico de datos	58
IV.	RESULTADOS.	59
4.1.	Efectividad de los propóleos en el tratamiento de mastitis clínica bovina	59
4.2.	Agentes bacterianos causantes de mastitis clínica en el establo San Isidro	66
4.3.	Presencia de halo de inhibición sobre bacterias que causan Mastitis Clínica.	66
4.4.	Costos económicos en el tratamiento de las mastitis clínicas.	71
V.	DISCUCIONES.	74
VI.	CONCLUSIONES.	77
VII.	RECOMENDACIONES.	78
VIII.	REVISIÓN BIBLIOGRAFICA.	79
	ANEXOS	87

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de la mastitis bovina	7
Tabla 2. Impacto económico de la mastitis bovina	29
Tabla 3. Perdidas económicas por vaca producidas por mastitis clínica	30
Tabla 4. Composición Aproximada del Propóleo Bionaturista.	42
Tabla 5. Dilución de la solución madre para obtener las diferentes concentraciones.	48
Tabla 6. Esquema del diseño experimental.	53
Tabla 7. Efectividad de los tratamientos a base de propóleos.	54
Tabla 8. Análisis de varianza efectividad de los diferentes tratamientos	55
Tabla 9. Efectividad de propóleo al 5 y 7,5%.	56
Tabla 10. Efectividad de propóleos al 10,0 % en el tratamiento de mastitis clínica bovina.	56
Tabla 11. Efectividad de propóleo al 12,5%.	57
Tabla 12. Efectividad de Penicilina + Kanamicina.	58
Tabla 13. Estadísticos, Número de dosis usado por tratamiento.	58
Tabla 14. Halos de inhibición antibacteriana de propóleos frente a <i>Staphiloccoccus aureus</i> .	60
Tabla 15. Estadísticos de los halos de inhibición bacteriana de las diferentes concentraciones de propóleo.	61
Tabla 16. Análisis de varianza halos de inhibición bacteriana de propóleos frente a <i>Staphiloccoccus aureus</i> .	62
Tabla 17. Halos de inhibición antibacteriana de propóleos frente a <i>Streptococcus agalactiae</i> .	63
Tabla 18. Halos de inhibición antibacteriana de propóleos frente a <i>Escherichia coli</i> .	64
Tabla 19. Halos de inhibición antibacteriana de propóleos frente a <i>Micrococcus sp.</i>	64
Tabla 20. Costos en Nuevos Soles para la preparación de dosis de las diferentes soluciones de propóleo.	65
Tabla 21. Costo en Nuevos Soles de las dosis individuales por tratamiento.	65
Tabla 22. Estadísticos de los costos de los diferentes tratamientos.	66
Tabla 23. Análisis de varianza para los costos por tratamiento	67

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Interacción de los factores de riesgo de la mastitis bovina	6
Figura 2. Causas de la mastitis bovina	11
Figura 3. Infección por <i>Staphylococcus aureus</i>	14
Figura 4. Infecciones por <i>Streptococcus agalactiae</i>	15
Figura 5. Infecciones por <i>Escherichia coli</i>	17
Figura 6. Defensas estructurales del canal del pezón	21
Figura 7. Eliminación de mastitis en un Hato lechero	28
Figura 8. Pérdidas económicas atribuibles a la mastitis clínica coliforme	31
Figura 9. Diagrama de flujo de la investigación.	46
Grafico 01: Número de dosis usado en el tratamiento de mastitis clínica.	59
Grafico 02: Diagrama de cajas: Diámetro de halos de inhibición según tratamiento aplicado en <i>Staphylococcus aureus</i>	61
Gráfico 03: Diagrama de cajas; diferencia de los costos en los tratamientos usados.	66

RESUMEN

La mastitis bovina es un complejo singular de enfermedades, que causa una gran cantidad de pérdidas a nivel mundial, es la causa más común para un sacrificio temprano de las vacas lecheras, además de problemas de Fertilidad. El propóleo es un producto natural fabricado por la abeja *Apis mellifera* con variadas propiedades medicinales, entre ellas la antimicrobiana. En el presente estudio determinó la efectividad de cuatro soluciones de propóleo (50mg, 75mg, 100mg y 125 mg) en el tratamiento de mastitis clínica bovina aguda y sub aguda en comparación a la Penicilina + Kanamicina. Se aplicó 10 ml de cada solución en vacas diagnosticadas con mastitis clínica, el seguimiento de la terapia se realizó con el reactivo de California Mastitis Test, para ver la evolución del caso clínico. Para determinar las bacterias causantes de mastitis clínica en el Establo San Isidro se tomaron 20 muestras de leche, se usó la prueba de difusión en placa en agar Muller Hilton para medir la susceptibilidad bacteriana a las diferentes soluciones de propóleo. En el presente trabajo se determinó que las soluciones de propóleo al 10% y 12,5% tienen una efectividad de 70 y 80% respectivamente. La bacteria más prevalente es el *Micrococcus sp* con 55% de prevalencia, seguido de *Staphilococcus aureus* con 20%, *Escherichia coli* 20% y *Streptococcus agalactiae* con 5%. Siendo el *Staphilococcus aureus* y *Micrococcus sp* sensibles a la solución de propóleo al 10% y 12,5% con halos de inhibición de 10 – 24 mm, en cambio *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli* son resistentes a todas las soluciones en estudio. En el análisis de costos se determinó que el tratamiento a base de propóleo al 12,5% es más económico que usar antibióticos comerciales.

Palabras clave: Mastitis bovina, propóleos, actividad antimicrobiana.

ABSTRACT

The bovine mastitis is a singular of complex diseases, which cause a lot of losses worldwide, is the most common cause for early slaughter of dairy cows as well as fertility problems. Propolis is a natural product produced by *Apis mellifera* with various medicinal properties, including antimicrobial. In the present study determined the effectiveness of four propolis solutions (50mg, 75mg, 100mg and 125 mg) in the treatment of bovine clinical mastitis acute and sub acute in comparison to penicillin + kanamycin. Applied 10 ml of each solution in cows diagnosed with clinical mastitis, monitoring of therapy was performed with the California Mastitis Test reagent, to see the evolution of the case. It took 20 samples of milk to determine the microorganisms present in the dairy San Isidro, and used the disk diffusion test in agar Muller Hilton for measuring bacterial susceptibility to different propolis solutions. The investigation determined that the solutions of propolis 10% and 12.5% had an effectiveness of 70 and 80% respectively. The most prevalent bacteria *Micrococcus sp* is the prevalence of 55%, followed by *Staphylococcus aureus* with 20%, 20% *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae* with 5%. *Staphylococcus aureus* and *Micrococcus sp* are sensitive to propolis solution 10% and 12.5% inhibition halos of 10 to 24 mm, but *Streptococcus agalactiae* and *Escherichia coli* are resistant to all solutions studied. In the cost analysis determined that the treatment with propolis is 12.5% cheaper than commercial antibiotics.

Keywords: Bovine Mastitis, propolis, antimicrobial activity.

I. INTRODUCCIÓN

La producción de leche en la actualidad se convirtió en la actividad económica principal de muchos productores en la región Apurímac, abasteciendo leche para los programas sociales y para el consumo de la población. Sin embargo las vacas que producen leche presentan como primer problema de salud a la mastitis, lo que conlleva a la aplicación de antibióticos para su tratamiento; se suma a esta problemática la falta de control para medir los residuos de antibióticos presentes en la leche, por lo que muchos productores seguirían destinando leche para el consumo humano, lo que implica un grave problema para la Salud Pública.

La mastitis bovina es uno de los problemas más costosos de la Industria Lechera. La reducción en producción de leche es el mayor gasto asociado con la mastitis subclínica y un costo importante también está asociado con la mastitis clínica. En general, las mastitis causan entre un 40 a 50% de disminución en los márgenes económicos netos por vaca, con la mayor parte de estas pérdidas debidas entre 5 a 7% por disminución en la cantidad de leche por lactancia. Las estimaciones de las pérdidas causadas por un menor rendimiento fluctúan entre 100 a 500 kg/vaca por lactancia, además de ser la causa más común para un sacrificio temprano de las vacas lecheras. El 26.5% de las vacas lecheras sacrificadas en el continente americano es debido a trastornos ocasionados por la mastitis (Philpot y Nickerson 2000).

En la actualidad se está investigando ampliamente el uso de nuevas alternativas a los antibióticos convencionales, las que incluyen sustancias químicas sintetizadas en laboratorios y productos que provienen de la naturaleza. Es así que etnofarmacólogos, botánicos, microbiólogos, y bioquímicos, están trabajando en la investigación de

sustancias fitoquímicas para desarrollar tratamientos contra enfermedades infecciosas basados en productos naturales (Rodríguez, 2007)

Recientemente, se ha puesto especial atención a las indicaciones médicas de un producto natural, denominado propolis o propóleos, el que ha mostrado interesantes propiedades medicinales. Propóleo fue usado por la medicina antigua durante cientos de años. Es un compuesto natural elaborado por abejas productoras de miel (*Apis mellifera*) a partir de la resina y exudados de varias plantas. Las abejas recolectan el exudado vegetal y forman pequeños grumos con sus mandíbulas, mezclando dicho exudado con cera y productos de las glándulas salivales de ellas mismas. El material resultante es usado para fortificar el panal, proveyendo protección frente a microorganismos, y como una sustancia para embalsamar el cuerpo de algún invasor, para que éste no se descomponga. Además, el propóleo presenta otras numerosas propiedades biológicas, entre las que se destaca su actividad antimicrobiana.

El objetivo de esta investigación fue determinar la efectividad terapéutica de cuatro soluciones de propóleo sobre la mastitis clínica bovina, para lo cual se realizaron pruebas en vacas con mastitis clínica aguda y subaguda, además de determinar la sensibilidad in vitro de las bacterias más importantes que causan mastitis clínica.

II. MARCO TEORICO

2.1. Antecedentes.

Shub *et al* (1978), preparó extractos de muestras de propolis recolectados en 18 regiones de la URSS. Estos extractos estaban diluidos en agar, en placas petri. Las placas fueron entonces inoculados con la bacteria *Bacillus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, y la *Candida albicans*, e incubados en 37 oC o 20-25 oC por 48h. Propolis en 125-500 ug/ml inhibió el crecimiento de *S. aureus* y *B. cereus*, pero a las otras 2 bacterias las inhibió a concentraciones superiores de 1000 ug/ml.

Kujumgiev *et al* (1999), evaluó la actividad antibacteriana de propóleos de distintas zonas geográficas se reporta que a pesar de las diferencias en su composición química todas las muestras evaluadas mostraron actividad contra bacterias Gram-positivas. Además en propóleos de zonas templadas los compuestos responsables de dicha actividad son flavonoides y ésteres de ácidos fenólicos. Sin embargo los propóleos de origen tropical no contienen tales sustancias, aun así muestran actividad antimicrobiana. El autor concluye que la combinación de diversas sustancias en los propóleos es esencial para su actividad biológica.

Díaz *et al* (2000), realizó una investigación para evaluar el efecto antibacteriano del propóleo a través de la determinación comparativa de la concentración mínima inhibitoria (CMI), todos los extractos de propóleos presentaron actividad antibacteriana frente a las cepas utilizadas; siendo mayor frente a las bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*, con valores de CMI entre 0.05 mg/mL y 45 mg/mL, que frente a las bacterias Gram negativas: *Salmonella typhimurium*,

Pseudomona aeruginosa y *Escherichia coli*, con valores de CMI entre 10 mg/mL y 50 mg/mL.

Velikova *et al* (2001), mediante difusión en agar, evaluaron la actividad antimicrobiana y la composición química de propóleos proveniente de Turquía frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, obteniendo resultados positivos para *Staphylococcus aureus*; para *Escherichia coli* obtuvieron una menor inhibición de crecimiento.

Hegazi *et al* (2002), demostró que propóleos de origen egipcio poseen la capacidad de inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, dos agentes importantes que causan mastitis clínica en el mundo. En esta investigación se reportan variaciones en la actividad antibacteriana causadas por el origen de los propóleos y la diferencia en su composición química

Tolosa y Cañizares (2002), realizó un estudio en Campeche, Mexico, obtuvieron y caracterizaron extractos etanólicos y acuosos de propóleos de diferentes localidades, probando posteriormente su efectividad antimicrobiana sobre las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus pyogenes*. Los extractos presentaron colores que variaron del ámbar claro al café oscuro, encontrándose un rendimiento en sólidos solubles totales superior en los etanólicos que en los acuosos. Se identificaron como metabolitos: lactonas, saponinas, fenoles, triterpenos, taninos, alcaloides, flavonoides, sustancias aminadas y leucoantocianidinas, estas últimas sólo en los extractos acuosos. La efectividad antimicrobiana de los extractos depende del solvente empleado, la procedencia del propóleo y de la especie bacteriana evaluada, siendo los extractos etanólicos los más efectivos, en particular los obtenidos de propóleos procedentes de Hampolol. La

especie bacteriana más sensible resultó ser la *Pseudomona aeruginosa* y la *Salmonella typhi* la más resistente.

Ortega y Vanegas (2006), evaluó la “Utilización de Propolina en el control de la mastitis bovina en fincas del municipio de Muy Muy - Nicaragua, para la cual se usaron soluciones de propolina al 1.5% y 3%. Cuyos resultados muestran que la solución de propolina al 1.5% alcanza una efectividad de 100% a los 35 días, y la solución de propolina al 3% alcanza una efectividad de 100 % a los 21 días, además reportaron que el cuarto mamario más afectado por la mastitis fue el anterior derecho, y concluyeron que es más económico un tratamiento a base de propolina.

2.2. Mastitis Bovina

2.2.1. Definición de la mastitis bovina.

La palabra mastitis deriva del griego, donde *mastos* significa “mama” e *itis* “inflamación del” Esta inflamación de la glándula mamaria resulta de: (1) traumatismos o lesiones en la ubre, (2) irritaciones químicas o, (3) más comúnmente, de infecciones causadas por microorganismos, especialmente bacterias. La reacción inflamatoria es un mecanismo de protección para: (1) eliminar los microorganismos, (2) neutralizar sus toxinas, y (3) ayudar a reparar los tejidos productores de leche para que la glándula pueda volver a funcionar normalmente (Philpot y Nickerson, 2000).

La mastitis es una inflamación de la glándula mamaria y sus tejidos secretores, que reduce la producción del volumen de leche, alterando su composición, además de elevar su carga bacteriana normal (Gasque, 2008)

Es un complejo singular de enfermedades, que causa una gran cantidad de pérdidas a nivel mundial y en especial en las regiones con una producción lechera intensiva. La causa más común para un sacrificio temprano de las vacas lecheras son

los problemas de salud de la glándula mamaria, además de problemas de Fertilidad. El 26.5% de las vacas lecheras sacrificadas en el continente americano es debido a trastornos ocasionados por la mastitis (Wolter *et al*, 2004)

La mastitis se clasificara en mastitis contagiosas que colonizan la glándula mamaria y que pueden ser propagados por la ordeñadoras mecánicas y por los ordeñadores, y la mastitis por patógenos ambientales que normalmente no infectan la glándula mamaria pero que la pueden infectar cuando el entorno de la vaca, los pezones, la ubre o la ordeñadora mecánica están contaminados con estos organismos y estos consiguen entrar en la cisterna del pezón (Rebhun *et al*, 1995).



Figura 1. Interacción de los factores de riesgo de la mastitis bovina.

Fuente: Philpot y Nickerson, (2000)

2.2.2. Clasificación de la mastitis bovina.

La mastitis bovina normalmente se da como resultado de la infección intramamaria por bacterias que pueden producir la enfermedad de manera clínica o subclínica (Dos Santos *et al.*, 2002).

Cuadro 1. Clasificación de la mastitis bovina

Formas de Mastitis	Vaca	Ubre	Leche
Clínica Hiperaguda	Muy enferma. Puede morir. No tiene coordinación muscular.	Fibrosis mamaria. Puede agravarse	Frecuentemente aguada y con manchas de sangre.
Clínica Aguda	No hay cambios observables	El cuarto afectado se muestra duro, rojo e inflamado.	Purulenta, como suero y acuosa.
Clínica subaguda	No hay cambios observables.	El cuarto afectado puede estar inflamado	No se ven cambios, pero la producción puede reducirse.
Subclínica	No hay cambios observables.	No hay cambios observables.	No hay cambios observables.

Fuente: Modificado de Philpot y Nickerson 2000.

a. Mastitis clínica.

La mastitis clínica es la enfermedad más común y más costosa en la producción de leche en los países industrializados. Es definida como una anomalía observada

por los ganaderos en cualquiera de los dos casos: la leche y/o la ubre (Tollersrud, 2001).

Se caracteriza por la tumefacción o dolor en la ubre, enrojecimiento, la leche presenta una apariencia anormal y, en algunos casos, hay aumento de la temperatura rectal, letargo, anorexia e incluso la muerte. Además, las bacterias están presentes en la leche, el rendimiento es muy reducido, y su contenido está alterado considerablemente (Heringstad *et al.*, 2000).

En algunos casos la inflamación de los cuartos mamarios es acompañada de signos clínicos (signos pronunciados de inflamación mamaria y de enfermedad sistémica), por lo que es diagnosticada entonces como mastitis clínica la cual puede presentarse de manera aguda y crónica (Djabri *et al.*, 2002).

En su forma aguda, la mastitis clínica se caracteriza por su condición de aparición súbita, la leche es de apariencia anormal, hay enrojecimiento, tumefacción, y dolor en la ubre, con o sin síntomas sistémicos. Afecta a las vacas lecheras en todo el mundo y tiene un impacto sustancial en la economía de las granjas, calidad de la leche y en el bienestar de las vacas (Morin, 2004).

En la forma crónica, se presenta una infección de la ubre de larga duración con leche de apariencia anormal y/o cambios al realizar la palpación del tejido de la ubre (Schrack *et al.*, 2001).

La mastitis clínica debida a *Escherichia coli*, estreptococos ambientales, y *Staphylococcus aureus* continua siendo un problema importante, y puede ser una condición aguda y dolorosa que afecta el comportamiento animal (Zadoks, 2002).

Las pérdidas causadas por mastitis clínica se clasifican según Wolter (2004), de la siguiente manera:

- Pérdida por baja producción del animal enfermo.
- Pérdida de producción de leche por desecho de la misma, durante la eliminación del medicamento.
- Frecuentemente hay un perjuicio duradero en el rendimiento lechero de la vaca, por el uso de medicamentos o la presencia de la enfermedad.
- Costos de medicamentos y del Médico Veterinario.
- Aumento en los costos de la mano de obra.

b. Mastitis subclínica

La mastitis subclínica es definida como la presencia de un microorganismo en combinación con un conteo elevado de células somáticas de la leche (Tollersrud, 2000).

La mastitis subclínica es sutil y difícil de corregir, la vaca parece saludable, la ubre no muestra ningún signo de inflamación y la leche parece normal, sin que existan cambios organolépticos en la misma. El número de células somáticas en la leche, indicativo de la respuesta inflamatoria, se encuentra elevado, al igual que el número de bacterias, lo que va acompañado de una disminución del nivel de producción de la secreción láctea, así como de la alteración de la composición de dicho producto. Comúnmente es de larga duración, difícil de tratar con los antibióticos, difícil de detectar, reduce drásticamente la producción de leche, afecta adversamente la calidad de leche, y puede servir como un reservorio para infectar a otros animales en el rebaño lechero (Valera *et al.*, 2005).

Cuando los signos no son visibles, la presencia de patógenos y las modificaciones citológicas de la leche traen como resultado una mastitis subclínica, por lo que las técnicas de laboratorio como la medición del conteo de células somáticas y

el cultivo bacteriológico son necesarios para detectar inflamación e infección (Djabri *et al.*, 2002).

La mastitis subclínica rara vez es peligrosa para el tejido mamario o para la vida de la vaca. Al no ser visible, muchos productores no toman conciencia de la cantidad de leche que dejan de ordeñar, ni de que la infección puede transmitirse a las otras vacas. Las especies de bacterias asociadas más frecuentemente con esta forma de infección de la ubre son los estafilococos, como *Staphylococcus aureus* y esp. *Staphylococcus* y algunos estreptococos, como *Streptococcus uberis* y *Streptococcus agalactiae* (Philpot y Nickerson, 2000)

En la práctica, los casos de mastitis subclínica con frecuencia no son detectados rápidamente, o pueden incluso no ser reconocidas por el ordeñador (Wellenberg *et al.*, 2002).

Es imperativo para los granjeros lecheros y sus asesores veterinarios enfocar su principal atención al control de la mastitis subclínica debido a que: (1) es 15 a 40 veces más prevalente que la mastitis clínica; (2) usualmente precede a la mastitis clínica; (3) es de duración prolongada; (4) es más difícil de detectar debido a la naturaleza oculta de la enfermedad; (5) reduce significativamente la producción láctea; (6) afecta adversamente la composición de la leche y (7) constituye un reservorio de patógenos causantes de mastitis que pueden diseminarse a otras vacas en el hato (Philpot y Nickerson, 2000).

2.2.3. Microorganismos que causan mastitis

Se han identificado más de 130 especies, subespecies y serovares de bacterias causantes de la enfermedad; sin embargo, más del 75% de los casos se deben a microorganismos Gram positivos, particularmente especies de los géneros

Staphylococcus y *Streptococcus*. La infección comienza con la presencia de microorganismos patógenos en el extremo del pezón, la penetración de los mismos a través del canal y su establecimiento final en la glándula mamaria. Una vez allí, invaden y producen daño en el tejido glandular cuya consecuencia directa es una disminución en la producción de leche (Scaramelli y Gonzales, 2005).

Desde el punto de vista epidemiológico, los patógenos causantes de la mastitis se han clasificado en los siguientes tres grupos, de acuerdo a su origen y forma de transmisión en el rebaño: Patógenos Contagiosos, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma bovis*, y *Corynebacterium bovis*; Patógenos Ambientales, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Arcanobacterium pyogenes* y muchos otros agentes y Patógenos Oportunistas, *Staphylococcus hycus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus intermedius* y muchas otras especies de estafilococos, que forman parte de la flora normal de piel (Scaramelli y Gonzales, 2005).

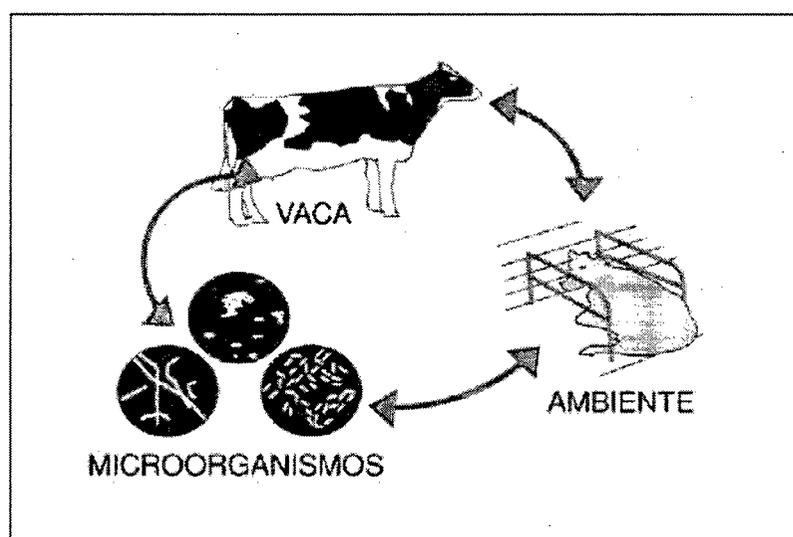


Figura 2. La mastitis es el resultado de la interacción entre la vaca, el entorno y los microorganismos. Fuente: Philpot y Nickerson, (2000).

a. Causas contagiosas.

La glándula mamaria bovina es el principal reservorio de los agentes infecciosos que causan mastitis contagiosa. El origen de infección suele ser una glándula mamaria infectada. La transmisión de la infección y las medidas de control apropiadas dependen de factores como la capacidad del agente patógeno en particular para sobrevivir en el hospedador. La gravedad de las respuestas sistémicas locales en las mastitis depende directamente de los factores de virulencia del agente patógeno (Quinn *et al*, 2002).

En este grupo de microorganismos se ubican: *Streptococcus agalactiae* el cual es un parásito estricto de la ubre bovina, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium bovis* y *Mycoplasma bovis*. Los dos primeros son los que prevalecen en explotaciones que carecen de programas de control de mastitis y buenas prácticas de ordeño. *Streptococcus agalactiae* generalmente causa una mastitis aguda que, en ausencia de tratamiento, tiene un curso crónico y subclínico, con eventuales episodios clínicos. El microorganismo induce un alto grado de inflamación, con gran aumento en el contenido de células somáticas. *Staphylococcus aureus* generalmente causa mastitis subclínica de larga data, con episodios clínicos recurrentes, gran aumento en el contenido de células somáticas y eliminación cíclica del agente; las infecciones crónicas no responden a los antibióticos y se recomienda la eliminación de los animales crónicamente infectados. *Corynebacterium bovis* es frecuentemente aislado del canal de pezón; causa mastitis subclínica con muy bajo grado de inflamación; es uno de los agentes más frecuentes en fincas en las que no desinfectan pezones. *Mycoplasma bovis* y otras especies de micoplasmas causan agalactia y un

desmejoramiento general en los animales afectados; suele afectar las cuatro glándulas y diseminarse rápidamente en el rebaño (Scaramelli y González, 2005).

▪ *Staphylococcus aureus*.

Los estafilococos son cocos Gram positivos, de aproximadamente 1 μm de diámetro, que tienden a aparecer en grupos irregulares parecidos a racimos de uvas. Las colonias son de tamaño mediano, doradas y son hemolíticas (Quinn *et al*, 2002).

La infección por *Staphylococcus aureus* es una causa habitual de mastitis bovina en muchas explotaciones lecheras a pesar de la aplicación de muchas medidas de control. *Staphylococcus aureus* puede colonizar la piel del pezón y el canal del pezón, lo que puede predisponer a la infección intramamaria. La tipificación de cepas ha demostrado que las cepas de *Staphylococcus aureus* que derivan de la ubre tienden a ser distintas de las que se aíslan de otros lugares del organismo. Aunque los estafilococos son microorganismos resistentes que pueden sobrevivir en el medio durante semanas, la transmisión de la infección suele tener lugar en el ordeño mediante las manos del ordeñador, las pezoneras o las toallas de secado de las ubres contaminadas (Rebhun *et al* 1997).

No obstante, la cura bacteriológica del cuarto afectado es algo que generalmente no se logra. La infección se disemina desde las vacas infectadas a las sanas durante el ordeño a través de la máquina de ordeño, las manos del ordeñador, y los materiales que se utilizan para limpiar los pezones, como las toallas, si se utiliza la misma en más de una vaca. El contacto con secreciones lácteas en el material de cama y breteles son puntos potenciales de infección. Las moscas pueden funcionar como vectores del *S. aureus*, transportándolo de un animal a otro (Ruegg, 2005).

Las vacas infectadas con *Staphylococcus aureus* pueden presentar múltiples episodios clínicos durante la misma lactancia. La leche de las vacas infectadas puede parecer normal o verse de otro color, con coágulos y grumos. Los recuentos de células somáticas generalmente son normales (<200,00 células/ml) o levemente elevados durante gran parte de la lactancia. Las vacas con infección crónica, pueden presentar abscesos o " nudos" en los cuartos que pueden ser palpados cuando la ubre esta vacía. Durante los episodios de enfermedad clínica, los cuartos pueden presentar una hinchazón de leve a moderada, y os recuentos de células somáticas pueden sobrepasar el 1, 000,000 de células/ml. Es raro que tanto una vaca como una ternera desarrollen gangrena o "bluebag" a causa de una infección a *Staphylococcus aureus*. Las terneras pueden infectarse en cualquier momento de la lactancia (Ruegg, 2005).

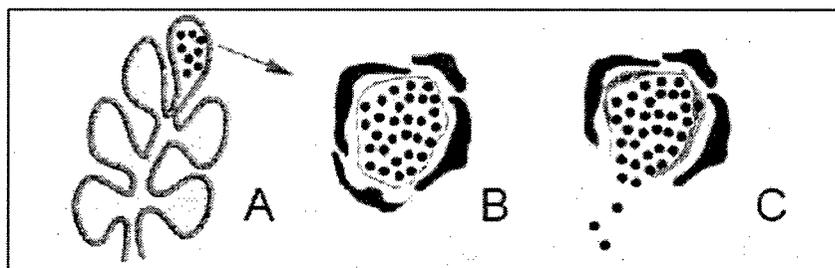


Figura 3. A. Infección por *Staphylococcus aureus* (●) forma bolsitas de infección en el tejido glandular. B. El sistema inmunológico de la vaca rodea estas áreas con leucocitos o tejido cicatrizal para mantener aislada a las bacterias. C. Las bacterias son liberadas periódicamente de estas áreas e infectan otros tejidos
Fuente: Philpot y Nickerson (2000).

- ***Streptococcus agalactiae*.**

Coco Gram-positivo, anti-hemolítico, colonias muy pequeñas. Produce una mastitis sumamente contagiosa y es transmitido de vaca a vaca durante la operación del

ordeño. Se presentan forma clínicas y subclínicas, en caso de *S. agalactiae*, el germen vive en los sueros de leche y la ubre. El tejido secretor se atrofia rápidamente o se hace fibroso e improductivo en forma permanente. La infección de *S. agalactiae* puede diseminarse rápidamente en hatos libres aun tras breve exposición, el único reservorio conocido son las ubres infectadas o lesiones en el pezón (Gasque, 2008).

Streptococcus agalactiae infecta principalmente la cisterna y el sistema ductal de la glándula mamaria. Se produce un irritante que causa inflamación de la glándula, que la mayoría de las veces es subclínica con síntomas clínicos ocasionalmente. La acumulación de desperdicios bacterianos intensifica la respuesta inflamatoria, resultando en destrucción del tejido productor de leche, reduciendo la producción de leche o causando agalactia. *Streptococcus agalactiae* rara vez produce enfermedad severa, pero el extensivo daño de un cuarto puede causar que en las subsiguientes lactaciones sea improductivo (Ruegg, 2005).



Figura 4. Las infecciones por *Streptococcus agalactiae* pueden reducir drásticamente la producción de leche. Fuente: Philpot y Nickerson, (2000).

▪ *Mycoplasma sp.*

Mycoplasma bovis es la causa más frecuente de la mastitis debida a *mycoplasma sp.* pero en varias partes del país han sido aisladas en la leche otras varias

especies. Las especies de mycoplasma producen epidemias de rebaño de mastitis aguda que subsiguientemente se convierten en mastitis crónica. Puede existir mastitis en un solo cuarteron pero en cada una de las vacas afectadas frecuentemente aparecen en dos o más cuarterones (Rebhun *et al*, 1997).

b. Causas ambientales de mastitis.

Las bacterias presentes en el medio ambiente, especialmente *E. coli* y *Streptococcus uberis*, son los microorganismos aislados con mayor frecuencia de los casos de mastitis clínica de muchos países. La contaminación de las puntas de los pezones es un factor predisponente fundamental para el desarrollo de las mastitis ambientales. Debido a que los agentes patógenos ambientales pueden sobrevivir y multiplicarse en los materiales orgánicos de las camas, las condiciones del alojamiento pueden influir sobre la tasa de contaminación de los pezones (Quinn *et al*, 2002).

Las mastitis por organismos coliformes son difíciles de diagnosticar por cultivo debido al bajo número de microorganismos que se eliminan en la leche (menos de 100 bacterias/ml) y la brevedad de la infección. Los estreptococos y enterococos que habitan en las vacas y su ambiente como *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus bovis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, entre otros, pueden causar cuadros subclínicos y también clínicos de diferente intensidad, desde leves hasta agudos, tanto en vacas en lactancia como secas, pero la infección es más frecuentemente en el período de seca (Scaramelli y Gonzalez, 2005).

▪ *Escherichia coli*.

La *Escherichia coli*, y diferentes especies de cepas coliformes se encuentran en el intestino grueso de animales de sangre caliente y se eliminan en heces fecales. Una

parte de esas enterobacterias saprofitas pueden causar daño en otros tejidos fuera del tracto gastrointestinal. Las mastitis por *Escherichia coli* se han observado frecuentemente en las primeras semanas de lactación, después del parto. Esta forma de mastitis transcurre de forma aguda e hiperaguda y en la mayoría de los casos con síntomas generales de infección. En los casos de mastitis con un desenlace mortal *E. coli* es el patógeno aislado con más frecuencia (Wolter *et al*, 2004).

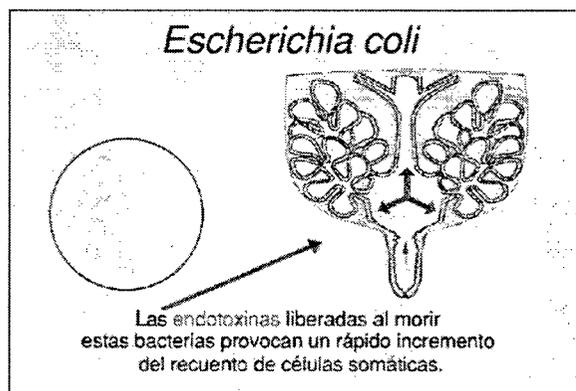


Figura 5. *Escherichia coli* libera endotoxinas, esto produce un rápido incremento de células somáticas. Fuente: Philpot y Nickerson, (2000)

▪ ***Streptococcus uberis*.**

Streptococcus uberis es omnipresente en todo el ambiente de la granja causa de la contaminación fecal por las vacas que albergan el organismo en su rumen. El organismo también se puede encontrar en los labios de la vaca, en la vagina, en los genitales externos, en la piel de los pezones y de la ubre. Por tanto *Streptococcus uberis* existente en los corrales contaminada, en los ambientes sucios, y el que coloniza la piel o las lesiones de los pezones representa un patógeno potencial. De igual modo a lo que sucede con otros patógenos ambientales, la limpieza y la preparación deficiente de la mama antes del ordeño predisponen a la mastitis causada por *Streptococcus uberis* (Rebhun *et al*, 1997).

- ***Streptococcus dysgalactiae*.**

Streptococcus dysgalactiae parece ocupar una posición intermedia entre los grupos de agentes patógenos causantes de mastitis contagiosas y ambientales. Se le puede encontrar en ambientes de las granjas bovinas y se ha aislado en tonsilas, boca, vagina de las vacas. Sin embargo, esas bacterias pueden permanecer en la glándula mamaria debido posiblemente a su capacidad de invadir células epiteliales mamarias de las vacas. Se puede transmitir de vaca en vaca durante el ordeño (Quinn *et al*, 2002).

2.2.4. Desarrollo de la mastitis.

El interior de cada cuarto mamario se compone de la cisterna del pezón, la cisterna de la glándula, numerosos conductos galactóforos y el tejido secretor. El interior de cada cuarto mamario se compone de la cisterna del pezón, la cisterna de la glándula, numerosos conductos galactóforos y el tejido secretor. Estos están recubiertos por cientos de células epiteliales que producen leche. Cada alveolo está rodeado por células musculares (mioepiteliales) que se contraen y evacuan la leche durante el ordeño. Los vasos sanguíneos transportan nutrientes hacia los alveolos, donde las células epiteliales los convierten en leche. Entre los ordeños, la leche se acumula en los alveolos, conductos y cisternas; durante el ordeño esta leche es evacuada a través del canal del pezón (Philpot y Nickerson, 2000).

a. Invasión del pezón.

La infección intramamaria se presenta cuando las bacterias atraviesan el canal del pezón y se multiplican dentro del cuarto afectado. Los microorganismos pueden invadir el canal del pezón por distintas vías: (1) entre ordeños las bacterias pueden avanzar por el canal del pezón por multiplicación, (2) pueden ingresar por la presión física ejercida sobre la punta del pezón cuando la vaca se mueve, (3) durante el ordeño

mecánico pueden ser impulsados hacia el canal del pezón o desde el mismo hacia el interior de la cisterna del pezón, por los impactos que causan las fluctuaciones de vacío contra el orificio del pezón y (4) durante la aplicación de un antibiótico pueden ser empujados físicamente a través del canal del pezón por la inserción completa de la cánula. La probabilidad de invasión se incrementa notablemente para las bacterias que colonizan la queratina del canal del pezón. El sellado con un germicida efectivo, tanto antes como después del ordeño, reduce marcadamente la colonización del canal del pezón (Philpot y Nickerson, 2000).

b. Establecimiento de la infección.

Algunas bacterias pueden avanzar dentro de la ubre atacando y colonizando nuevos tejidos; otras pueden moverse por medio de la corriente de leche producida por el movimiento de la vaca. Las bacterias dañan primero los tejidos que recubren los grandes tubos colectores de leche. Las bacterias pueden enfrentarse con leucocitos (células blancas de la leche) presentes naturalmente en bajas cantidades en la leche. Estas células son la segunda barrera de defensa debido a que pueden englobar y destruir a las bacterias. Durante este proceso, los leucocitos liberan sustancias que atraen a más leucocitos desde el torrente circulatorio hacia la leche. Si las bacterias no son totalmente destruidas, pueden continuar multiplicándose y comenzar a invadir los pequeños conductos y áreas alveolares. Las células secretoras de leche que son dañadas por las toxinas, liberan sustancias irritantes que conducen a un incremento en la permeabilidad de los vasos sanguíneos. Leucocitos adicionales se mueven al lugar de la infección. Ellos penetran el tejido alveolar en gran medida moviéndose entre el tejido secretor de leche dañado. Fluidos, minerales y factores de coagulación también se mueven dentro del área

infectada. La leche coagulada también puede cerrar conductos y, en efecto, aislar las regiones infectadas (Wolter *et al*, 2004)

c. Inflamación intramamaria.

El ingreso de leucocitos y fluidos desde la sangre constituye la respuesta inflamatoria. La inflamación puede ser leve, y no ser detectada por el ordeñador, o puede producir signos clínicos evidentes que pueden variar según la severidad de la enfermedad. La mastitis subclínica aumenta leve a moderadamente el recuento de células somáticas. Una inflamación severa con mastitis clínica provoca un movimiento masivo de leucocitos hacia la glándula. Según el grado de severidad de la infección estos cambios pueden ser acompañados por edemas, enrojecimiento e inflamación con secreciones anormales, aguachentas, que contienen fibrina, grumos y glóbulos rojos (Philpot y Nickerson, 2000)

a. Respuesta tisular a la infección.

La velocidad de llegada de células a la glándula mamaria es un factor importante en relación con la sensibilidad frente a mamitis, de modo que las vacas con un recuento celular bajo antes de la infección presentan riesgos superiores a enfermar con mastitis. Los neutrófilos son el principal tipo de célula implicado en la eliminación de las bacterias de la glándula mamaria. El reclutamiento de neutrófilos desde la sangre hasta el lugar de la infección como respuesta a diversos mediadores inflamatorios, como las citosinas y las prostaglandinas es uno de los primeros pasos de la reacción inflamatoria (Quinn *et al*, 2002).

2.2.5. Mecanismo de defensa de la glándula mamaria.

a. Barreras del pezón.

El esfínter del canal del pezón impide la entrada de bacterias. La amplitud del canal del pezón se encuentra en una íntima relación con el funcionamiento del esfínter. El crecimiento del epitelio se dirige hacia el exterior en la desembocadura del canal del pezón, lo cual también sirve para evitar la entrada de bacterias. Mediante el flujo hacia fuera de la leche (por la ordeña o cuando el becerro mama) son expulsados los agentes patógenos del canal del pezón. La roseta de Füstenberg forma una corona en el paso del canal del pezón a la cisterna de este. Los pliegues de la roseta de Füstenberg no solo tienen una función mecánica como mecanismo de cierre sino también sirve como mecanismo de defensa en ese lugar. La queratinización intensiva del epitelio del canal del pezón forma una capa lactosada bactericida que representa una barrera muy efectiva contra agentes extraños. Si bien ese tapón de queratina será lavado casi completamente durante la ordeña y después de 2- 3 horas del ordeño se restablece completamente la función de defensa del canal del pezón (Wolter *et al*, 2005).

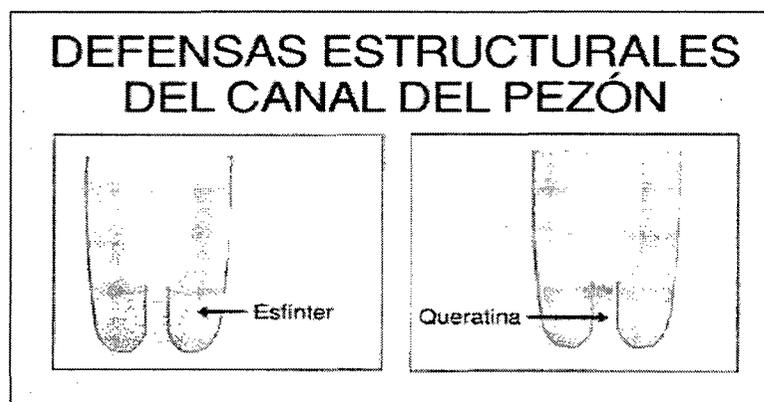


Figura 6. Defensas estructurales del canal del pezón. El esfínter cierra firmemente, y la queratina forma una barrera física. Fuente: Philpot y Nickerson, (2000).

b. Conducto del pezón.

El conducto del pezón también está revestido con la epidermis queratinizada y por ello está dotada de propiedades de defensa parecidas a la de la piel del pezón. Estas propiedades antibacterianas del conducto del pezón son sus propiedades más eficaces cuando el pezón está cerrado (Blowey y Edmonson, 2004)

c. Factores de defensa celular y humoral de la leche.

La leche tiene un efecto antibacteriano, debido al cual inhibe el crecimiento de bacterias y también mata o hace inofensivas a las bacterias. El efecto antibacteriano es debido a factores de defensa celulares y humorales. En esto intervienen los leucocitos polimorfonucleares, los linfocitos y los macrófagos (principal tipo celular en la leche). Los factores humorales son las inmunoglobulinas, factores del complemento, el sistema lactoperoxidasatiocianato- peróxido-hidrógeno, la lactoferrina y la lisozima. El paso rápido de los leucocitos sanguíneos a la luz alveolar es de los mecanismos naturales más importantes de defensa contra la mastitis (Wolter *et al*, 2004)

2.2.6. Resistencia bacteriana a los antibióticos.

En el tratamiento de la mastitis bovina se utilizan de forma generalizada agentes antimicrobianos. Los antibióticos empleados en el tratamiento de las mastitis se pueden administrar vía parenteral o por vía intramamaria. En el tratamiento de mastitis clínica aguda se utilizan con frecuencia la inyección intramuscular o intravenosa. En las mastitis agudas, los productos antimicrobianos administrados por vía intramamaria puede que no consigan alcanzar el lugar afectado debido a la obstrucción de los conductos galactóforos con exudados inflamatorios (Quinn *et al*, 2002).

Como los casos individuales de mastitis suelen estar producidos por una única especie bacteriana, el agente terapéutico seleccionado debería ser tan específico como sea posible. Según eso, deberían evitarse las combinaciones de antimicrobianos de amplio espectro. Aunque el tratamiento de las mastitis clínicas suele comenzar antes de la identificación del agente causal, los síntomas clínicos e historial previo de la explotación puede indicar cuál es el agente implicado con mayor probabilidad. Si es necesario el tratamiento puede modificarse con los resultados del antibiograma (Quinn *et al*, 2002).

El tratamiento de la mastitis causada por coliformes es sumamente polémico y aun se ha convertido en más polémico por el uso de fármacos no autorizados que han dado como resultado periodos de supresión prolongados o indeterminados. Varias investigaciones experimentales de la mastitis por coliformes ponen en evidencia que las infecciones se resuelven espontáneamente gracias a la afluencia de neutrófilos de la inflamación hacia la glándula mamaria y que la mayoría de los signos clínicos solo representan los efectos de las endotoxinas y de otros mediadores de la inflamación de la vaca (Rebhun *et al*, 1997)

2.2.7. Diagnóstico de la mastitis clínica.

a. Recuento de células somáticas.

Con el nombre de células somáticas se designa a las células del propio organismo. Por tanto, las células somáticas son células corporales. Éstas pasan a la leche procedente de la sangre y del tejido glandular. El contenido de células somáticas en la leche nos permite conocer el estado funcional y de salud de la glándula mamaria en periodo lactante; debido a su estrecha relación con la composición de la leche, es un criterio de calidad muy importante (Wolter W *et al*, 2004)

El recuento de células somáticas (RCS) está compuesto principalmente de glóbulos blancos. El porcentaje de los diferentes tipos de células somáticas presentes en la leche de una glándula sana es el siguiente: (1) macrófagos (60 %), (2) linfocitos (25 %) y (3) neutrófilos o leucocitos neutrófilos polimorfonucleares (15 %). Aprox. el 99 % de todas las células presentes en la leche de un cuarto infectado son glóbulos blancos, mientras que el 1% restante son células secretoras de leche provenientes del tejido mamario. Ambos tipos de células componen el RCS de la leche, que generalmente se expresa por mililitro (Philpot y Nickerson, 2000).

b. Pruebas en sala de ordeño.

▪ Examen Físico.

El examen físico deberá realizarse preferentemente con la ubre limpia e inmediatamente después de que la vaca haya sido ordeñada. La ubre se examina para detectar cuartos individuales que estén duros, hinchados y calientes a causa de la mastitis. También se observa si la glándula mamaria presenta cuartos malformados o atrofiados con áreas de tejido cicatrizal. Esto indicaría daño permanente a los tejidos de secreción de leche debido a una inflamación crónica (Philpot y Nickerson, 2000).

▪ Despunte.

Mientras se prepara la ubre para comenzar con el ordeño, se examinan los primeros chorros de leche. Este proceso comúnmente se denomina despunte y permite la detección de leche clínicamente anormal, que presenta alteraciones en la coloración, grumos, flóculos y aspecto líquido seroso. Esta leche no debe ser enviada al tanque. Además, el despunte ayuda a estimular la bajada de leche (Quinn *et al*, 2002).

▪ **California Mastitis Test. (CMT).**

El California Mastitis Test (CMT) estima el recuento de células somáticas (RCS) de la leche y puede realizarse al pie de la vaca para detectar mastitis. Los valores del CMT se relacionan con el número de células somáticas en la leche. El RCS es alto en los cuartos infectados con microorganismos causantes de mastitis, porque las células somáticas migran de la sangre hacia la leche como respuesta a la infección. Cuanto más severa la infección, mayor el RCS. Cuando el mismo supera las 200.000/ml, estamos en presencia de condiciones anormales en la ubre (Philpot y Nickerson, 2000).

Valoración del test de glóbulos blancos en la leche.

Según Neacato (2005) los resultados del test de california para mastitis se clasifican de la siguiente manera.

Reacción negativa (-) La mezcla de la leche con el líquido del test conserva su fluidez y no muestra alteraciones visibles. Contenido normal (hasta 500 000 glóbulos / ml.

Reacción ligeramente positiva (+) La mezcla se vuelve estriosa. El contenido de glóbulos blancos ha aumentado ligeramente (400 000 hasta 1.5 millones de glóbulos / ml.). La producción lechera disminuye.

Reacción positiva (++) Mezcla bastante musilaginosa (movimiento más lento de la mezcla). El contenido de glóbulos ha aumentado (800 000 hasta 5 millones de glóbulos / ml.). La producción de leche disminuye de forma considerable.

Reacción fuertemente positiva (+++) La mezcla aparece muy musilaginosa y gelatinosa, no fluye libremente y se forman grumos. El contenido de glóbulos se ha incrementado de forma ostensible (casi siempre por encima de 5 millones de glóbulos / ml.). La producción de leche disminuye de modo importante

c. Cultivo de muestras de leche.

El cultivo de la leche de cada vaca del hato puede ser indicado para: (1) identificar vacas para tratamiento, particularmente aquellas infectadas con *Streptococcus agalactiae* o (2) para apartar o eliminar, por ej., vacas con *Staphylococcus aureus* y *Mycoplasma bovis*. Los cultivos de cuartos individuales son indicados en el caso de mastitis inusual, severa o que no responde, para determinar su causa y para permitir mejores decisiones en cuanto a terapia y eliminación de vacas. El cultivo de muestras de leche de vacas representativas antes del secado y al parto, ayudará a evaluar el éxito del programa de tratamiento de las vacas secas y a comprender mejor qué organismos están causando la mastitis en el hato (Philpot y Nickerson, 2000)

2.2.8. Prevención y control.

La persistencia de la mastitis en los hatos lecheros puede atribuirse a: (1) prácticas de manejo deficientes, (2) rutina de ordeño incorrecta, (3) equipos de ordeño defectuosos, aunque este problema mejoró notablemente con respecto al pasado, (4) estabulación inadecuada, (5) ambientes con higiene deficiente, (6) fallas en la implementación de los métodos comprobados de control de mastitis, y (7) cría con el objetivo único de aumento permanente de producción. Todos estos factores, además de otros aún no identificados, probablemente predispongan a las vacas para contraer mastitis. La mastitis no se controla haciendo una sola cosa. Sino siguiendo varios pasos, generalmente llamados programa de control. Un programa de control debe: (1) prevenir un porcentaje sustancial de nuevas infecciones, (2) eliminar la mayoría de las infecciones instauradas, y (3) ser de fácil modificación en caso de que la investigación desarrolle nuevos métodos de control (Philpot y Nickerson, 2000).

a. De los microorganismos contagiosos.

Organismos contagiosos, para los cuales la fuente primaria es la glándula mamaria de la vaca, son transferidos principalmente por eventos asociados con el ordeño. Buenos procedimientos de ordeño, incluyendo la limpieza e higienización de los pezones durante el ordeño y el sellado de los pezones después del ordeño, ayudan a reducir la diseminación de la infección de una vaca infectada a una no infectada. En hatos infectados con *Mycoplasma*, el uso de guantes de hule o plástico durante el ordeño es altamente, las manos enguantadas deben desinfectarse entre vaca y vaca y secadas con toallas de papel. Algunos ensayos de investigación han indicado un adicional control de patógenos contagiosos mediante la desinfección automática de los colectores (retrolavado) o sumergiendo los colectores entre vaca y vaca en una solución desinfectante. Sin embargo, esta práctica en el campo ha tenido un mínimo efecto en reducir la tasa de nuevas infecciones, especialmente cuando son comparadas con lo que se puede obtener cuando un efectivo sellado de los pezones después del ordeño es usado apropiadamente (Ruegg, 2005).

b. De los microorganismos ambientales.

Las fuentes de los organismos ambientales son: (1) material de la cama, (2) estiércol, (3) suciedad y barro, (4) agua estancada y (5) pienso. La fuente más importante es el material de la cama, ya que los pezones están en contacto frecuente y prolongado con el mismo. Estos organismos no pueden sobrevivir por mucho tiempo sobre la piel de los pezones. Por eso es importante prevenir la contaminación de los mismos. Es un hecho conocido que tanto los estreptococos ambientales como los coliformes proliferan en todos los materiales orgánicos para cama, en especial si el contenido de humedad y la

temperatura ambiental favorecen la multiplicación microbiana (Philpot y Nickerson, 2000).

Otras fuentes de organismos ambientales son: (1) limpieza de ubres con trapos contaminados, (2) pasillos mojados y cubiertos de estiércol, (3) envases para varias dosis de antibióticos, (4) áreas alrededor de los comederos y (5) jeringas, cánulas o agujas contaminadas. Estos organismos también pueden ser empujados inadvertidamente hacia el interior de la glándula mamaria cuando se administran antibióticos, porque: (1) no se sanearon bien las puntas de los pezones, y (2) no se aplicó la técnica de inserción parcial de la cánula en el canal del pezón (Rebhun *et al*, 1997).

Los procedimientos que son altamente efectivos para controlar la mastitis contagiosa tienen limitaciones para controlar la mastitis ambiental. El punto más importante es disminuir la humedad del ambiente, así como la exposición de los pezones a potenciales patógenos ambientales. Esto vale tanto para el período de seca como durante toda la lactancia (Quinn *et al*, 2002).

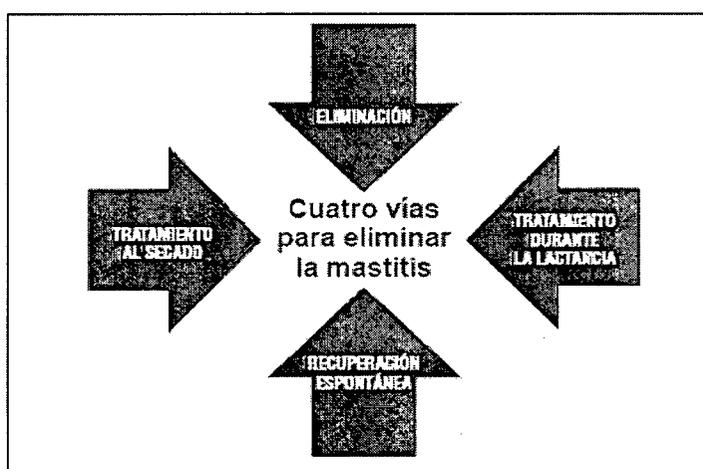


Figura 7. Eliminación de mastitis en un Hato lechero, Se han adoptado cuatro vías para controlar y eliminar la mastitis bovina. Fuente: Philpot y Nickerson, (2000).

2.2.9. Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina.

La mastitis bovina está considerada como la enfermedad que más pérdidas económicas ocasiona a los productores lecheros, pues su presencia en los establos se refleja en gastos excesivos en medicamentos para el productor y una disminución en los ingresos por decremento de la producción, que generalmente deberían percibirse dentro de la explotación (Medina, 2002).

Las pérdidas ocasionadas por esta enfermedad pueden agruparse de la siguiente manera: Disminución de la producción, descarte de leche, costo de medicamentos, honorarios veterinarios, trabajo extra, pérdida de potencial genético (Halasa *et al.*, 2007).

Los costos de mastitis en Estados Unidos son de alrededor de 107 a 180 dólares por vaca y en total las pérdidas anuales de la mastitis han sido estimadas entre 1.5 a 2 billones de dólares americanos u 11% de la producción de leche americana total (Bedolla, 2008).

Tabla 2: Impacto económico de la mastitis bovina

Perdidas	Porcentaje
Disminución de la producción	64,00
Descarte de leche después del tratamiento	14,00
Costo de medicamentos y honorarios profesionales	8,00
Muertes y descarte prematuro	13,00
Trabajo extra	1,00

Fuente: Modificado de Saran y Chaffer, 2000.

a. Pérdidas económicas producidas por mastitis clínica.

La mastitis clínica es una enfermedad costosa en las granjas lecheras de los Estados Unidos, con una tasa promedio de incidencia lactacional de 14.2%. Los costos de la mastitis clínica reportados por los granjeros varían de 108 a 122 dólares por caso, en base a medicamentos y veterinario, preventivos, de trabajo extra, desecho y pérdidas de leche (Heringstad *et al.*, 2000).

En cada caso de mastitis clínica los costos varían con la severidad del caso, el tiempo de respuesta del tratamiento, el desecho de leche anormal y los residuos de leche-medicamento (Heringstad *et al.*, 2000).

Tabla 3: Pérdidas económicas por vaca producidas por mastitis clínica.

Concepto	Perdida en dólares por vaca	Porcentaje
Menor producción láctea	55,00	51,50
Leche descartada	35,00	32,70
Medicamentos	12,00	11,20
Servicios veterinarios	2,00	1,80
Mano de obra extra	3,00	2,80

Fuente: Modificado de Philpot y Nickerson, 2000

b. Pérdidas económicas causadas por mastitis subclínica.

La mastitis subclínica es más importante y peligrosa en el ganado bovino productor de leche, porque al no poder medir su dimensión se le subestima, ya que produce bajas de productividad crónica con alteraciones imperceptibles en la leche, lo que suele provocar que se tomen medidas contra el proceso cuando ya la supresión de productividad es muy grande y el procedimiento para la curación es muy costoso (Reza, 2000).

La mastitis subclínica cuya frecuencia es de 20 a 50 veces superior a la mastitis clínica, es hoy en día el principal problema de todo el complejo patológico que representa la mastitis. Cuidadosos análisis indican que el 80% de las pérdidas de la producción de leche son debidas a las mastitis subclínicas. Aunque la mastitis subclínica no tiene ningún costo directo, la ubre infectada produce un 5% menos leche por cada 100 000 células somáticas adicionales en ml de leche (Quinn *et al*, 2002)

El costo atribuible a las formas subclínicas de mastitis asciende a la mayoría del costo total, que se ubica entre 100 y 150 dólares vaca/año o del 50 % al 80% de las pérdidas de producción total de la industria que proviene de mastitis, mientras que las pérdidas de producción de leche, debido a la mastitis subclínica, y los costos de reemplazo de vacas, asociados con las cuentas de las células somáticas, se estimó en 960 millones de dólares americanos (Wellenberg *et al.*, 2002).

2.3. Propóleos.

El propóleo es una sustancia resinosa elaborada por las abejas melíferas (*Apis mellifera*) a partir de los brotes y exudados de ciertas plantas. Una vez colectado, el material es enriquecido con secreciones salivares y enzimáticas, y usado para construir

y reparar la colmena. Sin embargo, el propóleo no sólo es un material de construcción, sino que también es el “arma química” de las abejas contra los microorganismos patógenos; la presencia de esta sustancia al interior de la colmena proporciona un ambiente inadecuado para el crecimiento de bacterias y otros microorganismos (Gómez *et al*, 2006).

2.3.1. Composición química.

Los compuestos en el propóleo sin procesamiento se originan de tres fuentes: exudado de plantas colectados por las abejas, productos metabólicos secretados por el insecto y, materiales introducidos durante la elaboración del producto (Marcucci, 1995).

El propóleo contiene una amplia variedad de compuestos químicos; se han identificado más de 300, tales como polifenoles (flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres, aldehídos, alcoholes y cetonas fenólicas), terpenoides, esteroides aminoácidos, y compuestos inorgánicos. Sin embargo, la composición de este producto de la colmena es altamente variable y dependiente de la flora local en el sitio de recolección (De Castro, 2001).

Así, algunos estudios han demostrado que los propóleos de regiones templadas (Europa, Norte América, Oeste de Asia) poseen como principales constituyentes compuestos fenólicos (flavonoides, ácidos cinámicos, y derivados), los cuales son colectados a partir de los exudados de diferentes brotes de álamo (*Populus spp.*), abedul (*Betula alba*), castaño de Indias (*Aesculus hippocastanum*) y otros árboles. No obstante, en las regiones tropicales donde está ausente esta vegetación, las abejas visitan otras plantas como fuente para la producción de propóleos, lo que conduce a diferencias en la composición química. En Brasil, por ejemplo, se han encontrado

como constituyentes principales de este producto apícola, terpenoides y derivados prenilados de ácidos p-cumáricos, mientras que en Chile se encontraron predominantemente lignanos y en Venezuela, Brasil y Cuba se hallaron benzofenonas (Silici y Kutluca, 2005).

El grupo más importante de compuestos encontrado en propóleos son los denominados fenoles, los cuales, constituyen más del 50% del peso total. Las propiedades médicas del propóleo son atribuidas principalmente a la presencia de estas sustancias. Más aún, la literatura apunta que algunas de las actividades pueden ser fuertemente relacionadas a los flavonoides, el principal compuesto fenólico del propóleo (Brushi *et al*, 2003)

El propóleo presenta una consistencia variable, dependiendo de su origen y de la temperatura. Hasta los 15°C es duro y se torna más maleable a medida que aumenta la temperatura. Su punto de fusión varía entre 60 a 70 °C, llegando en algunos casos hasta 100°C. Su color también es variable, de amarillo claro a marrón oscuro, pasando por una gran cantidad de tonos castaño. (Asís, 1996).

2.3.2. Mecanismo de acción.

La acción antibacteriana del propoleo utiliza varios mecanismos, tales como la formación de complejos streptocócicos pseudomulticelulares, desorganización del citoplasma, de la membrana plasmática, y de la pared celular, bacteriolisis parcial, e inhibición de la síntesis de proteínas. Además se observó una inhibición de la división celular en presencia de propolis, y este hecho sugirió que el propóleos podría actuar inhibiendo la replicación del DNA a través de la RNA polimerasa e, indirectamente, afectando la división celular (Takaisikikuni y Schilcher, 1994).

2.3.3. Composición según zona geográfica.

Se ha demostrado químicamente que los exudados de los árboles de tipo Poplar (*Populus alba*), son el principal recurso de propolis de zonas con clima mediterráneo como la zona norte de Europa, Sudamérica, y oeste de Asia (China). Menos comúnmente, en otras partes del mundo, especies como Bétula, Ulmus, Pinus, Quercus, Sálix, y Acacia son utilizadas como recurso para el propolis. Se ha demostrado además, que la composición química del género Poplar (*Populus*) incluye principalmente muchos tipos de flavonoides, flavonas y fenoles (Popova *et al*, 2005)

A diferencia de los anteriores, en países con clima tropical como Brasil los principales componentes del propóleo son, terpenoides y prenilados, los cuales derivan de ácidos cumarínicos. Esta diferencia ha sido explicada por el diferente origen vegetal de este propolis, el cual, pertenece principalmente al género *Baccharis sp* (Marcucci y Bankova, 1999)

a. Los Flavonoides.

Los flavonoides son pigmentos vegetales, sintetizados a partir del aminoácido fenilalanina, que generalmente exhiben brillantes colores como el de los pétalos de las flores. La mayoría de las veces emiten fluorescencia cuando son excitados por la luz UV, y se localizan en las células de las plantas verdes. Los flavonoides son usados por los botánicos para clasificación taxonómica. Ellos regulan el crecimiento de las plantas e influyen en otras células biológicas de diversas maneras. Los flavonoides inhiben o destruyen muchas especies bacterianas, inhiben importantes enzimas virales, tales como la transcriptasa reversa y otras diversas proteasas, y además, destruyen algunos importantes protozoos (Havsteen, 2002).

Poseen actividad antialérgica, antiinflamatoria, antioxidante, atrapadora de radicales libres, antimutagénica y moduladora de actividad enzimática. Además, se puede decir que aportan grandes beneficios para la salud al actuar como agentes quimiopreventivos en cáncer y prevención de ataques al corazón. (Havsteen , 2002).

Tabla 4. Flavonoides presentes en el propóleo.

Grupo	Compuesto
Flavonoles	Quercetina, Kaempferol galangina, fisetina
Flavononas	Pinocembrina, naringenina, herperidina.
Flavonas	Apigenina, acacetina, crisina, luteolina.

Fuente: Viuda *et al*, 2008.

b. Acacetina.

Tiene propiedades antiinflamatorias, recientemente se ha visto que es un poderoso inhibidor de enzimas presentes en el Citocromo P450 (pertenecientes a la familia de las enzimas denominadas CYP1), que estarían involucradas en el metabolismo de los hidrocarburos policíclicos aromáticos y hormonas. Por ello se especula que estas enzimas tendrían un rol importante en la aparición de algunos tipos de cáncer, más aún, que han sido detectadas en algunas muestras de tejidos cancerígenos (Jin *et al*, 2005).

c. Galangina

Es uno de los flavonoides que con mayor frecuencia se han encontrado en propóleos, presenta actividad antimutagénica, antioxidante, secuestrador de radicales libres y modulador de actividad de enzimas metabólicas, pero se le destaca principalmente por su capacidad antigenotóxica como un potente agente

quimioprotector frente al cáncer. Además posee actividad antibacteriana (Jin *et al*, 2005).

2.3.4. Propiedades antimicrobianas.

Numerosas propiedades biológicas se han asociado con el propóleo, incluyendo antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiinflamatoria, antitumoral, antioxidante. Se pueden distinguir innumerables usos para el propóleo en diferentes industrias: farmacéutica (tanto en medicina humana como medicina veterinaria), agrícola, cosmética, y alimentaría (Matsuka, 2000).

a. Antibacteriana.

La actividad biocida del propóleos estudiada frente a bacterias de interés en medicina, ha mostrado resultados alentadores *in vitro* e *in vivo*, ya que inhibió el crecimiento de bacterias aerobias y anaerobias, tanto Gram positivo como Gram negativo. Sin embargo, se ha señalado que el efecto del propóleo en contra de bacterias Gram positivo y levaduras, es mayor que sobre bacterias Gram negativo (Drago *et al*, 2000).

b. Antiviral.

También se ha evaluado la actividad antiviral de propóleos sobre ADN y ARN de virus de herpes simples tipo I y tipo II, adenovirus tipo II, virus de estomatitis vesicular y poliovirus tipo II. Encontrando que los propóleos son capaces de inhibir la propagación de virus herpes y poliovirus, mostrando menor efecto sobre el virus de estomatitis vesicular y adenovirus (Silici y Kutluca, 2005).

c. Antifúngica.

En cuanto a la actividad antifúngica y antiviral, se ha reportado que propóleos de distintas zonas geográficas poseen actividad contra *Candida albicans* y el virus de

la influenza aviar. La actividad observada en las muestras de propóleos fue similar a pesar de las diferencias en su composición (Drago *et al*, 2000).

d. Cicatrizante y anti-inflamatorio.

El propóleos ganó espacios importantes en el tratamiento de heridas, por su capacidad antibacteriana y por su notable capacidad cicatrizante y anti-inflamatoria. Esto último es comparable a la de anti-inflamatorios de síntesis como el diclofenaco. Se señaló al ácido cafeico como responsable de inhibir la dihidrofolato reductasa, reduciendo la producción de interleuquinas y prostaglandinas (Ramos y Miranda, 2007).

e. Inmunomodulador.

Diversos trabajos demuestran que el propóleos estimula la inmunidad inespecífica y la específica, tanto inmunidad celular (linfocitos T) como la humoral (linfocitos B). En ratones infectados con el virus influenza tipo A y tratados con propóleos, se constató un aumento de los linfocitos T, un mayor nivel de fagocitosis y una menor mortalidad, en comparación con animales testigo no tratados (Ramos y Miranda, 2007).

2.3.5. Métodos de extracción de propóleos.

Martínez *et al* (2005), realizaron la extracción en un equipo soxhlet industrial de 300 L durante 56 h, alternando 8 h de extracción a 45°C -50 °C y 16 h de maceración, tomando muestras a las 24 h, 48 h y 56 h. Como solvente se empleó etanol a 70 °GL y 85 °GL. Determinación de sólidos totales: se tomaron 10 mL de las muestras a los tiempos señalados anteriormente y se colocó en balanza Sartorius hasta peso constante. Finalizada la extracción, se trasvasó el extracto para un tanque colector enchaquetado para su enfriamiento a 10 °C. Posteriormente se sometió a un proceso de

centrifugación continua hasta 160 rpm y se determinó el propóleo extraído como porcentaje de sólidos en la muestra. El extracto así obtenido se estandarizó a 5 % de sólidos totales para su posterior uso.

Campo (2007), preparo la solución madre de propóleo bajo el siguiente protocolo: tomaron 35,6 g de la muestra M-A y se extrajeron por maceración con metanol (6 X 50 mL) durante una hora, empleando agitación esporádica con el uso de un agitador de vidrio. Los extractos metanólicos, filtrados por embudo de vidrio normal con algodón desengrasado, se reunieron y concentraron a sequedad en un rotoevaporador Büchi (40 °C) a presión reducida. El extracto seco se conservó en desecadora a vacío.

Ortega y Vanegas (2006) preparo la solución madre de propóleo bajo el siguiente detalle: 20 gramos de propóleos para 80 ml de alcohol al 70 % para obtener una solución madre, se diluyo por varios días a una temperatura de 37 a 38° hasta disolver totalmente el propóleos en el alcohol.

Neacato (2005), describe la preparación de la solución madre de la siguiente manera: obtenido el propóleo libre de impurezas se procedió a mezclar en una proporción de: 300g de propóleo, aforando este peso a 1000g con etanol de 96° de uso interno, sin antiséptico (alcohol potable). - Posteriormente se colocó esta mezcla en vidrio, se los recubrió con papel aluminio, de esta manera se aisló la mezcla de la luz del sol. - Durante nueve días se procedió a agitar la mezcla durante quince minutos diarios en tres intervalos de cinco minutos cada uno. Se aseguró que el sedimento que quedó pese de 30 a 33% menos del peso inicial de la masa, de esta manera se aseguró la obtención de un extracto etanólico con la mayor concentración posible.

2.3.6. Toxicología del propóleo.

Múltiples estudios realizados en el mundo han demostrado la buena tolerancia y la inocuidad de este producto natural administrado por vía oral, no lográndose establecer la dosis letal 50 por su alta tolerancia (Ortega, 2006).

Para el estudio de toxicidad aguda oral se emplearon ratas Sprague-Dawley de ambos sexos, realizándose un ensayo límite donde se clasificó al extracto de propóleos en la categoría “sin clasificar”, al ser administrado a una dosis de 2 g/Kg por vía oral en ratas. El estudio de irritabilidad dérmica se desarrolló en conejos albinos F1 machos, obteniéndose un índice de irritación primario igual a cero, con el cual se clasifica al producto como no irritante (Pérez *et al*, 2003)

Su toxicidad a células animales es baja. Muchos profesionales están incrementando el uso de flavonoides puros para tratar muchas importantes enfermedades, debido a su comprobada habilidad de inhibir enzimas específicas, simular algunas hormonas y neurotransmisores, y eliminar radicales libres (Havsteen, 2002).

2.4. Definición de términos.

Alcaloide: Sustancia nitrogenada básica encontrada en las plantas y muchas son farmacológicamente activas.

Agar: Es una mezcla compleja de sales de polisacáridos, fundamentalmente, galactósidos. Las grandes moléculas que lo constituyen determinan sus cualidades sobresalientes, como coloides y espesantes, es usados para hacer medios de cultivo.

Antibacteriano: Relativo a una sustancia que destruye bacterias o inhibe su crecimiento o reproducción.

Antimicrobiano: Sustancia que impide el desarrollo de los microbios: bacterias hongos protozoos y virus.

Célula somática. Célula del cuerpo, incluye principalmente glóbulos blancos que migran hacia la ubre durante la inflamación de la ubre, y un pequeño porcentaje de células epiteliales de tejido productor de leche.

Discos de sensibilidad: Discos de papel filtro de alta calidad de aproximadamente 6 mm de diámetro, impregnados con cantidades exactas de antibióticos u otros agentes quimioterapéuticos.

Endotoxina: Toxina termoestable asociada con las membranas externas de ciertas bacterias Gram negativas, como brucelas, enterobacterias, neiserias y vibrios. Las endotoxinas no son productos de secreción externa, solo se liberan cuando se desintegra la célula.

Fenol: Término genérico para cualquier compuesto orgánico que contiene uno o más grupos hidroxilo unidos a un anillo aromático o de carbono y se emplea como agente antibacteriano.

Fibrosis: Reemplazo de tejido productor de leche infectado, por tejido fibroso conectivo o cicatrizal, que protege los focos infecciosos contra las drogas.

Inflamación: Estado en que el organismo de la vaca busca eliminar o neutralizar a los microorganismos invasores y reparar los tejidos dañados

Mastitis clínica subaguda: Inflamación de la ubre que es levemente clínica, los síntomas se limitan a grumos o flóculos en la leche.

Mastitis clínica: Inflamación de la ubre caracterizada por anomalías visibles en la ubre y/o leche.

Mastitis crónica: Inflamación de la ubre que continúa por un período de tiempo prolongado, con desarrollo progresivo de tejido cicatrizal, merma de producción de leche, y brotes ocasionales de mastitis clínica.

Mastitis hiperaguda: Inflamación de la ubre con efectos sistémicos como depresión, aceleración del pulso, deshidratación y diarrea.

Microorganismos ambientales: Especies de bacterias que crecen en el entorno de las vacas y entran en contacto con la ubre durante el intervalo entre ordeños, causando la infección de la ubre.

Microorganismos contagiosos: Especies de bacterias que crecen en la ubre y suelen transmitirse de vaca en vaca durante el ordeño.

Queratina: Sustancia cerosa producida por las células que rodean el canal del pezón, que hace de tapón entre los ordeños y reduce la penetración de los microorganismos.

Recuento bacteriano: Cantidad de bacterias presentes en un mililitro de leche.

Recuperación espontánea: La capacidad de una vaca de curarse sola de una infección de la ubre, sin la ayuda de antibióticos u otras drogas.

Saponina: Grupo de glucósidos ampliamente distribuidos en las plantas, y que se caracterizan: 1) por su propiedad de formar espuma duradera cuando se agitan sus soluciones acuosas; 2) por su capacidad para disolver eritrocitos incluso en altas diluciones, y 3) por su contenido en sapogenina como agluconas.

Tejido cicatrizal: Tejido fibroso acumulado en la ubre después de una infección, y que reemplaza en forma permanente al tejido productor de leche, impidiendo que las drogas alcancen los focos de infección.

III. MATERIALES Y METODOS.

3.1. Materiales

3.1.1. Material Biológico: Vacunos del establo San Isidro para las pruebas *In*

Vivo.

a. Vacas tratados con propóleo al 5,0 y 7,5%.

Identificación	Nº Lactación	Edad	Raza
6877	4ta lactación.	6	Holstein
7379	3ra lactación	4	Holstein
7393	3ra lactación.	5	Holstein
7467	2da lactación.	3	Holstein
7482	2da lactación.	4	Holstein
7685	1era lactación.	2	Holstein

b. Vacas tratadas con propóleo al 10,0 %.

Identificación	Nº Lactación	Edad	Raza
756	5ta lactación.	8	Holstein
872	5ta lactación.	7	Holstein
892	4ta lactación.	7	Holstein
6681	5ta lactación.	6	Holstein
7253	2da lactación.	4	Holstein
7273	2da lactación.	3	Holstein
7463	2da lactación.	3	Holstein
7487	2da lactación.	4	Holstein
7571	1era lactación.	3	Holstein
7581	1era lactación.	2	Holstein

c. Vacas tratadas con propóleo al 12,5%.

Identificación	Nº Lactación	Edad	Raza
889	4ta lactación.	5	Holstein
928	2da lactación.	3	Holstein
1066	2da lactación	2	Holstein
6498	5ta lactación.	7	Holstein
7042	4ta lactación.	6	Holstein
7244	3ra lactación.	5	Holstein
7268	3ra lactación.	4	Holstein
7274	3ra lactación.	4	Holstein
7482	3ra lactación.	5	Holstein
7571	3ra lactación.	5	Holstein

d. Vacas tratadas con Penicilina + Kanamicina (grupo testigo).

Identificación	Nº Lactación	Edad	Raza
800	4ta lactación.	6	Holstein
897	4ta lactación	5	Holstein
6678	4ta lactación.	6	Holstein
6693	6ta lactación.	9	Holstein
7010	4ta lactación.	6	Holstein
7228	3ra lactación.	5	Holstein
7300	3ra lactación.	5	Holstein
7463	2da lactación.	4	Holstein
7494	2da lactación.	3	Holstein
7638	1ra lactación.	2	Holstein

Fuente propia.

3.1.2. Del terapéutico.

El propóleo fue recolectado por el Laboratorio Algas Marinas y la solución madre fue elaborado en sus instalaciones, las diferentes soluciones hidro alcoholicas fueron procesados en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

La composición aproximada del propóleo del laboratorio Algas Marinas es:

Tabla 4. Composición Aproximada del Propóleo Bionaturista.

COMPOSICIÓN	(%)	COMPUESTOS, CARACTERISTICAS Y OBSERVACIONES
Resinas	50	Flavonoides, ácidos fenólicos y ésteres.
Ceras	25	Cera de abeja y de origen vegetal
Aceites esenciales	10	Volátiles.
Ácidos grasos	5	La mayoría proceden de la cera y restos de vegetales.
Polen	5	Vitaminas B1, B2, B3, B6.
Otros compuestos	5	14 oligoelementos: predominan Fe y Zn; Cetonas, quinonas, esteroides, esterres.

Fuente: Laboratorio Algas Marinas, 2011.

3.1.3. Cepas bacterianas para las pruebas *In Vitro*.

Para realizar la actividad antimicrobiana *In vitro* de las diferentes soluciones de propóleo se utilizaron cepas bacterianas aisladas de vacas con mastitis clínica.

Gram negativa.

- *Escherichia coli*, cepa aislada de muestras de leche con diagnóstico de mastitis clínica.

Gram positiva.

- *Staphilococcus aureus*, cepa aislada de muestras de leche con diagnóstico de mastitis clínica.
- *Streptococcus agalactiae*, cepa aislada de muestras de leche con diagnóstico de mastitis clínica.
- *Micrococcus sp*, cepa aislada de muestras de leche con diagnóstico de mastitis clínica.

3.1.4. De laboratorio.

a. Dilución de la solución madre.

- Propóleo al 25 %.
- Agua destilada.
- Vasos precipitados, capacidad 20 ml, 50 ml, 100 ml, 500 ml.
- Botellas color ámbar, capacidad 100 ml.
- Probetas, capacidad 50 ml, 100 ml.
- Estufa.
- Etiquetas.
- Registros de sanidad.

b. Cultivo y evaluación antibacteriana.

- Medios de cultivo (Agar sangre, Agar Müller Hilton).
- Discos de papel filtro 6 mm para antibiograma.
- Suero fisiológico.
- Agua destilada.
- Escala nefelométrica de Mc Farland.
- Hisopos largos de madera.

- Mechero a gas.
- Cámara de flujo.
- Cubre y portaobjetos.
- Pinzas de laboratorio clínico.
- refrigeradora

3.1.5. De campo

Para toma de muestras.

- Colector para fluidos biológicos Samplix® Estéril.
- Colector multiusos – estéril Aky®
- Pañitos desinfectantes con alcohol.
- Geles refrigerantes.
- Cooler para transporte de muestras.
- Registros.

a. Para pruebas in vivo.

- Propóleo al 5 %; 7,5 %; 10,0%; 12,5%.
- Jeringas descartable de 10 ml.
- Cánulas intramamarias desechables.
- Soluciones de propóleo al 10 y 12.5 %.
- Alcohol antiséptico.
- Reactivo California Mastitis Test.
- Raqueta para prueba CMT.
- Cámara fotográfica.
- Registros individuales.
- Selladores de pezones.

3.2. Medios de cultivo.

- Agar Mueller – Hilton.
- Agar Sangre.
- Agar Mac Conkey.

3.3. Equipos.

- Microscopio compuesto.
- Autoclave de acero inoxidable.
- Estufa
- Cámara de flujo.

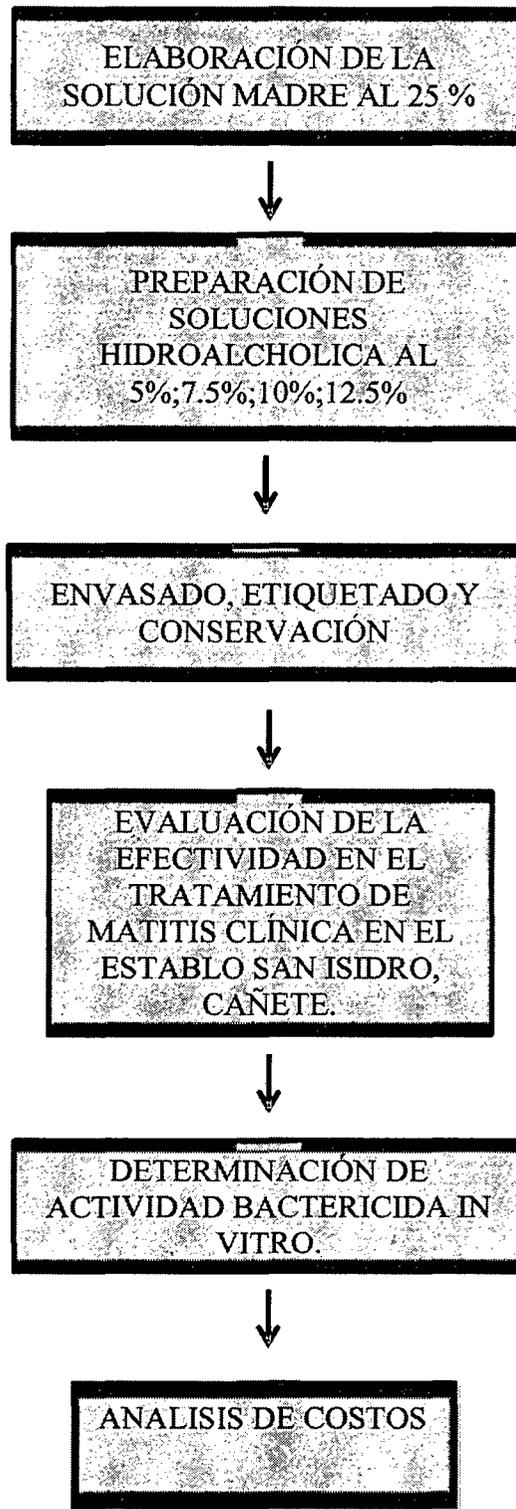


Figura 9. Diagrama de flujo general para determinar la actividad terapéutica del propóleo en mastitis clínica bovina.

3.4. Métodos.

3.4.1. Criterios de inclusión a las pruebas.

- Se incluyeron vacunos con mastitis clínica aguda o sub aguda.
- No fueron incluidos vacunos con signos y síntomas de mastitis ambiental por coliformes (hiperaguda), debido a que implicaba la vida del animal y la terapia compleja que se empleaba.
- No fueron incluidos vacunos con mastitis gangrenosa causada por *Staphilococcus aureus*.
- Los vacunos que no mostraron mejorías al cuarto día de iniciado el tratamiento fueron tratados con un antibiótico por vía parenteral (Enrofloxacin al 10 %).

3.4.2. Manejo y alimentación de los animales.

El tipo de ordeño practicado en el establo San Isidro es el ordeño mecánico en dos turnos: de 4:00 AM a 12:00 PM; y de 4:00 PM a 12 AM, además en el establo San Isidro se practica el ordeño eficiente que incluye: lavado, desinfección con solución de pre sellado, secado y sellado de pezones, además de desinfectar las unidades de ordeño antes de ordeñar a la siguiente vaca.

La alimentación se basaba en una dieta de maíz forrajero fresco, ensilado de maíz forrajero, alimento balanceado, y camote molido, cuya distribución era de acuerdo a un horario establecido.

Como medidas de control para bajar la incidencia de mastitis clínica se realizaba las siguientes actividades: terapia de secado a base de Cloxacilina y Neomicina, vacunaciones contra mastitis con Hipramastibac, Tratamiento de los casos clínicos a base de antibioterapia, hidroterapia y aplicación de antiinflamatorios.

Los antibióticos usados para el tratamiento de las mastitis clínicas son los siguientes; Enrofloxacina al 10%, Gentamicina, Penicilina + Estreptomina, Trimetropin + Sulfametoxazol, Penicilina + Kanamicina.

3.4.3. Etapa I - Preparación de la tintura madre al 25 %.

La tintura madre al 25 % fue elaborado por el laboratorio Algas Marinas del Biólogo Blas Silva. Es un producto estandarizado y elaborado bajo las normas adecuadas, además cuenta con las certificaciones internacionales SQF 2000, HACCP, GMP, ISO 9001.

Obtención de los extractos de propóleo (Protocolo del laboratorio Algas Marinas).

1. Cosecha del propóleos en apiarios (las colmenas son de las abejas del género y especie *Apis mellifera*)
2. Almacenado del propóleo en bolsas atóxicas transparentes (que se usan para conservar alimentos.
3. Se coloca de manera conjunta en bolsas oscuras alejado de la luz (los principios activos del propóleo se oxidan en presencia de la luz)
4. Se transporta hacia el laboratorio
5. En el laboratorio se eliminan las impurezas burdas (alas, patas y cuerpos de abejas, porciones de cera, etc)
6. Se congela la masa de propóleo a temperatura de -20 A -40 °C por 48horas.
7. Se procede a pulverizar la masa de propóleo (uso de mortero o sistema mecánico)

8. Extracción con alcoholica al 96% (se coloca 25 g de propóleo en 100 ml de la solución alcoholica)

9. Proceso de maceración por 4 días a 37 °C.

10. Se procede a la filtración del extracto

11. Se estandariza (cada envase contenga el 25% de los principios activos del propóleo que son los aceites esenciales, resinas, bálsamos.

12. Envase en frascos color ámbar de 100 ml.

13. Conservación en lugar seco y fresco alejado de la luz

Se obtiene un extracto de propóleo al 25% (concentración 250mg/ml)

Las diferentes soluciones se elaboran diluyendo 100 ml de la tintura madre en agua destilada hasta obtener:

- Solución de extracto de propóleo a 50 mg/ml.
- Solución de extracto de propóleo a 75 mg/ml.
- Solución de extracto de propóleo a 100 mg/ml.
- Solución de extracto de propóleo a 125 mg/ml.

3.4.4. Etapa II – Preparación de las soluciones hidroalcoholicas de propóleos al 5 %; 7,5 %; 10 %; 12.5 % (Protocolo propio).

Las diferentes soluciones hidroalcoholicas fueron preparados en el laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria Zootecnia bajo el siguiente detalle.

Tabla 5. Dilución de la solución madre para obtener las diferentes concentraciones.

Concentración de una dosis de propóleo.	Solución madre al 25 %	Agua destilada	Concentración mg/ml
5.0 %	100 ml	400 ml	50 mg/ml.
7.5 %	100 ml	230 ml	75 mg/ml.
10.0 %	100 ml	250 ml	100 mg/ml
12.5 %	100 ml	100 ml	125 mg/ml.

Después de ser preparados las diferentes concentraciones de propóleo fueron envasadas en botellas de 100 ml color ámbar y etiquetados con sus respectivas concentraciones.

3.4.5. Etapa III – Recolección de muestras de leche de vacas con mastitis clínica.

a. Toma de muestras (Iñiguez, 2011).

No se deben tomar muestras de vacas que hayan recibido tratamiento antibiótico. Antes de tomar la muestra, la ubre debe estar limpia y seca. La recolección de las muestras de leche se debe hacer antes del ordeño y en forma aséptica para evitar contaminación con microorganismos que alteren el resultado de la prueba.

- En un recipiente estéril con tapa, se escribió el número de la vaca, la fecha y el cuarto del que se tomó la muestra.
- Se limpió la punta del pezón con una toalla desechable impregnada en una solución de alcohol al 70 %.
- Se eliminó los primeros chorros de leche (despunte).

- Se destapo el envase aséptico, manteniéndolo en posición horizontal para evitar entrada de suciedad que altere los resultados.
- Se ordeño algunos chorros de leche dentro del tubo sin llenarlo completamente.
- Tapamos el envase y lo colocamos en refrigeración hasta el traslado de la muestra.

b. Envío de muestras al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM.

Las muestras fueron enviadas al laboratorio dos horas después de tomadas las muestras, estas fueron transportadas en un Cooler con geles refrigerantes. Las muestras llegaron al laboratorio en un tiempo de cuatro horas después de la toma de muestras.

3.4.6. Etapa IV – Evaluación *In Vivo* de la efectividad de los propóleos en el tratamiento de mastitis clínica bovina.

a. Evaluación de la toxicidad de soluciones de propóleo (Protocolo propio).

- Esta prueba se realizó en 2 vacunos del establo San Isidro.
- Se aplicó 10 ml en un cuarto mamario para evaluar reacciones adversas que puedan presentarse después de la aplicación del producto.
- Se evaluaron los siguientes datos: irritación, reacción anafiláctica, inhibición de la producción láctea.
- Los resultados se recogieron en la ficha.

b. Aplicación de las soluciones de propóleo (Protocolo propio).

- Se lavó las ubres con agua y solución desinfectante de yodo al 2 %.
- Posteriormente se secaron con papel toalla desechable.
- Se realiza el despunte de los cuartos mamarios (los primeros chorros de leche serán desechados).
- En la paleta de CMT se vierten 2ml por cada cuarto mamario.
- Se realizó la prueba de California para la Mastitis, para ver la evolución de la infección.
- Seguidamente se realizara el ordeño completo de todos los cuartos mamarios.
- Para la aplicación de las soluciones de propóleos se usaron jeringas desechables por cuarto mamario afectado.
- Además se usaron cánulas intramamarias desechables para la aplicación de las soluciones.
- Se aplicó una dosis de 10 ml según la solución.
- Se selló las ubres con una solución de yodo.
- La desinfección de las manos se realizara también con Virkons.

c. Evaluación de la efectividad de las diferentes concentraciones.

- Para evaluar la efectividad en el tratamiento de mastitis clínica se consideró los casos recuperados sobre los casos tratados, además el número de dosis usado para la recuperación del cuarto mamario.

3.4.7. Etapa V - Evaluación In Vitro de la actividad bactericida de las soluciones de propóleos (LABVETSUR).

Para determinar la actividad antibacteriana de las diferentes soluciones de propóleo se aplicó la técnica de difusión en agar.

Se inició preparando las concentraciones respectivas de propóleo cuya unidad de medida fue ug/ul, los discos utilizados fueron de papel filtro con diámetro de 6 mm, al cual se le agrego las concentraciones correspondientes.

a. Cultivo de muestras de leche con mastitis clínica.

- Las muestras de leche se refrigeraron hasta su procesamiento.
- Se prepararon los diferentes agares para cultivo bacteriano (agar sangre, agar Muller Hilton).
- Con una anza se tomó una gota de la muestra de leche y se procedió a hacer el cultivo bacteriológico en agar sangre y agar Muller Hilton.
- Los cultivos se incubaron a 37°C por 24 horas.

b. Aislamiento de las cepas bacterianas de muestras de leche con mastitis clínica.

- Después de 24 horas se retiran las placas para ver si hubo crecimiento bacteriano.
- Se procede a identificar a las bacterias que tuvieron crecimiento mediante, tamaño de la colonia, color de la colonia, hemolisis y pruebas específicas.

c. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana, método de Kirby – Bauer

- Una vez identificado las cepas bacterianas, se diluyo cada cepa en un envase estéril con 2 ml de agua bidestilada hasta obtener una dilución de Mc Farland 0.5

- Se prepararon las soluciones experimentales y los controles en 6 tubos de ensayo.
- Se procedió a realizar la siembra de las bacterias en las placas petri que contienen el agar Muller Hilton, mediante un hisopo(el cual se pasaba de manera uniforme sobre la placa).
- Luego colocamos los discos de papel en las placas de agar a una distancia no menor de 15 mm entre si y a 1.5 cm del borde de la placa.
- Aplicamos las soluciones, una en cada disco, mediante una micropipeta de 20 ul.
- La siembra de las soluciones se realizó por cada género de bacteria y por triplicado.
- Las placas son incubadas a 37°C por 24 horas.
- Los resultados son recogidos en la ficha.

3.5. Diseño Experimental.

Para determinar la efectividad de las soluciones de propóleo para el tratamiento de mastitis clínica se usó un diseño completamente aleatorio (DCA), en este diseño no existe ninguna restricción de aleatoricidad por lo que se le asignación de los tratamientos a las unidades experimentales será completamente aleatoria (Esto quiere decir que cualquier distribución de los tratamientos en las unidades experimentales es igualmente probable)

Tabla 6. Esquema del diseño experimental.

Repeticiones	Tratamientos con soluciones de propóleo				
	T1	T2	T3	T 2	TESTIGO
	5 %	7,5%	10%	12.5 %	Penicilina + kanamicina
R1					
R2					
R3					
R4					
R5					
R6					
R7					
R8					
R9					
R 10					

3.6. Procesamiento estadístico de datos.

El procesamiento de datos estadísticos se realizó con el programa SPSS 17. Convenientemente se aplicó el ANOVA con estadístico de “F” calculado al 5 %, posteriormente se determinó la significancia por la prueba de comparación de medias Duncan.

IV. RESULTADOS

4.1. Evaluación de la efectividad de los propóleos en el tratamiento de mastitis

clínica bovina

Tabla 7. Efectividad de los tratamientos a base de propóleos.

Repeticiones	Tratamientos con soluciones de propóleo				
	T1	T2	T3	T4	TESTIGO
	5%	7,5%	10 %	12.5 %	Penicilina + Kanamicina
R1	0	0	1	1	1
R2	0	0	1	1	1
R3	0	0	1	1	1
R4			1	1	1
R5			1	1	1
R6			0	1	0
R7			0	1	1
R8			1	0	1
R9			1	1	1
R 10			0	0	0

Fuente propia: 0 = No efectivo; 1 = Efectivo.

La tabla 7 nos muestran los efectos terapéuticos de las diferentes soluciones de propóleo y del tratamiento testigo (Penicilina + kanamicina); las soluciones de 5 % y 7,5% no tienen efectividad para curar casos de mastitis clínica, esto puede ser debido a que la concentración mínima bactericida del propóleo sea mayor a 75 mg/ml (7,5%). En cambio el tratamiento al 10% tiene una efectividad del 70 %, lo que nos indica que la concentración a 100 mg/ml es la concentración mínima bactericida del Propoleo Bionaturista para bacterias causantes de mastitis clínica bovina. El tratamiento al 12,5 % tiene una efectividad del 80%, con estos resultados se puede afirmar que la concentración

de 125 mg/ml de propóleo es la adecuada para realizar tratamientos de casos clínicos de mastitis bovina aguda y sub aguda.

Análisis de Varianza Eficacia de Tratamiento con Propóleo de la Mastitis

Se comparó solamente el grupo control y las soluciones de propóleo al 10% y 12,5%, debido a que las soluciones al 5 y 7,5 % no presentaron ninguna actividad antibacteriana in vivo e in vitro.

1. Donde se propuso: La efectividad de las soluciones propóleo al 10 %; 12,5% y testigo en el tratamiento de mastitis clínica bovina son iguales.

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$$

Al menos dos son diferentes

$$H_1: \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$$

2. $\alpha = 0,05$

El cuadro de análisis de varianza, se muestra a continuación

Tabla 8: Análisis de varianza efectividad de los diferentes tratamientos

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	G.L.	CUADRADO MEDIO	F
TRATAMIENTO	0,067	2	0,033	0,170
ERROR	5,300	27	0,196	
TOTAL	5,367	29		

3. Determinando la región crítica:

La región crítica para nuestros datos, dado que: $f_{(2, 27)} = 3,354$

$$RC = [3,354 ; \infty >$$

4. Decisión: Dado que el valor de $f_c = 0,170 \notin RC = [3,354 ; \infty>$, aceptamos la hipótesis nula (H_0) y rechazamos la hipótesis alterna (H_1), con lo que concluimos que la efectividad de los tres tratamientos es la misma, con un nivel significancia de 0,05.

5. Interpretación: No hay diferencia significativa en cuanto a la efectividad de los tratamientos a base de propóleo al 10%, 12.5% y la Penicilina + Kanamicina. Eso nos indica que la capacidad bactericida de las soluciones de propóleo es comparable al antibiótico comercial.

4.1.1. Efectividad de propóleos al 5 y 7,5% en el tratamiento de mastitis clínica bovina.

Tabla 9a. Efectividad de propóleo al 5 %

Identificación	Cuarto mamario afectado	Recuperación del cuadro clínico	Nº de dosis usado	Días tratados	CMT.				
					Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
7685	AD	NO	8	4	++	++	++	++	
6877	PD	NO	8	4	+++	+++	++	++	
7482	AD	NO	8	4	++	++	++	++	

Tabla 9b. Efectividad de propóleo al 7,5 %

7393	PI	NO	8	4	+++	+++	+++	++	
7467	AI	NO	8	4	+++	++	++	++	
7379	AD	NO	8	4	++	++	++	++	

Fuente Propia: AD (Anterior derecho), AI (Anterior izquierdo), PI (Posterior izquierdo).

De acuerdo a la tabla 9a y 9b se observa que los porcentajes de 5 y 7.5% de propóleo no tuvieron ningún efecto terapéutico en el tratamiento de la mastitis clínica, estos resultados coinciden con los resultados in vitro, en los cuales se observa que a estas concentraciones el propóleo no presentan halos de inhibición bacteriana. Se usaron 8 dosis por cada vaca tratada, lo que corresponde a cuatro días de tratamiento. Al no

tener ningún efecto curativo al cuarto día se decidió hacer el cambio de tratamiento a Enrofloxacina al 10%.

4.1.2. Efectividad de propóleos al 10,0 % en el tratamiento de mastitis clínica bovina.

Tabla 10. Efectividad de propóleo al 10 %.

Identificación	Cuarto mamario afectado	Recuperación del cuadro clínico	Nº de dosis usado	Días tratados	CMT.				
					Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
756	AI	SI	8	4	+++	++	++	T (N)	
872	AD	SI	9	5	+++	++	++	+	N
7571	AD	SI	8	4	+++	++	++	T (N)	
7273	AI	SI	9	5	+++	++++	++	T	N
7253	AD	SI	8	4	++	++	+	T(N)	
892	PI	NO	10	5	+++	+++	++	++	++
7463	AI	NO	10	5	+++	+++	+++	++	++
6681	PD	SI	10	5	+++	++	++	+	N
7487	AD	SI	7	4	++	+	T	N	
7581	PD	NO	10	5	++	++	++	++	++

Fuente propia: AD (Anterior derecho), AI (Anterior izquierdo), PD (Posterior derecho), PI (Posterior izquierdo), T (Trazas), N (Negativo).

La tabla 10 nos muestra el resultado de los tratamientos a base de soluciones de propóleo al 10 %, de las 10 vacas tratadas con la solución de propóleo 8 vacas mostraron una evolución positiva del caso clínico, esto nos indica que la actividad bactericida del propóleo es a concentraciones mayores de 100 mg/ml; las vacas 892, 7463, 7581 no mostraron mejoría al quinto día del tratamiento, al no tener una evolución favorable se cambió el tratamiento por un producto parenteral (Enrofloxacina al 10%)

4.1.3. Efectividad de propóleos al 12,5 % en el tratamiento de mastitis clínica bovina.

Tabla 11. Efectividad de propóleo al 12,5%.

Identificación	Cuarto mamario afectado	Recuperación del cuadro clínico	N° de dosis usado	Días tratados	CMT.				
					Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
889	AI	SI	7	4	+++	++	+ (T)	N	
7482	AD	SI	6	3	++	+	T (N)		
7274	AD	SI	7	4	+++	++	+ (T)	N	
1066	PD	SI	9	5	+++	+++	++	T	N
7268	AD	SI	6	3	++	+	T (N)		
928	AD	SI	8	4	+++	++	++	T (N)	
6498	AD	SI	6	3	++	+	T(N)		
7244	PI	NO	10	5	+++	+++	+++	++	++
7671	AD	SI	8	4	+++	++	+ (T)	N	
7042	PD	NO	10	5	++	++	++	++	++

Fuente propia: AD (Anterior derecho), AI (Anterior izquierdo), PD (Posterior derecho), PI (Posterior izquierdo), T (Trazas), N (Negativo).

La tabla 11 nos muestra el resultado del tratamiento a base de propóleos al 12,5%, que tuvieron una efectividad del 80%, para tratar casos clínicos de mastitis aguda y sub aguda, con una media de 7.7 dosis aplicadas, una desviación estándar de 1.567 y una varianza de 2.456. Estos resultados coinciden con las pruebas *in vitro* donde se observa que la solución a 125 mg/ml tiene mayores halos de inhibición bacteriana.

4.1.4. Efectividad de la penicilina + kanamicina en el tratamiento de mastitis clínica bovina.

Tabla 12. Efectividad de Penicilina + Kanamicina.

Identificación	Cuarto mamario afectado	Recuperación del cuadro clínico	N° de dosis usado	Días tratados	CMT.				
					Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
897	AI	SI	7	4	+++	++	+ (T)	N	
6678	PD	SI	7	5	+++	++	++	T	N
800	PD	SI	8	4	++	++	+	T (N)	
7494	AD	SI	7	5	+++	++	++	T	N
7300	AI	SI	8	6	+++	+++	++	++	+ (N)
6693	AD	NO	10	5	+++	+++	++	++	++
7638	PD	SI	5	4	++	++	+	N	
7228	AD	SI	8	5	+++	++	++	+	N
7010	PI	SI	9	6	+++	+++	++	++	+ (N)
7463	AD	NO	10	5	+++	++	++	++	++

Fuente propia: AD (Anterior derecho), AI (Anterior izquierdo), PD (Posterior derecho), PI (Posterior izquierdo), T (Trazas), N (Negativo).

La tabla 12 nos muestra el resultado del tratamiento testigo a base de penicilina + Kanamicina, que tuvieron una efectividad del 80%, para tratar casos clínicos de mastitis aguda y sub aguda, con una media de 7.9 dosis aplicadas, una desviación estándar de 1.524 y una varianza de 2.322. Las vacas identificadas como 7463 y 6693 no respondieron al tratamiento al quinto día de iniciado este, por lo que se cambió a un tratamiento parenteral a base de Enrofloxacin al 10 %.

**4.1.5. Estadísticos respecto al número de dosis en los tratamientos al 10%;
12,5%; testigo (Penicilina + Kanamicina)**

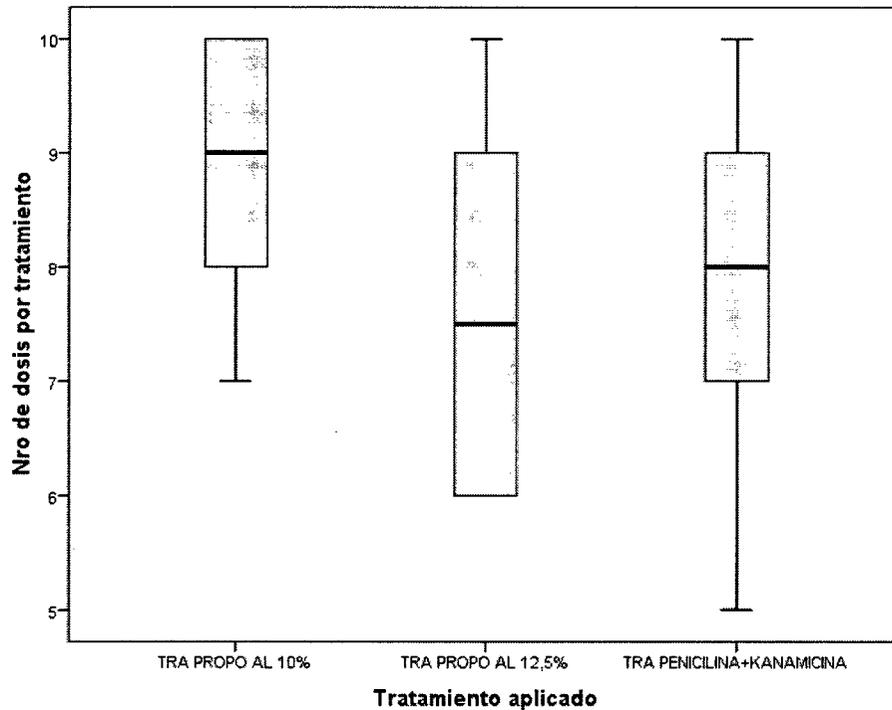
Tabla 13: Estadísticos, Número de dosis usado por tratamiento.

	Nro de dosis Tratamiento con propóleo al 10%.	Nro de dosis Tratamiento propóleo al 12,5 %	Nro de dosis Penicilina+ Kanamicina.
Animales tratados	10	10	10
Media	8.9	7.7	7.9
Desviación estándar	1.101	1.567	1.524
Varianza	1.211	2.456	2.322

Fuente propia.

Esto nos permite mencionar que las dosis al 5 y 7.5% no son efectivas para el tratamiento de la mastitis bovina, de la misma manera nosotros concluimos que los porcentajes de 10 y 12.5 % son efectivas.

Gráfico 01: Diagrama de cajas: número de dosis usado en el tratamiento de mastitis clínica.



El gráfico 01 muestra el número de dosis usado en los diferentes tratamientos, la solución de propóleo al 10% requiere entre 8 -10 dosis para un tratamiento efectivo; la solución de propóleo al 12,5% requieren entre 6-9 dosis para una terapia efectiva y la Penicilina + Kanamicina requiere un promedio de 7-9 dosis para un resultado efectivo.

4.2. Agentes bacterianos causantes de mastitis clínica en el establo San Isidro (agroindustrias San Isidro S.A)

- *Micrococcus sp.* (55%) 11 muestras positivas de 20 muestras.
- *Staphilococcus aureus.* (20%) 4 muestras positivas de 20 muestras.
- *Escherichia coli.* (20%) 4 muestras positivas de 20 muestras.
- *Streptococcus sp.* (5%) 1 muestras positivas de 20 muestras.

Estos resultados nos muestran que en el establo san Isidro el principal problema que causa mastitis clínica bovina es a la mala práctica de los BPO (buenas prácticas de ordeño), que es la principal causa de las mastitis contagiosas. Además se puede confirmar que las infecciones causadas por *Streptococcus* sp han sido controlados con la antibioterapia aplicada.

4.3. Presencia de halo de inhibición sobre bacterias que causan Mastitis Clínica.

4.3.1. Presencia de halo de inhibición sobre *Staphilococcus aureus*.

Tabla 14. Halos de inhibición antibacteriana de propóleos frente a *Staphilococcus aureus*.

<i>Staphilococcus aureus</i> .	Diámetro del halo (incluido el disco) mm			Promedio
	Placa 1 6 ul	Placa 2 10 ul	Placa 3 50 ul	
Propóleo 50 mg	6 mm	6 mm	6 mm	6mm
Propóleo 75 mg	6 mm	6 mm	6 mm	6mm
Propóleo 100 mg	6 mm	12 mm	12 mm	10 mm
Propóleo 125 mg	6 mm	15 mm	20 mm	13,67 mm
Solución madre 250 mg	14 mm	20 mm	20 mm	18 mm
Penicilina	26 mm	26 mm		26 mm

Fuente propia. La tabla 14

El extracto de propóleo 125 mg (12,5 %), tiene un halo de inhibición bacteriana promedio de 13,67 mayor que a las otras concentraciones en prueba, pero su halo fue menor que la penicilina.

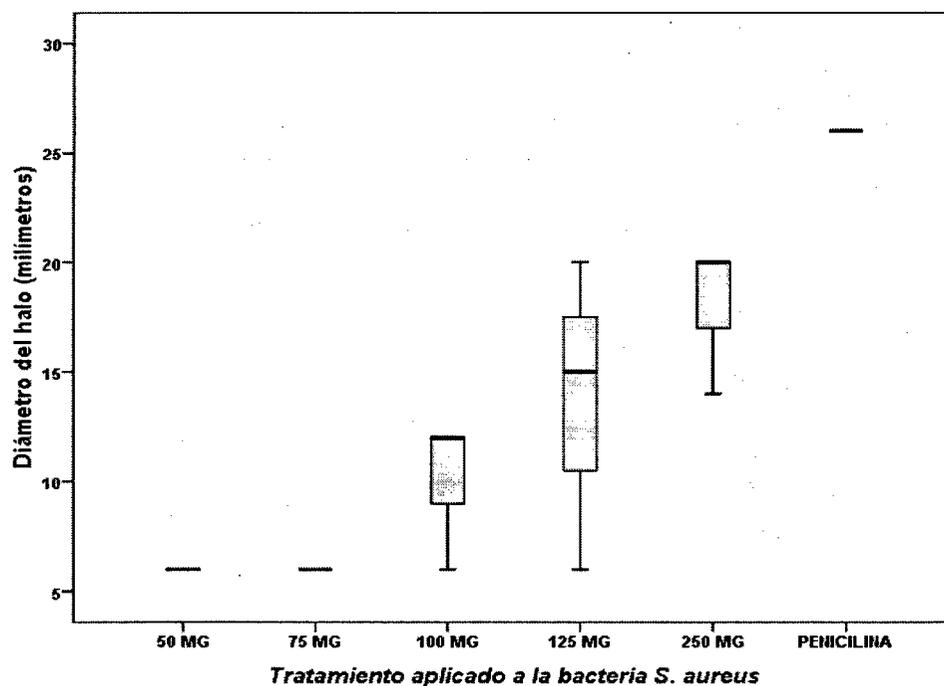
Tabla 15. Estadísticos de los halos de inhibición bacteriana de las diferentes concentraciones de propóleo.

	Propóleo 50 mg	Propóleo 75 mg	Propóleo 100 mg	Propóleo 125 mg	Propóleo 250 mg	Penicili na
N° Placas	3	3	3	3	3	3
Media	6.00	6.00	10.00	13.67	18.00	26.00
Mediana	6.00	6.00	12.00	15.00	20.00	26.00
Moda	6	6	12	15	20	26
Desviación estándar	0	0	3.464	7.095	3.464	0
Varianza	0	0	12	50.3	12	0

Fuente propia.

GRÁFICO 02: Diagrama de cajas: Diámetro de halos de inhibición según

tratamiento aplicado en *Staphilococcus aureus*.



En el grafico se puede observar la acción bactericida de las diferentes soluciones de propóleo, la solución al 5% (50mg); 7,5% (75mg); no tuvieron ninguna acción bactericida, la solución al 10% (100mg) tuvo halos de inhibición de 8 a 12 mm; y la solución al 12,5%(125mg) tuvo halos inhibitorios de 16 - 20mm, lo cual demuestra la sensibilidad del *Staphilococcus aureus* a las soluciones de 10% y 12,5%.

Podemos demostrar la sensibilidad del *Staphilococcus aureus* comparándolos con los estudios de Neacato (2007), donde encontraron halos de inhibición del extracto etanólico de propóleo que varían entre 10 – 13 mm. Estas dimensiones no están alejadas de las encontradas por otros autores. Brumfitt *et al.* (1990), En cuyos experimentos encontró halos de inhibición de *Staphylococcus aureus* con diámetros

que varían entre 7 – 14 mm (media = 13 mm), en discos de papel filtro (diámetro = 6 mm) impregnados con extracto etanólico de propóleo al 10 % es decir un radio de inhibición medio de 6.5 mm

Análisis de Varianza Sensibilidad del *Staphilococcus aureus*

1. Los diámetros de halo de inhibición para el *Staphilococcus aureus* son iguales para los diferentes concentraciones de propóleo.

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$$

Al menos dos de los diámetros halos son diferentes.

$$H_1: \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$$

2. $\alpha = 0,05$
3. El cuadro de análisis de varianza, se muestra a continuación

Tabla 16: Análisis de varianza halos de inhibición bacteriana de propóleos frente a *Staphilococcus aureus*.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	G.L.	CUADRADO MEDIO	F
DIÁMETRO DE HALO	595,167	5	119,033	73,883
ERROR	19,333	12	1,611	
TOTAL	614,500	17		

4. Determinando la región crítica:

La región crítica para nuestros datos, dado que: $f_{(5, 12)} = 3,106$

$$RC = [3,106 ; \infty >$$

5. Decisión: Dado que el valor de $f_c = 73,883 \in RC = [3,106 ; \infty >$, rechazamos la hipótesis nula (H_0) y aceptamos la hipótesis alterna (H_1), con lo que concluimos

que los diámetros de halo son diferentes para los diferentes concentraciones de propóleo, con un nivel significancia de 0,05.

4.3.2. Presencia de halo de inhibición sobre *Streptococcus agalactiae*.

Tabla 17. Halos de inhibición antibacteriana de propóleos frente a *Streptococcus agalactiae*.

<i>Streptococcus agalactiae</i> .	Diámetro del halo (incluido el disco) mm		
	Placa 1 6 ul	Placa 2 10 ul	Placa 3 50 ul
Propóleo 50 mg	6 mm	6 mm	6 mm
Propóleo 75 mg	6 mm	6 mm	6 mm
Propóleo 100 mg	6 mm	6 mm	6 mm
Propóleo 125 mg	6 mm	6 mm	6 mm
Solución madre 250 mg	6 mm	10 mm	6 mm
Penicilina	30 mm	30 mm	

La prueba de sensibilidad bacteriana por el método de difusión en placa nos indica que la bacteria *Streptococcus agalactiae* es resistente a todas las soluciones de propóleo. La solución madre (250 mg) presenta un halo de inhibición de 4 mm en la segunda placa, a diferencia de la penicilina que tiene un halo de inhibición de 30 mm, lo que demuestra su efectividad frente a este microorganismo.

4.3.3. Presencia de halo de inhibición sobre *Escherichia coli*.

Tabla 18. Halos de inhibición antibacteriana de propóleos frente a *E. coli*.

<i>Escherichia coli</i>	Diámetro del halo (incluido el disco) mm		
	Placa 1 6 ul	Placa 2 10 ul	Placa 3 50 ul
Propóleo 50 mg	6 mm	6 mm	6 mm
Propóleo 75 mg	6 mm	6 mm	6 mm
Propóleo 100 mg	6 mm	6 mm	6 mm
Propóleo 125 mg	6 mm	6 mm	6 mm
Solución madre 250 mg	6 mm	13 mm	10 mm
Gentamicina	14 mm	14 mm	

Fuente propia

La prueba de sensibilidad bacteriana por el método de difusión en placa nos indica que la bacteria *Escherichia coli* es resistente a todas las soluciones de propóleo. La solución madre (250 mg) presenta un halo de inhibición de 7 mm en la segunda placa y 4 mm en la tercera placa a diferencia de la gentamicina que tiene un halo de inhibición de 14 mm, que nos indica que la *Escherichia coli* también es resistente a la Gentamicina.

4.3.4. Presencia de halo de inhibición sobre *Micrococcus sp.*

Tabla 19. Halos de inhibición antibacteriana de propóleos frente a *Micrococcus sp.*

<i>Micrococcus sp.</i>	Diámetro del halo (incluido el disco) mm		
	Placa 1 6 ul	Placa 2 10 ul	Placa 3 50 ul
Propóleo 50 mg	6 mm	8 mm	8 mm
Propóleo 75 mg	6 mm	8 mm	8 mm
Propóleo 100 mg	10 mm	16 mm	18 mm
Propóleo 125 mg	10 mm	18 mm	20 mm
Solución madre 250 mg	15 mm	22 mm	25 mm
Penicilina	25 mm	25 mm	25 mm

Fuente propia.

La solución de propóleo 125 mg tiene un halo de inhibición de 16 mm promedio, es mayor a las otras concentraciones en estudio, pero demuestra que el *Micrococcus sp* es sensible a las concentraciones del 10 y 12,5 %.

4.4. Costos económicos en el tratamiento de las mastitis clínicas.

Tabla 20. Costos en Nuevos Soles para la preparación de dosis de las diferentes soluciones de propóleo.

Descripción.	Cantidad.	Costo en Nuevos Soles.	Costo por unidad de medida
Propóleo al 25 %	1200 ml	350.00	S/. 0.30 x ml.
Envases 100 ml color ámbar	15 unid.	30.00	S/. 2.00 x unid
Agua destilada	2000 ml	16.00	S/. 0.008 x ml.
Etiquetado	15 etiquetas	2.00	S/. 0.13 x ml.
Costo de dilución		30.00	S/. 2.5 x hora de trabajo.

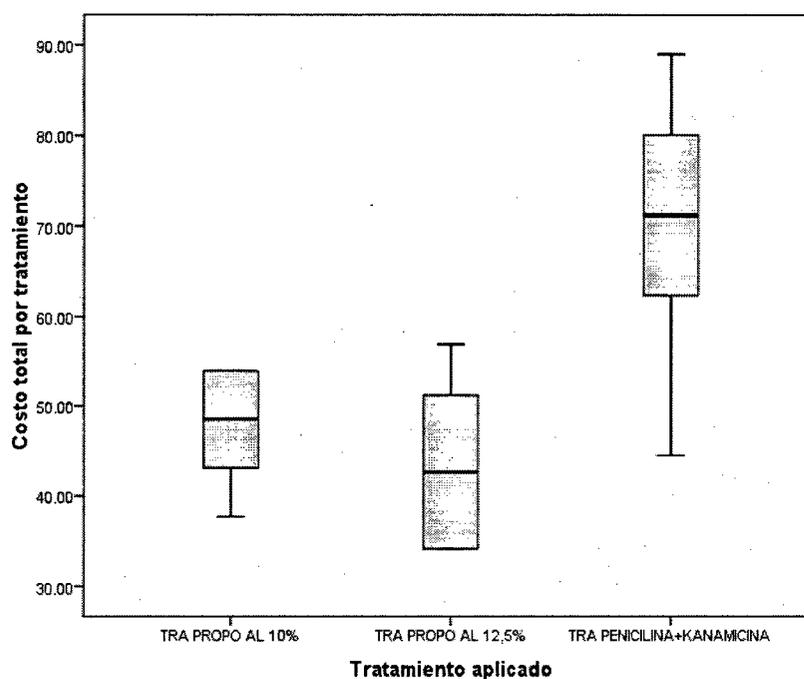
Tabla 21. Costo en Nuevos Soles de las dosis individuales por tratamiento.

Descripción	Propóleo 5 %	Propóleo 7,5 %	Propóleo 10,0 %	Propóleo 12,5 %	Penicilina + Kanamicina.
Costo por dosis 10 ml.	S/. 1.73	S/. 2.00	S/. 2.30	S/. 2.60	S/. 5.00
Alcohol desinfectante	S/. 0.25				
Reactivo CMT	S/. 0.84				
Oxitocina	S/. 2.00				
TOTAL POR DOSIS	S/. 4.82	S/. 5.09	S/. 5.39	S/. 5.69	S/. 8.90

Tabla 22. Estadísticos de los costos de los diferentes tratamientos.

	Costo total tratamiento al 10%	Costo total tratamiento al 12,5%	Costo total tratamiento Penicilina + Kanamicicina
Animales tratados	10	10	10
Media	47.9710	43.8130	70.31
Desviación estándar	5.9317	8.9163	13.5625
Varianza	35.185	78.501	183.943

Gráfico 03: Diagrama de cajas; diferencia de los costos en los tratamientos usados.



La tabla 22 y en el grafico 03 se puede observar las diferencias en relación a los costos totales de los diferentes tratamientos usados en la investigación, demostrando que el tratamiento a base de propóleo al 12,5% es más económico que la Penicilina + Kanamicicina.

Análisis de varianza costo total de los tratamientos.

1. Los costos por tratamiento para mastitis en ganado vacuno son iguales

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$$

Al menos dos de los costos son diferentes

$$H_1: \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$$

2. $\alpha = 0,05$

3. El cuadro de análisis de varianza, se muestra a continuación

Tabla 23. : Análisis de varianza para los costos por tratamiento

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	G.L.	CUADRADO MEDIO	F
COSTOS/TRA	4061,370	2	2030,685	20,400
ERROR	2687,669	27	99,543	
TOTAL	6749,038	29		

4. Determinando la región crítica:

La región crítica para nuestros datos, dado que: $f_{(2, 27)} = 3,354$

$$RC = [3,354 ; \infty >$$

5. Decisión: Dado que el valor de $f_c = 20,4 \in RC = [3,354 ; \infty >$, rechazamos la hipótesis nula (H_0) y aceptamos la hipótesis alterna (H_1), con lo que concluimos los costos por tratamiento de la mastitis en ganado vacuno son diferentes, con un nivel significancia de 0,05.

V. DISCUCIONES.

En la presente investigación utilizamos la solución de extracto de propóleo de 50 mg/ml, 75 mg/ml, 100 mg/ml y 125 mg/ml en el tratamiento de casos de mastitis clínica bovina, se pudo determinar la efectividad de las soluciones de propóleo al 10% y 12,5%, siendo coincidente con el estudio realizado por Yera (2003) que determino la efectividad del propóleo al 10% para tratar casos de mastitis aguda.

Las soluciones de propóleo al 5%, y 7,5% no presentaron actividad terapéutica frente a la mastitis clínica bovina, esto quedó demostrado con las pruebas in vitro donde se determinó su actividad bactericida in vitro y presento halos de inhibición entre 6-8 mm, esto coincide con el estudio realizado por Rodríguez (2007) que estudio la susceptibilidad de bacterias anaerobias a diferentes soluciones de propóleo demostrando que la solución de 50 µg/10 µl tiene halos de inhibición entre 6 y 8 mm. Con esto determinamos que la solución de propóleo al 5 y 7,5% posee actividad inhibitoria mínima.

Staphilococcus aureus y *Micrococcus sp* fueron susceptibles a las soluciones de propóleo de 100 mg/ml y 125 mg/ml con halos de inhibición entre 13-25 mm, lo cual coincide con los resultados in vivo, donde se obtiene tazas de curación de 70 y 80% respectivamente. Estos resultados coinciden con el estudio realizado por Rojas (1997) donde demuestra que el 100% de las muestras de propóleo muestran actividad contra *Staphilococcus aureus* y el 83.3% contra *Micrococcus sp*, y ninguna de las muestras mostro actividad contra cepas Gram negativas como la *Escherichia coli*.

Además Delgado *et al* (2005) demostró que el extracto etanólico de *Apis mellifera* mostró más susceptibilidad sobre todas las bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*. Con halos de inhibición de 19 y 21 mm respectivamente y las CMI fueron ≥ 10 mg/ mL en los tres casos, aunque no se detectó CMB para estas bacterias, la actividad contra esta bacteria se atribuye al compuesto ácido 3,5 difenil-4-hidroxicinámico presente en el Propóleo. Lo cual es contradictorio con nuestra investigación ya que el *S. agalactiae* no mostro ninguna susceptibilidad frente a todas las soluciones de propóleo.

En el estudio realizado por Tolosa y Cañizares (2000) se determinó la sensibilidad del *Staphylococcus aureus* a soluciones de propóleo con una concentración mínima bactericida de 4.80 mg/ml en solución etanolica y 11.6 mg/ml usando soluciones acuosas de propóleo. Lo que demuestra que las soluciones alcoholicas puras tienen mayor actividad bactericida que las soluciones diluidas con agua destilada. Lo que coincide con nuestra investigación donde se necesitó mayor concentración de las soluciones de propóleo para inhibir el crecimiento del *S. aureus* y *Micrococcus sp*.

Brumfitt (1990), En cuyos experimentos encontró halos de inhibición de *Staphylococcus aureus* con diámetros que varían entre 7 – 14 mm (media = 13 mm), en discos de papel filtro (diámetro = 6 mm) impregnados con extracto etanólico de propóleo al 10 % es decir un radio de inhibición medio de 6.5 mm, estos resultados coinciden con los halos de inhibición obtenidos en las pruebas in vitro de la solución de propóleo al 10% que presento halos de inhibición de 10-12 mm frente a *Staphylococcus*

aureus. Además estos resultados coinciden con lo obtenido por Konishi *et al.* (2004) con halos de inhibición entre 7,9 y 12,0 mm.

En otro estudio realizado por Mayta y Sacsquispe (2010) donde analizaron la acción antibacteriana contra el *Staphylococcus aureus* de los extractos etanolicos de propóleo. Se encontró que el propóleo al 10% presentó una media de 9,95mm de halo de inhibición con una desviación estándar de 0,62 lo cual es idéntico al resultado obtenido donde la solución de propóleo al 10% presento una media de 10 mm con una desviación estándar de 3,464.

En el estudio realizado por Diaz *el al* (2000) demostraron que la bacteria *E. coli*, no presento reducción del crecimiento en presencia de propóleos. Se demostró que esta bacteria es resistente a todas las soluciones diluidas de propóleo, solo presentando un halo de inhibición de 13 mm con la solución madre al 25 %.

En los estudios realizados por Batista de Paula (2006) Mediante su estudio en difusión y dilución por agar determinaron el Concentración Mínima Bactericida (MBC) del extracto de propóleo fue de 200-400 ug/ml formando halos de inhibición de 14 a 17 mm de diámetro. En la presente investigación el extracto de propóleo a de 100 mg y 125 mg formaron halos inhibitorios entre 9 y 22 mm de diámetro Determinando así que la actividad antibacteriana a estas concentraciones es mayor.

VI. CONCLUSIONES.

- Se determinó que las soluciones de propóleo al 5 y 7,5% no tienen actividad antimicrobiana frente a las bacterias causantes de mastitis clínica bovina.
- La solución al 10% tiene una efectividad de 70 % en el tratamiento de mastitis clínica, siendo las bacterias susceptibles *Staphilococcus aureus* y *Micrococcus sp* con halos de inhibición de 10-16 mm. El *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli* no presentaron inhibición en su crecimiento.
- La solución al 12,5% tiene una efectividad de 80% en el tratamiento de mastitis clínica, siendo las bacterias susceptibles *Staphilococcus aureus* y *Micrococcus sp*. con halos de inhibición de 16 mm – 20 mm. El *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli* no presentaron inhibición en su crecimiento.
- La Penicilina + kanamicina tiene una efectividad de 80% en el tratamiento de mastitis clínica, siendo las bacterias susceptibles *Streptococcus agalactiae*, *Staphilococcus aureus*, *Micrococcus sp* con halos de inhibición mayores a 24 mm. *Escherichia coli* tubo halo de inhibición de 13 mm.
- La bacteria más prevalente fue *Micrococcus sp* con una prevalencia del 55%, seguido del *Staphilococcus aureus* con un 20%, *Escherichia coli* 20%, *Streptococcus aureus* 5%.
- A través del análisis de costo se determinó que el tratamiento a base de propóleos al 10% es S/. 47,97 , el tratamiento con propóleos al 12,5 es 43,81 y el tratamiento con el antibiótico testigo (penicilina + kanamicina) fue de 70,31, lo que nos indica que el tratamiento de propóleos al 12,5 % es más económico que usar el antibiótico comercial.

VII. RECOMENDACIONES.

- Realizar más estudios del efecto bactericida del propóleo local, frente a bacterias causantes de mastitis clínica bovina.
- Realizar pruebas de la susceptibilidad o resistencia de microorganismos, que provoquen enfermedades económicamente importantes en las diferentes especies productivas de animales, frente a extractos de propóleo.
- Evaluar las otras propiedades de los extractos de propóleos, como es su acción cicatrizante, regeneradora de tejidos, antifúngica, antiviral, anestésica, antiinflamatoria, activadora del sistema inmune.
- Realizar estudios para determinar las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (MIC) y Concentraciones Mínimas Bactericidas (MBC) del extracto de propóleo de Apurímac.

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

1. Asís M. 1996. Apiterapia Para Todos. Ed. Científico técnica. Cuba pp. 60- 96.
2. Batista A; Gomez R; Kwasnicka W; Sousza R; Esperanza M. 2006. "Suceptibility of oral pathogenic Bacteria and Fungi to Brazilian Green Propolis Extract" Laboratory of Microbiology and Biomaterials. Brazil Pharmacologyonline 3: 467-473.
3. Bedolla C. y Ponce de león, 2008. Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina en la industria lechera. REDVET. Revista electrónica de Veterinaria 1695-7504. Volumen IX Número 4
4. Blowey R.; Edmondson P. 2004. Control de la mastitis en granjas de vacunos de leche. Editorial Acribia. Zaragoza. España.
5. Brumfitt R, 1990. Actividad Antibiotica De Productos Naturales: 1. Propóleo. Microbios, n. 62, p. 19-22.
6. Brushi M.; Franco S.; Gremiao M. 2003. Application of an HPLC Method for Analysis of Propolis Extract. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies 26(14): 2399-2409
7. Campo M. 2007. Estudio Químico de Propóleos Rojos cubanos. Tesis n opción al título de Doctor en Ciencias Farmacéuticas. Universidad de la Habana. Cuba.
8. De Castro S. 2001. Propolis: biological and pharmacological activities. Therapeutic uses of this beeproduct. Annual Review of Biomedical Science 3: 49-83.
9. Delgado M; Quijano E; Perez I; Quintero E. 2005. Actividad Antimicrobiana del propóleos Recolectado por *Apis mellifera* y *Melipona beecheii* B. Universidad Autónoma de Yucatán.

10. Diaz M.; Gil R.; Valdes G. 2000. Determinacion de la CMI de propóleos cubanos a partir de técnicas diferentes. Revista Apiciencia, vol. 2 No 2. ISSN:1608-1862.
11. Djabri B.; Barielle N.; Beaudeau F.; Seegers H. 2002. Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: a meta analysis. Vet. Res. 33:335-357.
12. Djabri B.; Barielle N.; Beaudeau F.; Seegers H. 2002. Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: a meta analysis. Vet. Res. 33:335-357.
13. Dos Santos J.; Netto Dos Santos K.; Gentilini E.; Sordelli D.; De Freire Bastos M. 2002. Phenotypic and genetic characterisation of bacteriocin-producing strains of *Staphylococcus aureus* involved in bovine mastitis. Veterinary Microbiology. 85: 133 -144.
14. Drago L.; Mombelli B.; Vecchi E.; Fascina M.; Tocalli M.; Gismondo M. 2000. In vitro antimicrobial activity of propolis dry extract. J Chemoterapy 12: 390-395
15. Gasque R. 2008. Enciclopedia Bovina, primera edición. Universidad autónoma de Mexico. Mexico.
16. Gómez A.; Gómez D.; Arráez A.; Fernández A. 2006. Advances of phenolic compounds in product derived from bees. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 41(4): 1220-1234.
17. Halasa T.; Huijps K.; Osteras O. y Hogeveen H. 2007. Economics effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. Veterinary Quaterly. 29 (1): 18-31.
18. Havsteen B. 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacology & Therapeutics 96(2-3) 67-202

19. Havsteen B. 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics* 96(2-3) 67-202
20. Hegazi A.; Faten K. 2001. Egyptian Propolis. Chemical Composition, Antiviral and Antimicrobial Activities of East Nile Delta Propolis. Verlag der Zeitschrift fur Naturforschung. www. Znaturforsch.com.
21. Heringstad B.; Klemetsdal G.; Ruane J. 2000. Selection for mastitis resistance in dairy cattle: a review with focus on the situation in the Nordic countries. *Livestock Production Science*. 64:95-106.
22. Heringstad B.; Klemetsdal G.; Ruane J. 2000. Selection for mastitis resistance in dairy cattle: a review with focus on the situation in the Nordic countries. *Livestock Production Science*. 64:95-106.
23. Jin U.; Chung T.; Kang S.; Suh S.; Kim J.; Chung K.; Gu Y.; Suzuki I.; Kim C. 2005. Caffeic acid phenyl ester in propolis is a strong inhibitor of matrix metalloproteinase-9 and invasion inhibitor: isolation and identification. *Clin Chim Acta* 362(1-2): 57-64.
24. Konishi S; Sawaya A; Custódio I; Shimizu M. 2004. Análise da influência de agentes solubilizantes na atividade antimicrobiana de extratos de propolis e de uma formulação de spray hidroalcoólico. *Rev. Mensagem Doce*, 75: 5-8.
25. Kujumgiev A.; Tsvetkova I.; Serkedijieva Y.; Bankova V.; Cristov R.; Popov S. 1999. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol* 64: 235-240.
26. Marcucci M. 1995. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* 26: 83-89

27. Marcucci MC, Bankova V. (1999) Chemical composition, plant origin and biological activity of Brazilian propolis. *Current Top Phytochem* 2: 115-123
28. Matsuka M. 2000. Criteria of propolis in Japan. p. 4. In: Japan Propolis Conference. Japan Health Food and Nutrition Food Association. Tokio.
29. Martinez J.; Fajardo M.; Perez J. 2005 Obtencion de tinura de propóleos en las plantas de productos naturales. *Revista CENIC Ciencias Quimicas*, Vol. 36, No. Especial, 2005.
30. Mayta F; Sacsquispe S.2010. Evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo de Oxapampa - Perú sobre cultivos de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). *Rev Estomatol Herediana*. 20(1):19-24.
31. Medina C. y Montaldo V. 2003. El uso de la prueba de conductividad eléctrica y su relación con la prueba de California para mastitis. CNM. V Congreso Nacional de Control de Mastitis., México.
32. Medina R. 2002. Prevalencia e identificación de agentes etiológicos causantes de mastitis en el Municipio de Vista Hermosa, Michoacán. (Tesis de licenciatura). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Morelia, Michoacán, México 39-41 y 83.
33. Mena D; Rodriguez J; Valdes G. 2000. Determinacion de la CMI de Propoleos Cubanos a partir de dos tecnicas diferentes. *Apiciencia* Vol.2 No. 2.
34. Morin D. 2004. Acute mastitis: revisiting the goals of therapy. 23rd World Buiatrics Congress. Québec, Canada. July 11-16.
35. Morin D. 2004. Acute mastitis: revisiting the goals of therapy. 23rd World Buiatrics Congress. Québec, Canada. July 11-16.

36. Neacato S. 2005. Uso De Extractos Etanolicos De Propóleo para el control de *Staphylococcus Aureus* in vitro obtenidos de leche de vacas con mastitis. Tesis para optar el titulo de Medico Veterinario. Escuela Politécnica del Ejercito. Ecuador.
37. Ortega J.; Vanegas N. 2006. Utilización de propolina en el control de mastitis bovina en fincas del Municipio de Muy Muy Departamento de Matagalpa. Tesis para optar al Título de Médico Veterinario Managua, Nicaragua. Universidad Nacional Agraria.
38. Palomino L; Martinez J; Garcia C; Gil J; Durango D. 2010. Caracterizacion Fisicoquimica y Actimicrobiana del propoleos en el Municipio de la Union. Rev. Fac. Nal. Agr. Medellin 63(1): 5373-5383.
39. Perez M.; Rordriguez C.; Leon S.; Rodriguez S.; Alvares J.; Vega J. 2003. Evaluacion Toxicologia de una Tintura de propoleos. Revista Acta Farm. Bonaerense 22 (1): 6
40. Philpot W. y Nickerson S. 2000. Importancia económica de la mastitis. Ganando la lucha contra la mastitis. Westfalia-Surge. Estados Unidos de América. : 1-13, 44-53.
41. Popova M, Silici S, Kaftanoglu O, Bankova V. (2005). Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. Phytomedicine 12(3) 221-228
42. Quinn P.; Markey B.; Carter M.; Donnelly W.; Leonard F. 2002. Microbiologia y enfermedades infecciosas veterinarias. Editorial Acribia. 1era edición. España. 580-595.

43. Ramos A. y Miranda J. 2007. Propolis: A review of its anti-inflammatory and Healing actions. Revista. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis. V.13, n.4, p.679-710.
44. Reza G. 2000. Mastitis bovina su reconocimiento clínico, programas de prevención y su terapia con antimastiticos a base de cefapirinas. Mastitis bovina su reconocimiento clínico. México D. F.: 1-13.
45. Rebhun W.; Guard C.; Richards C. 1997. Enfermedades del Ganado vacuno lechero. Editorial Acribia. España. 362-398.
46. Rodriguez M. 2007. Actividad antibacteriana de cuatro soluciones del extracto de propóleo en bacterias anaerobias frecuentes en necrosis pulpar con reacción periapical. Tesis de la UNMSM. Facultad de Medicina Veterinaria. P 26-35, 85-93
47. Rojas N. 1997. Actividad antimicrobiana de propóleos cubanos. Tesis de doctorado. Facultad de Biología. Universidad de La Habana, 1997.
48. Ruegg P. 2005. *Staphylococcus aureus*. Milk Quality Factsheet en español. Resources milk quality. NMC (Organization for Mastitis Control and Milk Quality). EE.UU.
49. Saran A. y Chaffer M. 2000. Mastitis y calidad de leche. Inter-Médica. Buenos Aires. pp.11-25, 133-135.
50. Saran A.; Chaffer M. 2000. Mastitis y calidad de leche. Inter-Médica. Buenos Aires. pp.11-25, 133-135.
51. Scaramelli A.; Gonzalez Z. 2005. Prevención y control de la mastitis bovina. Manual de Ganadería Doble Propósito. Universidad Central de Venezuela. Venezuela.

52. Schrick F.; Hocket M.; Saxton A.; Lewis M.; Dowlen H.; Oliver S. 2001. Influence of subclinical mastitis during early lactation on reproductive parameters. *J. Dairy Sci.* 84:1407-1412.
53. Shub T.; Kagramanova K.; Voropaeva S.; Kivman G. 1981. Effect of propolis on strains of *Staphylococcus aureus* resistant to antibiotics. *Antibiotik* 26 (4) 268-271.
54. Silici S.; Kutluca S. 2005. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *Journal of Ethnopharmacology* 99(1): 69–73.
55. Takaisikikuni N, Schilcher H. (1994). Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. *Planta Med* 60: 222-227
56. Tollersrud T. 2001. *Staphylococcus aureus* mastitis. Bacterial characteristics and host immune responses. Thesis of *Doctor Medicinae Veterinariae*. National Veterinary Institute. Oslo.
57. Tollersrud T.; Kenny K.; Reitz A.; Lee J. 2000. Genetic and Serologic Evaluation of Capsule Production by Bovine Mammary Isolates of *Staphylococcus aureus* and Other *Staphylococcus* spp. from Europe and the United States. *Journal of Clinical Microbiology*. 38:2998-3003.
58. Tolosa L.; Cañizares E. 2002. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de de Campeche. *Revista, Ars Pharmaceutica*, 43:1-2; 187-204.

59. Valera M.; Caballero M.; Linares P.; Novoa Q.; Casanovas, C. E. 2005. Efecto de la aplicación del Reylac sobre la calidad de la leche en rebaños con mastitis subclínica bovina. RedVet. Vol. VI, N° 6. : 1-7.
60. Velikova M.; Bakova V.; Sorkun K.; Popova S.; Kujumgiev A. 2001. Chemical composition and biological activity of propolis from Turkish and Bulgarian origin. Mellifera 1(1): 57-59
61. Viuda M.; Ruiz Y.; Fernandez J.; Pérez. 2008. Functional properties of honey, propolis and royally jelly. Journal of Food Science (JFS) 73(9): 117-124.
62. Wellenberg G.; Van der Poel W.; Van Oirschot J. 2002. Viral infections and bovine mastitis: a review. Veterinary Microbiology, Article 2361, pp. 2-21.
63. Wolter W.; Castañeda H.; Kloppert B.; Zschock M. 2004. Mastitis Bovina. Prevención, diagnóstico y tratamiento. Mastitis Bovina. Editorial Universitaria. Universidad de Guadalajara, Jalisco. 16, 62-72.
64. Yera P. Graciela. 2003. Efectividad del Propóleos en el Tratamiento de la Mastitis Aguda Bovina. Congreso Veterinarias. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad de Granma – Cuba
65. Zadoks R. 2002. Molecular and mathematical epidemiology of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis* mastitis in dairy herds. Dissertation Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine: 2-3, 239.

ANEXOS

1. Tabla de recolección de datos en el laboratorio.

Bacteria	Diámetro del halo (incluido el disco) mm		
	Placa 1	Placa 2	Placa 3
Alcohol 96° + agua destilada			
Propóleo al 5 % (50 mg/ml)			
Propóleo al 7,5 % (75 mg/ml)			
Propóleo al 10 % (100 mg/ml)			
Propóleo al 12,5 % (125 mg/ml)			
Solución madre al 25 % (250 mg/ml)			
Gentamicina			
Penicilina			

2. Tabla de recolección de datos de las pruebas *In Vivo*.

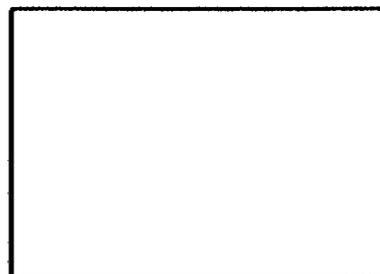


UNIVERSIDAD NACIONAL MIKAELA BASTIDAS DE APURÍMAC
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



CONTROL INDIVIDUAL DE LA EVOLUCIÓN DE MASTITIS CLÍNICA

IDENTIFICACIÓN: _____
 NÚMERO DE LACTACIÓN: _____
 FECHA DE DIAGNÓSTICO DE MASTITIS CLÍNICA: _____
 CUARTOS MAMARIOS AFECTADOS: _____
 DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE MASTITIS CLÍNICA: _____
 TRATAMIENTO SELECCIONADO: _____
 FECHA DE INICIO DE TRATAMIENTO: _____



EVOLUCIÓN DEL CASO CLÍNICO

DÍA 1		DÍA 2		DÍA 3		DÍA 4		DÍA 5	
1ª M. DCS3	2ª M. DCS3								

DÍA 1		DÍA 2		DÍA 3		DÍA 4		DÍA 5	
CMT	CMT								

OBSERVACIONES:

FIGURAS



Figura 1: Materiales esterilizados para preparación de las soluciones de propóleo.

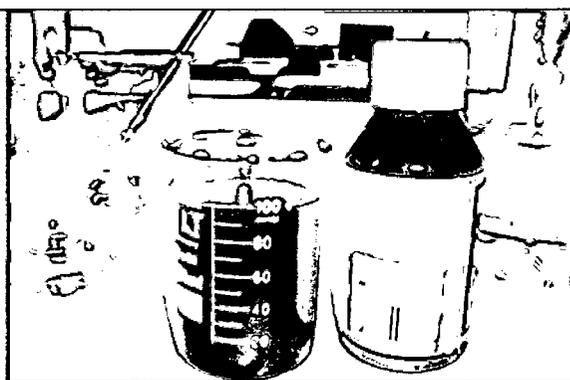


Figura 2: solución madre al 25%, antes de ser diluido.



Figura 3: Proceso de dilución realizado en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.



Figura 4: Mastitis clínica que afecta al cuarto anterior izquierdo – Establo San Isidro S.A.

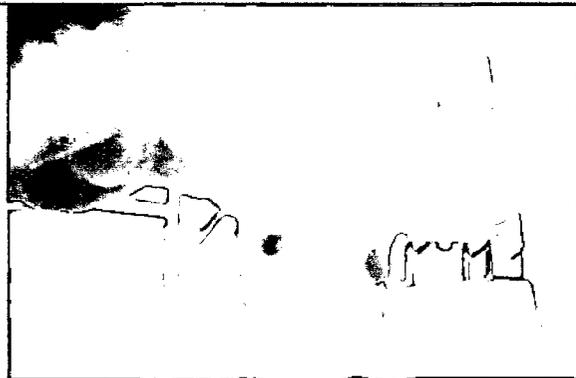


Figura 5: Cuarto anterior derecho afectado por mastitis clínica – Establo san Isidro S.A.

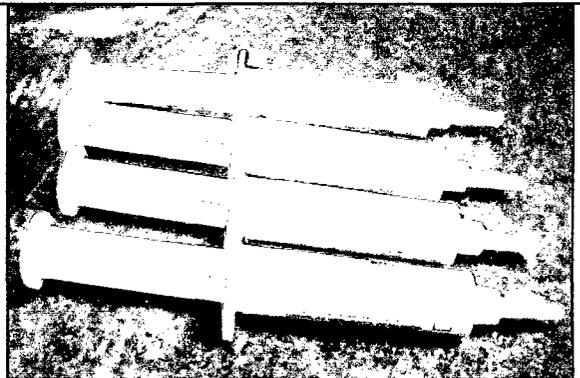


Figura 6: Antibiótico intramamario compuesto de Penicila + Kanamicina.



Figura 7: Aplicación de solución de propóleo al 12,5% en el cuarto anterior derecho.

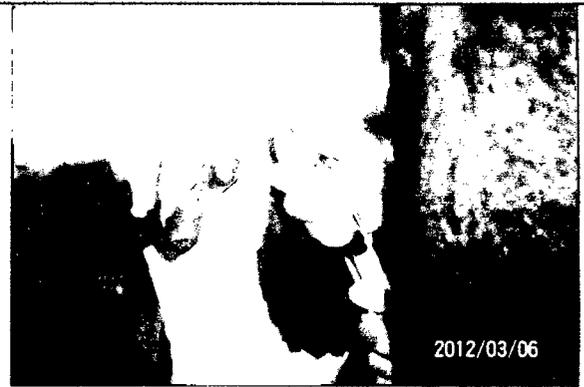


Figura 8: Aplicación de solución de propóleo al 10% en el cuarto posterior izquierdo.



Figura 9: Aplicación de solución de propóleo al 12,5% en el cuarto anterior derecho.



Figura 10: Prueba de CMT, realizado para confirmar la mejoría del caso clínico.



Figura 11: Preparando una dosis de Propóleo al 10 %.

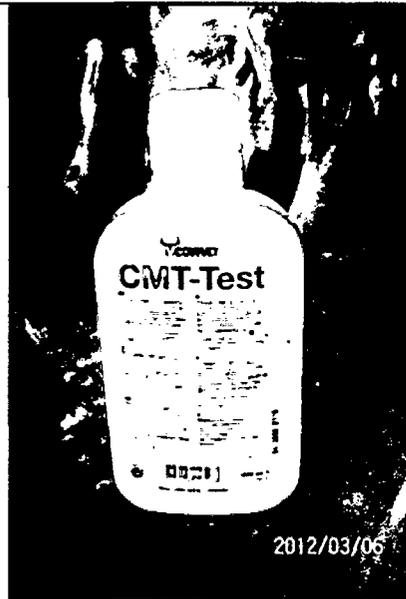


Figura 12: Reactivo CMT (California Mastitis Test).

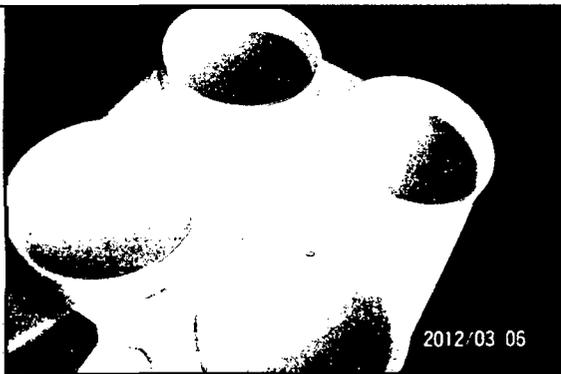


Figura 13: Reacción Negativa al final del tratamiento con soluciones de propóleo al 12,5%.

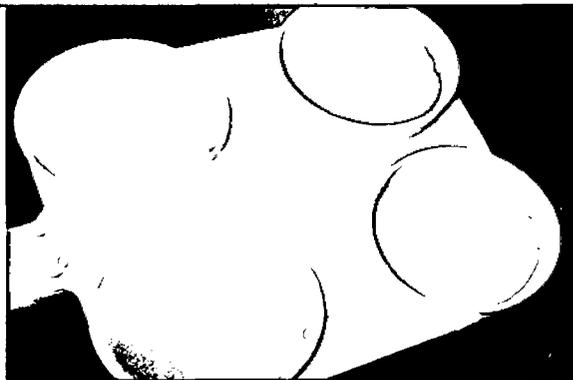


Figura 14: Reacción positiva de ++ en el cuarto anterior izquierdo, Seguimiento del tratamiento con propóleos a base de 10,0%.



Figura 15: Reacción positiva a la prueba de CMT (+++), en el cuarto posterior derecho.



Figura 16: Mastitis clínica bovina que afecta al cuarto anterior derecho – establo San Isidro S.A.



Figura 17: Materiales para toma y envío de muestras de leche.

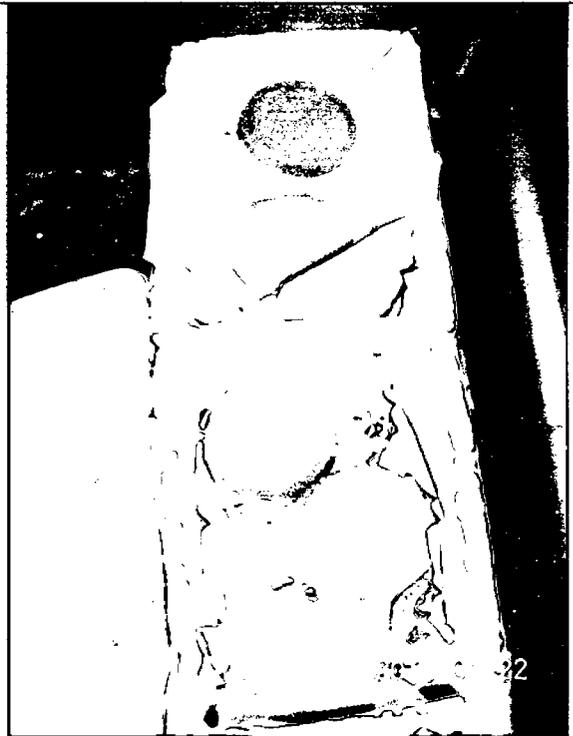


Figura 18: Muestras de leche conservado con geles refrigerantes hasta el envío al laboratorio.



Figura 19: Desinfección de pezones para la recolección de muestras.



Figura 20: Vacuno 7274, antes de realizar la recolección de muestras de leche.

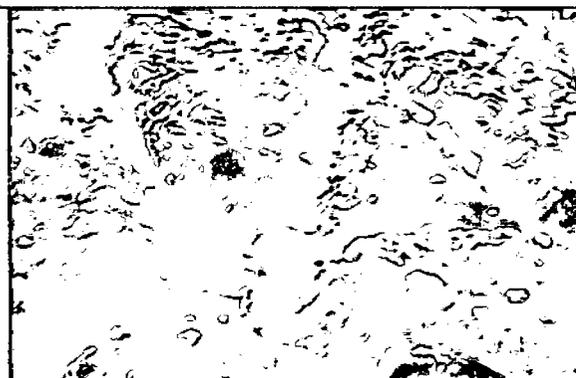


Figura 21: Coágulos lácteos que indican la presencia de mastitis clínica.



Figura 22: prueba de fondo oscuro, nos muestras pequeños coágulos lácteos en el fondo del envase.

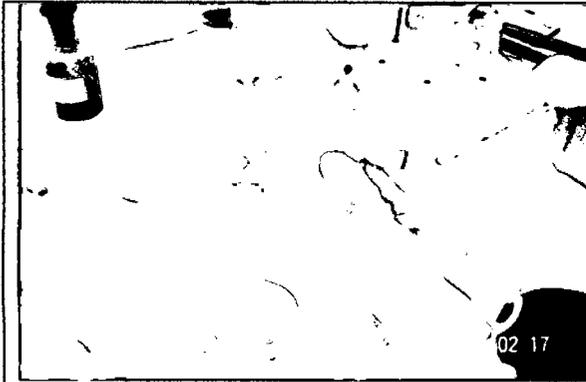


Figura 23: Cultivo de bacterias causantes de mastitis clínica en el Laboratorio Veterinario del Sur.

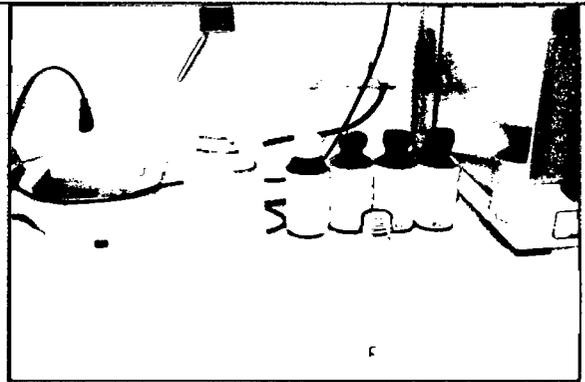


Figura 24: Propóleo al 5; 7,5; 10; 12,5 % antes de realizar las pruebas de sensibilidad bacteriana *In Vitro*.

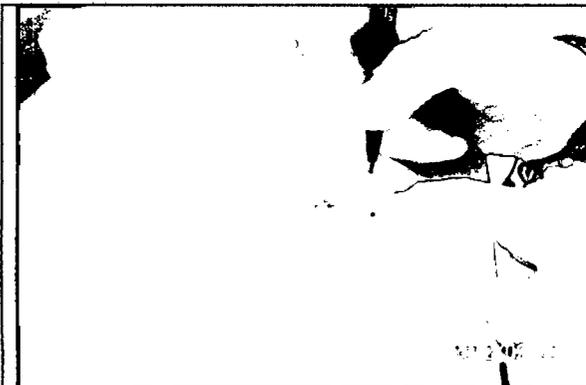


Figura 25: Identificación de la placa Petri, que contiene cepas de *E.coli*.

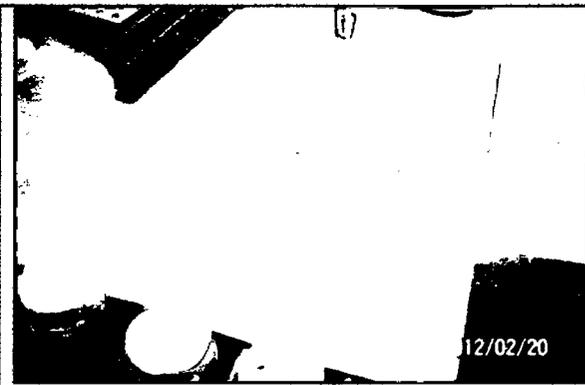


Figura 26: Colocación de discos de sensibilidad con 10 ul de cada solución en prueba.

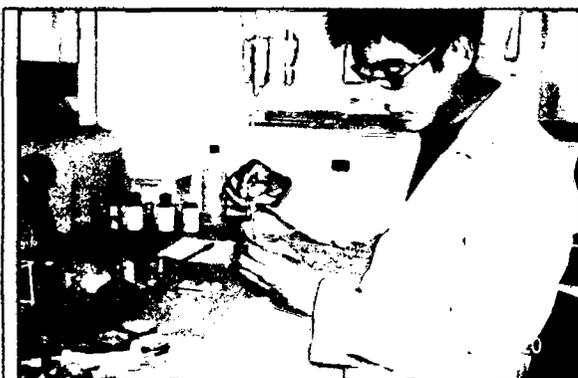


Figura 27: Preparación de los discos de sensibilidad bacteriana.

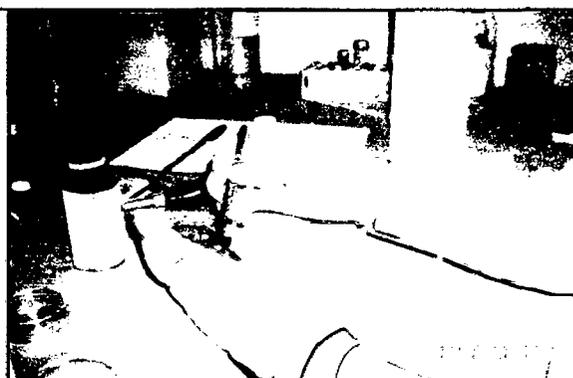


Figura 28: Colocación de los discos de sensibilidad bacteriana en una placa Petri con cultivos de *Streptococcus agalactiae*.

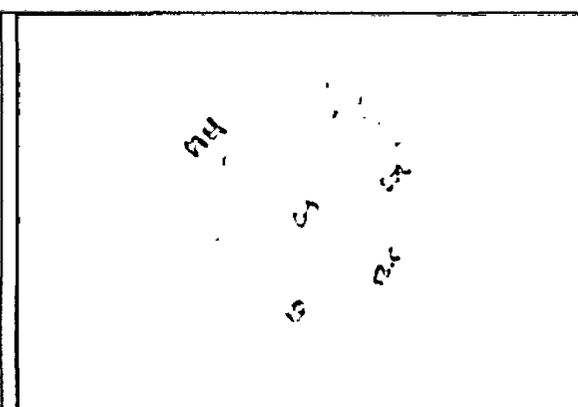


Figura 29. Antibiograma frente a *S. aureus*:
5 (propóleo al 5 %); 7,5 (Propóleo al 7,5%);
10 (Propóleo al 10 %); 12,5 (Propóleo al
12,5%); P (penicilina)

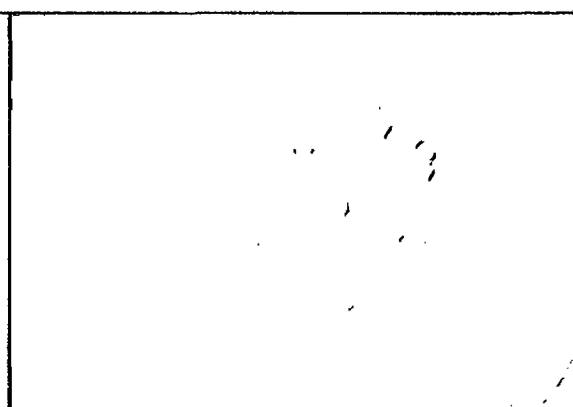


Figura 30. Antibiograma frente a *S. aureus*:
5 (propóleo al 5 %); 7,5 (Propóleo al 7,5%);
10 (Propóleo al 10 %); 12,5 (Propóleo al
12,5%); P (penicilina)

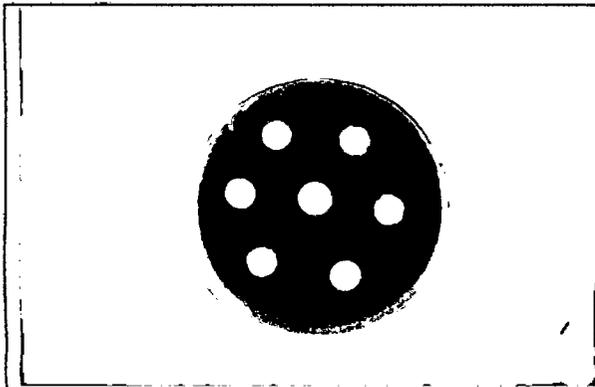


Figura 31. Antibiograma frente a *Streptococcus agalactiae*

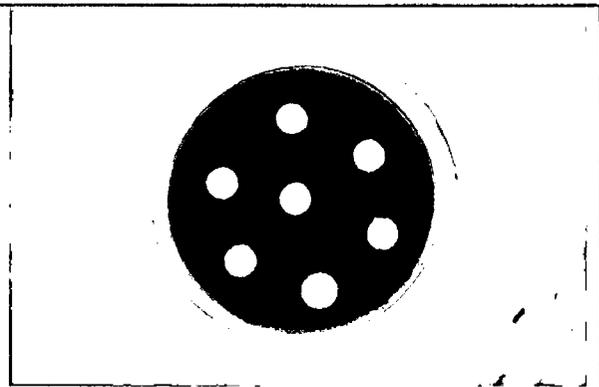


Figura 32. Antibiograma frente a *S. agalactiae*



Figura 33. Antibiograma frente a *E. coli* - LABVETSUR.

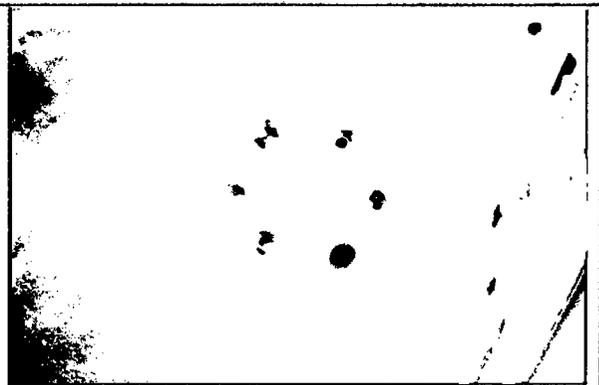


Figura 34. Antibiograma frente a *E. coli*: 5 (propóleo al 5 %); 7,5 (Propóleo al 7,5%); 10 (Propóleo al 10 %); 12,5 (Propóleo al 12,5%);