

**Universidad Nacional Experimental  
de los Llanos Occidentales  
"EZEQUIEL ZAMORA"**



**LA UNIVERSIDAD QUE SIEMBRA**

**VICERRECTORADO  
DE PLANIFICACIÓN Y  
DESARROLLO SOCIAL ESTADO  
BARINAS**

**PROGRAMA DE ESTUDIOS  
AVANZADOS  
MAESTRIA EN PRODUCCIÓN  
ANIMAL SOSTENIBLE**

**USO DEL PROPÓLEO EN EL CONTROL DE MASTITIS CLINICA Y  
SUBCLINICA EN VACAS Y BUFALAS**

**Autor: M.V.: CESAR A.PAREDESG**

**Tutor: MSc.: NEYO C. PEREZ**

**BARINAS, FEBRERO, 2022**



LA UNIVERSIDAD QUE SIEMBRA

**VICERRECTORADO DE PLANIFICACIÓN Y DESARROLLO SOCIAL**  
**COORDINACIÓN DE POSTGRADO**  
**MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN ANIMAL SOSTENIBLE**

**USO DEL PROPÓLEO EN CONTROL DE MASTITIS CLÍNICA Y**  
**SUBCLÍNICA EN VACAS Y BÚFALAS**

**Autor:**  
**M.V. CESAR A.PAREDES G**  
**C.I. 5.687.152**  
**Tutor: Msc. NEYO PEREZ**

**Barinas, Febrero, 2022**

## ACEPTACIÓN DEL TUTOR

Yo, **Neyo la Cruz Pérez Guedez**, cédula de identidad N° **9.383.454** hago constar que he leído el Anteproyecto del Trabajo de Grado titulado **USO DEL PROPOLEO EN EL CONTROL DE LA MASTITIS CLINICA Y SUBCLINICA EN VACAS Y BUFALAS**, presentado por el ciudadano **César Augusto Paredes Gómez**, para optar por el título de **Magister Scientiarum en Producción Animal Sostenible**, y acepto asesorar al estudiante, en calidad de tutor, durante el periodo de desarrollo del trabajo hasta su presentación y evaluación.

En la ciudad de **Barinas**, a los **5**, días del mes de **Julio** del año **2021**.

Nombre y Apellido: **Neyo la Cruz Pérez Guedez**



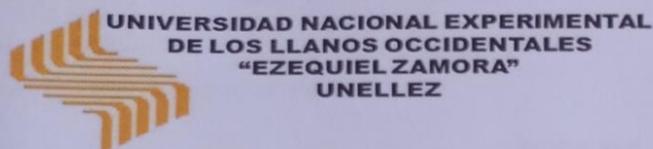
---

Firma de Aprobación del Tutor

05/07/2021

---

Fecha de Entrega



La Universidad que Siembra

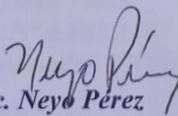


**PRESAV**  
PROGRAMA DE  
ESTUDIOS AVANZADOS  
BARINAS UNELLEZ

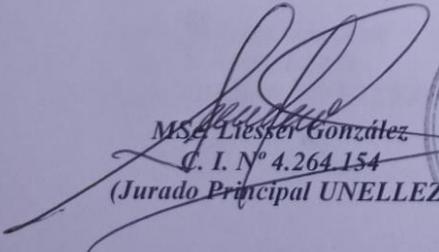
VICERRECTORADO DE PLANIFICACIÓN Y DESARROLLO SOCIAL

### ACTA DE ADMISIÓN

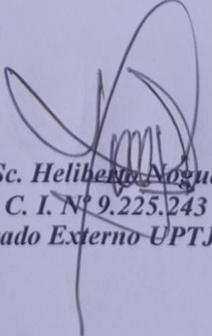
Siendo las 10:30 a.m. del día 28 de enero 2022, reunidos en la Sede del Programa de Estudios Avanzados del Vicerrectorado de Planificación y Desarrollo Social de la UNELLEZ, los profesores: **MSc. Neyo Pérez** (Tutor Coordinador UNELLEZ) **MSc. Liesser González**, (Jurado Principal UNELLEZ), **MSc. Heliberto Noguera**, (Jurado Externo UPTJFR), titulares de las cédulas de identidad N°: 9.383.454, 4.264.154 y 9.225.243 respectivamente, quienes fueron designadas por la Comisión Asesora de Estudios Avanzados del Vicerrectorado de Planificación y Desarrollo Social UNELLEZ, según **RESOLUCIÓN N° CAEA/2021/10/AD10 DE FECHA: 09/12/2021, ACTA N° 10 ORDINARIA, N° AD10** como miembros del Jurado para conocer el contenido del Trabajo de Grado titulado **“USO DEL PROPÓLEO EN CONTROL DE MASTITIS CLINICA Y SUBCLINICA EN VACAS Y BUFALAS”**, presentado por el maestrante: **César Paredes** titular de la Cédula de Identidad N° 5.687.152, con el cual aspira obtener el Grado Académico de **Magister Scientiarum en Producción Animal Sostenible**; quienes decidimos por unanimidad y de acuerdo con lo establecido en el Artículo 36 y siguientes de la Normativa para la Elaboración de los Trabajos Técnicos, Trabajos Especiales de Grado, Trabajos de Grado y Tesis Doctorales y 54 del Reglamento de Estudios Avanzados Universidad Nacional Experimental de los Llanos Occidentales “Ezequiel Zamora” – UNELLEZ 2021, **ADMITIR** el Trabajo de Grado presentado y fijar la fecha de defensa pública, para el día 24 de febrero del 2022 a las 10.30 a.m. Dando fe y en constancia de lo aquí señalado firman:

  
**MSc. Neyo Pérez**  
C.I. N° 9.383.454

(Tutor Coordinador UNELLEZ)

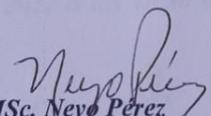
  
**MSc. Liesser González**  
C. I. N° 4.264.154  
(Jurado Principal UNELLEZ)

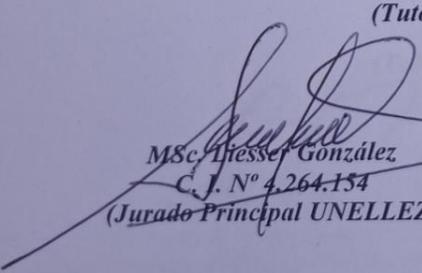


  
**MSc. Heliberto Noguera**  
C. I. N° 9.225.243  
(Jurado Externo UPTJFR)

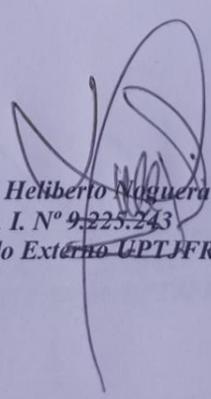
### ACTA DE VEREDICTO

Siendo las 10.30 a.m. del 24 de febrero del 2022, reunidos en la Sede del Programa de Estudios Avanzados del Vicerrectorado de Planificación y Desarrollo Social de la UNELLEZ, los profesores: **MSc. Neyo Pérez (Tutor Coordinador UNELLEZ)** **MSc. Liesser González, (Jurado Principal UNELLEZ)**, **MSc. Heliberto Noguera, (Jurado Externo UPTJFR)**, titulares de las cédulas de identidad N°:9.383.454, 4.264.154 y 9.225.243 respectivamente, quienes fueron designadas por la Comisión Asesora de Estudios Avanzados del Vicerrectorado de Planificación y Desarrollo Social UNELLEZ, según **RESOLUCIÓN N° CAEA/2021/10/AD10 DE FECHA: 09/12/2021, ACTA N° 10 ORDINARIA, N° AD10** como miembros del Jurado para conocer el contenido del Trabajo de Grado titulado, "**USO DEL PROPÓLEO EN CONTROL DE MASTITIS CLINICA Y SUBCLINICA EN VACAS Y BUFALAS**", presentado por el maestrante: **César Paredes** titular de la Cédula de Identidad N° 5.687.152, con el cual aspira obtener el Grado Académico de **Magister Scientiarum en Producción Animal Sostenible**; procedemos a dar apertura al acto de defensa y a presenciar la sustentación de dicho trabajo por el maestrante. Con una duración de **Treinta (30) minutos**. Posteriormente, el ponente respondió a las preguntas formuladas por el jurado y defendió sus opiniones. Cumplidas todas las fases de la defensa, el jurado, después de sus deliberaciones, por unanimidad acordó **APROBAR CON MENCIÓN PUBLICACIÓN** el Trabajo de Grado aquí mencionado. Dando fe y en constancia de lo aquí expresado firman:

  
**MSc. Neyo Pérez**  
C.I. N° 9.383.454  
(Tutor Coordinador UNELLEZ)

  
**MSc. Liesser González**  
C. J. N° 4.264.154  
(Jurado Principal UNELLEZ)



  
**MSc. Heliberto Noguera**  
C. I. N° 9.225.243  
(Jurado Externo UPTJFR)

## DEDICATORIA

A Dios todo poderoso por ser fuente de vida, y guiarme en todo momento, por darme sabiduría y confianza, para culminar esta nueva etapa de formación.

A mis padres Carlos (†) y Flor, por ser pilares fundamentales en mi vida, ejemplos de honradez, amor y perseverancia, inspirándome a luchar para obtener lo que me proponga, educándome y brindándome todo su apoyo.

A María Elena Aguilar mi compañera incondicional, apoyándome en todo momento para que no decayera, animándome para salir adelante, con su amor y dedicación.

A mis hijos, César y Augusto por ser ellos mi razón de superación, constancia y persistencia a ustedes siempre mis éxitos.

## AGRADECIMIENTO

Al Profesor Msc. Neyo Pérez, por dedicar su tiempo en la tutoría del presente Trabajo.

Al Profesor Msc. Liesser González, por su entusiasmo, dedicación y orientación a lo largo de la Maestría.

Al personal de la finca La Granja de Hoy, por su apoyo y solidaridad.

A los profesores Gregorio Espinoza, Douglas Montoya y el personal del Laboratorio de Microbiología VPDS, por adoptarme en el laboratorio, brindarme toda su colaboración y aguantarme durante la realización de la etapa experimental.

A todos de corazón, muchas gracias... Y si me faltó alguno: ¡No es menos importante!

## INDICE

ACEPTACIÓN DEL TUTOR.....	iii
ACTA DE ADMISIÓN.....	iv
ACTA DE VEREDICTO.....	V
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTO.....	vii
INDICE.....	viii
LISTA DE TABLAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
INTRODUCCIÓN.....	2
<b>CAPITULO I FORMULACIÓN DEL PROBLEMA</b>	<b>3</b>
1.1 Planteamiento del problema.....	3
1.2 Importancia de la investigación.....	6
1.3 Objetivo general.....	7
1.2.1 Objetivos específicos.....	7
1.4 Alcances y limitaciones.....	7
<b>CAPÍTULO II MARCO TEORICO</b>	<b>9</b>
2.1 Antecedentes de la investigación.....	9
2.2 Bases Teóricas.....	20
2.2.1 Mastitis.....	20
2.2.1.1. Generalidades.....	20
2.2.1.2. Tipos de mastitis.....	22
2.2.1.3 Etiología de la mastitis.....	24
2.2.1.4. Diagnóstico de la mastitis bovina.....	27
2.2.1.5. Prevalencia e índice de mastitis subclínica (IMSC).....	31
2.3 Tratamiento de la mastitis.....	33
2.3.1. Tratamiento tradicional.....	33
2.3.2. Tratamiento alternativo.....	35

2.3.2.1. El propóleo.....	35
2.3.2.2. Composición del propóleo.....	35
2.3.2.3 Acción farmacológica.....	37
2.3.2.3.1. Antioxidante.....	37
2.3.2.3.2. Inmunomoduladora.....	38
2.3.2.3.3. Antimicrobiano.....	38
2.4 Obtención del extracto etanólico del propóleo.....	41
2.5. Bases legales.....	41
<b>CAPITULO III METODOLOGIA DE LA INVESTIGACIÓN.</b>	46
3.1. Tipo y naturaleza de la investigación.....	46
3.2. Nivel de investigación.....	47
3.3. Diseño de la investigación.....	47
3.3.1. Población y muestra.....	48
3.3.2. Técnica de recolección de datos.....	48
3.3.3. Procedimientos y análisis de laboratorio.....	49
3.3.3.1. Etapa I. Diagnostico bacteriológico.....	49
3.3.3.2. Etapa II. Laboratorio (pruebas in vitro).....	50
3.3.3.3. Etapa III. campo (pruebas en vivo).....	54
3.4. Materiales.....	60
<b>CAPITULO IV RESULTADO Y DISCUSIONES</b>	61
4.1. Resultados Etapa I: Bacteriológica de diagnóstico.....	61
4.1.1 Manejo higiénico-sanitario de la unidad de producción.....	61
4.1.2 Calculo de prevalencia e índice de mastitis subclínica.....	62
4.2. Resultados Etapa II: Laboratorio pruebas in vitro.....	65
4.2.1. Identificación de los agentes etiológicos.....	65
4.2.2. Antibiograma. medición de halos de crecimiento.....	66
4.3. Resultados Etapa III: Pruebas de campo o pruebas in vivo.....	69
4.3.1. Asignación de tratamientos.....	69
4.3.2. Aplicación de tratamientos.....	70
4.3.3. Análisis de los resultados por tratamiento.....	78

4.3.3.1. Tratamiento 0 (Etanol).....	78
4.3.3.2. Tratamiento 1 (Propóleo al 15%).....	79
4.3.3.3. Tratamiento 2 (Propóleo al 25%).....	80
4.3.3.4. Tratamiento 3 (Cefalexina + Kanamicina).....	81
4.3.4. Aerófilos mesófilos y coliformes totales.....	82
4.4. Discusión del caso clínico.....	84
4.5. Análisis económico.....	86
4.5.1 Ingresos por producción de leche.....	86
4.5.2 Costos de los tratamientos.....	88
<b>CAPITULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	94
5.1. Conclusiones.....	94
5.2. Recomendaciones.....	95
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	96
ANEXOS.....	103

## LISTA DE TABLAS

TABLA	PÁG
1.	Agentes infecciosos productores de mastitis..... 26
2.	Resultados del CMT..... 31
3.	Índice de Mastitis Subclínica. IMSC..... 33
4.	Características del propóleo..... 36
5.	Prevalencia y prevalencia total por cuartos mamarios..... 62
6.	Índice de mastitis subclínica..... 64
7.	Análisis bacteriológico de las muestras de leche..... 65
8.	Halos de inhibición del crecimiento bacteriano de los diferentes tratamientos..... 66
9.	Crecimiento (mm) in vitro del halo inhibitorio (Antibiograma) por tratamiento..... 67
10.	Asignación de Tratamientos..... 69
11.	Resultados de los Tratamientos..... 70
12.	Aproximación a F de Kruskal-Wallis y Comparación de medias (MDS) de Rango (medianas por escala ordinal) del grado de la mastitis en vacas y búfalas combinadas..... 73
13.	Aproximación a F de Kruskal-Wallis y Comparación de medias (MDS) de rango (medianas por escala ordinal) del grado de la mastitis por especie animal..... 74
14.	Aproximación a F de Kruskal-Wallis y Comparación de medias (MDS) de rango (medianas por escala ordinal) del grado de la mastitis en cada tratamiento y cada especie Interacción)..... 76
15.	Medición de aerófilos mesófilos y coliformes totales..... 83
16.	Promedios Aerófilos mesófilos y Coliformes Totales (ufc/mlx104) antes y después de aplicados los tratamientos..... 83
17.	Producción de leche..... 87

TABLA	PAG
<b>18.</b> Efecto de un tratamiento contra la mastitis a base de propóleo, sobre la producción de leche en vacas durante treinta días (en Lt/vaca/día)	<b>89</b>
<b>19.</b> Efecto de un tratamiento contra la mastitis a base de propóleo, sobre la producción de leche en búfalas durante treinta días (en Lt/búfala/día).....	<b>89</b>
<b>20.</b> Efecto de un tratamiento contra la mastitis a base de propóleo, sobre la producción de leche en un sistema con búfalas y vacas (en Lt/a/día).....	<b>90</b>
<b>21.</b> Costo de los tratamientos.....	<b>91</b>
<b>22.</b> Efecto de un tratamiento contra la mastitis a base de propóleo, sobre los indicadores económicos en un sistema de producción de leche en vacas.....	<b>91</b>
<b>23.</b> Efecto de un tratamiento contra la mastitis a base de propóleo, sobre los indicadores económicos en un sistema de producción de leche en búfalas.....	<b>92</b>
<b>24.</b> Efecto de un tratamiento contra la mastitis a base de propóleo, sobre los indicadores económicos en un sistema de producción de leche con vacas y búfalas.....	<b>92</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURAS</b>	<b>PÁG</b>
1. Examen físico y palpación de la ubre.....	28
2. Aparato para determinar la conductividad eléctrica de la leche.....	29
3. Prueba del recipiente de fondo oscuro.....	29
4. Interpretación de los resultados de la prueba de California.....	30
5. Visualización de colonias de Staphylococcus sp.....	66
6. Crecimiento (mm) del halo inhibitorio (Antibiograma) de 5 tratamientos.....	68
7. Evolución del grado de mastitis en vacas y búfalas con 4 tratamientos.....	73
8. Mediana de CMT para vacas y búfalas.....	75
9. Interacción tratamiento por especie para CMT 5.....	77
10. Interacción tratamiento por especie para CMT 7.....	77
11. Interacción tratamiento por especie para CMT 12.....	78
12. Tratamiento 0.....	79
13. Tratamiento 1.....	80
14. Tratamiento 2.....	80
15. Tratamiento 3.....	82
16. Desarrollo de ufc en aerófilos mesófilos y coliformes totales.....	84
17. Precio Promedio de la Leche a puerta de corral.....	88

UNIVERSIDAD NACIONAL EXPERIMENTAL DE LOS LLANOS  
OCCIDENTALES “EZEQUIEL ZAMORA”  
VICERECTORADO DE PRODUCCION Y DESARROLLO SOCIAL  
PROGRAMA DE ESTUDIOS AVANZADOS  
MAESTRIA EN PRODUCCION ANIMAL SOSTENIBLE

**USO DEL PROPOLEO EN EL CONTROL DE MASTITIS CLINICA  
Y SUBCLINICA EN VACAS Y BUFALAS**

**AUTOR:** CESAR AUGUSTO PAREDES

**TUTOR:** NEYO LA CRUZ PEREZ

**AÑO:** 2021

**RESUMEN**

El objetivo del presente estudio fue investigar el efecto del propóleo sobre los cuadros de mastitis clínica y subclínica en vacas y búfalas en la fina La Granja de Hoy. Para ello se dividió el ensayo en tres etapas: Diagnóstico, Laboratorio y Campo. Se realizó el diagnóstico utilizando la prueba del test de California, seleccionando los cuartos que presentaron diagnóstico de dos y tres cruces. Se conformaron 4 grupos, totalmente al azar, para medir el efecto del propóleo en extracto etanólico (EEP) de la manera siguiente: T0 solo etanol, T1 EEP al 15%, T2 con EEP al 25% y T3 correspondiente al antibiótico comercial que para el ensayo, se utilizó una mezcla de Cefalexina + Kanamicina. Seguidamente de las muestras de leche de vacas y búfalas, se sembraron en medios bacteriológicos, donde se aisló el *Staphylococcus aureus* como el agente etiológico causal de esta patología. La metodología experimental empleada fue la difusión en agar utilizando discos de papel de filtro. Se utilizó Cefalexina + Kanamicina como control antibacteriano se realizaron antibiogramas para medir el efecto de los tratamientos sobre el crecimiento de esta bacteria y se realizó un control de la calidad de la leche, realizando conteo de Aerófilos Mesófilos y Coliformes Totales. En la etapa de campo se aplicaron dos dosis por cuanto afectado, tanto en vacas como búfalas, de los 4 tratamientos evaluados.

El análisis económico indica que el tratamiento 2 fue el más eficiente en el control de la bacteria y el incremento posterior de la producción láctea.

Durante el ensayo se presentó un solo cuadro clínico en vaca, el cual fue tratado con dos dosis de EEP al 50%.

**Palabras claves:** Propóleo, extracto etanólico, *Staphylococcus aureus*, halo de inhibición

UNIVERSIDAD NACIONAL EXPERIMENTAL DE LOS LLANOS  
OCCIDENTALES “EZEQUIEL ZAMORA”  
VICERECTORADO DE PRODUCCION Y DESARROLLO SOCIAL  
PROGRAMA DE ESTUDIOS AVANZADOS  
MAESTRIA EN PRODUCCION ANIMAL SOSTENIBLE

**USO DEL PROPOLEO EN EL CONTROL DE MASTITIS CLINICA  
Y SUBCLINICA EN VACAS Y BUFALAS**

**AUTOR:** CESAR AUGUSTO PAREDES

**TUTOR:** NEYO LA CRUZ PEREZ

**AÑO:** 2021

**ABSTRACT**

The objective of this study was to investigate the effect of propolis on clinical and subclinical mastitis in cows and buffaloes at the La Granja de Hoy farm. For this, the trial was divided into three stages: Diagnosis, Laboratory and Field. The diagnosis was made using the California test, selecting the quarters that presented a diagnosis of two and three crosses. Four groups were formed, completely at random, to measure the effect of propolis in ethanolic extract (EEP) as follows: T0 only ethanol, T1 EEP at 15%, T2 with EEP at 25% and T3 corresponding to the commercial antibiotic that stops the test, a mixture of Cephalexin + Kanamycin was used. Following the samples of milk from cows and buffaloes, they were sown in bacteriological media, where *Staphylococcus aureus* was isolated as the causal etiological agent of this pathology. The experimental methodology used was diffusion in agar using filter paper discs. Cephalexin + Kanamycin was used as an Antibacterial control, antibiograms were performed to measure the effect of the treatments on the growth of this bacterium and a control of the quality of the milk was carried out, counting Mesophilic Aerophils and Total Coliforms. In the field stage, two doses were applied as affected, both in cows and buffaloes, of the 4 treatments evaluated.

The economic analysis indicates that treatment 2 was the most efficient in the control of the bacteria and the subsequent increase in milk production. During the trial, a single clinical picture was presented in a cow, which was treated with two doses of 50% EEP.

**Keywords:** Propolis, ethanolic extract, *Staphylococcus aureus*, inhibition halo

## INTRODUCCIÓN

El término Mastitis se refiere a la inflamación de la glándula mamaria, sea cual fuere su causa. Se caracteriza por alteraciones físicas, químicas y, casi siempre, bacteriológicas de la leche y por modificaciones patológicas del tejido glandular (Blood y Radostits, 1992). Aunque de mayor importancia económica en la vaca lechera, la mastitis puede afectar cualquier especie y se trata de la misma manera en todas ellas. Esto ocasiona pérdidas económicas en la industria láctea y afecta a los productores de leche en sus rebaños por hembras que deben ser descartadas tempranamente, riesgo de subsecuentes mastitis, y problemas de salud pública que pueden ocurrir dado que se trata de una enfermedad zoonótica (Mantilla, 2018).

En este sentido, los gastos en tratamientos, básicamente antibióticos, causan erogaciones de dinero que conllevan a disminuir la rentabilidad del sistema de producción. Actualmente se ha creado una gran presión sobre el uso de antibióticos para el control de las mastitis, ya que sus residuos afectan las características organolépticas de la leche y la de sus productos, causando en algunos casos, una posible resistencia bacteriana por el uso de dichos antibióticos lo cual afecta la salud humana. La resistencia a los Antibióticos es una amenaza muy grave para la salud humana y animal, Promover el uso responsable y reducir la cantidad de antibióticos usados en personas y animales, en todo el mundo, es vital para mantener la su eficacia y combatir enfermedades bacterianas en animales y humanos. Animales bien cuidados y adecuadamente manejados, experimentarán un mejor bienestar, serán menos propensos a las infecciones y necesitarán menos antibióticos (Laguens *et al*, 2016). Por esta razón, en la actualidad organismos internacionales han ejercido presión sobre el uso de antimicrobianos para el tratamiento de las mastitis bovinas y sus periodos de retiro para el consumo humano y el procesamiento industrial.

A la par con esta realidad, existe otra no menos importante. La situación económica de Venezuela es la más grave de nuestra historia contemporánea. Esta crisis ha abarcado todos los ámbitos productivos, incluyendo la producción pecuaria. La adquisición de productos y antibióticos para las explotaciones ganaderas es cada día más limitada, en cuanto a la disponibilidad y variedad de fórmulas (principios activos). Esta realidad nos lleva a buscar procedimientos alternativos que sean eficaces para el tratamiento de patologías como la mastitis en bovinos, económicos y amigables con el animal y el medio ambiente, que participen en un cambio de modelo de producción tradicional a uno ecológico y sostenible.

En este sentido hemos estudiado el uso del propóleo para el control de las mastitis clínicas y subclínicas en vacunos y búfalos. Para ello tenemos planteado realizar una investigación de laboratorio y campo en la finca: La Granja de hoy, ubicada en el sector La Luz, Municipio Obispo del estado Barinas. Esta investigación se ha realizado en tres etapas: La primera de campo, para el diagnóstico de las mastitis y la toma de muestras. La segunda etapa de laboratorio para realizar cultivos, identificar las bacterias presentes y evaluar la sensibilidad de las bacterias a antibióticos y al propóleo a través de los antibiogramas y la tercera etapa de campo donde se aplicaron las soluciones etanólicas a base de propóleo y luego se evaluó su eficacia.

Con este trabajo se espera hacer una contribución en el uso de tratamientos alternativos para enfermedades como la mastitis (en vacas y búfalas), amigables con el ambiente y aumentar el portafolio de alternativas Veterinarias en el manejo de enfermedades bacterianas.

## CAPÍTULO I FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

### 1.1 Planteamiento del problema

La mastitis continúa siendo la enfermedad bovina más costosa a nivel mundial, al generar importantes pérdidas económicas, dado que disminuye la producción de leche, incrementa los costos de insumos para tratamientos, aumenta el descarte de vacas por pérdida de cuartos glandulares y eliminación de leche por retiro, motivado, a la presencia de antibióticos residuales que afectan la salud humana. La mastitis causa un fuerte impacto sobre la salud y el bienestar animal, y en especial, sobre la rentabilidad y la calidad de vida de los productores de leche (Boscán, 2011).

El consenso mundial sobre las repercusiones de la mastitis bovina en la producción lechera ha sido descrito, atendiendo las formas subclínica, clínica y crónica. No obstante, las pérdidas económicas anuales combinando ambos casos (subclínica y clínica) oscilan entre 170.00 a 400.00 \$ por vaca - año; dependiendo de muchos factores técnicos, biológicos y económicos. Sin embargo, los hatos lecheros con mayores problemas de salud en este campo, pueden tener mayores pérdidas económicas anuales por hembra efectiva anual (Araúz, 2010).

El problema es complejo y presenta varios factores intrínsecos y extrínsecos, pues cuando apreciamos la interacción de la producción lechera con la mastitis y su relación con las estrategias nutricionales, las instalaciones, el ambiente e incluso con la influencia fundamental de factores sociales y de actitud, hacen que la prevención y el control de la enfermedad se presente como un gran desafío. Es importante destacar que la mastitis clínica representa sólo la “punta del iceberg” del problema, pues el gran ámbito de la enfermedad subclínica se suele subestimar (Boscán, 2011).

Se considera que una vaca con mastitis subclínica presenta pérdidas económicas por reducción en la capacidad de síntesis y secreción de la glándula mamaria, alcanzando entre 70 % y 75 %; mientras que el resto de las pérdidas económicas son ocasionadas por la Mastitis Clínica. Un hato lechero de aparente estado de salud

mantiene entre 15 y 45 % de sus vacas en producción con un evento inflamatorio subclínico en algún momento del periodo de producción; cuyo estadio puede durar días, semanas e incluso meses hasta que el mismo se declare como un cuarto mamario con mastitis clínica o el proceso logre ser controlado por los mecanismos de defensa de la vaca (Araúz, 2010).

Recientemente se ha incorporado otra variable a la estimación de las pérdidas producidas por la mastitis, como es el costo de la transmisibilidad de las infecciones. Si una vaca está infectada con una bacteria como *Staphylococcus aureus* y no se logra la curación, se considera que estaría infectada en forma persistente por el resto de la lactancia aumentando así la presión de infección sobre las vacas que están sanas. Debería en consecuencia, asumirse un costo por el tratamiento de las vacas que desarrollan nuevas infecciones, así como el costo que supone el tratamiento infructuoso de la vaca origen de las nuevas infecciones (Pinzón-Sánchez, *et al.* 2011).

A partir de la década de los 80 hasta años recientes, la tasa promedio de incidencia de la mastitis clínica en el Reino Unido fue calculada en aproximadamente 35 a 50 casos por cada 100 vacas por año; no muy diferente a la observada 15-20 años antes. Esta enfermedad, desde el punto de vista económico, es la más importante en la industria lechera de los Estados Unidos, ya que el 50% de las vacas se encuentran infectadas con algún tipo de mastitis. Se considera que esta enfermedad representa el 70% de los gastos totales para los ganaderos lecheros, resultando en una pérdida de billones de dólares cada año (Bedolla, 2008).

En Argentina las últimas estimaciones realizadas hace tres décadas, indican pérdidas anuales por menor producción de US\$ 115 a US\$ 220 millones por año, según la Asociación Argentina de Lucha Contra Mastitis. Además, no existen precedentes de investigaciones dirigidas a examinar las pérdidas directas y las erogaciones del control y prevención de esta enfermedad, y observar la variabilidad entre establecimientos. Posteriormente se realizó un estudio en Córdoba donde se

concluyó que la erogación por control de mastitis clínica y subclínica se consideraba alrededor de 1 dólar/vaca/día (Vissio *et al.* 2015).

Según Ferraro *et al.* (1999), En Venezuela los índices de prevalencia de mastitis subclínica se han estimado en un 30,18%, donde las causas son principalmente atribuidas a factores ambientales y de manejo, siendo importante acotar que, en el país la producción lechera proviene de ganadería mestiza de doble propósito, en su gran mayoría, salvo algunas ganaderías lecheras especializadas, en la zona Andina, donde se utilizan razas puras o con un alto grado de pureza en su mayoría Holstein.

Por otra parte, es muy común en las fincas de Venezuela que no se cuente, por diversas circunstancias relacionadas con las dificultades económicas bajo las cuales trabaja el productor agropecuario, con controles ni tratamientos adecuados para las búfalas, lo cual se traduce en bajas en la producción, calidad de leche y pérdida de cuartos. La falta de información y desarrollo de investigaciones especializadas en mastitis de búfalas generan una costumbre de utilizar los tratamientos contra la mastitis igual a los empleados en bovinos, sin saber en muchos casos de su efecto benéfico y si las dosis son adecuadas para ser utilizadas en búfalas (Mantilla, 2018).

En los llanos occidentales y particularmente en el estado Barinas, la situación no es muy diferente.

En la actualidad la realidad de unidades de producción, como la Granja de Hoy, es que presentan casos de mastitis clínicas en sus rebaños de ordeño. Esta situación es producto de la falta de diagnósticos oportunos de los casos subclínicos, que luego se cierto tiempo, evolucionan a casos clínicos y algunas veces crónicos. Además, en nuestro país no existen cifras oficiales, por parte de los entes encargados, sobre la incidencia y prevalencia de mastitis clínica y subclínica en nuestros rebaños lecheros.

Esta realidad llevo al autor, a realizar un ensayo con tratamientos alternativos, como el uso de propóleo en diferentes concentraciones, y evaluar su eficacia, tanto de vacas como en búfalas.

## 1.2 Importancia de la investigación

En la actualidad, existe en los llanos occidentales, un fuerte incremento de la explotación lechera bufalina (*Bubalus bubalis*). Fincas que tradicionalmente se dedicaban a la explotación lechera vacuna en sistemas doble propósito, han migrado a la producción con búfalos, con la intención de aprovechar sus ventajas comparativas como lo son la rusticidad, manejo y tenor graso de la leche de esta especie que, se ha incrementado fuertemente en nuestro estado Barinas.

Existen fincas, como La Granja de Hoy, donde se explotan vacunos y búfalos indistintamente con la intención de definitivamente quedarse con la explotación búfalera. Este cambio ha traído como consecuencia la adaptación de instalaciones, manejo de la pastura y del manejo sanitario de este bovino con teoría de ensayo y error que Palella *et al.* (2012) la describe como “El procedimiento que, mediante la ejecución de acciones, permite descubrir una solución entre diversas opciones. Su principal limitación radica en la falta de garantías de que la solución encontrada sea la mejor ni que la respuesta encontrada sea aplicable a situaciones similares”. La falta de información y desarrollo de investigaciones especializadas en mastitis de búfalas generan una costumbre de utilizar los tratamientos contra la mastitis igual a los empleados en bovinos, sin saber en muchos casos de su efecto benéfico y si las dosis son adecuadas para ser utilizadas en búfalas (Mantilla, 2018).

Así mismo, los nuevos paradigmas en la producción agropecuaria a nivel mundial y más aún en los sistemas de explotación Bovinos, establecen la imperiosa necesidad de modificar viejos cánones de manejo y adaptarlos a modelos altamente ecológicos, rentables y que proporcionen bienestar tanto a propietarios y personal que allí laboran, garantizando la sostenibilidad del sistema.

Por estas circunstancias se hace imperativo el estudio de tratamientos alternativos que, sean eficaces en el control de la mastitis, para ambos bovinos, tanto en casos clínicos como subclínicos, rentables y sin el riesgo de trazas de antibióticos en leche que puedan afectar la calidad del producto y causar problemas de salud pública.

### **1.3 Objetivo general**

Determinar la eficacia del propóleo en el control de la mastitis clínica y subclínica en Búfalas y Vacas.

#### **1.3.1 Objetivos Específicos**

- Describir el manejo higiénico-sanitario de los animales en ordeño dentro de la unidad de producción.
- Calcular la prevalencia y el Índice de mastitis subclínica clínica (IMSC) con base a la prueba CMT y mastitis clínica a través de observación clínica en los rebaños objetos de estudio.
- Identificar la etiología causal de la mastitis clínica y subclínica en la finca La Granja de Hoy, utilizando cultivos bacteriológicos.
- Determinar la sensibilidad a antibióticos y al propóleo mediante el uso de Antibiogramas.
- Comparar el efecto de los tratamientos con propóleo y el antibiótico comercial, sobre el índice de mastitis, producción de leche y relación beneficio-costos de los animales en estudios.

### **1.4 Alcances y limitaciones**

La presente investigación tiene como finalidad, proponer una alternativa para el tratamiento de la mastitis subclínica y clínica en vacas y búfalas en los llanos occidentales, el país y en otras latitudes donde se realice este tipo de explotación. Conociendo las limitantes del uso de antibióticos tradicionales en cuanto a las lesiones no reversibles que permanentemente quedan en la ubre, la limitada disponibilidad de antibióticos eficaces y los problemas organolépticos de la leche proveniente de vacas y búfalas tratadas, su periodo de retiro y la factibilidad de encontrar trazas que causan problemas de resistencia a los antibióticos, casos

alérgicos a nivel de consumidores y por ende problemas de salud pública, el campo de acción para los tratamientos alternativos no convencionales presentan un inmenso universo de estudio, desarrollo y aplicación, pues el límite solo lo coloca el investigador.

En el mismo orden de ideas, en la actualidad las nuevas orientaciones de la políticas agropecuarias a nivel mundial, tratan de corregir los desequilibrios producidos por modelos anteriormente implantados, desincentivando la producción intensiva de alimentos y apoyando medidas agroambientales más respetuosas con el entorno natural. Es por ello que el uso de alternativas naturales para el manejo clínico de estas patologías, que ayuden a garantizar la economía del sistema bajo un ambiente ecológico y sin riesgo de producir efectos secundarios en la salud humana y por ende en la salud pública, tiene hoy día mayor vigencia, proporcionándole sostenibilidad al sistema de producción y garantizando su rentabilidad.

## CAPÍTULO II MARCO TEORICO

Comprende los antecedentes de la investigación, bases teóricas, operacionalización de las variables, y definición de términos básicos. Razón por la cual, a continuación se exponen una serie de antecedentes tanto históricos como investigativos que se relacionan con el trabajo en curso.

### 2.1 Antecedentes de la investigación

Los antecedentes constituyen el apoyo suministrado para el presente trabajo de aplicación las cuales representaran la base del desarrollo temático considerando estudios similares de investigaciones previas realizadas. En Venezuela y otros países se han desarrollado trabajos con tratamientos alternativos para la mastitis y el uso de propóleo.

A continuación se mencionan algunos:

Cuenca *et al.* (2017) trató casos de mastitis con una solución hidroalcohólica de propóleo al 5%, 10% y 15%, más una disolución de matico (*Piper aduncum*) al 5%, comparando su eficacia frente a Cobactán (Cefquinoma base, como sulfato 75 mg). Para el estudio se utilizó 40 bovinos en producción que resultaron positivos a la prueba de campo CMT, la identificación del agente causal, RCS y composición química de la leche se analizaron en laboratorio. Los tratamientos se aplicaron por vía intramamaria en dosis de 10 ml por cuarto afectado cada 24 horas durante tres ocasiones. Los resultados determinaron que la solución al 5% disminuye la presencia de células somáticas por debajo de 200.000 al igual que Cobactán, mientras que los tratamientos al 10% y 15% no lograron este objetivo. Se concluye que la solución hidroalcohólica de propóleo al 5% iguala al producto comercial en conteo de células somáticas y tiempo de eficacia del tratamiento.

Paredes (2013), Determinó la eficacia del plasma marino, propóleos y chichipince

(*Hamelia patens*), en el control de la mastitis clínica en vacas.

Para ello utilizó 3 tratamientos a saber:

- Tratamiento 1 (T1): Plasma marino hipertónico al 33 %, 10cc por cuarto afectado, dos veces por días (cada doce horas) por cinco días como máximo.
- Tratamiento 2 (T2): Propóleos al 12.5 %, 10cc por cuarto afectado dos veces al día (cada doce horas) por cinco días.
- Tratamiento 3 (T3): Chichipince (*Hamelia patens*) al 50 %, 10cc por cuarto afectado dos veces al día (cada doce horas) por cinco días.

Los resultados fueron los siguientes:

El Plasma Marino no aplicó en esta prueba debido a que no fue significativo en las pruebas “in Vitro”.

Las vacas tratadas con Chichipince al 50%, los resultados fueron significativos ( $P < 0.05$ ); así tenemos que en promedio de dosis para una mastitis clínica es entre 5 y 6 dosis, entre tres y cuatro días para curarla de un total de 12 vacas tratadas el 100% de estas fueron curadas.

Los tratamientos hechos con Propóleos al 50%, determinamos que el promedio de dosis para curar una mastitis es de 2 dosis (un día) y los días de residuo de propóleos oscila entre los 2 y 3 días, teniendo que de 10 vacas todas se curaron de mastitis clínica que representa el 100 % de los casos tratados.

En conclusión, se presentó una efectividad del 100% para el propóleo y el Chichipince de casos tratados, con la diferencia en el número de dosis por tratamiento, días de residuo y días a curarse para cada uno.

Arguello *et al.* (2008), Evaluaron de la dosis efectiva de la Propolina en el tratamiento de la Mastitis en vacas, en Managua, Nicaragua. Para ello utilizaron 3 tratamientos: El tratamiento I: Propolina al 0,5%. Tratamiento II: Propolina al 1,0%. Tratamiento III: Mastix (Oxitetraciclina). Cada grupo contó con 7 vacas que a la prueba del test de California presentarán mastitis grado 2 y 3.

A los 56 días, las vacas tratadas con propolina al 0,5% tenían 1 cuarto afectado y 27 cuartos sanos para una efectividad del 96%, mientras que las vacas tratadas con propolina al 1,0% tenían 7 cuartos afectados y 21 cuartos sanos para una efectividad del 75%, mientras que las vacas tratadas con el tratamiento químico tenían 9 cuartos afectados y 19 cuartos sanos para una efectividad del 68%.

Vera *et al.* (2020), Evaluaron la efectividad de los biopreparados orgánicos como tratamiento de la mastitis clínica y subclínica en bovinos en producción. Se seleccionaron 15 vacas, agrupadas en tres grupos de cinco animales cada uno para la aplicación (durante tres días) de los respectivos tratamientos: Sangre de Drago (*Croton lechleri*) al 5%, Propóleo (Propolis de *Apis mellífera*) al 5% y Cefalexina (comercial).

Además se realizó la prueba California Mastitis Test (CMT) y toma de muestras de leche, a nivel de cada pezón, para la realización del Conteo de Células Somáticas (NCS), antes de la aplicación de los tratamientos y 48 horas después que se finalizó la aplicación de los preparados. Se empleó un DCA con submuestras, para tres tratamientos con cinco repeticiones, para un total de 60 observaciones. Las variables medidas fueron: Número de células somáticas (NCS/ml), cantidad de aglutinación de las submuestras de leche (CMT), efectividad de los biopreparados orgánicos y Cefalexina. Los resultados infieren un efecto no significativo ( $p > 0,05$ ) en los tratamientos para las variables estudiadas. Se observó en los valores obtenidos un mejor comportamiento entre los preparados orgánicos en comparación al comercial; destacando el Propóleo (Propolis de *Apis mellífera*) al 5% que redujo las NCS y la aglutinación de la leche, que presentó el menor costo a nivel económico. Se concluye que la aplicación de los preparados orgánicos (Propóleo y Sangre de Drago) mantiene una semejanza en la eficacia con respecto al producto comercial (Cefalexina).

Paredes (2018), en Ecuador, comparó el efecto de tres concentraciones de propóleos en el tratamiento de mastitis subclínica de vacas lecheras. Las concentraciones evaluadas fueron de 2,5%, 5% y 10%, en un hato bovino

perteneciente al Centro Experimental Uyumbicho, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, utilizando una dosis de 10 ml, cada 12 horas y un total de 2 aplicaciones, se aplicó suero al grupo testigo. Esta investigación constó de 12 vacas que presentaron una reacción a la prueba de California mastitis test de grado ++, considerada como mastitis subclínica. Los animales se distribuyeron bajo un diseño de bloques al azar para la aplicación de los tratamientos. Las variables utilizadas fueron, la reacción a la prueba de CMT antes y después del tratamiento (cualitativo) y la efectividad en contra del agente causal expresado en porcentaje. En el 100% de las muestras se aisló *Staphylococcus aureus*. No existió diferencia significativa entre los tratamientos ya que todas presentaron una efectividad del 100% en contra del agente causal y una respuesta negativa al CMT posterior a su evaluación.

De Lima *et al.* (2015), probaron 70 cepas de *Staphylococcus spp.*, que fueron proporcionadas por el laboratorio de microbiología e inmunología animal de la Universidad Federal de Vale do São Francisco. Los microorganismos aislados fueron identificados con base en su morfología (color, tamaño), coloración (tinción de Gram) y características bioquímicas (presencia o ausencia de hemólisis).

Las muestras se aislaron de bovinos con mastitis subclínica en rebaños de las ciudades de Petrolina y Arcoverde en el estado de Pernambuco (Brasil). Los rebaños contenían animales de varias razas y edades, y también se encontraban en diferentes etapas de lactancia.

Tras las pruebas morfológicas, de tinción y bioquímicas, se observó la siguiente distribución de los aislamientos: *Staphylococcus aureus* (n = 27), *Staphylococcus coagulasa positiva* (n = 26) y *Staphylococcus coagulasa negativa* (n = 17).

Los niveles de compuestos fenólicos y flavonoides totales encontrados para propóleos comerciales fueron 126,22 mg (12,62%) de gálico equivalente de ácido por gramo de extracto de propóleo, y 51,06 mg (5,10%) equivalente de quercetina por gramo de propóleo. Estos resultados están de acuerdo con los límites establecidos por el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Abastecimiento (MAPA), con un porcentaje mínimo de fenoles totales de 5% y un porcentaje mínimo de

flavonoides totales del 0,5% Brasil, 2001.

El análisis Cromatografía Líquida con Alto Performance (HPLC-DAD) de propóleo reveló la presencia de compuestos fenólicos. Ferúlico (7,04 mg), cafeico (106,87 mg), cinámico (222,55 mg), cumárico (226,55 mg) y 3,4-dihidroxibenzoico (2,20 mg). Se detectaron ácidos en 5 mg de extracto seco de propóleo.

La concentración bactericida mínima de gentamicina y amoxicilina, después de la asociación con  $\frac{1}{2}$  MBC de la extracto de etanol de propóleo (34,35 mg), siempre que la media valores de 0,1384 y 0,5235  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , respectivamente. Los resultados del presente estudio corroboran los hallazgos de Ashraf y Bassuony (2009), quienes también encontraron compuestos fenólico y flavonoides en muestras de propóleo de Egipto. Las concentraciones de fenoles y flavonoides totales difieren debido a varios factores, incluida la ecología del flora, el período de recolección de la resina, la genética de la abeja reina, la flora local y la región de recolección, entre otros (Bankova, 2005; Sous *et al.*, 2007). El análisis HPLC-DAD de propóleo reveló la presencia ácidos cinámicos, ferúlico, cafeico, cumárico y 3,4-dihidroxibenzoicos. Estos compuestos fueron identificados de acuerdo con su tiempo de retención y espectral UV características y luego se comparan con los estándares. Los derivados de los ácidos cinámicos se encuentran comúnmente en el propóleo.

En el presente estudio, la combinación de amoxicilina y gentamicina con el tercer antimicrobiano, propóleo, redujo el valor medio de los dos antimicrobianos MBC en más de doce veces. Se encontraron que las asociaciones entre los antimicrobiano tiene como objetivo potenciar su acción y aumentar el espectro de la acción en microorganismos. Se cree que una combinación de extractos de propóleo y agentes antimicrobianos podrían conducir a una reducción de las dosis de los medicamentos utilizados, lo que resulta en menos presión para la aparición de cepas resistentes. Podría también reducen los efectos secundarios y los restos de antimicrobiano de desecho.

Neacato (2005), Elaboró extractos etanólicos de propóleo para determinar su acción bactericida y/o bacteriostática en el control de *Staphylococcus aureus*, in vitro

aislado de 14 vacas enfermas con mastitis, esta acción fue comparada con un antibiótico comercial y además se determinó la concentración mínima inhibitoria del extracto de propóleo frente a esta bacteria. Para ello realizó 3 diluciones de propóleo a saber; 100%, 50% y 25%, además de ciprofloxacina como antibiótico comercial y solución de etanol como testigo. Para cada tratamiento se utilizaron 3 concentraciones bacterianas de *Staphylococcus aureus*, 0,5; 5 y 9 Mc Farland respectivamente.

Al analizar todos los tratamientos en estudio se destacó el producto ciprofloxacina con un radio de 15,33 mm de inhibición, el tratamiento más cercano se presentó con el 25% de Propóleo a 9 Mc Farland que demostró un promedio de 13,00 mm de radio. Es importante anotar que a medida que se diluye más el propóleo el halo de inhibición aumenta debido al incremento de su difusión en el medio. Evaluando los promedios de los halos de inhibición de los tratamientos en estudio, en una forma individual en función al efecto de los niveles de propóleo y testigos con cada una de las concentraciones bacterianas, se observa que la ciprofloxacina tiene un mayor halo de inhibición 15,33 mm para la concentración bacteriana 0,5 de Mc Farland que los demás tratamientos, la dilución de propóleo al 50% tiene un mayor halo de inhibición 12,00 mm para la concentración bacteriana 5 de Mc Farland que los demás tratamientos, la dilución de propóleo al 25% tiene un mayor halo de inhibición 13,00 mm para la concentración bacteriana 9 de Mc Farland que los demás tratamientos. El etanol se mantiene en todas las concentraciones bacterianas en 0,00 mm.

Ortega *et al.* (2006), evaluaron el efecto de la utilización de propolina en el control de la mastitis bovina en el Municipio de Muy Muy, Departamento de Matagalpa, Nicaragua. Una muestra de 36 animales fue utilizada en un diseño completamente al azar (D.C.A) distribuido aleatoriamente en tres tratamientos. Tratamiento I: Tratamiento testigo (Oxitetraciclina), Tratamiento II: Solución al 1,5% de propolina. Tratamiento III: Solución al 3% de propolina. Se encontró una prevalencia de mastitis en el hato de 17,46 %, (13,53 % de mastitis subclínica y 4,80 % de mastitis

clínica), y el 82,54 %, resultó negativa, el cuarto más afectado fue el anterior derecho (AD) con 10,04 % de reacción positiva. Aplicaron una dosis de 5ml por cuartos afectados cada 24 horas por 3 días. Este tratamiento se efectuó después de un ordeño a fondo. El tratamiento químico se aplicó de acuerdo al prospecto. Emicina 200 L.A cada ml contiene oxitetraciclina clorhidrato e.q.a oxitetraciclina base 200 mg, 2 pirrolidona 400 mg, providote 50 mg vehículo c.h.p dosis 1ml/10kg de peso vivo vía de administración intramuscular, se aplicó intramuscular. Las pruebas diagnósticas se realizaron a los 7 días de comenzado el tratamiento, y se repitieron a los 14, 21, 28, 35, 41 y 49 días respectivamente. A los 49 días la propolina al 3 % (tratamiento III) tenía 10 animales negativos, 1 animal débilmente positivo y 1 animal intensamente positivo. La propolina al 1,5 % (tratamiento II) tenía 12 animales negativos. Y el químico (tratamiento I) tenía 12 animales negativos.

Como se puede observar el tratamiento 1 y 2 tuvieron mejores resultados en el control de la mastitis bovina, donde a los 35 días el tratamiento I alcanza su efectividad con un 100 %. El tratamiento II alcanza su efectividad a los 21 días con un 100 %. El tratamiento III alcanzo su efectividad a los 28 días con un 83,3 %.

El análisis económico refleja que con el medicamento natural de origen animal se logró aplicarles tratamiento a 12 animales, con propolina al 3 % con un costo total de C\$ 85,17 (ochenta y cinco córdobas con 17/100 ) y a otros 12 animales se les aplico propolina al 1,5 % con un costo total de C\$ 83,68 (ochenta y tres córdobas con 68/100) con respecto al producto químico se trataron 12 animales con un costo total de C\$ 389,00 (trescientos ochenta y nueve córdobas) existiendo un incremento de C\$ 305,00 (trescientos cinco córdobas) que podría ser destinado para la compra de otro producto.

Mantilla (2018), estudió la eficacia de tratamientos con base en extractos blandos de propóleos para el control de la mastitis subclínica en búfalas de la finca Parcela 7, zona norte del estado Táchira, Venezuela. La investigación tuvo tres fases: 1) Diagnóstico para determinar la presencia de mastitis subclínica mediante la prueba de California Mastitis Test (CMT) y análisis bacteriológico de los agentes

etiológicos; 2) pruebas in vitro de propóleos usando técnica de Kirby Bauer; y 3) pruebas in vivo con aplicaciones intramamarias. La prevalencia inicial de mastitis subclínica fue de 29,5 %. Se diagnosticó el *Staphylococcus aureus* como agente etiológico principal el cual se aisló y usó en las pruebas in vitro. Las medias de los radios de los halos de inhibición fueron: 21.33 mm para el propóleo hidrosoluble al 50%; 20,11mm para el propóleo hidrosoluble al 25%; 25,44 mm para el control positivo ciprofloxacina; y 26,33 mm para el comercial Nitroforantoina.

Estos tratamientos se clasificaron como “sumamente sensibles” según la escala de Duraffourd, mientras que el propóleo liposoluble al 50% arrojó 17,33 mm, clasificándose como de “sensibilidad media”. Para las pruebas in vivo los cuartos diagnosticados con mastitis subclínica fueron distribuidos aleatoriamente en tres bloques para aplicar seis tratamientos: testigo; propóleo liposoluble al 25%; propóleo liposoluble al 50%; propóleo hidrosoluble al 50%; propóleo hidrosoluble al 25%; y tratamiento comercial.

El hidrosoluble de propóleo al 50% sanó el 66,6% de los cuartos y el hidrosoluble al 25% curó 33,3% de los casos, para un total de 50% de cuartos sanos con ambos tratamientos hidrosolubles. Los tratamientos liposolubles no pudieron evaluarse por la intoxicación letal causada por el aceite de ricino. Se concluyó que las soluciones hidrosolubles, en base de extracto blando de propóleo, son efectivas para el control de la mastitis subclínica causada por *S. aureus* en búfalas de la zona norte del estado Táchira.

Gil *et al.* (2012), Evaluaron la actividad bacteriostática y bactericida in vitro de la tintura etanólica de propóleos comercial al 70 % v/v proveniente de un apiario del Estado Cojedes, Venezuela sobre bacterias enteropatógenas ATCC. Se utilizaron *Salmonella entérica* subsp. entérica serotipo paratyphi A, *Salmonella entérica* subsp entérica serotipo paratyphi B *Salmonella entérica* subsp entérica serotipo typhi, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica* y *Escherichia coli* enterohemorrágica (O157:H7). Las cepas mencionadas se expusieron a distintas concentraciones de tintura de propóleos durante 24 horas para determinar la

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) utilizando el método de macrodilución en tubos. Resultados: *Salmonella paratyphi A* fue la única bacteria con efecto inhibitorio total en agar BHI. En las demás bacterias se evidenció efecto bacteriostático parcial. *Yersinia enterocolitica* fue la más sensible con una CMI 4% y CMB 8 %, seguida por *Shigella sonnei*, *Salmonella paratyphi B*, *Salmonella typhi* y *Escherichia coli* (O157:H7), con CMI 8% Y CMB 11% y finalmente *Shigella flexneri* y *Salmonella paratyphi A* fueron las más resistente con CMI 11% y CMB 15%. Se demostró que la tintura de propóleos tiene efecto bacteriostático y bactericida in vitro en las cepas estudiadas y que el etanol presente como solvente no es el responsable de tal efecto.

Gonsales *et al.* (2005). Estudiaron la actividad antibacteriana del propóleo recolectado en diferentes regiones de Brasil, el objetivo de este estudio fue investigar la actividad antibacteriana de muestras de propóleos de los estados de Goiás, Paraná y São Paulo, Brasil, y sus contenidos de flavonoides. Se prepararon extractos etanólicos de propóleo (EEP) (30 g de propóleos en etanol al 70%), y se probaron en los microorganismos *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. La metodología empleada fue la difusión en agar utilizando discos de papel de filtro. Se utilizaron ampicilina y tetraciclina como controles antibacterianos. La actividad se determinó mediante la lectura de los diámetros de la zona de inhibición (mm) después de 24 horas de incubación a 37°C. Los resultados demostraron que EEP inhibió el crecimiento de *Staphylococcus aureus* pero no el de *Escherichia coli*. Tetraciclina y ampicilina mostró una acción eficaz contra ambas bacterias. El contenido de flavonoides fue variable, dependiendo de la muestra de propóleo. De acuerdo con los resultados, se puede concluir que EEP mostró una acción eficaz contra las bacterias Gram-positivas, independientemente de su origen geográfico, y una correlación positiva entre la actividad antibacteriana y contenido de flavonoides.

Kartal *et al.* (2003), estudiaron la actividad antimicrobiana de dos muestras de propóleos de las regiones de Kazán y Marmaris en Turquía se investigó mediante el método de difusión en disco. La actividad antimicrobiana se probó con cuatro

extractos etanólicos diferentes (etanol al 30, 50, 70 y 96%) de cada muestra frente a siete bacterias Gram positivas, cuatro bacterias Gram negativas y un cultivo de hongos. Se descubrió que la actividad se debe principalmente al ácido cafeico y sus ésteres. Se aisló una mezcla isomérica que contenía cafeato de 3,3-dimetilalilo y cafeato de isopent-3-enilo a partir de muestras de propóleo de Kazán.

Moscoso *et al.* (2014), analizaron datos correspondientes a 15 búfalas de cada uno de los hatos búfaleros, en el municipio de Granada (Meta) y Puerto Boyacá, (Boyacá), Colombia; los cuales presentan diferencias de clima, humedad relativa, y el manejo en cada uno de los predios, para un total 30 animales seleccionadas por medio de un muestreo aleatorio; las cuales se encontraron en diferentes estadios de la lactación, donde se realizaron diferentes estudios como el Californian Mastitis Test, el recuento de células somáticas, y análisis microbiológico ya que estos revelan la presencia de mastitis, tanto clínica como subclínica. De los 704 Cuartos examinados, 291 fueron positivos es decir el 28% luego se realizaron cultivos y lecturas de éstos a las 24 y 48 horas.

Entre los resultados más significativos se halló que el microorganismo con mayor ocurrencia en los cultivos fue el *Staphylococcus* coagulasa negativo (SCN) con un (79,85%) y como segundo agente de importancia se estableció el *Streptococcus agalactiae* con un (5,74%). En cuanto a la prevalencia de la mastitis en ambas fincas los resultados arrojan que para la finca 1 se obtuvo una prevalencia P= 61 % y para la finca 2 se obtuvo una prevalencia de P=65% y una prevalencia general de P= 64%; En Colombia no se tienen datos previos a este estudio pero en diferentes países ha sido muy estudiado donde se encontraron datos de Paquistán el 20,6%, en Irak el 31,9%, India (24,4%) y Egipto el 54%. En Italia se reportó una prevalencia de 63%.

De estos antecedentes citados de investigaciones realizadas a nivel mundial, donde se contrastan prevalencias de casos de mastitis subclínicas y clínicas, se observa que las citadas por Mantilla (2018), en el Estado Táchira, Venezuela de 29,5% difiere con la calculada por el autor en Barinas Venezuela, la cual fue de

51,9%, y coincide con la publicada por Moscoso *et al.* (2014), en Cundinamarca, Colombia, la cual fue del 61%.

De igual manera, en cuanto a la efectividad del propóleo como producto natural con efecto antibacteriano en los casos de mastitis subclínica, el autor obtuvo mejoría y curación de cuartos tratados en un 86% y 40% respectivamente, resultados estos que se coinciden con los publicados por Mantilla (2018), Paredes (2018), Arguello *et al.* (2008), Paredes (2013) y Ortega *et al.* (2006), donde consiguieron curación de cuartos con mastitis subclínica de 66%, 100%, 68%, 100% y 86% respectivamente.

Es importante señalar, que en todos de los casos citados, los tratamientos con propóleos en todas sus concentraciones, presentaron curación y mejoría de los cuartos tratados, lo cual se relaciona con la investigación que se presenta, donde se obtuvo resultados positivos sobre los indicadores de mastitis.

## 2.2 Bases teóricas.

### 2.2.1 Mastitis

#### 2.2.1.1 Generalidades

La mastitis bovina es una enfermedad infecto-contagiosa de la glándula mamaria, en la cual la inflamación se produce como respuesta a la invasión, a través del canal del pezón, de diferentes tipos de bacterias, micoplasmas, hongos, levaduras y hasta algunos virus. Sin embargo, las bacterias de los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium* y algunos gérmenes Gram -, son responsables de más del 90 % de los casos. Las bacterias que pueden producir mastitis sobreviven en diferentes nichos ecológicos, difiriendo por lo tanto en su mecanismo de transmisión e infección y en la facilidad con la cual pueden ser controladas. *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* están fundamentalmente asociados a ubres infectadas, lesiones de los pezones y colonización del canal del pezón, transmitiéndose de vaca a vaca y de cuarto a cuarto al momento del ordeño o poco después (Corbellini, 2014).

Esta inflamación trae como consecuencia, la alteración de las características físico-químicas y organolépticas de la leche. Los componentes de la leche que se ven afectados, como consecuencia de la mastitis, son las células somáticas, la grasa, proteína, lactosa y otros componentes menores como enzimas y minerales.

En esta fase subaguda, los Macrófagos (MA) y Polimorfonucleares (PMN) migran desde la sangre y del intersticio circundante a los alvéolos infectados y a la leche. Los MA funcionan como las células de “alarma temprana”, reconociendo a toda sustancia extraña al cuerpo, a través de sus receptores de membrana para las distintas Inmunoglobulinas (Ig's), fracciones del complemento, quininas, histaminas y citoquinas. Así, en la leche mastítica la proporción de PMN se incrementa concomitantemente con la severidad de la inflamación, pudiendo llegar a constituir el 80-90% de las Células Somáticas de la leche. La función específica de esos PMN es la de fagocitar y destruir a los microorganismos invasores y a cualquier otro tipo de

proteína foránea y remover los desechos producidos en el foco de infección. Las armas que poseen los PMN para combatir la infección son principalmente enzimas e inhibidores bacterianos (proteasas, lipasas y fosfolipasas), que también se incorporan a la leche. Además, y debido a la disrupción de la barrera endotelio capilar-epitelio mamario, hay una penetración anormal de componentes del plasma sanguíneo a la leche.

El plasma sanguíneo también contiene proteasas y lipasas, las cuales aceleran la descomposición de la grasa y de la proteína de la leche. En especial la plasmina, una enzima proteolítica proveniente del plasma sanguíneo puede causar un daño extenso a la caseína. Si bien cuando la leche es enfriada, la plasmina descompone a la caseína más lentamente, esta enzima es muy perjudicial en el procesado de los productos lácteos porque, al ser termoresistente, no es inactivada en el proceso de pasteurización y resiste también algunos de los procedimientos de UHT. Por lo tanto, la plasmina continuará dañando a la proteína láctea durante la elaboración de los productos y aún durante su almacenamiento hasta consumo. Al mismo tiempo que aumenta el número de Células Somáticas en la leche, comienzan los cambios en la composición de la leche. La inflamación disminuye la capacidad de síntesis del epitelio alveolar, de tal manera que los sólidos totales disminuyen entre un 5 y un 10 %, en proporción lineal con el aumento del número de células somáticas. La influencia sobre el contenido de grasa es variable. De acuerdo a la mayoría de los trabajos, disminuye en menos del 10 %. Sin embargo, la composición de la grasa sí cambia considerablemente, disminuyendo la calidad de los productos lácteos. Si bien la cantidad total de ácidos grasos no cambia, aumenta la cantidad de ácidos grasos libres, así como disminuye la cantidad de fosfolípidos, debido a una reducción en el tamaño del glóbulo de grasa (Corbellini, 2014).

Aunque siempre habrá más por aprender sobre la mastitis a nivel celular y molecular, en la actualidad existe un importante cuerpo de conocimientos sobre la enfermedad, lo que nos permitirá administrar de manera óptima su prevención. La base del conocimiento científico se mantiene en un aumento rápido, aunque se ha

observado la existencia de un enfoque inadecuado, tanto en la aplicación de los conocimientos adquiridos para desarrollar sistemas de control de enfermedades como para aumentar la capacidad de asimilación de esos conocimientos. Uno de los desafíos más importantes que enfrenta la industria láctea en Venezuela es el desarrollo, implementación y evaluación económica de soluciones prácticas para el control de la mastitis. Para hacer frente a este reto será necesario un enfoque integrado del problema y del trabajo conjunto entre el productor y el Veterinario, con el apoyo de los especialistas de las universidades e institutos de investigación, que aunando esfuerzos logren ganarle la batalla a la mastitis (Boscán, 2011).

#### **2.2.1.2 Tipos de Mastitis**

##### **Mastitis subclínica.**

La denominación mastitis subclínica hace referencia a que a pesar de la existencia de infección en la ubre, no existen cambios externos visibles que manifiesten la condición patológica en el animal. La mastitis subclínica evoluciona sin signos inflamatorios externos. Los signos más importantes son el aumento del contenido celular de la leche y la presencia de los microorganismos causales en la ubre (Blowey & Edmondson, 1995).

La mastitis subclínica ocurre cuando un patógeno infecta uno o más cuartos, pero no causa suficiente daño a los alvéolos (Ruegg, 2004); no es fácilmente visible por el operario, pues todos los cuartos de la vaca se ven normales y la leche tiene apariencia normal, con aproximadamente 500.000 unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml) (Pinzón, 2004), pero hay cambios importantes en la composición de la leche (Wolter, 2000).

En las mastitis subclínicas, una gran proporción de las glándulas afectadas no se identifican fácilmente por palpación manual de la ubre ni por el examen visual con la copa de fondo oscuro. Debido a estas circunstancias, el diagnóstico de este tipo de mastitis depende de pruebas como el CMT (California Mastitis Test), que permiten identificar el grado de infección subclínica (Blood y Radostits, 1992).

La mastitis subclínica se derivada del manejo deficiente, la higiene y de los traumas relacionados con los procedimientos ligados al ordeño; así como por la presencia de los microorganismos patógenos que pueden alcanzar el sistema mamario y ubicarse entre el conducto galactóforo del pezón y la cisterna glandular; el cual culmina con un proceso inflamatorio en la glándula mamaria; desencadenando los procesos celulares y bioquímicos; incluyendo la producción de agentes locales que alertan la migración leucocitaria mamaria. El proceso inflamatorio local es aquel estado que afecta el tejido parenquimal mamario que reduce la capacidad de biosíntesis y de transporte de los componentes de la leche. En la práctica, la mastitis subclínica pasa desapercibida para todas las personas encargadas del ordeño si partimos del concepto organoléptico, es decir en base a las características anatómicas del sistema mamario y en las condiciones de la leche (Arauz, 2010).

### **Mastitis clínica.**

En esta mastitis el cuarto infectado generalmente se inflama. Se aprecia dolor al tocarlo, la leche se observa a simple vista alterada por la presencia de coágulos, descamaciones, o suero descolorido y algunas veces sangre. Cuando el caso es más severo se aprecia en el animal fiebre, pulso acelerado, pérdida de apetito, reducción aguda de la producción de leche. Casi todos los casos clínicos comienzan como subclínicos; por lo tanto, el control efectivo de la mastitis subclínica es la mejor forma de reducir los casos clínicos (Mantilla, 2018).

**Según el grado de severidad clasificamos a las mastitis clínicas en:**

#### **Mastitis clínica subaguda:**

Esta forma de inflamación es levemente clínica y los síntomas son alteraciones menores en la leche, como grumos, flóculos u aspecto aguachento. El cuarto afectado puede presentar leve inflamación y sensibilidad al tacto, además de un poco o nada de calor localizado y enrojecimiento. Puede haber reducción de la producción de leche. No hay signos sistémicos de la enfermedad.

**Mastitis clínica aguda:**

Estas mastitis se caracterizan por un ataque repentino con enrojecimiento, hinchazón y endurecimiento del cuarto afectado, el cual además es sensible al tacto. La leche tiene un aspecto muy anormal (purulento, seroso aguachento o sanguinolento) y la producción disminuye marcada y repentinamente. Los síntomas generales que pueden presentarse son: 1) aumento de la temperatura rectal, 2) pérdida del apetito, 3) menor actividad, 4) disminución de la función ruminal, 5) pulso acelerado, 6) deshidratación, 7) debilidad, 8) temblores, 9) diarrea y 10) depresión.

**Mastitis clínica hiperaguda:**

Esta forma muy poco frecuente de inflamación mamaria se caracteriza por acontecer muy rápidamente. Los síntomas son los mismos que los descriptos para la Mastitis Clínica Aguda, pero su expresión es mucho más severa. Se presentan además signos como: 1) shock, 2) fibrosis en la ubre, 3) septicemia, 4) pérdida de coordinación muscular, 5) extremidades frías, 6) reducción del reflejo pupilar (Chaves, 2004).

**2.2.1.3 Etiología de las mastitis**

Clásicamente se la ha definido como una “enfermedad polifactorial”, porque el riesgo de infección depende de la habilidad de la vaca para rechazarla, del tipo, número y patogenicidad de las bacterias presentes en un rodeo y, fundamentalmente, de las condiciones de medio ambiente y del manejo en general y del manejo del ordeño en particular que se estén desarrollando en un establecimiento. Las bacterias que pueden producir mastitis sobreviven en diferentes nichos ecológicos (Corbellini, 2014), difiriendo por lo tanto en su mecanismo de transmisión e infección y en la facilidad con la cual pueden ser controladas. *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* están fundamentalmente asociados a ubres infectadas, lesiones de los pezones y colonización del canal del pezón, transmitiéndose de vaca a vaca y de cuarto a cuarto al momento del ordeño o poco después. Los llamados “patógenos

*ambientales*” (en especial coliformes *Streptococcus uberis* y *Pseudomona aeruginosa*), están ampliamente diseminados en los lugares donde viven los animales, en especial si están húmedos (barro) y/o con un alto contenido de materia orgánica (materia fecal, restos de alimentos como silajes o granos húmedos, etc.).

Según Mantilla (2018), Los problemas de higiene en los ordeños en las fincas venezolanas, agravados por la falta de insumos para la limpieza y desinfección se acrecientan, puesto que esos organismos siempre están presentes en los ordeños. Esos patógenos tienen poco potencial para causar enfermedades, pero pueden penetrar el conducto galactóforo hacia la ubre y con ello generar infecciones muy difíciles de erradicar. Existen más de 140 microorganismos diferentes que pueden causar una infección intramamaria (IMM). Estos microorganismos generalmente son bacterias, aunque también se pueden encontrar micoplasmas, hongos, levaduras, etc. En la tabla 1 se describen algunos de mayor incidencia y sus características.

Se han clasificado a los patógenos, según su reacción inflamatoria, en patógenos mayores y patógenos menores. Los patógenos mayores producen una elevación marcada del Conteo de Células Somáticas (CCS) y los menores un aumento leve. Otra clasificación útil es la que los divide en contagiosos, ambientales, oportunistas y otros. Los patógenos contagiosos se transmiten de cuartos infectados a cuartos sanos. Los cuartos infectados son el principal reservorio de éstos patógenos (Chaves, 2004). El contagio ocurre principalmente durante el ordeño (a través de las pezoneras, de las manos del ordeñador, trapos para limpiar ubres, retroimpactos de gotas de leche en el colector, etc.).

Otra clasificación de los patógenos según su reacción inflamatoria, la categoriza en patógenos mayores y patógenos menores. Los patógenos mayores producen una elevación marcada del Conteo de Células Somáticas (CCS) y los menores un aumento leve. Así mismo, también se dividen, estos patógenos, en contagiosos, ambientales, oportunistas y otros. Los patógenos contagiosos se transmiten de cuartos infectados a cuartos sanos.

Tabla 1 Agentes Infecciosos Productores de Mastitis

Agentes Infecciosos	Taxonomía y características generales
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Coco, gran positivo, catalasa y oxidasa negativo, anaerobio facultativo.
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	
<i>Streptococcus uberis</i>	
<i>Escherichia coli</i>	Bacilo, gram positivo, catalasa positivo, oxidasa negativo, anaerobio facultativo.
<i>Pasteurella sp</i>	Coco bacilo, gram negativo, tiende a ser pleomórfico, aerobios o anaerobios facultativos, capsulados, catalasa y oxidasa positivos.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Coco, gram positivo, aerobio y anaerobio facultativo, inmóvil.
<i>Clostridium perfringens</i>	Bacilo, gram positivo, anaerobio facultativo, esporulado.
<b>Bacterias</b> <i>Nocardia asteroides</i>	Bacilo, gram positivo, aerobios, en forma de filamentos ramificados.
<i>Mycoplasma bovis</i>	Anaerobio facultativo, posee diferentes formas, carece de pared celular.
<i>Corynebacterium pyogenes</i>	Bacilos y gram positivos, inmóviles, anaerobio facultativos, catalasa positivas, no esporulada y carecen de movilidad.
<i>Pseudomonas sp</i>	Bacilos gram negativos, aerobios, su forma es recta y curvada con flagelación polar.
<i>Leptospira sp</i>	Espiroquetas, son microorganismos helicoidales, son aerobias y microaerófilas, oxidasa positivas y catalasa negativas.
<i>Serratia sp</i>	Bacilo, gram negativo, móvil.
<i>Klebsiella sp</i>	Inmóviles, gram negativas, anaerobias facultativas y con cápsula de polisacáridos.
<i>Fusobacterium sp</i>	Bacilo, anaerobio, gram negativo.
<b>Algas</b> <i>Prototheca sp</i>	Aclorifílica, unicelular, aerobia, familia Chlorellaceae, son incoloras.
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Hongo filamentosos con conidióforos cortos, de pared lisa, incoloros o ligeramente verdosos, sin tabicar y sin ramificaciones.
<i>Trichosporon sp</i>	Levadura presente en el suelo, el agua, vegetales, mamíferos y aves, no es fermentativo.
<b>Hongos y Levaduras</b> <i>Candida sp.</i>	Levaduras mitospóricas alargadas o ligeramente redondas, se reproducen por gemación (blastoconidios)
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Hongo levaduriforme perteneciente al filo Basidiomycota, sus células son esféricas o elipsoides y están rodeadas de una cápsula polisacáridica gruesa que aumenta de tamaño.

Fuente: Modificado de (Gómez, 2008; Forbes, 2009; Bial Aristegui, 2002).

Los cuartos infectados son el principal reservorio de éstos patógenos (Chaves, 2004). El contagio ocurre principalmente durante el ordeño (a través de las pezoneras, de las manos del ordeñador, trapos para limpiar ubres, retroimpactos de gotas de leche en el colector, etc.).

#### **2.2.1.4 Diagnóstico de la mastitis bovina.**

Existen varios tipos de pruebas, tanto físicas, como químicas y biológicas, para la detección de mastitis bovina, tanto clínica como subclínica.

**Observación y palpación de la ubre:** En la mastitis subclínica, la ubre de la vaca permanece aparentemente sana, la leche que produce, a simple vista, es una leche normal, pero una infección incipiente puede estar dañando el tejido glandular y provocando por lo tanto una alteración en la leche que esta produce. La infección puede provocar inflamación de uno, varios cuartos o de toda la glándula, aumento de la temperatura en el área afectada, así como enrojecimiento de la zona y dolor, estos eventos provocan que el sistema inmune del animal actúe tratando de aliviar el problema, además de lograr la mayoría de las veces mantener la infección únicamente en el área afectada sin alterar otros órganos o sistemas del animal (Pérez *et al.*, 2005).

Cuando se encuentran todos o alguno de los síntomas se puede interpretar como un caso de mastitis clínica, donde encuentran cambios importantes en la leche que produce el tejido afectado, como alteración del color, aparición de grumos, coágulos sanguinolentos o con pus, o una leche más acuosa, entre otros (Pérez *et al.*, 2005).



**Figura 1.** Examen físico y palpación de la Ubre  
Fuente: Bedolla *et al.* 2007.

**Conductividad eléctrica de la leche:** Fernández *et al.* (2012), Describen La prueba de conductividad eléctrica (PCE) que se ha utilizado como un indicador de la mastitis durante la última década, se basa en el aumento de conductividad eléctrica de la leche debido a su mayor contenido electrolítico especialmente iones de sodio y de cloro y se ha desarrollado como un método para monitorear el estado de la mastitis en la vaca.

Esta técnica es importante porque mide la lesión, como es el caso del recuento celular. Sin embargo, sus limitaciones probablemente restringen su uso a vacas de producción elevada que se mantienen en rebaños pequeños, o en laboratorios con auto analizadores. Se puede emplear una combinación de la detección de mastitis subclínica tomando como base la conductividad eléctrica de la leche, la producción láctea, el número de parto y los días de lactación, como un modelo logístico de regresión como instrumento de análisis en un rebaño con una incidencia alta de mastitis subclínica. El aparato disponible, es un dispositivo que se sostiene con la mano y tiene una copa empotrada donde se lanzan los chorros de la leche (Blood y Radostits, 1992).



**Figura 2.** Aparato para determinar la conductividad eléctrica de la leche  
Fuente: Bedolla *et al.*, 2007.

**Prueba del recipiente de fondo oscuro:** Ésta se realiza durante la preparación de la vaca para la ordeña. Consiste en la detección de grumos en la leche haciendo pasar los primeros chorros a través de una malla negra o bien utilizando una cubetilla de fondo oscuro especialmente diseñada para eso. Es recomendable realizar este procedimiento en todos los ordeños ya que además de detectar leche anormal, se eliminan bacterias que normalmente se encuentran en mayor cantidad en estos primeros chorros, se mantiene un control eficiente sobre casos clínicos de mastitis en sus inicios y además se estimula la “bajada” de la leche (Pérez, 2005).



**Figura 3.** Prueba del recipiente de fondo oscuro  
Fuente: Bedolla 2007.

**Prueba del test de california (CMT):** La prueba de california para mastitis (CMT, por sus siglas en inglés) ha sido empleada durante décadas y sigue siendo la prueba más utilizada a nivel de campo para el diagnóstico de la mastitis en el ganado bovino lechero (Blood y Radostits, 1992; Medina y Montaldo, 2003).

La prueba consiste en el agregado de un detergente a la leche, el alquil-aril sulfonato de sodio, causando la liberación del ADN de los leucocitos presentes en la ubre y este se convierte en combinación con agentes proteicos de la leche en una gelatina. A mayor presencia de células se libera una mayor concentración de ADN, por lo tanto mayor será la formación de la gelatina, traduciéndose en nuestra lectura e interpretación del resultado como el grado más elevado de inflamación. Es decir, permite determinar la respuesta inflamatoria con base en la viscosidad del gel que se forma al mezclar el reactivo (púrpura de bromocresol) con la misma cantidad de leche en una paleta con cuatro pozos independientes permitiendo evaluar cada cuarto independientemente (Medina y Montaldo, 2003).



**Figura 4.** Interpretación de los resultados de la prueba de California  
Fuente: Bedolla 2007

**Tabla 2 Resultados del CMT.**

	<b>Grado</b>	<b>Rango de células</b>	<b>Criterio de Interpretación</b>
<b>1</b>	<b>Negativo (-)</b>	0 – 200.000	Si no hay formación visible de gel.
<b>2</b>	<b>Trazas (T)</b>	200.000 400.000	– Si en el fondo de la paleta se forma una película. (Mastitis subclínica)
<b>3</b>	<b>Claramente Positivo (+)</b>	400.000 1.200.000	– Si en el fondo de la paleta se forman grumos que desaparecen rápidamente. (Mastitis subclínica)
<b>4</b>	<b>Positivo (++)</b>	1.200.000 5.000.000	– Si hay presencia de grumos reforzantes.
<b>5</b>	<b>Muy Positiva (+++)</b>	Más de 5.000.000	Si hay un gel que no desaparece al dejar de girar la paleta.

Fuente: Fernández, 2012.

### 2.2.1.5 Prevalencia e índice de mastitis subclínica (IMSC)

Para la evaluación de los muestreos en campo, se utilizan parámetros que nos indican la presencia de esta patología en el rebaño lechero. Existen múltiples parámetros calculados para tal fin. En ésta investigación, el autor utilizara la prevalencia y el índice de mastitis subclínica como indicadores de la presencia de la enfermedad en el rebaño de ordeño de la finca objeto de estudio y como indicador de gestión y eficiencia de los tratamientos a evaluar.

#### **Prevalencia:**

En el campo de la Medicina Veterinaria, una medida del número total de individuos en un grupo específico que tienen (o tuvieron) cierta enfermedad, afección o factor de riesgo (como la mastitis subclínica) en un momento específico o durante un período determinado. Para ello se utilizarán las siguientes formulas:

$$\text{Prevalencia en vacas (P)} = (\text{N.º de vacas positivas} / \text{N.º total de vacas}) \times 100$$

$$\text{Prevalencia en el total de cuartos mamarios (PTC)} = (\text{N.º de cuartos positivos} / \text{N.º total de cuartos}) \times 100.$$

### Índice de mastitis subclínica:

Alonso, (1979), estableció el índice de mastitis subclínica en la evaluación de mastitis subclínica y el índice alto riesgo / bajo riesgo en términos de tiempo y población. Si la evaluación del CMT se realiza en forma periódica en zonas o fincas con alta prevalencia de mastitis subclínica, el empleo del IMSC e I BR/AR permitiría una interpretación más dinámica. Con el uso de estos indicadores, se toma en cuenta a todas las vacas que están en lactación, permitiendo una vigilancia constante de la sanidad de la ubre. El IMSC considerado como deseable es de 0.5. Mientras menor sea este índice, menor será la magnitud de la mastitis.

Para determinar el IMSC, se asignaron los valores siguientes, de acuerdo a los resultados obtenidos en la prueba del Test de California:

- N (negativo) = 0
- Trazas = 1
- ( + ) = 2
- ( ++ ) = 3
- ( +++ ) = 4.

Para el cálculo del índice de Mastitis Subclínica se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{IMSC} = \frac{(N \times 0) + (T \times 1) + ((P1) \times 2) + ((P2) \times 3) + ((P3) \times 4)}{\text{N}^\circ \text{ de pezones funcionales} - \text{N}^\circ \text{ de pezones perdidos y con mastitis clínica}} =$$

**Tabla 3. Índice de mastitis subclínica. IMSC**

Menor a 0,5	Muy Bueno
0,50 a 0,75	Bueno
0,75 a 1,00	Regular
1,00 a 1,25	Malo
Mayor a 1,25	Muy Malo

Fuente: Alonso, (1979).

## 2.3 Tratamiento de la mastitis

### 2.3.1. Tratamiento tradicional

Tradicionalmente, en la terapéutica Veterinaria, se han utilizado antibióticos para el tratamiento de la mastitis, tanto por vía parenteral como intramamaria. En la actualidad el uso de antibióticos está altamente cuestionada, la cantidad de residuos en la producción de leche y carne y si no se considera tiempos de retiro, representan un problema para la salud humana, puesto que, varios estudios determinan que pequeñas cantidades de antibióticos como 0,003 UI (unidades internacionales) de penicilina/ml de leche, pueden ocasionar: ardor en la piel, comezón, asma, shock anafiláctico, generación de resistencia por parte de los microorganismos a los antibióticos lo cual puede reducir o eliminar por completo su acción y uso en el tratamiento de diferentes enfermedades, Cuenca *et al* (2017), por lo tanto, existe una nueva tendencia a nivel mundial de no usar antibióticos por sus efectos nocivos que causan daño a la salud del ser humano, por ello es necesario investigar nuevas alternativas para el control de la mastitis, que sean de bajo costo, de fácil aplicación y que otorguen un rápido retorno económico para las empresas ganaderas (Paredes, 2017). En el mismo orden de ideas existe otro aspecto no menos importante, como lo es la resistencia de las bacterias a los antibióticos. Esta resistencia bacteriana a los antibióticos no es un fenómeno nuevo, sino antiguo. La resistencia en humanos y animales representa una amenaza creciente para los humanos, la medicina, salud y

bienestar animal. La resistencia a los antibióticos puede provocar el fracaso de tratamientos de enfermedades graves y mortales que actualmente percibimos como curables.

Entre los antibióticos de mayor uso en la terapéutica de enfermedades bacterianas (Concha, 2007) y según su mecanismo de acción, se describen tres grupos básicos:

- **Grupo I:** Con la Penicilina y sus derivados, que atacan a las bacterias en la actividad de sus membranas celulares, representado con productos como: Penicilina, Ampicilina, Cloxacilina etc., agrupados como Betalactámicos.
- **Grupo II:** antibióticos que actúan sobre las membranas citoplasmáticas: Polimixinas y Polienos (Nistatina y Anfotericina B).
- **Grupo III:** antibióticos que actúan dentro de la célula, inhibiendo la capacidad de síntesis del ADN celular, agrupados como Macrolider con Eritromicina, Espiramicina y Tetraciclina, etc.

No existe conflicto entre el uso responsable y prudente de antibióticos y el bienestar animal. De lo contrario; El uso responsable y prudente comprende la necesidad de mejorar la cría de animales en el contexto de la mejora de la bioseguridad e higiene, reduciendo la frecuencia de infecciones bacterianas y la necesidad de corregir tratamiento con antibióticos después del diagnóstico. La introducción de medidas de bienestar positivas reducirá Estrés y por lo tanto reduce la susceptibilidad a la infección (Laguens, 2016).

En la actualidad, las investigaciones van orientadas en la búsqueda de compuestos naturales que presenten características antimicrobianos, antiinflamatorias, antioxidantes, inmunomoduladores, que den respuesta a este tipo de patologías, de manera versátiles económicos y amigables con el ambiente.

Estudios realizados utilizando compuestos naturales como el ajo (*Allium sativum*), chichipince (*Hamelia patens*), plasma marino y propóleo, presentan resultados

importantes y ventajas en el manejo clínico de enfermedades bacterianas. Además, todas estas investigaciones tienen un común denominador: No presentan el riesgo de trazas de antibióticos en productos como la carne o la leche, que traigan como consecuencia problemas de salud humana y salud pública.

### **2.3.2 Tratamiento alternativo**

#### **2.3.2.1 El propóleo.**

En su estado natural, el propóleo se presenta como una sustancia resinosa de color amarillo verdoso o pardo rojizo, compuesto por ciertas resinas naturales que tienden a oscurecerse. Recogido por la abeja de las yemas de los árboles, es luego trasladado a la colmena y regurgitado, probablemente con el agregado de otros elementos elaborados por las mismas abejas. El resultado de este proceso es un polímero balsámico resinoso, que contiene principalmente cera y aceites esenciales, y constituye una sustancia muy compleja, soluble en alcohol, éter, acetona, benceno y otros solventes.

Según Bedascarrasbure *et al.* (2004), “Esta sustancia, elaborada por las abejas, es conocida por el hombre desde tiempos remotos. La utilizaban los sacerdotes egipcios y más tarde, los griegos, quienes lo denominaron "propóleos", pro: que significa delante de y polis: que quiere decir ciudad”.

#### **2.3.2.2 Composición del propóleo.**

Desde el punto de vista organoléptico, Gil *et al.* (2012) “Las características organolépticas varían según su origen botánico; por lo general tiene un sabor acre (Tabla 4), frecuentemente amargo, de olor agradable”.

Mendonça *et al.* (2017), realizaron un estudio sobre las diferencias en composición química de dos tipos de propóleo en Brasil, encontrándose más de trescientas sustancias.

**Tabla 4 Características del propóleo**

<b>Denominación de los Índices</b>	<b>Características y Norma</b>
Aspecto Externo	Esferas Granos
Color	Verde oscuro, pardo o gris con matices verdes, amarillo castaño, oscuro o rojo
Olor	Característico resinoso aromático
Sabor	Amargo, algo fuerte
Estructura	Espesa, con deformaciones heterogéneas
Consistencia	De 20 a 40 °C debe ser viscosa, a menos de 20°C dura
Cera	No más de 20%
Índice de Oxidación	No mayor a 22 segundos
Reacción Cualitativa ante los compuestos Flavonoides	Positiva
Mezclas Mecánicas	No más del 20%
Compuestos Fenólicos	No menos del 30%
Índice de yodo	No menor del 35%

Fuente: Crea, 1993

Se identificaron sustancias en muestras de propóleos, como flavonoides canferol, quercetina, galangina, crisina, pinocembrina, tectocrisina; aldehídos aromáticos vainillina y isovanilina; cumarinas y ácidos fenólicos como el ácido cafeico, ferúlico, cinámico y cumárico; ácidos (ácido benzoico), alcoholes y ésteres alifáticos y aromáticos, ácidos grasos, aminoácidos, esteroides, cetonas, chalconas, dihidrocalconas, terpenoides, triterpenoides. La diversidad de compuestos activos que se encuentran en el propóleo brasileño, verde y rojo, posibilita una amplia aplicación de estos en el área de la salud, debido a sus actividades biológicas. Por tanto, no basta con conocer las actividades terapéuticas, sino también identificar, aislar y estudiar sus componentes químicos. Por esta razón, la búsqueda de la estandarización constante del propóleo, es una prometedora empresa a conquistar en Brasil, en relación con los diferentes tipos de propóleos. Mientras más estandarizado es un producto, mayor es su fiabilidad en el mercado. Y, con base en la investigación ya realizada, se puede inferir que esta meta no está tan lejos de lograrse.

### 2.3.2.3 Acción farmacológica

#### 2.3.2.3.1 Antioxidante

En los últimos años ha tomado relevancia el consumo de antioxidantes, en especial los de origen natural, para la prevención de enfermedades de gran trascendencia como la aterosclerosis, reuma e incluso el cáncer. Los antioxidantes, como la vitamina E (alfa tocoferol), impiden la oxidación lipídica (transformación del colesterol LDL en colesterol HDL), reduciendo el riesgo de enfermedades cardiovasculares, y además, neutralizan los radicales libres, que son los responsables del envejecimiento celular. El propóleo posee una potente capacidad antioxidante, que le permite adquirir insospechables perspectivas de desarrollo.

Se han identificado más de 160 compuestos, de los que un 50% son compuestos fenólicos, a los cuales se les atribuye acción farmacológica. Los principales fenoles identificados son: flavonoides, ácidos aromáticos y sus ésteres, aldehídos aromáticos, cumarinas, triglicéridos fenólicos. En términos de acción farmacológica, los principales constituyentes del propóleo son los compuestos fenólicos. (Bedascarrasbure *et al.* 2004).

Fiordalisi *et al.* 2016. Evaluaron la composición química de tres tipos de propóleos al sur de Brasil, sus estudios revelaron que las muestras de propóleos mostraron resultados similares para el contenido total de fenoles, sin embargo, contenido de flavonoides difirió entre las muestras ( $P < 0.05$ ; con el mayor contenido encontrado en el propóleo de Minas Gerais seguido por el propóleo de São Joaquim, Água Doce y Urupema ( $P < 0.05$ ). También por tener el menor contenido de flavonoides, el propóleo Urupema, mostró el menor porcentaje de inhibición del 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo DPPH (es decir, el nivel más bajo de actividad antioxidante). Del propóleo restante, no hay diferencias para la actividad antioxidante.

### **2.3.2.3.2 Inmunomoduladora**

Diversos trabajos demuestran que el propóleo 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 propóleo, se constató un aumento de los linfocitos T, un mayor nivel de fagocitosis y una menor mortalidad, en comparación con animales testigo no tratados. Los autores determinaron que se estimula la liberación del factor inhibidor de la migración de los leucocitos.

Durante el 1º Simposio Internacional sobre Apiterapéuticos, realizado en La Habana en 1991, se mostraron resultados positivos con el empleo de propóleo en pacientes con inmunodeficiencia. Uno de los grupos de investigadores cubanos evaluó su respuesta en niños con síndrome respiratorio alto o bajo recidivante y con inmunodepresión celular o mixta, lográndose primero una mejoría clínica y luego la normalización para clínica. Se ha comprobado que el propóleo estimula la actividad de los macrófagos a casi el doble y aumenta el número de linfocitos incrementándose la respuesta inmune. (De Los Reyes Rodríguez, 1991).

### **2.3.2.3.3 Antimicrobiano.**

Múltiples autores y trabajos publicados, le confieren al propóleo la característica de antibiótico, por lo que el autor se permite realizar una importante aclaratoria antes de continuar con las bondades antimicrobianas de este excelente compuesto.

Bavestrello, (2003), explica de una manera muy académica las condiciones que debe cumplir un compuesto para ser considerado antibiótico: “Para que un producto innovador o de marca sea autorizado y comercializado se requiere un dossier con datos biológicos, farmacéuticos, farmacológicos, toxicológicos y clínicos de eficacia y seguridad. El desarrollo de un producto innovador demora 12 a 15 años, de cada 5.000 moléculas evaluadas tan sólo uno llega al mercado y cada proyecto cuesta 800 millones de dólares, de los cuales el 94% de ellos proviene de la industria.”

Adicionalmente es importante señalar que un compuesto debe ser estandarizado, lo que garantiza que cualquier dosis en diferentes presentaciones y envases deben ser idénticas, copias al carbón, lo que garantiza al usuario que la fórmula es la misma en cualquier presentación.

Como ya se ha explicado, el propóleo proviene de las yemas de los árboles, lo que modifica su composición química. Se ha explicado en trabajos que, propóleos provenientes de plantas como el Álamo tiene mayor eficacia antimicrobiana, que los provenientes de otras plantas.

La actividad antimicrobiana ha sido probablemente la más estudiada, habiéndose verificando su doble función: bactericida y bacteriostática.

Esto es simplemente demostrable, con un sencillo análisis de las propiedades de algunos de sus componentes: El ácido benzoico que aquí encontramos también en sus derivados activos oxi y metoxibenzoicos, entre otras múltiples propiedades, son reconocidas sus acciones antimicrobianas, así como las de los ácidos p-cumarico, cafeico y férulico, este último con probada acción frente a microorganismos, tanto gram positivos y gram negativos. Tienen actividad antibiótica los sexquiterpenos, en particular, el bisabolol. También se le considera a la galangina, gran actividad antimicrobiana.

La actividad antimicrobiana del propóleo, se determina por un aumento de la actividad fagocitaria, motivado a la gran cantidad de compuestos fenólicos que contiene.

La actividad antibacterial y antifúngica de los polifenoles se basa en la capacidad que tienen estos compuestos para inhibir el crecimiento, reproducción, respiración, y cualquier otra función vital de los microorganismos. Esta acción la realizan mediante mecanismos como la oxidación de enzimas específicas, que van a inhibir alguna función vital, como la respiración, también se reporta que estos los polifenoles se pueden unir a las cadenas de ADN interrumpiendo la reproducción o la síntesis de

proteínas y elementos vitales para los microorganismos Martínez-Flórez *et al.* 2002 (citado por Martin, 2017).

Estudios realizados por diferentes autores con muestras de propóleos obtenidos en diferentes latitudes, confirmaron las propiedades antimicrobianas de los propóleos. No todos los propóleos presentan el mismo potencial frente a un microorganismo y en algunos casos resultan inactivos a las concentraciones ensayadas. El origen geográfico de las muestras de propóleo condiciona su composición química y su vez las potencialidades ante diferentes organismos (Guacara *et al.* 2018).

En Venezuela, son escasos los estudios sobre la acción bacteriostática y bactericida del propóleos autóctono de diversas regiones del país. Sin embargo, hay reportes de su eficacia sobre cepas de: *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomona aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Elizabethkingia meningoséptica*, con el propóleos de Cojedes y sobre *Micrococcus luteus* y *Staphylococcus aureus* con propóleos de Miranda.

Gil, *et al.* (2012), determinaron la concentración mínima inhibitoria o bacteriostática (CMI) y bactericida (CMB) de una tintura de propóleos producido en un Apiario del estado Cojedes sobre el crecimiento in vitro de bacterias enteropatógenas. Trabajaron con una tintura de propóleos de Tinaquillo Edo. Cojedes, Venezuela sobre siete bacterias de interés clínico entre las que se encuentran dos bacilos aerobios entéricos (*Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*) en donde el resultado obtenido en la determinación de la CMB sobre estas dos bacterias fue de 18% y 20% respectivamente; y aunque la fabricación de las tinturas de propóleos provienen de la misma zona geográfica, cabe destacar que se elaboraron en apiarios diferentes. Esto sugiere que podría establecerse rangos de efectividad por géneros bacterianos de acuerdo a la zona geográfica en la que se produce el producto, siendo una guía para futuros tratamientos.

## **2.4 Obtención del extracto etanólico del propóleo.**

Los Propóleos que se utilizaron en el presente ensayo, fueron obtenidos principalmente de colmenas ubicadas en el Municipio Barinas en donde las principales fuentes de resina para la elaboración de Propóleos son los Robles (*Quercus acatenangensis* o *Quercus peduncularis*) y palos de hule (*Castilla elástica hevea braziliensis*). Estos propóleos son 99% puros, libres de tierra, astillas de madera y otros residuos macroscópicos. Para la elaboración del extracto etanólico de propóleos al 50% se utilizó 500 gramos de propóleos 99% puros y 1 litro de alcohol etílico al 70%.

En el día 1 se maceraron los propóleos en una marmita por 3 horas a 40°C y luego se dejó enfriar durante 5 horas; en el día 2 se filtró el extracto con un tamiz de 80 micrones para extraer las ceras e impurezas que contenía los Propóleos, se macero de nuevo por 2 horas en la marmita y se dejó enfriar 5 horas; el día 3 se filtró el producto con 3 tamices de 80 micrones y se macero de nuevo por 1.30 horas y se dejó enfriar; el día 4 como fase final se filtró por 7 tamices de 80 micrones para eliminar los últimos residuos de ceras que resultaran, y el faltante se reconstituyo con alcohol etílico al 70% para conservar los 1000 ml de la solución. Este producto final fue envasado en frascos de color ámbar para que lo protegieran de la luz exterior, ya que esta puede degradarlo. Luego se almacenó en un sitio fresco y ventilado, por 15 días, agitándolo por 15 minutos diariamente. En el ensayo para las mastitis subclínicas se utilizó extracto etanólico de propóleo al 25% y 15%. Y para las mastitis clínicas se utilizó extracto al 50%.

## **2.5 Bases legales.**

Este apartado tiene por finalidad la descripción detallada de cada uno de los instrumentos que conforman el basamento jurídico que justifica la existencia del tópico de estudio y de pertinencia de la investigación. A nivel nacional se dispone de un marco legal, contenido en varios instrumentos que regulan la gestión de las instituciones públicas, garantizando el bienestar físico y mental del trabajador.

Adicionalmente existen convenios y tratados internacionales, suscritos por la nación, que tiene una obligatoriedad de cumplimiento implícito. Entre ellos se destacan:

### **Constitución de la República Bolivariana de Venezuela.**

**Artículo 305.** El Estado promoverá la agricultura sustentable como base estratégica del desarrollo rural integral, a fin de garantizar la seguridad alimentaria de la población; entendida como la disponibilidad suficiente y estable de alimentos en el ámbito nacional y el acceso oportuno y permanente a éstos por parte del público consumidor. La seguridad alimentaria se alcanzará desarrollando y privilegiando la producción agropecuaria interna, entendiéndose como tal la proveniente de las actividades agrícola, pecuaria, pesquera y acuícola. La producción de alimentos es de interés nacional y fundamental para el desarrollo económico y social de la Nación. A tales fines, el Estado dictará las medidas de orden financiero, comercial, transferencia tecnológica, tenencia de la tierra, infraestructura, capacitación de mano de obra y otras que fueran necesarias para alcanzar niveles estratégicos de autoabastecimiento. Además, promoverá las acciones en el marco de la economía nacional e internacional para compensar las desventajas propias de la actividad agrícola.

### **FAO, (2017) Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura.**

El 25 de septiembre de 2015, los 193 Estados miembros de las Naciones Unidas adoptaron la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible, que incluye 17 Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) y 169 metas. La comunidad internacional quedó así comprometida a erradicar la pobreza y el hambre y a lograr el desarrollo sostenible en sus tres dimensiones (social, económica y ambiental) a lo largo de los próximos 15 años (2016-2030).

### **Objetivo de desarrollo sostenible: Nutrir y Alimentar.**

Midiendo la sostenibilidad de la producción agrícola, los gobiernos pueden identificar formas de producción sostenibles desde el punto de vista económico,

social y medioambiental. También podrán detectar dónde y cómo intensificar la producción y cómo obtener rendimientos más elevados con menos insumos.

Esta visión de la Organización reúne varios enfoques para la sostenibilidad de la agricultura, la ganadería, la silvicultura y la pesca, tales como: el intercambio de conocimientos y capacitación, el empoderamiento, la buena gobernanza y la coherencia entre distintos sectores agrícolas.

**Indicador ODS:** 2.1.4 Sostenibilidad de la Producción Agrícola.

### **Ley Orgánica de Seguridad y Soberanía Agroalimentaria.**

**Título V.** De la investigación y educación en materia agroalimentaria.

**Capítulo I.** De la Investigación en Materia Agroalimentaria.

#### **Utilización de investigaciones de las instituciones docentes**

**Artículo 93.** Las universidades e instituciones públicas de educación superior o de investigación en el área agroalimentaria, así como las de carácter privado que reciban algún beneficio económico por parte del Estado, pondrán a disposición del Ejecutivo Nacional, el registro de las investigaciones realizadas, a objeto de que las mismas sean empleadas para dirigir, orientar y planificar las políticas agroalimentarias.

### **Plan de la patria**

**Objetivo V.** Contribuir con la preservación de la vida en el planeta y la salvación de la especie humana.

**5.1.** Construir e impulsar el modelo histórico social ecosocialista, fundamentado en el respeto a los derechos de la Madre Tierra y del vivir bien de nuestro pueblo desarrollando el principio de la unidad dentro de la diversidad, la visión integral y sistémica, la participación popular, el rol del Estado-nación, la incorporación de tecnologías y formas de organización de la producción, distribución y consumo, que apunten al aprovechamiento racional, óptimo y sostenible de los recursos naturales, respetando los procesos y ciclos de la naturaleza.

**5.1.3.** Fomentar la edificación y consolidación de alternativas socioproductivas y nuevos esquemas de cooperación social, económica y financiera para el apalancamiento del ecosocialismo y el establecimiento de un comercio justo, bajo los principios de complementariedad, cooperación, soberanía y solidaridad.

**5.1.3.4.** Implementar una política de rescate, implementación y mejora de tecnologías ancestrales para la producción y procesamiento agrícola y pecuario, entre otros, que logre índices de eficacia y productividad aceptables, con un menor impacto ambiental que las tecnologías actuales.

**5.1.3.4.2.** Fortalecer el plan de producción de bioinsumos para la agricultura.

**5.1.3.5** Promover la apropiación social del conocimiento, desarrollo tecnológico e innovación, que permitan el aprovechamiento sustentable, justo y equitativo de la diversidad biológica, garantizando su conservación y la soberanía del Estado sobre sus recursos naturales.

**5.1.3.5.1** Desarrollar la industria química y farmacéutica con respeto y aprovechamiento de la biodiversidad para la atención y protección de la población.

**Líneas de investigación UNELLEZ 2020-2025.**

Acta N°1263, Resolución N° CD 2020/045, de Fecha 19/02/2020, Punto N°12, Sesión extraordinaria.

**Línea de creación intelectual:** N° 4 Seguridad y Soberanía Alimentaria.

**Fundamento temáticos para la propuesta de líneas de creación intelectual**

**UNELLEZ:** Objetivos del Milenio UNESCO, Plan de la Patria 2019-2025, MPPEU.

**Plan del sistema de creación intelectual 2019-2025 del vicerrectorado de planificación y desarrollo social de la UNELLEZ. Abril, 2019**

**Sub áreas de conocimiento y saberes de las ciencias del agro y del mar por líneas de creación intelectual:** Sistemas de producción agrícola vegetal y animal.

**Línea de creación intelectual:** 39 Mejoramiento genético.

### CAPITULO III METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

La investigación se realizó en la finca La Granja de Hoy, ubicada en la parroquia La Luz, municipio Obispo del estado Barinas, entre los meridianos 70° 0´ y 70° 30´ y los paralelos 8°30´y 9°00. El municipio limita hacia el norte con los municipio Rojas, Cruz Paredes y Alberto Arvelo Torrealba, al sur con el municipio Barinas y el estado Apure, al este con los municipios Alberto Arvelo Torrealba, Rojas y Sosa y al oeste con el municipio Barinas. La topografía es principalmente plana con <2% de pendiente general. Presenta una temperatura media de 26,4°C y una precipitación promedio entre los 1.400-1.600 mm. anuales. El municipio de caracteriza dentro de una zona de vida: Bosque seco tropical (bs-T) Geoambiental, (2011).

Esta investigación se orientó bajo el paradigma cuantitativo (Hernández *et al.*, 2010) dado que se trata de un trabajo que intenta establecer claramente la relación entre los propóleos y su efecto antimicrobiano en búfalas y vacas diagnosticadas con mastitis. También son llamados experimentos puros, “Los experimentos “*auténticos o puros*” manipulan variables independientes para ver sus efectos sobre variables dependientes en una situación de control”.

#### **3.1 Tipo y naturaleza de la investigación.**

Para la clasificación del de la investigación se utilizaron los planteamientos propuestos por Palella y Martíns (2012). Al respecto la propuesta se enmarca dentro de una investigación experimental con un enfoque cuantitativo. En este sentido, la investigación cuantitativa requiere el uso de instrumentos de medición y comparación, que proporcionan datos cuyo estudio necesita la aplicación de modelos matemáticos y estadísticos, por ello el ensayo será realizado dentro de la investigación cuantitativa, por cuanto al realizar el estudio de las variables, se obtienen datos que se someten a modelos matemáticos y estadísticos con la finalidad se discernir la efectividad de las diferentes concentraciones del propóleo y los tratamientos clínicos y subclínicos de las mastitis contra el producto comercial. Por

otra parte, es experimental debido a que los datos sobre el efecto antibiótico de propóleos en búfalas y vacas diagnosticadas con mastitis clínica y subclínica, se recolectarán en forma sistemática y se evalúan objetivamente. El grupo control es similar al experimental en todos los aspectos y no recibe el tratamiento de la variable independiente ya que éste se aplica solo al grupo experimental. De allí que toda diferencia que se presente entre ambos grupos después del tratamiento, debe ser atribuible al tratamiento.

### **3.2 Nivel de la investigación.**

La investigación se ubica en un nivel explicativo. Para Palella y Martins (2012) este nivel se centra en determinar los orígenes o causas de un determinado conjunto de fenómenos, para luego encontrar las relaciones causa-efecto. En este nivel la investigación se realiza mediante la manipulación de una variable experimental no comprobada, en condiciones rigurosamente controladas, con el fin de describir de qué modo o por qué causa se produce una situación o acontecimiento particular, en otras palabras se quiere medir la relación **causa-efecto** entre el propóleo y la eliminación de los agentes patógenos responsables de la mastitis, por ello toda diferencia que se presente entre ambos grupos después del tratamiento, debe ser atribuible al tratamiento.

### **3.3 Diseño de la investigación.**

El diseño de la investigación corresponde a un diseño completamente aleatorizado y se desarrolló en tres etapas:

- Etapa I. Bacteriológica de diagnóstico.
- Etapa II. Laboratorio (pruebas *in vitro*).
- Etapa III. Campo (pruebas *in vivo*).

#### **Variables de Estudio:**

**Variables independientes:** Tratamientos

- a) T0: Testigo con etanol

- b) T1: tratamiento con propóleos al 15%
- c) T2: Tratamiento con propóleos al 25%
- d) T3: Tratamiento con fármaco comercial

#### **Variables dependientes: Respuestas**

- a) Crecimiento de colonias bacterianas: Diámetro (cm) del halo de inhibición producido por los tratamientos.
- b) Aislamiento e identificación de los patógenos presentes.
- c) Producción de Leche
- d) Análisis del grado de intensidad de mastitis Subclínica según CMT.
- e) Calidad de la Leche mediante medición de Aerófilos Mesófilos y Coliformes Totales al inicio y al final del ensayo.

#### **3.3.1 Población y muestra**

La población en una investigación, es el conjunto de unidades de las que se desea obtener información y sobre las que se van a generar conclusiones, Palella y Martins (2012).

La muestra representa un subconjunto de la población, accesible y limitado, sobre el que realizamos las mediciones o el experimento con la idea de obtener conclusiones generalizadas a la población, Palella y Martins (2012). En esta unidad de producción, se efectuó el ensayo con 30 búfalas y 22 vacas en ordeño, para la mastitis subclínica, de un lote total de 38 búfalas y 30 vacas con que cuenta la finca. En el caso de las mastitis clínicas, se evaluaron los casos que se presentaron durante el ensayo.

#### **3.3.2 Técnica de recolección de datos**

Son las distintas formas o maneras de obtener la información. Para el acopio de los datos se utilizan técnicas como observación, entrevistas, encuestas, pruebas, entre otras Palella y Martins (2012).

En la presente investigación, se utilizaron instrumentos de recolección de datos como la observación directa, lista de cotejo (anexo 1) y registro anecdótico (anexo 2), con la finalidad de recabar una información real y objetiva de los eventos presentados en la unidad de producción.

### **3.3.3 Procedimientos y análisis de laboratorio.**

En este punto se describen los distintos procedimientos y análisis realizados a las muestras de leche recolectadas en la unidad de producción, para su caracterización bacteriológica y comportamiento frente a los distintos tratamientos, tanto pruebas in vitro, como pruebas in vivo, para luego realizar el análisis correspondiente de los datos.

#### **3.3.3.1 Etapa I. Diagnostico Bacteriológico**

Esta etapa se desarrolló a nivel de campo, donde, inicialmente se realizó una evaluación higiénico-sanitaria de las instalaciones, como la vaquera, sala de ordeño, sala de espera, así como la asepsia y desinfección de la ubre antes del ordeño y el lavado periódico de manos, por parte de ordeñador durante la faena.

Luego de esta etapa se realizó la prueba del california mastitis test (CMT) al rebaño de ordeño, tanto vacuno como bufalino, con la finalidad de evaluar la presencia de mastitis subclínica y seleccionar los semovientes para el ensayo con el propóleo y antibiótico comercial.

De igual manera se realizó un muestreo de leche, a través de un pool de las muestras tanto vacunas como bufalinas que se llevaron al laboratorio para su procesamiento.

#### **Diseño del muestreo**

De la población total en el rebaño de ordeño, 22 Vacas y 30 Búfalas, se efectuó el diagnóstico del grado de mastitis subclínica, con la prueba CMT y de esta

población se seleccionaron las vacas y búfalas con al menos un cuarto con 2 o 3 cruces (Criterio de muestreo simple del mayor tamaño posible) catalogadas por Alonso (1979), como de alto riesgo según el índice alto riesgo/bajo riesgo, que es la condición necesaria y óptima para medir el efecto de los tratamientos. Así mismo, se realizó un pool de muestras de leche, tanto de vacas como de búfalas, que al CMT presentaron 2 y 3 cruces para ser utilizadas en la fase II.

### **3.3.3.2 Etapa II. Laboratorio (pruebas in vitro)**

Esta etapa se realizó con el fin de identificar el o los patógenos microbianos presentes en las muestras de leche, causantes de las mastitis subclínicas y determinar el efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano, in vitro, causado por el propóleo y el antibiótico comercial, en los cultivos bacterianos de las muestras de leche seleccionadas. Esta determinación se efectuó midiendo el halo de inhibición de crecimiento bacteriano en los cultivos realizados.

#### **Diseño del muestreo**

En esta fase se realizó un experimento in vitro, mediante un diseño completamente aleatorizado (DCA) con los cuatro tratamientos mencionados, utilizando 4 capsulas de Petri por tratamiento con el enfrentamiento de los microorganismos (muestras de leche) a cada tratamiento y se midió el diámetro del halo de inhibición a las 24 y 48 horas.

Variables independientes: Tratamientos

- a) T0: Testigo solo con etanol
- b) T1: tratamiento con propóleos al 15%
- c) T2: Tratamiento con propóleos al 25%
- d) T3: Tratamiento con fármaco comercial
- e) Variables dependientes: Respuestas
- f) Crecimiento de colonias bacterianas: Diámetro (cm) del halo de inhibición producido por los tratamientos.

g) Aislamiento e identificación de los patógenos presentes

Análisis y procesamiento estadístico de datos:

El procesamiento estadístico de los resultados del crecimiento (Halo inhibitorio) con modelo de clasificación de una vía (DCA) y medidas repetidas (24 y 48 horas), se realizó utilizando los programas SPSS versión 19.0 y STATISTIX versión 8.0, mediante las técnicas:

- a) Estadísticos descriptivos: Promedios de diámetro (cm) del halo inhibitorio.
- b) Análisis de la varianza para modelo simple con medidas repetidas en el tiempo según modelo:

*Modelo lineal aditivo*

$$X_{ijk} = \mu + \tau_i + \rho_j + (\tau\rho)_{ij} + \psi_{i(k)} + \varepsilon_{ijk}$$

Dónde:

$X_{ijk}$  : Observación cualquiera de diámetro del halo inhibitorio.

$\mu$ : Efecto de la media general.

$\tau_i$ : Efecto de tratamiento.

$\rho_j$ : Efecto del período (24 y 48 horas).

$(\tau\rho)_{ij}$ : Efecto de interacción Tratamiento\*Período.

$\psi_{i(k)}$ : Error intrasujeto.

$\varepsilon_{ijk}$ : Error experimental.

- a. Pruebas de Shapiro-Wilk y de Levene para verificar el cumplimiento de los supuestos del análisis de la varianza.
- b. Prueba de Tukey para comparar los promedios de tratamientos en el caso del crecimiento del Halo de inhibición superiores e inferiores.

### **Procedimiento para la recolección de la muestra de leche**

Se realizó el proceso de extracción y recolección de las muestras de leche empleando el siguiente orden, según la Norma Venezolana: Leche Cruda Covenin 903-93:

- a) Lavado y desinfectado de las manos. Se cuidó el lavado de las manos antes del muestreo.
- b) Ordeño de los primeros chorros. Se ordeñan (aproximadamente 10 ml) en una copa para verificar la presencia o no de cambios en la apariencia de la leche. Los cambios se refieren a presencia de grumos, coágulos o bien sangre. Los primeros chorros se deben desechar para extraer la flora bacteriana normal del canal y del orificio del pezón y minimizar así la posibilidad de que se contamine la leche.
- c) Lavado y secado de cada ubre y pezones. Se procedió al lavado y secado cuidadoso de la ubre y cada pezón. Todo este proceso de limpieza y muestreo de los pezones se hizo en el sitio de ordeño.
- d) Toma de las muestras de leche, para tomar las muestras:
  - Desinfección con solución de GERDEX a la tercera parte distal de cada pezón, en sentido del ápice a la base, esto se hace utilizando una toalla de papel absorbente por cuarto.

### **Procedimiento para la Prueba de CMT**

Esta prueba se realizó de la siguiente manera:

- a) Se tomó una muestra de leche directamente en la paleta de prueba y en la posición adecuada. La cantidad de leche adecuada es la que queda en el recipiente de la paleta de prueba cuando ésta se inclinaba hasta una posición casi vertical (aproximadamente 2 ml.)
- b) Con la paleta de prueba inclinada, se agregó la misma cantidad de reactivo de

CMT que de leche. Luego se mezcló la leche y el reactivo haciendo girar suavemente la paleta hasta obtener un color uniforme.

- c) Se les hará CMT a todas las búfalas y vacas en ordeño y se clasificarán los resultados, de acuerdo a los criterios de interpretación presentados anteriormente en la Tabla 2.

### **Toma de muestras para análisis bacteriológico**

Las muestras con una reacción de CMT grado 2 y grado 3 (mastitis Subclínica) de vacas y búfalas, fueron procesadas en el Laboratorio de Microbiología de la UNELLEZ-VPDS, para identificar los microorganismos patógenos presentes. Se realizaron pruebas bacteriológicas para la identificación de las diferentes cepas causantes de la mastitis subclínica hasta el rango de género.

### **Aislamiento de microorganismos causantes de la mastitis**

El aislamiento de estos microorganismos se realizó de la manera siguiente:

#### **Procedimiento:**

- a) Se colectaron muestras de leche con mastitis grado 2 y 3 (prueba de CMT) en tubos de ensayo estériles con tapa de rosca y debidamente identificados.
- b) Se procedió a sembrar las muestras en agar sangre (bacterias hemolíticas) y se realizó el aislamiento por agotamiento de estrías para aislar colonias. Se incubó a 37 °C. durante 24 horas.
- c) Se observaron las características de las colonias (hemólisis), Gram (forma, agrupación y tipo de tinción Gram) y catalasa. Se sabe que catalasa (+) corresponde a género *Staphylococcus* y catalasa negativa (-) corresponde al género *Streptococcus*, presente en microorganismos aeróbicos pero nunca en anaeróbicos o microaerófilos.

### **Medición de halos de inhibición del crecimiento microbiano por el método de Kirby-Bauer (Antibiograma).**

Se realizó el Método de Kirby-Bauer modificado, del modo como se menciona a continuación:

- a) Se humedeció un hisopo en cada una de las muestras de leche de vacas y búfalas, con 2 y 3 cruces según el CMT, para realizar el antibiograma.
- b) Se siembra uniformemente, con un hisopo estéril, sobre la superficie de una placa de agar Müller-Hinton y se colocaron con una pinza estéril los discos con el antibiótico comercial y cada tratamiento a utilizar previamente impregnados con 15  $\mu$ L.
- c) Así mismo, se hizo un control negativo con discos en blanco (solución de etanol). Se incubó a 37 °C durante 24 horas y se observaron las inhibiciones de los halos de crecimiento bacteriano. El diámetro (en mm) de los halos formados alrededor de cada disco con los tratamientos aplicados se midieron con la ayuda de la escala de zonas antibióticas (antibiotic zone scale code N° PW096 de Hi Media TM laboratorios Pvt. Ltd de diámetros standard).
- d) Las lecturas de los halos de inhibición se interpretaron según los valores de sensibilidad de Duraffourd que son: Nula 8 mm; Límite 9-14 mm; Media 15mm a 19 mm y Sumamente sensible 20 mm (Duraffourd *et al.*, 1986).

#### **3.3.3.3 Etapa III. Campo (pruebas in vivo)**

Esta fase corresponde a la organización y realización del experimento para medir la eficacia de tratamientos para la mastitis subclínica y del casos clínico que se presentó durante el desarrollo del ensayo, mediante la utilización de propóleos y comprende las pruebas de unidades formadoras de colonia (UFC/ml) de aerobios mesófilos y coliformes totales realizadas antes y después de los tratamientos.

#### **Día 0: Selección y organización de cuartos:**

Se tomarán los cuartos afectados con mastitis subclínica con 2 y 3 cruces, tanto de

vacas como de búfalas, se realizó la asignación de cuartos para cada tratamiento. El experimento se organizó con base en cuatro tratamientos incluyendo un testigo (T0) que se refiere al etanol, y de propóleos en las siguientes concentraciones del 15% (T1), 25% (T2) y un antibiótico comercial en presentación intramamaria (pomo) de uso habitual en la finca en estudio (T3).

Los cuartos seleccionados serán distribuidos de manera homogénea en cuatro grupos al azar, donde T 0 será grupo control, T1 Propóleo al 15%, T2 Propóleo al 25% y T3 Antibiótico Comercial. (Cefakan de Laboratorios Over es una asociación a base de 0,2 gramos Cefalexina más 100.000 U.I. Kanamicina Sulfato c.s.p. 5 grms.)

De igual manera se tomaron las muestras en pool, para ser procesadas en laboratorio, de la leche proveniente de cuartos con 2 y 3 cruces de vacas y búfalas, en la prueba CMT. Para ello se utilizó un matraz aforado estéril de 250 ml por cada grupo de muestras.

### **Día 1. Inicio de tratamiento.**

Los tratamientos se aplicaron en dos oportunidades a intervalos de doce horas comenzando el primero en el ordeño de la mañana y el segundo a las 12 horas.

Para ello se realizaron los siguientes pasos:

- La toma de muestras de leche para el análisis bacteriológico CMT inicial antes de la aplicación de cada tratamiento.
- Aplicación de la primera dosis. Para ello se colocó 10 ml de solución intramamaria, a base de propóleo y etanol en cada cuarto afectado y 5 gramos del antibiótico comercial que corresponde al total antibiótico contenido en cada jeringa unidosis.
- A las 12 horas del primer tratamiento se aplicó el segundo de manera similar sin realizar la prueba del test de California, puesto que la misma se realizara en los ordeños de la mañana.

**Días 3, 4, 5, 7 y 12. CMT**

Se realizó pruebas de CMT (días 3, 4, 5, 7y12). También el día 12 se tomó una muestra para el análisis bacteriológico final.

**Pruebas de unidades formadoras de colonia (UFC/ml) de Aerófilos Mesófilos y Coliformes totales.**

Esta prueba se realizó antes de iniciar los tratamientos y el día de la última medición del CMT, siguiendo el procedimiento establecido en las Normas COVENIN 1292-89, primera revisión: Aislamiento y recuento de *Staphylococcus áureos* y según protocolos utilizados por el personal técnico del laboratorio de microbiología de la UNELLEZ-VPDS.

**Procedimiento:**

- a) Se realizó el recuento de microorganismos aerobios mesófilos usando el medio agar para contaje estándar en placa y recuento de coliformes totales en placa con el medio agar bilis rojo violeta.
- b) Se mezcló el frasco con la muestra de leche 25 veces.
- c) Se pipeteó 1 ml de la muestra de leche a un frasco con 99 ml de agua peptonada para obtener la dilución  $10^{-2}$  y se agitó el frasco 25 veces.
- d) Se pipetea 1 ml del frasco con la dilución  $10^{-2}$  y se transfirió a un frasco de dilución con 99 ml para obtener la dilución  $10^{-4}$ . Se tapó y se agitó el frasco 25 veces.
- e) Se pipeteó por duplicado en placas de Petri alícuotas de 1 ml y 0,1 ml de la muestra de leche y sus diluciones  $10^{-2}$  y  $10^{-4}$  para obtener placas sembradas de la siguiente forma: sin diluir,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ .
- f) Se dispensó en cada placa 12 ml del medio de cultivo fundido y temperado a 45 – 50 °C.

Nota: A una serie de las placas sembradas con las diluciones de la muestra se les agregó el medio agar para contaje estándar en placa para aerobios mesófilos y a la otra serie se les dispensó al medio agar bilis-rojo violeta para enumeración de

coliformes totales.

- g) Se mezcló el inóculo con el medio de cultivo girando la placa en forma de ocho y se dejó solidificar.
- h) Una vez solidificado el agar, se invirtieron las placas y se incubaron a 35 °C durante 48 horas.

Finalizado el período de incubación, se seleccionaron las placas que contenían entre 30 y 300 colonias, y se realizó el recuento con la ayuda de un contador de colonias. Se aplicaron las reglas del recuento:

- Para aerobios mesófilos, se contaron todas las colonias, incluyendo las que se observaron como puntos pequeños.
- Para Coliformes totales, se contaron las colonias rojas con halo de precipitación rojizo, debido a la degradación de la lactosa a ácido provocando el viraje a rojo del indicador de pH rojo neutro y por la precipitación de ácido biliares presentes en el medio. Se seleccionaron 36 las placas que contenían no más de 150 colonias.
- Se contaron como coliformes las colonias de color rojo oscuro que tenían diámetros no menor de 0,5 mm.
- El número de colonias de aerobios mesófilos y de coliformes totales se expresa como unidades formadoras de colonias/ml ó g (UFC/ml ó g).

### **Diseño experimental**

En esta fase se realizaron dos experimentos in vivo (Vacas y Búfalas), mediante un diseño completamente aleatorizado (DCA) con los cuatro tratamientos mencionados, aplicados a los cuartos positivos con dos o más cruces (22) de vacas y (30) de búfalas por separado y se aplicaron la CMT antes y después de realizados los tratamientos a los 0, 15 días, y se repitió tanto a vacas como a búfalas.

VARIABLES INDEPENDIENTES: Tratamientos

- a) T0: Testigo solo con etanol

- b) T1: tratamiento con propóleos al 15%
- c) T2: Tratamiento con propóleos al 25%
- d) T3: Tratamiento con fármaco comercial
- e) Variables dependientes: Respuestas
- f) Clasificación ordinal (Graduación de intensidad) del grado de la mastitis: -; T; +; ++ ó +++. Según prueba CMT
- g) Medición de intensidad de la medición en UFC/ml.

Análisis y procesamiento estadístico de datos:

Para el procesamiento estadístico de los datos con modelo de clasificación de una vía (DCA) aplicado al grado de mastitis antes y después de la aplicación de los tratamientos, se utilizaron los programas SPSS versión 19.0 y STATISTIX versión 8.0, mediante las pruebas:

1. Estadísticos descriptivos: Evolución de los cuartos con dos y tres cruces
2. Prueba t de STUDENT para muestras relacionadas en la comparación de AM y CT antes y después de tratamiento con confirmación de Wilcoxon por tamaño de muestra.
3. Prueba de Kruskal y Wallis (Variable ordinal) para modelo simple, aplicada antes y después de tratados los cuartos, ya que es el método no paramétrico equivalente al modelo paramétrico de ANOVA:

*Modelo lineal aditivo*

$$X_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Dónde:

$X_{ij}$ : Observación cualquiera del grado de la mastitis.

$\mu$ : Efecto de la media general

$\tau_i$ : Efecto de tratamiento o especie o especie por tratamiento, según el caso

$\varepsilon_{ij}$ : Error experimental

1. Prueba MSD de rangos para la comparación de medidas de rango al 5% y la conformación de grupos homogéneos superiores e inferiores de tratamiento.

Desde el punto de vista económico el impacto de la utilización del propóleo en el control de mastitis clínica y subclínica en comparación con los productos comerciales se midieron utilizando las fórmulas propuestas por Gómez (1994), las cuales determinan en términos generales el rendimiento económico de una actividad productiva agropecuaria o empresarial. Las formulas son las siguientes:

Margen Bruto (MB): este indicador mide el margen que deja una actividad económica una vez que a los ingresos se deducen los costos directos que originaron esos ingresos.

$$M.B = \text{Ingresos} - \text{Costos}$$

Relación Beneficio/Costo: (B/C): relaciona el ingreso con los costos directos y representa la cantidad de ingresos brutos que produce cada bolívar u otra moneda gastada durante el proceso productivo. Mide que tan efectiva o racional fue la utilización de los insumos directos en el proceso productivo.

$$B/C = \text{Ingresos} / \text{Costos}$$

Relación Costo/Beneficio: esta relación establece el porcentaje que representan los costos de los ingresos brutos obtenidos por el proceso productivo, al igual que la relación B/C, mide la eficiencia en el uso de insumos directos en la producción.

$$C/B = \text{Costos} / \text{Ingresos} \times 100$$

Para el caso del uso del propóleo en el control de la mastitis clínica y subclínica, los ingresos están representados por la leche producida por cada búfala y vaca en estudio y los costos fueron aquellos insumos, materiales y servicios utilizados directamente en el proceso de control de mastitis de los animales sometidos al uso del propóleo mientras que el grupo control no le serán adjudicados estos costos. Luego se procesaran los datos con la aplicación de las fórmulas.

### 3.4 Materiales

Los materiales utilizados en cada fase de la investigación fueron los siguientes:

- **Etapa bacteriológica de diagnóstico:** Guantes, gasas, desinfectantes, paleta de CMT, solución CMT. Lista de Cotejo (Anexo 1).
- **Etapa de laboratorio pruebas in vitro:** Muestras de leche, tubos de ensayo con tapa de baquelita estériles para recolección de muestra, placas de agar: Agar Sangre, Caldo soya tripticasa (TSB), Caldo de infusión cerebro corazón (BHI), Agar Mueller Hinton, Medio selectivo y diferencial como agar Baird Parker, papel filtro para la elaboración de discos con antibiótico como control positivo y tratamientos experimentales, porta-objetos, 1 asa calibrada para 0,01 ml, cuenta colonias, Autoclave, kit para la coloración de Gram, solución de azul de metileno, xilol y alcohol al 95%, agua oxigenada, hisopos aplicadores con punta de algodón estéril. También se necesitó gel, propóleos, etanol, micropipetas, instrumentos de laboratorio para determinación de halos de crecimiento, microscopio, lupas estereoscópicas,
- **Etapa de campo in vivo:** Lista de cotejo (Anexo 1), registro anecdótico (Anexo 2), guantes, desinfectantes, cánula metálica, inyectora para glándula mamaria y extractos de propóleos, antibiótico comercial (Cefakan<sup>R</sup>), paleta para prueba del test de california, reactivo de california

## CAPITULO IV RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 4.1 Resultados etapa I: Bacteriológica de diagnóstico

#### 4.1.1 Manejo higiénico-sanitario de la unidad de producción.

La unidad de producción La Granja de Hoy, se enmarcada dentro de un Sistema de producción de bovinos doble propósito. En ella se explotan vacas y búfalas en un modo de producción vaca-maute para ambas especies. El ordeño se realiza de forma manual, una vez al día, con apoyo del becerro y bucerro respectivamente.

Dentro de sus instalaciones, cuenta con un corral-vaquera tradicional, sin puestos de ordeño, donde las hembras bovinas son atadas a botalones y luego maneadas para la faena del ordeño.

Es importante señalar que, desde el punto de vista de higiene del ordeño, los ordeñadores no se lavan las manos al iniciar el ordeño de cada nueva vaca o búfala, ni se realiza lavado de los pezones o de la ubre según sea el caso. Así mismo se observó que la vaquera carece de puntos de agua potable (grifos) para el lavado de pezones, manos de los ordeñadores o cualquier otra necesidad. Para ello toman agua en baldes del bebedero del ganado y la utilizan para la higiene. Así mismo, terminada las labores de ordeño, la limpieza de la vaquera se basa en recoger las tortas de bosta con pala y depositarla en un extremo fuera del corral, utilizando una pala y carretilla.

En el tiempo que duró la investigación en la unidad de producción, se modificaron conductas higiénicas del personal, en ordeñadores y becerrero, capacitándolos sobre la importancia de la asepsia y limpieza en la faena de ordeño. Así mismo se habilitó una manguera con suficiente agua para el lavado de pezones y manos y en el caso de las búfalas el lavado total de la ubre cuando se ameritaba, seguido del secado de la misma con toallas de tela limpias. De igual manera se instruyó al personal sobre la importancia de realizar la prueba de fondo oscuro con los primeros chorros de leche en el pre-ordeño, todo esto basado en la Norma Venezolana Covenin 903-93.

También se realizó saneamiento de la instalación, lavando el piso de cemento del

área de ordeño, con agua a presión (utilizando una electrobomba para tal fin) y luego se le roció solución de creolina al piso para el control de insectos.

#### 4.1.2 Cálculo de prevalencia e índice de mastitis subclínica.

Durante los 13 días de duración del ensayo, se calculó la prevalencia de mastitis subclínica, prevalencia total por cuartos e Índice de Mastitis Subclínica, al inicio y al final del mismo, midiendo los parámetros en vacas, búfalas y el general de la finca.

**Tabla 5. Prevalencia y Prevalencia Total por Cuartos Mamarios**

Prevalencia	Inicial	Final	Diferencia
P. Vacas	68,18	63,63	+ 4,55
P. Búfalas	40,0	40,0	0
P. finca	51,92	50,0	+ 1,92
PTC vacas	41,37	34,48	+ 6,89
PTC búfalas	33,33	28,33	+ 5,0
PTC finca	36,71	30,91	+ 5,8

Fuente: El Autor

Según Ferraro *et al*, (1999) en Venezuela, los índices de prevalencia de Mastitis Subclínica se han estimado en 30,18%. Y fincas por encima de esta prevalencia, se consideran seriamente afectadas.

En el caso de la Granja de Hoy, al inicio del ensayo, presentó una prevalencia del 51,92%, siendo mayor en vacas que en búfalas. En cuanto a la prevalencia total por cuartos mamarios, más específica, la finca presentó inicialmente una PTC de 36,71% igual con mayor participación en vacas que en búfalas. Los resultados indican un elevado conteo de células somáticas y además según la referencia anterior, que la unidad de producción en estudio evidencia un problema de mastitis puesto que más de la mitad de los animales en ordeño se encuentran afectados por esta enfermedad inflamatoria lo que a su vez se ve reflejado en la producción de leche por animal y ello se debe según lo observado, a las deficientes medidas sanitarias en los rebaños

específicamente en el ordeño. Esto trae como consecuencia un efecto negativo en la rentabilidad del predio debido a que por un lado, se incrementan los costos de sanidad y por el otro una baja en los ingresos lo que impacta sobre la relación costo-beneficio de la citada finca.

En el mismo orden de ideas, la Tabla 5 indica que al final del experimento (pos tratamiento), la prevalencia total de la finca se ubicó en 50% y la PTC en 30,91. Estos valores demuestran una disminución de 1,92% y PTC de 5,8 respectivamente, manteniéndose la tendencia inicial de una mayor prevaecía en vacas que en búfalas tanto en total de la finca como en PTC.

Con respecto a las diferencias en los niveles de mastitis entre una especie y otra, la Prevalencia inicial señala un 28,18% de mayor infestación en vacas que en búfalas y de 8,04% en PTC, mientras que los valores al final del ensayo (pos tratamiento) se ubicaron en 23,63% y 6,15% respectivamente. Estas prevalencias, con marcada diferencias, mayor número en vacas que en búfalas, obedecen a una resistencia natural a esta patología que favorece al ganado bufalino

. Esto puede explicarse por razones fisiológicas, ya que la búfala lechera padece menores problemas de mastitis en comparación con vaca lechera, como lo afirma Napolitano *et al.*, (2021) lo cual se atribuye a las diferencias morfofisiológicas de la búfala que funcionan como barreras que dificultan y/o impiden el acceso a los microorganismos causantes de mastitis como *Staphylococcus aureus* y *Clostridium perfringens*. Estos atributos conceden gran resistencia a la colonización de microorganismos, como lo son una mayor concentración de pigmentos de melanina, un canal del pezón con un epitelio de queratina de mayor espesor que el característico en vacas, así mismo la capa muscular del esfínter alrededor del canal del pezón más grueso, con más tono, más vasos sanguíneos y fibras nerviosas, además, el lumen del canal del pezón es más estrecho que el de las vacas lecheras.

**Tabla 6. Índice de Mastitis Subclínica.**

IMSC	Inicio	Categoría	Final	Categoría
IMSC vacas	1,12	Malo	0,77	Regular
IMSC búfalas	0,99	Regular	0,59	Bueno
IMSC finca	1,06	Malo	0,66	Bueno

Fuente: El Autor

Los diferentes criterios de interpretación del CMT para mastitis subclínica bovina tienen similares significados; pero cada uno proporciona detalles particulares de la enfermedad y los indicadores como el IMSC proveen información útil sobre la dinámica de la mastitis subclínica (Gómez *et al.* 2015).

En el presente trabajo se manejó como indicativo epidemiológico el Índice de Mastitis Subclínica (IMSC), el cual considera todas las vacas que están en lactancia y excluye los pezones que presentan mastitis clínica para el momento del muestreo y los pezones ciegos o disfuncionales. . Para la calificación del IMSC se utilizó el criterio propuesto por Gómez *et al.* (2015).

En la Granja de Hoy, al inicio del ensayo, el IMSC para vacas se ubicó en 1,12, para búfalas 0,99 y total de la finca 1,06. Los valores tanto para vacas como el total se consideran como “Malo” y la búfala se califica como “regular”. Luego del tratamiento este indicador terminó en 0,77 para vacas, 0,59 en búfalas y 0,66 para el total de la finca, datos que reflejan una disminución de 0,35 en vacas, 0,40 búfalas y 0,40 para el total, valores que se califican como regular, bueno y bueno respectivamente. Estos valores están por debajo de los encontrados por Castillo *et al.* (2008), quien reportó un IMSC de 1,81 en un estudio realizado en cuatro fincas en la zona alta del estado Mérida y de lo reportado por Aguilar *et al.* (2014), quienes señalan un índice de 1,93 en la región lechera del estado de Jalisco México. Así mismo, los resultados están por debajo de los hallazgos presentados por Riera (2020), al obtener un IMSC de 0,58 en unidades de producción ubicadas en la zona de La Vereda, municipio Torres del estado Lara.

La disminución tanto de la Prevalencia como del IMSC para los tres conceptos (vacas, búfalas y total de la finca), demuestra por una parte la efectividad del tratamiento a base de propóleo y por la otra la mayor positividad a mastitis subclínica en el rebaño de vacas, en concordancia con lo expuesto por Napolitano *et al.*, (2021).

## 4.2 Resultados etapa II: laboratorio pruebas in vitro:

Fueron procesados los cuatro pool de muestras de leche, provenientes de vacas y búfalas con dos y tres cruces en la prueba del CMT, para el aislamiento bacteriológico y medición de los halos de inhibición.

### 4.2.1 Identificación de los Agentes Etiológicos.

La tabla 7 muestra los microorganismos aislados de las cuatro muestras procesadas en el laboratorio de microbiología de la UNELLEZ-VPDS.

**Tabla 7. Análisis Bacteriológico de las muestras de leche**

Muestra	Resultado
Leche Vaca ++	<i>Staphylococcus sp</i> <i>Staphylococcus coagulasa negative</i>
Leche Vaca +++	<i>Staphylococcus sp</i> y <i>Bacterias Gram -</i>
Leche Búfala ++	<i>Staphylococcus sp</i>
Leche Búfala +++	<i>Staphylococcus sp</i>

Fuente: El Autor



**Figura 5.** Visualización de colonias de *Staphylococcus* sp. cultivadas en placas con agar Baird Parker.

#### 4.2.2 Antibiograma. Medición de halos de inhibición del crecimiento bacteriano.

Para esta prueba se procedió a medir los halos de inhibición de las cuatro muestras de leche sembradas en placas de Petri que contiene agar Müller-Hinton, realizando la distribución de la manera siguiente: a) Etanol (control negativo). b) Propóleo al 15%. c) Propóleo al 25%. d) Propóleo al 50% y e) Antibiótico comercial (Cefalexina + Kanamicina).

Los resultados obtenidos al realizar la medición de los diferentes halos de inhibición del crecimiento bacteriano, se muestran en la tabla 8.

**Tabla 8. Halos de inhibición del crecimiento bacteriano de los diferentes tratamientos**

Muestra	Control diámetro (mm)	Propóleo 15% diámetro (mm.)	Propóleo 25% Diámetro (mm.)	Propóleo 50% Diámetro mm.	Antibiótico Cefalexina+Ka namicina Diámetro (mm.)
Leche Vacas ++	0	15	20	22	24
Leche Vacas +++	0	16	19	20	26
Leche Búfalas ++	0	14	21	21	25
Leche Búfalas +++	0	15	20	22	26

Fuente: El Autor.

Evaluando los promedios de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano según los valores de sensibilidad de Duraffourd, se observa que el grupo control

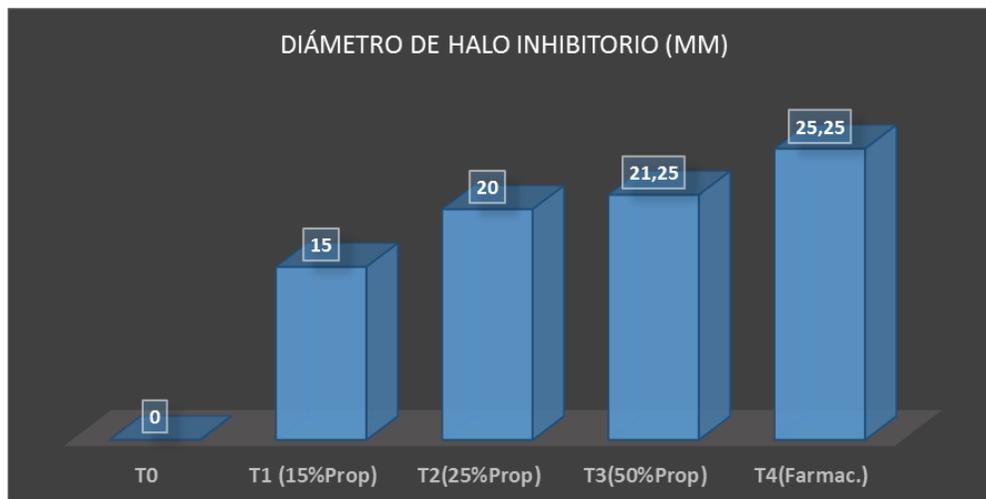
(T0), discos con etanol, el diámetro es cero, lo que explica que su actividad antibacteriana es **nula**. Para el tratamiento con propóleo al 15% (T1), tenemos un promedio de 15 mm, lo que enmarca su actividad antibacteriana dentro de la escala de sensibilidad **media**. En los tratamientos propóleo al 25%, 50% y fármaco comercial, (T2, T3 y T4) los promedios son superiores a 20 mm, de halo de inhibición, correspondiendo el mayor diámetro, al antibiótico comercial (25,25 mm), lo que se consideran **sumamente sensibles** (Duraffourd *et al.*, 1986).

**Tabla 9. Crecimiento (mm) in vitro, del halo inhibitorio (Antibiograma) por tratamiento**

<b>Tto</b>	<b>Promedio Antibiogramas</b>
T0( Control)	00,00 c
T1(15% Prop.)	15,00 b
T2(25% Prop.)	20,00 ab
T3(50% Prop.)	21,25 ab
T4(Fármaco.)	25.25 a
Valor F (ANOVA)	F=71,1**(P<0,01)
	CV= 4,88%

\*\* : Diferencias altamente significativas (P<0,01) entre tratamientos

En la tabla 9, se contrastaron los promedios del diámetro del halo inhibitorio de crecimiento bacteriano de los 5 tratamientos. Para ello se procesó el análisis de la varianza, utilizando la prueba F, para determinar si la variabilidad de las medias entre los 4 grupos es mayor que la variabilidad de las observaciones dentro de los grupos. En base al resultado de la prueba F (P<0,01) y del cociente de variación, se concluye que existe una diferencia altamente significativa, en el efecto inhibitorio de crecimiento bacteriano de los 5 tratamientos evaluados.



**Figura 6. Crecimiento (mm) del halo inhibitorio (Antibiograma) de 5 tratamientos**

En la figura 6, se evidencia la diferencia de la inhibición de crecimiento bacteriano, merced de los 5 tratamientos probados, siendo el más eficiente en la prueba “in vitro”, el tratamiento 4 (antibiótico comercial) y el menos eficiente el tratamiento 0 a base de etanol. Es importante señalar que se eligió el etanol como T0, debido a que es el vehículo (solvente) utilizado en las soluciones de propóleo evaluadas y se quiere dejar constancia de su nula actividad antimicrobiana, lo cual coincide con reportes de Gonsales *et al.*, (2005) donde midieron la actividad antimicrobiana de propóleos de varias zonas de Brasil y, utilizando etanol al 70% como blanco y concluyeron que no mostró actividad antibacteriana en cepas estudiadas. Estos resultados sugieren que la acción antibacteriana de extracto etanólico de propóleo (EEP) contra *Staphylococcus aureus* se debió a los componentes del propóleo.

El promedio general del diámetro de inhibición para el propóleo al 50% fue de 21,25 mm, para la solución al 25% fue de 20 mm y para el propóleo al 15% fue de 15mm. Estos resultados son mayores a los reportados por Neacato (2005) quien señaló un promedio general del diámetro del halo de inhibición de 7,48 mm, con un coeficiente de variación de 12,60%. Esta misma concentración fue utilizada en estudios anteriores realizados por Bankova *et al.*, (2014) quienes al trabajar con cuatro muestras de propóleos brasileño y con extractos elaborados con etanol a 70%,

obtuvieron como resultado halos de inhibición radios entre 3 y 5 mm. De igual manera, Principal *et al.*, (2005) Midieron la actividad antibacteriana in vitro del EEP sobre una cepa de *Staphylococcus aureus*, obteniendo halos de inhibición de 10 y 12 mm en promedio con concentraciones de EEP de 20 y 40 % respectivamente.

Kushikawa *et al.*, (2011) reportan halos de e inhibición crecimiento entre 6-18 mm y Najmadden *et al.*, (2009) informan de halos de inhibición de *Staphylococcus aureus* con diámetros que varían entre 15 y 22 mm al aplicar tratamientos con propóleos, los cuales son similares a los obtenidos en esta investigación.

#### 4.3 RESULTADOS ETAPA III: PRUEBAS DE CAMPO O PRUEBAS IN VIVO:

En la etapa de campo se trabajó con 54 cuartos mamarios de los cuales 24 pertenecen a vacas y 30 a búfalas respectivamente, que resultaron positivas con 2 y 3 cruces a la prueba del CMT.

##### 4.3.1 Asignación de tratamientos.

En la tabla 10 se muestra la asignación aleatoria de los cuartos afectados a cada tratamiento.

**Tabla 10. Asignación de Tratamientos**

Tratamiento	Especie	Nº Animal	A (anterior derecho)	B (posterior derecho)	C (anterior izquierdo)	D (posterior izquierdo)
T 0	Vaca	1250		++	++	
	Vaca	1397	+++	+++	+++	+++
T 1	Vaca	1514	++	++		++
	Vaca	1321	++		++	
	Vaca	1165		++		
T 2	Vaca	1401	++	++	+++	++
	Vaca	1525	++			++
T 3	Vaca	8052	++			
	Vaca	9049	++	++	++	+++
	Vaca	1133		++		
T 3	Búfala	9281536	+++	+++	++	++

	Búfala	9281532	+++	++	+++	++
T2	Búfala	9281552	++	++		++
	Búfala	9281554	++	++		
	Búfala	9281533	++		+++	
	Búfala	9281553	++	++		
	Búfala	9281540	+++	++	++	
T 1	Búfala	9281560		++		
	Búfala	9281534	++	++	+++	+++
	Búfala	9281548	++	+++	++	++
T 0	Búfala	9281558	++	++	++	++
	Búfala	9281542	++			

Fuente: El Autor

### 4.3.2 Aplicación de tratamientos

Se aplicaron los 4 tratamientos respectivos a vacas y búfalas con los resultados plasmados en la tabla 11.

**Tabla 11. Resultados de Tratamientos**

Muestra	Especie	Tratamiento	Identificación	Cuarto	Dx Cmt inicial Día 1	3	4	5	7	12	Resultado
1	Vaca		1250	PD	2	2	2	2	2	2	Msc
2	Vaca		1250	AI	2	2	2	2	2	2	Msc
3	Vaca		1397	AD	3	3	3	3	3	m c	Mastitis clínica
4	Vaca		1397	PD	3	3	3	3	3	3	Msc
5	Vaca		1397	AI	3	3	3	3	3	3	Msc
6	Vaca		1397	PI	3	3	3	3	3	3	Msc
7	Búfala	T 0	9281548	AD	2	2	2	2	2	2	Msc
8	Búfala		9281548	PD	3	3	3	3	3	3	Msc
9	Búfala		9281548	AI	2	2	2	2	2	2	Msc
10	Búfala		9281548	PI	2	2	2	2	2	2	Msc
11	Búfala		9281558	AD	2	2	2	2	2	2	Msc

12	Búfa la		9281558	PD	2	2	2	2	2	2	Msc
13	Búfa la		9281558	AI	2	2	2	2	2	2	Msc
14	Búfa la		9281558	PI	2	2	2	2	2	2	Msc
15	Búfa la		9281542	AD	2	2	2	2	2	2	Msc
16	Vaca		1514	AD	2	2	2	2	2	2	Msc
17	Vaca		1514	PD	2	2	2	2	2	2	Msc
18	Vaca		1514	PI	2	2	2	2	T	N	Cuarto Sano
19	Vaca		1321	AD	2	2	2	2	2	2	Msc
20	Vaca		1321	PD	2	2	2	2	2	2	Msc
21	Vaca		1165	PD	2	2	2	2	1	T	Msc
22	Búfa la		9281540	AD	3	3	3	3	2	2	Msc
23	Búfa la		9281540	PD	2	2	2	2	1	1	Msc
24	Búfa la	T 1	9281540	AI	2	2	2	2	1	N	Cuarto sano
25	Búfa la		9281560	PD	2	2	2	2	1	T	Msc
26	Búfa la		9281534	AD	2	2	2	2	1	1	Msc
27	Búfa la		9281534	PD	2	2	2	2	2	1	Msc
28	Búfa la		9281534	AI	3	3	3	2	2	T	Msc
29	Búfa la		9281534	PI	3	3	3	2	2	1	Msc
30	Vaca		1401	AD	2	2	2	1	1	T	Msc
31	Vaca		1401	PD	2	2	2	1	T	T	Msc
32	Vaca		1401	AI	3	3	3	3	2	T	Msc
33	Vaca		1401	PI	2	2	2	1	1	N	Cuarto sano
34	Vaca		1525	AD	2	2	2	2	1	N	Cuarto sano
35	Vaca	T 2	1525	PI	2	2	2	1	N	N	Cuarto sano
36	Búfa la		9281552	AD	2	2	2	2	1	T	Msc
37	Búfa la		9281552	PD	2	2	2	2	1	N	Cuarto sano

38	Búfa la		9281552	PI	2	2	2	1	1	N	Cuarto sano
39	Búfa la		9281554	AD	2	2	2	2	2	2	Msc
40	Búfa la		9281554	PD	2	2	2	2	2	1	Msc
41	Búfa la		9281533	AD	2	2	2	2	1	T	Msc
42	Búfa la		9281533	AI	3	3	3	2	2	T	Msc
43	Búfa la		9281553	AD	2	2	2	1	1	T	Msc
44	Búfa la		9281553	PD	2	2	2	1	T	N	Cuarto sano
45	Vaca		8052	AD	2	2	2	2	T	T	Msc
46	Vaca		9049	AD	2	2	2	2	2	2	Msc
47	Vaca		9049	PD	2	2	2	2	2	2	Msc
48	Vaca		9049	AI	2	2	1	1	T	N	Cuarto Sano
49	Vaca		9049	PI	3	3	3	3	2	2	Msc
50	Vaca		1133	PD	2	2	2	1	1	2	Msc
51	Búfa la		9281536	AD	3	3	3	2	2	2	Msc
52	Búfa la		9281536	PD	3	3	3	2	2	T	Msc
53	Búfa la	T 3	9281536	AI	2	2	1	1	2	2	Msc
54	Búfa la		9281536	PI	2	2	1	1	N	N	Cuarto sano
55	Búfa la		9281532	AD	3	3	2	2	1	1	Msc
56	Búfa la		9281532	PD	2	2	2	1	1	T	Msc
57	Búfa la		9281532	AI	3	3	2	2	1	1	Msc
58	Búfa la		9281532	PI	2	2	2	2	1	1	Msc

Fuente: El Autor

En la tabla 12 se observa la evolución de los tratamientos entre grupos y dentro de cada grupo para ambas especies.

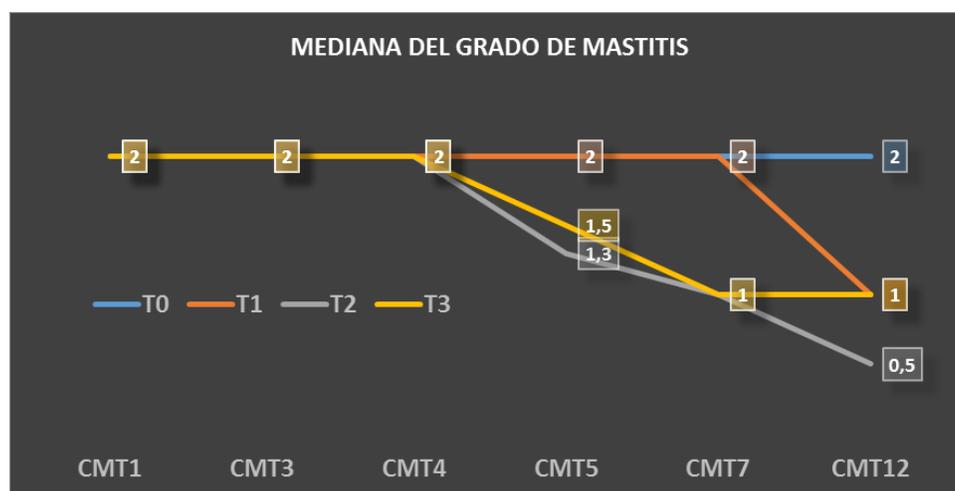
**Tabla 12. Aproximación a F de Kruskal-Wallis y Comparación de medias (MDS) de rango (medianas por escala ordinal) del grado de la mastitis en vacas y búfalas combinadas**

Tratamiento	Mast.Inic	Mast. 3	Mast.4	Mast. 5	Mast.7	Mast.12
T0	2 a	2 a	2 a	2 a	2 a	<b>2 a</b>
T1	2 a	2 a	2 a	2 a	2 a	<b>1 b</b>
T2	2 a	2 a	2 a	1,3 b	1 b	<b>0,5 b</b>
T3	2 a	2 a	2 a	1,5 b	1 b	<b>1 b</b>
<b>Aprox a F.</b>	<b>1,03 ns</b>	<b>1,03 ns</b>	<b>0,96 ns</b>	<b>6,16**</b>	<b>12,0**</b>	<b>20,6**</b>

NOTA: Letras Distintas en la misma columna, indican medianas o tendencias estadísticamente diferentes.

NOTA: ns; No hay diferencias significativas; \*; Diferencias significativas ( $P < 0,05$ ); \*\*: Diferencias altamente significativas ( $P < 0,01$ ) entre tratamientos

El análisis estadístico General (ambas especies), para un diseño con modelo simple, ejecutado con la prueba de Kruskal y Wallis por la escala ordinal de medición de la mastitis (Tabla 12) no detectó diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre tratamientos, antes de la aplicación, lo que avala el análisis posterior ya que cualquier diferencia que se detecte debe ser atribuida al efecto de tratamiento y no a los animales.



**Figura 7. Evolución del grado de mastitis en vacas y búfalas de ordeño con 4 tratamientos.**  
Fuente: El Autor

El análisis tampoco detectó diferencias en las tendencias en las dos primeras evaluaciones, sin embargo, a partir de la tercera medición (5 días) se obtuvieron diferencias altamente significativas ( $P < 0,01$ ) generales por lo que podemos inferir (Figura 6) que los tratamientos T2 y T3 redujeron significativamente el grado de mastitis en los animales (sin diferencias entre estos) en general y esto es un buen síntoma que favorece el efecto positivo del propóleo al 25% ya que compitió eficientemente con el tratamiento convencional con antibióticos, al reducir el grado de mastitis en la misma magnitud y tendencia que el fármaco. Un poco más tarde, en la última evaluación, ya la dosis baja del propóleo mostraba un efecto similar a los dos tratamientos mencionados, indicando con esto que desde el 15%, el propóleo es efectivo para controlar el efecto de esta patología en vacas y búfalas en producción.

Cuando se consideró el mismo análisis anterior, promediando la evolución por especie, la tabla 12 señaló que búfalas y vacas, se mantuvieron con las mismas tendencias a lo largo de las evaluaciones, sin diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) sobresalientes, y solo se podría mencionar una tendencia en las búfalas a mejorar un poco más rápido que las vacas (Figura 7)

**Tabla 13. Aproximación a F de Kruskal y Wallis y comparación de medias (MDS) de rango (Medianas por escala ordinal) del grado de la mastitis por especie animal**

Especie	Mast.Inic.	Mast. 3	Mast.4	Mast. 5	Mast.7	Mast.12
Vacas	2 a	2 a	2 a	2 a	2 a	<b>2 a</b>
Búfalas	2 a	2 a	2 a	2 a	2 a	<b>1 a</b>
<b>Aprox a F.</b>	<b>0,02 ns</b>	<b>0,02 ns</b>	<b>0,20 ns</b>	<b>0,45 ns</b>	<b>0,06 ns</b>	<b>0,78ns</b>

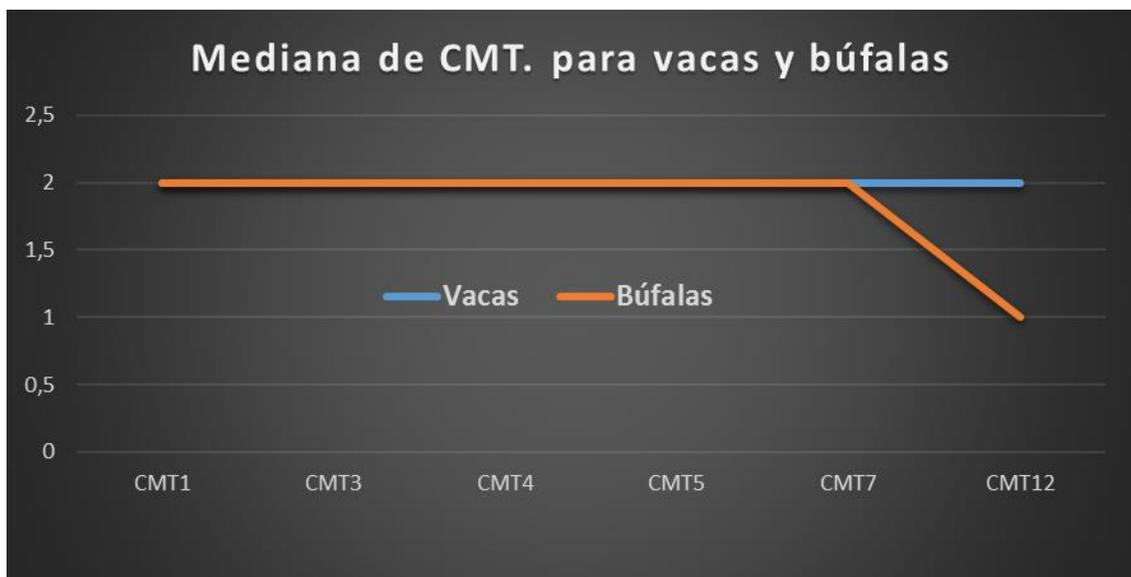
NOTA: Letras Distintas en la misma columna, indican medianas o tendencias estadísticamente diferentes.

NOTA: ns; No hay diferencias significativas.

Aunque la tabla 13, nos demuestra claramente que desde el punto de vista estadístico, no hubo diferencias significativas entre especies, sobre las repuestas de los cuartos con mastitis a los tratamientos realizados. Desde el punto de vista clínico existe una mayor resistencia del ganado bufalino sobre el vacuno a esta patología,

por presentar la búfala una ubre con mayor concentración de pigmentos de melanina, mayor espesor de la capa epidérmica del epitelio queratinizado, capa muscular del esfínter más gruesa, organizada con más tono, mayor número de vasos sanguíneos y fibras nerviosas y menor diámetro de la luz del canal del pezón que le confieren mayor resistencia al proceso infeccioso Carvalho,2005(citado por Sánchez, 2021).

Esta situación se evidencia en la presente investigación, pues analizando las prevalecias al inicio del ensayo, la del rebaño bufalino fue menor que la de le rebaño vacuno, como se explica en el anterior análisis. Además al final del ensayo, aunque ambas especies se comportaron de igual manera frente a los tratamientos, la prevalencia de las búfalas fue menor.



**Figura 8. Mediana de CMT para vacas y búfalas**

Fuente: El Autor

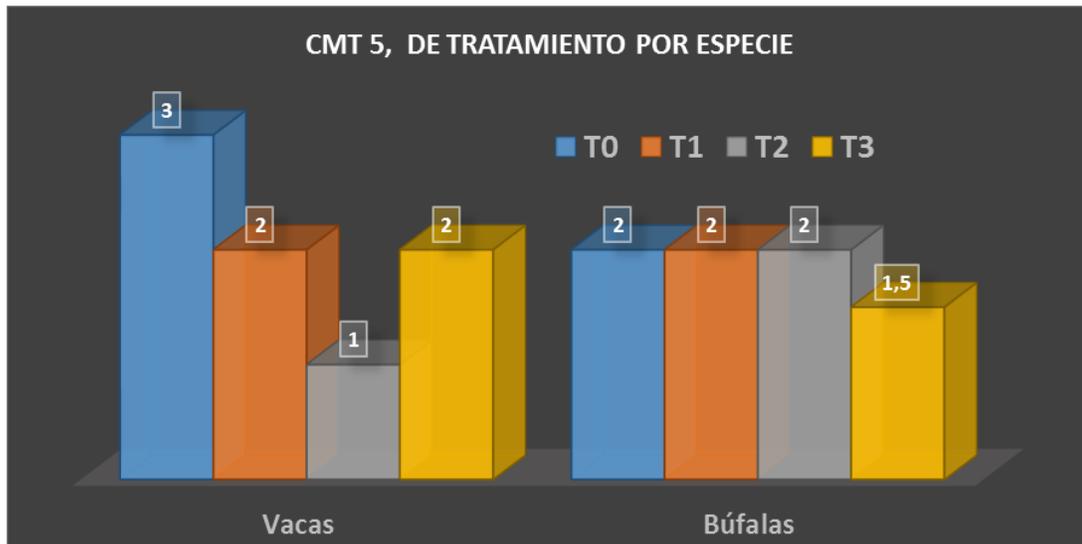
**Tabla 14. Aproximación a F de Kruskal y Wallis y comparación de medias (MDS) de rango (Medianas por escala ordinal) del grado de la mastitis en cada tratamiento y cada especie (Interacción)**

Tratamiento	Mast.Inic.	Mast. 3	Mast.4	Mast. 5	Mast.7	Mast.12
T0V	3 a	3 a	3 a	3 a	3 a	<b>3 a</b>
T1V	2 a	2 a	2 a	2 a	1 a	<b>0,9 ab</b>
T2V	2 a	2 a	2 a	1 b	1 b	<b>0,3 c</b>
T3V	2 a	2 a	2 a	2 a	1,5 b	<b>2 a</b>
T0B	2 a	2 a	2 a	2 a	2 a	<b>2 a</b>
T1B	2 a	2 a	2 a	2 a	1,5 a	<b>0,7 b</b>
T2B	2 a	2 a	2 a	2 a	1 b	<b>0,5 c</b>
T3B	2,5 a	2,5 a	2 a	1,5 b	1 b	<b>0,7 b</b>
<b>Aprox a F.</b>	<b>2,04 ns</b>	<b>0,04 ns</b>	<b>1,51 ns</b>	<b>3,44**</b>	<b>5,27**</b>	<b>9,51**</b>

NOTA: Letras Distintas en la misma columna, indican medianas o tendencias estadísticamente diferentes.

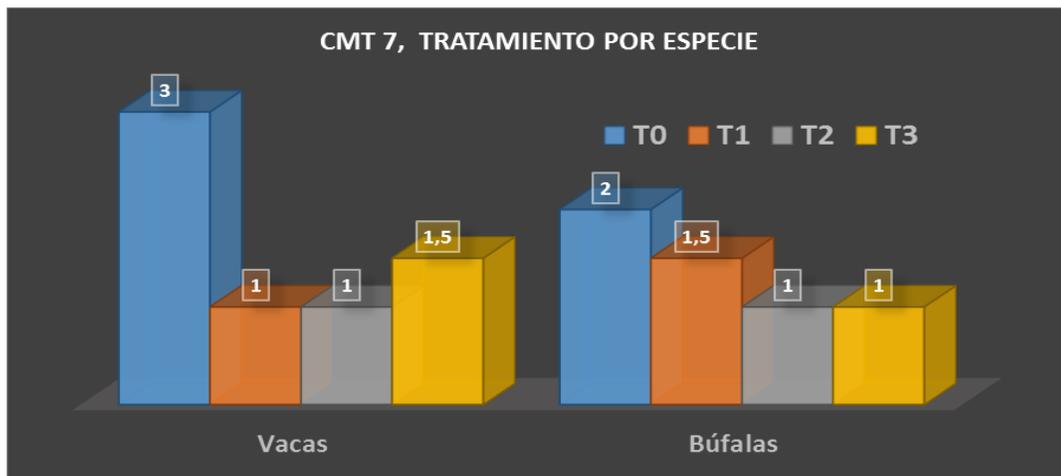
NOTA: ns; No hay diferencias significativas; \*, Diferencias significativas (P<0,05); Diferencia altamente significativas (P<0,01) entre tratamientos

El análisis estadístico individual de ambas especies en el tiempo, según la prueba de Kruskal y Wallis (Tabla 14) no detectó diferencias significativas (P> 0,05) en las tendencias en las tres primeras evaluaciones, sin embargo, a partir de la tercera medición (5 días) se obtuvieron diferencias altamente significativas (P< 0,01), tanto en búfala como en vacas con reducción del grado de mastitis de los tratamientos T2 y T3 desde el CMT5 y luego T1, T2 y T3. En las pruebas CMT7 y CMT12. Al respecto, las figuras 8, 9 y 10 correspondientes a las pruebas CMT5, CMT7 y CMT12.

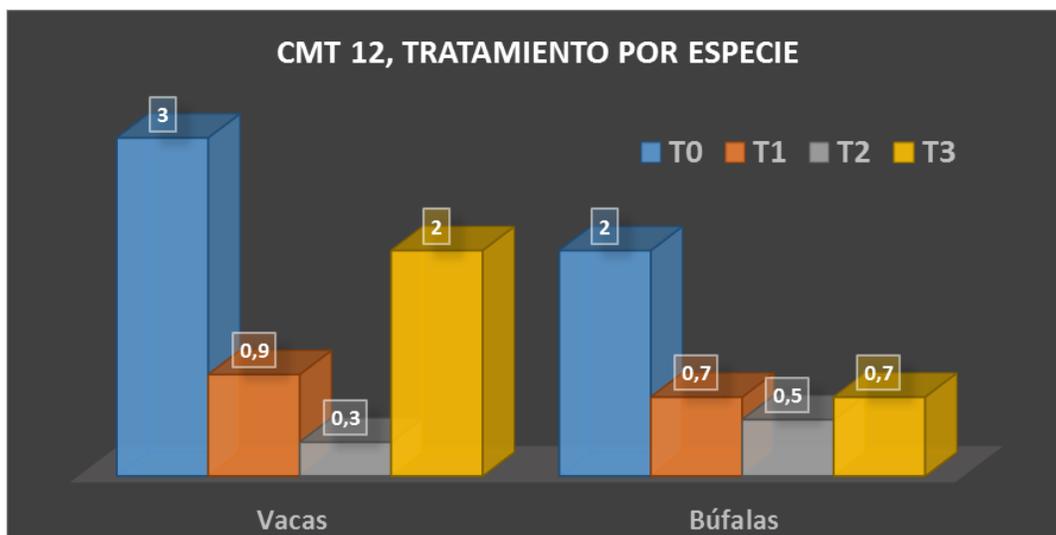


**Figura 9. Interacción tratamiento por especie para CMT 5.**

Estos resultados (fig. 8) muestran claramente, que el tratamiento con propóleo presentó reducciones del grado de mastitis tanto en vacas como en búfalas, incluso que llegaron a ser más drásticas que el antibiótico comercial, por lo que podemos decir que el tratamiento con propóleo resultó tan efectivo o más que el fármaco para controlar el efecto de esta patología en vacas y búfalas en producción.



**Figura 10. Interacción tratamiento por especie para CMT 7**



**Figura 11. Interacción tratamiento por especie para CMT 12**

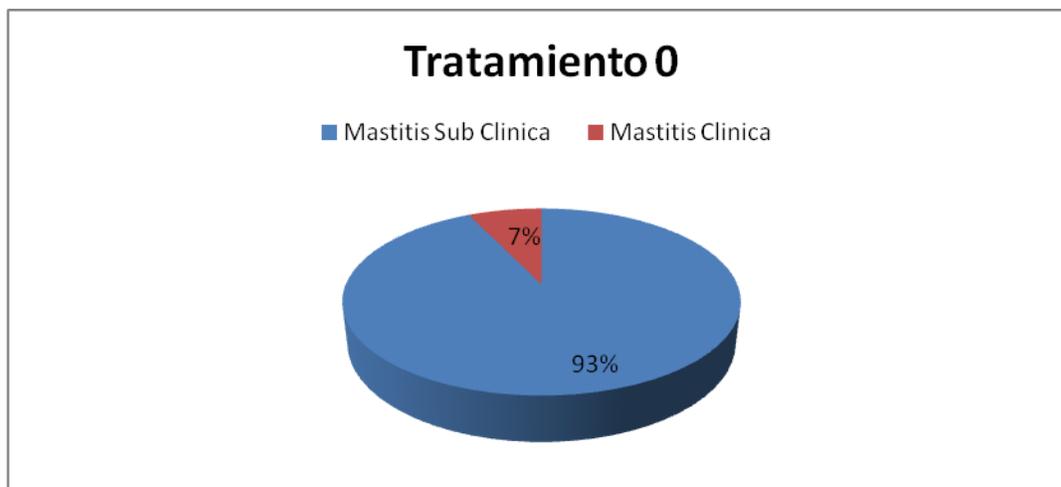
En las figuras 9, 10 y 11, se observa la progresión de la respuesta de ambas especies a los 4 tratamientos realizados, donde hay una tendencia del rebaño bufalino a disminuir la mastitis subclínica en T1, T2 y T3. La tendencia también explica que T2 fue el más efectivo en ambas especies.

### **4.3.3 Análisis de los resultados por tratamiento.**

#### **4.3.3.1 Tratamiento 0 (Etanol)**

En referencia a los resultados obtenidos en la investigación (tabla 12) el efecto antibacteriano del tratamiento fue nulo, porque como se explicó anteriormente, el etanol no tiene bondades antimicrobianas ni de control contra bacterias, resultado este que confirma lo publicado por Gonsales, (2005) en Brasil, donde utilizó el etanol como control. Adicional a lo descrito anteriormente, un cuarto mamario aumento su grado de mastitis, pasando de mastitis subclínica a un caso clínico.

En este grupo de 14 cuartos tratados, 13 presentaron mastitis subclínica y un cuarto se agravo y fue diagnosticado como mastitis clínica.



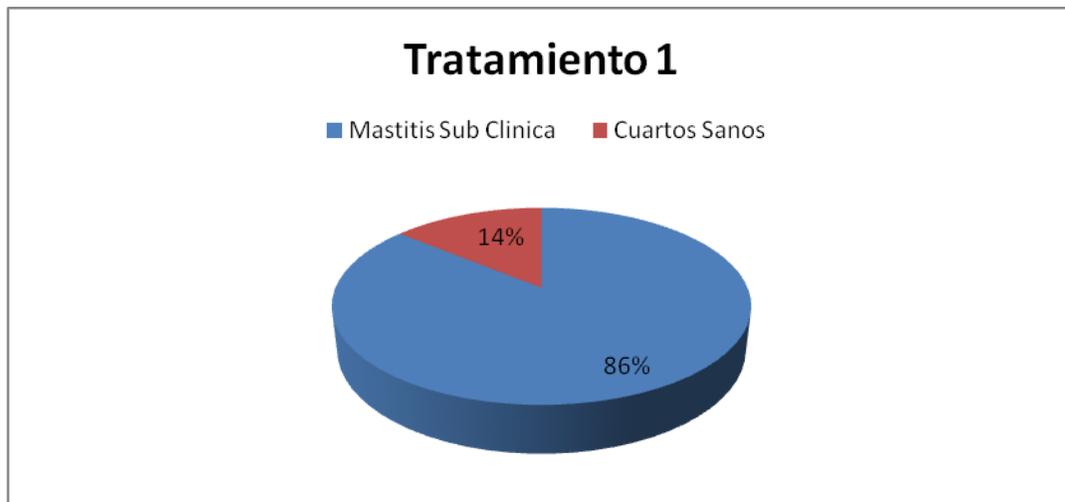
**Figura 12. Tratamiento 0**

Fuente: El Autor.

#### **4.3.3.2 Tratamiento 1 (Propóleo al 15%)**

Los cuartos mamarios tratados con propóleo al 15% no presentaron cambios en el grado de mastitis subclínica, durante los primeros 5 días de aplicado el tratamiento (tabla 12). En las mediciones del CMT a los 7 y 12 días, se observa una leve baja del recuento de células somáticas (figura 6), disminuyendo en 1 o 2 grados su diagnóstico y al día 12, dos cuartos mamarios se presentaron negativos o cuartos sanos.

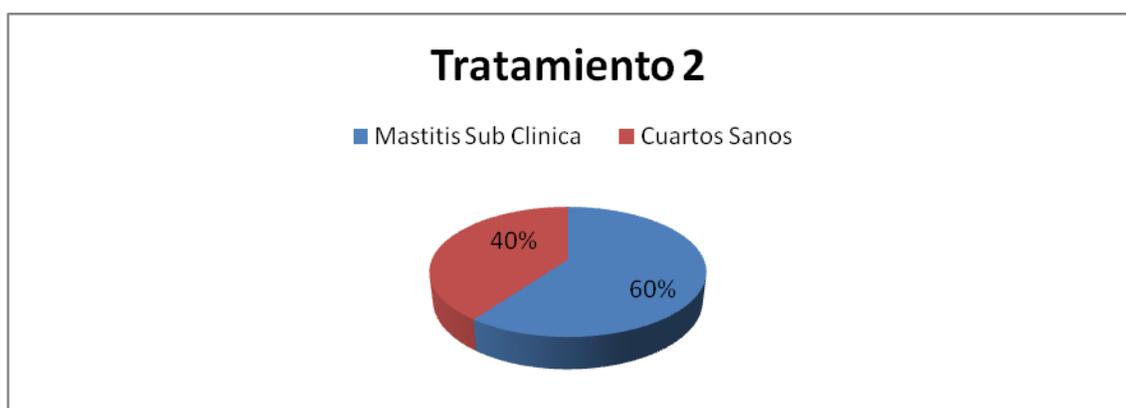
Paredes (2017) obtuvo resultados diferentes al evaluar 3 concentraciones de propóleo al 2,5%, 5% y 10% en vacas diagnosticadas con ++ a la prueba del CMT. Según su publicación obtuvo resultados de 100% de curación con estos tratamientos, aplicado 2 dosis de 10 en extracto etanólico cada 12 horas.



**Figura 13. Tratamiento 1**  
Fuente: El Autor

#### 4.3.3.3 Tratamiento 2 (Propóleo al 25%)

En el grupo tratado con propóleo al 25%, los cambios de grado de mastitis subclínica, comenzaron a observarse a partir de la medición del día 5, acá se presentó una marcada disminución de esta patología, evidenciándose para el día 12. De los 15 cuartos mamarios tratados con este propóleo, 14 presentaron al menos mejoría en un grado del diagnóstico de mastitis subclínica y de ellos, en la prueba del día 12, seis cuartos resultaron negativos o cuartos sanos.



**Figura 14. Tratamiento 2**  
Fuente: El Autor

Estos resultados, coinciden con los publicados por Mantilla, (2018) donde obtuvo un 33% de curación de cuartos afectados por mastitis subclínica, con un tratamiento similar de propóleo al 25%.

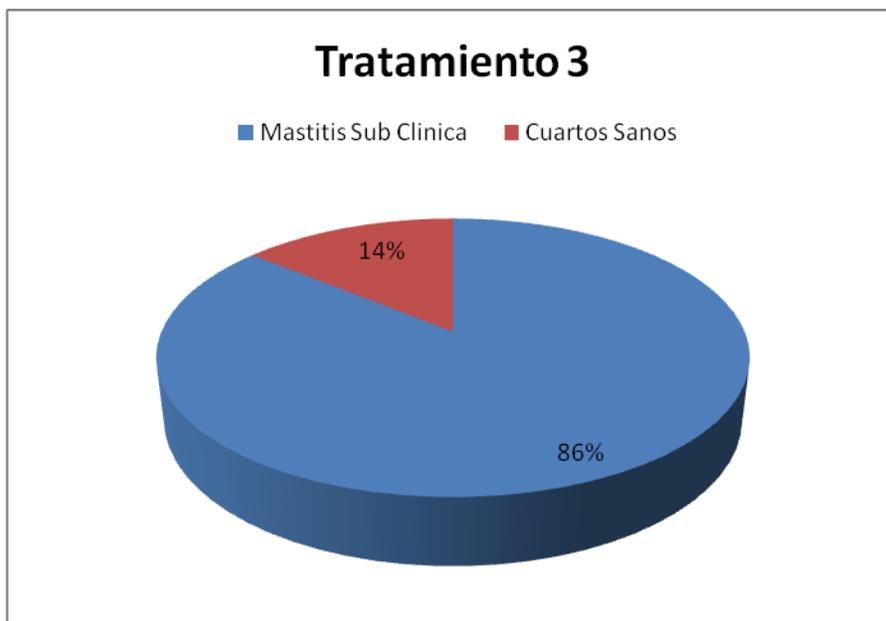
#### **4.3.3.4 Tratamiento 3 (Cefalexina + Kanamicina)**

En el tratamiento 3 que corresponde al fármaco comercial, dos cuartos mamarios de los 14 pertenecientes a este grupo, no presentaron variación en el grado de mastitis subclínica, durante los 12 días que duró el ensayo. Los 12 restantes, presentan variación positiva disminuyendo su grado de afección a partir del CMT 5 hasta el CMT 12 y de ellos dos cuartos presentaron mejoría total clasificándose como cuartos sanos.

Este resultado puede deberse, entre otras causas, a que en la asociación de cefalexina y kanamicina, este último es activo solo contra bacterias gram negativas. Adicionalmente la cefalexina, cefalosporina de primera generación, es eficiente contra bacterias gram positivas, pero en un estudio de sensibilidad a antibióticos publicados por Celis-Enríquez *et al.* (2016) los *Staphylococcus* presenta 68% de resistencia a este antibiótico, debido a la formación de la enzima betalactamasa, por parte del *Staphylococcus*, la cual hidroliza el anillo betalactámico de la cefalosporina neutralizando su acción bactericida.

También es importante señalar que, según indicaciones en el prospecto recomendadas por el fabricante, se debe aplicar las dosis intramamarias cada 12 horas hasta que desaparezcan los síntomas, y en la presente investigación, solo se realizaron 2 aplicaciones al igual que los tratamientos con propóleo.

Es por estas razones que el antibiótico comercial, no expresó su potencial como se esperaba, a pesar que en la prueba del antibiograma tuvo el halo de inhibición de crecimiento bacteriano con mayor diámetro.



**Figura 15. Tratamiento 3**

Fuente: El Autor

El comportamiento de los dos tratamientos de propóleo al 15% y 25%, cuyo efecto se evidencia a partir de los días 7 y 5 respectivamente, sugieren que para este caso, tuvo un comportamiento bacteriostático más que bactericida. Estos resultados se comprueban con los hallazgos de Gil *et al.*, (2012) quienes encontraron, al trabajar con tintura de propóleos, que tienen efecto bactericida para algunas cepas y bacteriostático para otras.

#### **4.3.4 Aerófilos mesófilos y coliformes totales**

En la presente investigación, se realizó la medición de bacterias aerófilas mesófilas y coliformes totales, medidas en unidades formadoras de colonias por mililitro de leche (UFC/ml), como indicadores de la calidad higiénica de las muestras de leche de la granja de hoy.

**Tabla 15. Medición de Aerófilos Mesófilos y Coliformes Totales**

Muestra	A.M ufc/ml. ( $\times 10^4$ )		C.T. ufc/ml. ( $\times 10^4$ )	
	Inicio	Final	Inicio	Final
Leche Vaca ++	220	54	23	12
Leche Vaca +++	300	62	62	24
Leche Búfala ++	242	47	47	0
Leche Búfala +++	250	36	120	32

Fuente: El Autor.

De acuerdo al recuento total en placas, determinado según la Norma Covenin 902, la leche cruda se clasifica en:

- **Categoría A:** Hasta 500.000 ufc/ml.
- **Categoría B:** Desde 500.001 hasta 1.500.000 ufc/ml.
- **Categoría C:** Desde 1.500.001 hasta 5.000.000 ufc/ml.
- **Sin clasificación:** Más de 5.000.000 ufc/ml.

Para la medición de coliformes totales, la Norma Covenin 798:1994, establece que en la recepción de leche a nivel de planta se permite hasta  $2,6 \times 10^2$  ufc/ml.

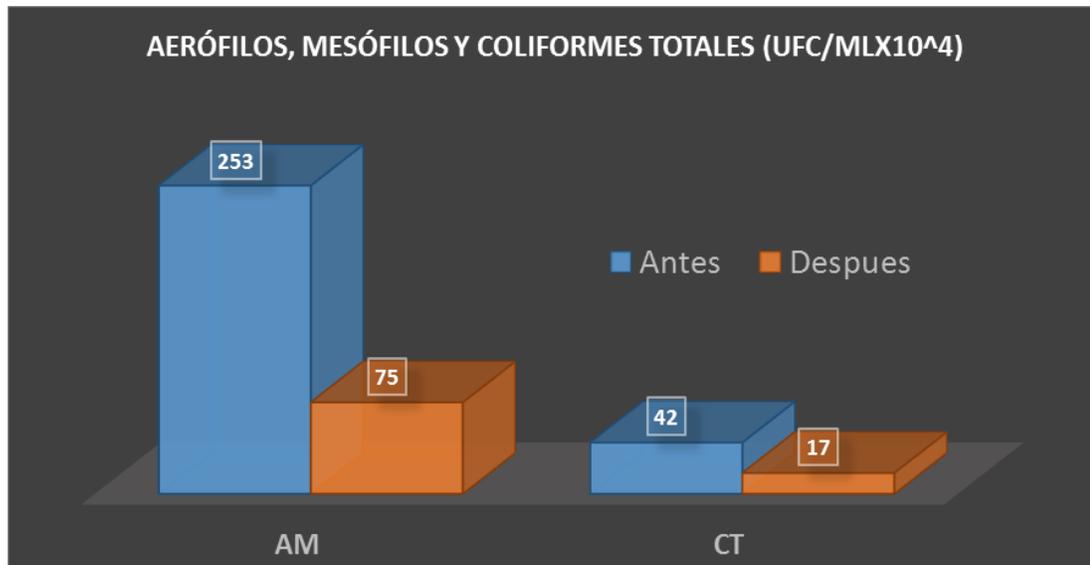
**Tabla 16. Promedios Aerófilos mesófilos y Coliformes totales (ufc/ml  $\times 10^4$ ) antes y después de aplicados los tratamientos**

	Promedio AM	Promedio CT
Inicial	253	42,0
Final	75	17,0
Diferencia	178	25,0
T de Student	8,39**	2,41
Significancia	( $P < 0,01$ )	( $P > 0,05$ )

Fuente: El Autor

Se observó que las muestras de leche (tabla 16) en el cálculo de Aerófilos Mesófilos al inicio del ensayo, las 4 muestras de leche son categoría C y al final del ensayo las 2 muestras de leche de vaca, suben a la categoría B, mientras que ambas muestras de leche de búfalas mejoran a categoría A. En cuanto al recuento de coliformes totales, ninguna de las muestras, al inicio del ensayo, cumple con la Norma Covenin 798:1994, en cuanto a la cantidad de ufc/ml permitidas en leche

cruda a nivel de planta. Al final del ensayo, solo la muestras perteneciente a las búfalas ++ cumple con la norma (Ob.cit).



**Figura 16. Desarrollo de UFC en Aerófilos Mesófilos y Coliformes Totales**  
Fuente: El Autor

En la tabla 16 se realiza la prueba t de student para determinar si hay una diferencia significativa entre las medias de dos grupos. Al analizar los resultados en el desarrollo de unidades formadoras de colonias (ufc) de los aerófilos mesófilos, con una significancia ( $P < 0,01$ ), concluimos que existe una diferencia significativa en los promedios de desarrollo bacteriano ufc en este grupo. Así mismo, para ufc en coliformes totales con una significancia ( $P > 0,05$ ) se concluye que no existe una diferencia significativa en las medias de crecimiento de ufc al inicio y final del ensayo. Estos resultados son graficados en la figura 16.

#### 4.4 Discusión del caso clínico.

Durante la realización del presenta ensayo, se presentó un caso de mastitis clínica en una vaca identificada con el arete N° 1397 perteneciente al grupo testigo (T-0) la cual presentaba mastitis subclínica grado 3 (+++) en los cuatro cuartos de la ubre. El cuarto mamario que presentó esta patología fue el anterior derecho, por lo que se procediendo a su tratamiento. Es importante señalar que, aunque en los objetivos de

la presente investigación, se planteó el tratamiento de mastitis clínicas y subclínicas, en el transcurso del mismo solo se presentó un caso de mastitis clínica, lo que limitó la comparación de tratamientos y medición de su efectividad.

El cuarto afectado, fue evaluado el día 12 del ensayo, mientras se realizaba la prueba CMT correspondiente a ese día (CMT 12). En el momento del ordeño, cuando se realiza la prueba de fondo oscuro y toma de muestras en la paleta del test, se observó que el cuarto presentaba aumento de volumen, enrojecimiento, calor y dolor a la palpación. De igual manera, en la evaluación clínica, se realizó medición de la temperatura rectal, encontrándose en 40°C, lo que es catalogado clínicamente, como una fiebre ligera. Al realizar el ordeño, se observaron escasos flóculos, característicos de leche coagulada. Seguidamente se procedió a exprimir totalmente el cuarto afectado, a lo cual la vaca expresaba dolor e incomodidad.

Para el tratamiento del cuarto, se tomó la decisión de utilizar la solución de propóleo al 50%, que se tenía reservada para tal fin, y se le realizaron 3 aplicaciones de 10 ml a un intervalo de 12 horas.

En la evaluación del tratamiento se pudo evidenciar que a las 36 horas del inicio del mismo, ya no se presentaron grumos de leche en la prueba de fondo oscuro y la leche presentaba su color y fluidez normal. De igual manera se realizó la prueba del CMT los días 3, 5 y 7 post tratamiento y se observó que a partir del día 7, la leche del cuarto anterior derecho no presentó ningún tipo de reacción al test de California, por lo que fue diagnosticado como cuarto sano.

Estos resultados confirman los reportados por López (2011), quien realizó aplicaciones de extracto etanólico de propóleo al 50% en vacas lecheras de diferentes fincas en Guatemala, obteniendo un 100% de curación al día 7.

Este comportamiento del propóleo, coincide con los resultados publicados por Mendoca (2017) y Fiordalisi *et al.* (2016), donde el propóleo tiene la particularidad de actuar de manera bactericida o bacteriostática, frente a algunas cepas bacterianas,

dependiendo de la zona y tipo de vegetación donde fueron recolectadas las resinas. En este caso en particular se considera un efecto bacteriostático, como el reportado por López, (2011).

#### **4.5 Análisis económico**

En el presente ensayo, se procedió a evaluar el impacto económico de los tratamientos de propóleo al 15%, 25% y antibiótico comercial, midiendo para ello la producción de leche obtenida, en base a 30 días post tratamiento, como parámetro de producción.

Para ello se utilizaron parámetros económicos como: Relación Beneficio/Costo, Margen Bruto y Costo Beneficio.

##### **4.5.1 Ingresos por producción de leche**

En la tabla 17 se observa la producción de leche medida durante y después de la aplicación de los tratamientos en vacas y búfalas. Así mismo se calculó el incremento de la producción, medido a los 30 días, y su valoración económica en dólares. En la finca la granja de hoy, el valor de venta de cada litro de leche actual es de 0,2\$/lt.

**Tabla 17. Producción de leche**

Especie	N° Animal	Día 0 (Kg. de leche)	Día 6 (Kg. de leche)	Día 12 (Kg. de leche)	Día 30 (Kg. de leche)	Incremento (Kg/día)	Incremento (Kg/mes)	Incremento (\$/mes)
<b>Vaca</b>	1250	3,6	3,8	3,7	4,0	0,4	12	2,4
<b>Vaca</b>	1397	4,0	4,0	4,2	4,0	0,0	0,0	0,0
<b>Vaca</b>	1514	4,0	4,5	4,9	5,0	1,0	30	6,0
<b>Vaca</b>	1321	3,6	3,8	4,0	3,9	0,3	9	1,8
<b>Vaca</b>	1165	3,2	3,4	3,7	4,0	0,8	24	4,8
<b>Vaca</b>	1401	3,8	4,4	5,0	5,2	1,4	42	8,4
<b>Vaca</b>	1525	4,1	4,5	5,1	5,5	1,4	42	8,4
<b>Vaca</b>	8052	4,4	4,8	4,7	4,5	0,1	3	0,6
<b>Vaca</b>	9049	3,5	3,8	4,3	4,0	0,5	15	3,0
<b>Vaca</b>	1133	2,9	3,1	3,3	3,0	0,1	3	0,6
<b>Búfala</b>	9281536	4,2	4,6	5,0	5,5	1,3	39	7,8
<b>Búfala</b>	9281532	4,4	4,6	4,9	5,4	1,0	30	6,0
<b>Búfala</b>	9281552	4,0	4,6	5,6	6,0	2,0	60	12,0
<b>Búfala</b>	9281554	5,2	5,5	5,7	6,2	1,0	30	6,0
<b>Búfala</b>	9281533	4,7	5,1	5,3	5,5	0,8	24	4,8
<b>Búfala</b>	9281553	4,3	5,0	5,5	5,7	1,4	42	8,4
<b>Búfala</b>	9281540	4,0	5,0	5,2	5,5	1,5	45	9,0
<b>Búfala</b>	9281560	5,7	5,9	6,2	6,7	1,0	30	6,0
<b>Búfala</b>	9281534	5,8	5,7	5,9	6,0	0,2	6	1,2
<b>Búfala</b>	9281548	6,0	6,2	5,9	6,5	0,5	15	3,0
<b>Búfala</b>	9281558	5,8	5,3	5,5	5,8	0,0	0,0	0,0
<b>Búfala</b>	9281542	5,5	5,8,	6,0	6,5	1,0	30	9,0
<b>Promedio</b>		4.39	4.7	4.98	5.2	0,8	<b>24,13</b>	<b>4,96</b>

Fuente: El Autor.

Como se puede evidenciar, ese precio de cancelación de la leche caliente es inferior al publicado por el observatorio lácteo.



**Figura 17. Precio Promedio de Leche a Puerta de Corral.**

Fuente: Observatorio Lácteo.

#### 4.5.2 Costos de los tratamientos.

Para el cálculo de los costos se tomaron como referencia el precio al detal del antibiótico comercial (Cefakan) en las agropecuarias de la ciudad de Barinas.

De igual manera el precio del extracto etanólico de propóleo fue proporcionado por apicultores de la región, que comercializan este compuesto.

Así tenemos que:

Costo del Cefakan: 3 \$ unidad. (Se entiende como unidad, la jeringa con 5 gramos de producto para aplicación unidosis).

Costo del propóleo: A nivel de apicultores, se comercializa de la manera siguiente:

100 ml de extracto etanólico de propóleo al 50% en solución de etanol al 70%: 6\$

De este costo se calcularon los costos de las dosis al 15% y 25% utilizadas en el ensayo, donde se utilizó agua bidestilada, como solvente para su dilución.

Para efectos de la aplicación se formularon dosis en base a 10 ml.

Costo 10 ml de propóleo al 15%: 0,22 \$

Costo de 10 ml. De propóleo al 25%: 0,3\$

**Tabla 18. Efecto de un tratamiento contra la mastitis a base de propóleo, sobre la producción de leche en vacas durante treinta días (en Lt/vaca/día)**

Tratamiento	Prod. Inicial (Lt/v/día)	Prod. Final (Lt/v/día)	Incremento	
			(Lt/v/día)	%
TO	3,80	4,00	0,20	5,26
T1	3,60	4,30	0,70	19,44
T2	3,95	5,35	1,40	35,44
T3	3,60	3,83	0,23	6,38

Fuente: El Autor

La tabla 18 evidencia el efecto del tratamiento contra la mastitis, aplicado a los cuatro (04) diferentes grupos de vacas, para lo cual se evaluó la producción a 30 días. Es importante señalar que el grupo T2 tuvo el mayor incremento en la producción de leche, lo cual evidencia la eficiencia del propóleo al 25%. El grupo T1 fue el segundo tratamiento con mejor eficiencia y T3 (tratamiento comercial) y T0 observaron un comportamiento similar.

**Tabla 19. Efecto de un tratamiento contra la mastitis a base de propóleo, sobre la producción de leche en búfalas durante treinta días (en Lt/búfala/día)**

Tratamiento	Prod. Inicial (Lt/b/día)	Prod. Final (Lt/b/día)	Incremento	
			(Lt/b/día)	%
TO	5,77	6,27	0,50	8,66
T1	5,17	6,07	0,90	17,41
T2	4,55	5,85	1,30	28,57
T3	4,30	5,45	1,15	26,74

Fuente: El Autor

En la tabla 19 se evidencia el efecto del tratamiento aplicado contra la mastitis a los diferentes cuatro (04) grupos de búfalas, para lo cual se muestra la producción inicial de litros de leche obtenidos por día y su producción final, luego de haber recibido tratamiento. En los 30 días que se realizó el pesaje de leche, se observa un incremento de la producción lechera similar entre T2 y T3 con una mayor tendencia en T2. T1 y T0 presentaron menor incremento en ese orden.

**Tabla 20. Efecto de un tratamiento contra la mastitis a base de propóleo, sobre la producción de leche en un sistema con búfalas y vacas (en Lt/a/día)**

Tratamiento	Prod. Inicial (Lt/a/día)	Prod. Final (Lt/a/día)	Incremento	
			(Lt/a/día)	%
TO	4,78	5,13	0,35	7,43
T1	4,38	5,18	0,80	18,26
T2	4,25	5,60	1,35	31,76
T3	3,95	4,64	0,69	17,47

Fuente: El Autor

Se observa, en la tabla 20, el efecto del tratamiento aplicado contra la mastitis aplicado en un sistema con búfalas y vacas, para lo cual se muestra la producción inicial de litros de leche obtenidos por día y su producción final, luego de haber recibido tratamiento, observándose como resultados el incremento porcentual en un lapso de 30 días. Es importante señalar que, en este análisis, se mantiene la tendencia superior de T2 en el incremento de la producción lechera. T1 y T3 presentan un comportamiento similar, como sistema de producción con vacas y búfalas, y T0 mostró un leve incremento.

El cálculo de los costos de los tratamientos por grupos, se realizó, tomando en cuenta los promedios de cuartos mamarios afectados y tratados, tanto de vacas como búfalas, por separado, y luego como sistema de producción. Para ello se tomó como base las dos aplicaciones de tratamiento por cuarto mamario afectado y el número de cuartos mamarios, sometidos a tratamiento (Tabla 11) en cada vaca o búfala para luego calcular el promedio por grupo.

Así tenemos que:

**Tabla 21. Costo de los tratamientos**

Tratamiento	Costo Tratamiento Vacas	Costo Tratamiento Búfalas	Costo Tratamiento Promedio
TO	0	0	0
T1	0.88 \$/vaca	1.17 \$/búfala	1.03 \$/animal
T2	1,8 \$/vaca	1,35 \$/búfala	1,6 \$/animal
T3	8 \$/vaca	24 \$/búfala	16 \$/animal

Fuente: El Autor

En esta se reflejan los cuatro (04) grupos sometidos a tratamiento, así como los costos unitarios de los de los tratamientos aplicados a las vacas y búfalas, y los promedios que generan entre ambas especies. En esta tabla 22 se manifiesta la diferencia de costos promedios de T3 Vs. T2 y T1. Estos costos se calcularon en base al número de cuartos tratados, el costo de las 2 aplicaciones de los tratamientos y los semovientes de cada grupo.

**Tabla 22. Efecto de un tratamiento contra la mastitis a base de propóleo, sobre los indicadores económicos en un sistema de producción de leche en vacas.**

Tratamiento	Margen Bruto (MB \$/vaca)	Beneficio/Costo (B/C \$/vaca)	Costo/Beneficio (C/B %)
TO	0,60	-0-	-0-
T1	1,22	2,38	42,0
T2	2,40	2,33	42,8
T3	(7,31)	0,08	1.159

Fuente: El Autor

En la tabla 22 se muestran los cuatro (04) grupos de vacas, sometidos a tratamiento, el margen bruto y la relación B/C expresados en dólares (\$), más la relación C/B expresada en términos porcentuales que produce dicho tratamiento. T1 y T2 muestran similar comportamiento, desde el punto de vista financiero, basado en la relación costo/beneficio. En cuanto al margen bruto, presenta mayor utilidad en términos tangibles el grupo T2 por presentar mayor incremento en la producción de leche. T3 presenta márgenes negativos, debido a entre otros aspectos, al alto costo del tratamiento y la corta medición del incremento de la producción. En mediciones más largas, es de esperar un mejor desempeño financiero.

**Tabla 23. Efecto de un tratamiento contra la mastitis a base de propóleo, sobre los indicadores económicos en un sistema de producción de leche en búfalas.**

Tratamiento	Margen Bruto /MB \$/búfala)	Beneficio/Costo (B/C \$)	Costo/Beneficio (C/B %)
TO	1,5	-0-	-0-
T1	1,53	2,31	43,3
T2	2,55	2,89	34,6
T3	(20,55)	0,14	695,6

Fuente: El Autor

Se muestran, en la tabla 23, los cuatro (04) grupos de Búfalas, sometidos a tratamiento, el margen bruto y la relación B/C expresados en dólares (\$), más la relación C/B expresada en términos porcentuales que produce dicho tratamiento. Aquí se evidencia desde el punto de vista financiero, una mayor utilidad y beneficio del grupo de búfalas T2, seguido de T1. T3 muestra una gran diferencia negativa, o estado de pérdida, respecto al costo del tratamiento y el incremento obtenido. Se hace necesario realizar mediciones de incremento de la producción lechera en lapsos de tiempo mayores para evaluar más objetivamente el grupo perteneciente al antibiótico comercial.

**Tabla 24. Efecto de un tratamiento contra la mastitis a base de propóleo, sobre los indicadores económicos en un sistema de producción de leche con vacas y búfalas.**

Tratamiento	Margen Bruto (MB \$/animal)	Beneficio/Costo (B/C \$)	Costo/Beneficio (C/B %)
TO	1,05	-0-	-0-
T1	1,38	2,34	42,7
T2	2,48	2,57	38,9
T3	(13,93)	0,13	772,9

Fuente: El Autor

**Nota:** Para los ingresos se tomó como referencia 15 días.

Se muestran los cuatro (04) grupos de Búfalas, sometidos a tratamiento, el margen bruto y la relación B/C expresados en dólares (\$), más la relación C/B expresada en términos porcentuales que produce dicho tratamiento. En el análisis como sistema, se observa mayor ingreso financiero del grupo T2 seguido de T1 y T3 respectivamente.

En todos los análisis financieros, la participación del grupo T0 se considera intangible y El grupo T2 es el más eficiente desde el punto de vista económico.

## CAPITULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1 Conclusiones

- Se realizó una evaluación de las instalaciones y del manejo sanitario de la faena de ordeño. Se observó falta de puestos para el ordeño y falta de puntos de agua potable, para el lavado de ubres y manos de los ordeñadores, para lo que se instruyó al personal sobre las normas sanitarias del ordeño, basado en la norma Covenin 903-93.

- Según los resultados de las pruebas de CMT, la prevalencia en vacas presentó una mejoría de 4,55%. En búfalas no se observó diferencia y en la finca, incluyendo vacas y búfalas, se obtuvo una disminución de 1,92%. En cuanto a la prevalencia total en cuartos mamarios, se presentó una mejoría de 6,89% en vacas, 5.0 en búfalas y 5,8 en la finca. Con estos resultados se concluye que el manejo integrado, tanto sanitario, como terapéutico en vacas y búfalas, disminuye la prevalencia de mastitis subclínica en la unidad de producción. Así mismo el IMSC, aumentó en vacas de malo a regular, en búfalas de regular a bueno y en la finca de malo a bueno, lo que coincide con la mejoría de los casos de mastitis subclínica observados en la prevalencia. El caso de mastitis clínica presentado en la vaca 1397, fue sanado en un 100% con la aplicación de 2 dosis de extracto etanólico de propóleo al 50%, lo que evidencia la eficacia del tratamiento alternativo.

- El *Staphylococcus* sp. fue el principal agente etiológico diagnosticado en las muestras de leche con mastitis subclínica, grado 2 y grado 3, en la unidad de producción La Granja de Hoy del municipio Obispos, parroquia La Luz, aislándose tanto en las muestras de vacas como de búfalas.

- Los resultados obtenidos en el antibiograma, midiendo (mm.) los halos de inhibición de crecimiento bacteriano, en promedio indican que, para la cepa de campo, el extracto etanólico de propóleo al 50% (21,25 mm), 25% (20 mm) y el tratamiento comercial cefalexina más kanamicina (25,25 mm) arrojaron todos ellos halos de inhibición mayores en a 20mm por lo cual se clasifican, según la escala de Duraffourd, como sumamente sensibles. Por otra parte el tratamiento de extracto

etanólico de propóleo al 15% (15 mm) resultó con sensibilidad media. Por lo cual se concluye que los tratamientos con propóleos tienen efecto antimicrobiano para esta cepa de *S. aureus* y pueden ser recomendados para su uso a nivel de campo.

- De los tratamientos utilizados en el presente ensayo, el tratamiento 2 presentó la mayor producción de leche al final del ensayo, mejor relación costo-beneficio lo que conlleva a una mejoría del índice de mastitis subclínica. El tratamiento 1 presenta el segundo mejor desempeño seguido del tratamiento 3 y tratamiento 0 respectivamente.

## 5.2 Recomendaciones

A partir de los resultados de esta investigación se sugiere lo siguiente:

- Repetir el ensayo, con fines confirmatorios, que pudieran aumentar, en recomendaciones finales y específicas sobre el uso del propóleo, para el tratamiento de estas patologías, sin los efectos adversos para la sostenibilidad que pudiese tener el mal uso de antibióticos.
- Estandarizar propóleos autóctonos con fines de formular productos alternativos para los tratamientos de estas enfermedades.
- Capacitar a los productores como producir y procesar propóleos a nivel de finca y de esta forma generar tratamientos naturales, efectivos y de bajo costo que faciliten la independencia en las unidades de producción.
- Realizar ensayos con propóleos donde el vehículo sea de tipo oleoso, previa comprobación de su inocuidad, para aumentar la longevidad del producto.
- Mantener buenas prácticas de higiene en las instalaciones para prevenir y reducir la incidencia de mastitis producidas por bacterias contagiosas y ambientales.
- Dado que los propóleos actúan como inhibidores para bacterias, hongos y otros patógenos se recomienda continuar investigando diversas propuestas terapéuticas contra la diversidad etiológica que produce mastitis subclínica en las búfalas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Alonso, F.R. (1979) **Prevalencia de Mastitis Subclínica Bovina en la Cuenca del Lago de Maracaibo**. I, Porcentaje de Prevalencia y Caracteres de la Infección. 1 Jornadas Nacionales sobre Ganadería Doble propósito. Machiques-Perijá, Zulia. Enero 12-16. 23 pp.
- Arauz, E. (2010). **La Mastitis Subclínica y su Influencia en la Producción, Calidad y Economía Lechera y Medidas de Manejo Estratégico para su Prevención y Control Apropiado**. Revista Electrónica Engormix. [Documento en línea] <https://www.engormix.com/ganaderia-leche/articulos/mastitis-subclinica-t28995.htm>.
- Aguilar, A.; Bañuelos, J.; Pimienta, E.; Aguilar, A. y Torres, P. (2014) **Prevalencia de mastitis subclínica en la región Ciénega del estado de Jalisco**. ABANICO VETERINARIO ISSN: 2448-6132 Editor Sergio Martínez González [sisupe.org/revistasabanico](http://sisupe.org/revistasabanico)
- Argüello, E.M. y González, A.F. (2008). **Evaluación de la dosis efectiva de la Propolina en el tratamiento de la mastitis bovina en la finca La Luna**, en el municipio de Boaco, Departamento de Boaco (Tesis de Pre-grado). [Repositorio]: <http://repositorio.una.edu.ni/1385/1/tnl73a694.pdf>.
- Bankova V, Popova M, Trusheva B. (2014). **Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review**. Chemistry Central Journal. 8(1):28. doi:10.1186/1752-153X-8-28.[Documento en línea]:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4014088/> Consultado: 26 Sep. 2017.
- Bavestrello, L. (2003). **Bioequivalence: Should we compel it?**. [Documento en línea] [Revista chilena de infectología](http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182003020100006) <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182003020100006> P 38-40.
- Bedascarrasbure, E., Maldonado, L., Álvarez, A. (2004). **Propóleos: Un Valioso Producto de la Colmena**. Revista Horizonte Agroalimentario. [Repositorio] [propoleos.ar.pdf](http://propoleos.ar.pdf) P 4-7.
- Bedolla, C.C., Ponce, De. L. (2007). **Métodos de detección de la mastitis bovina (Methods of detection of the bovine mastitis)** [Documento en línea] Revista Electrónica de Veterinaria REDVET. Recuperado de <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040408/040805.pdf>. Consultado 15 Nov, 2020. Edición 9 (Vol4), pp.1-26.
- Bedolla, C.C., Ponce, De. L. (2008). **Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina en la industria lechera**. Revista Electrónica de Veterinaria

REDVET. 9(4), pp.1-26. [Documento en línea]:<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040408/040805.pdf>. Consultado, 14 Mar 2019.

Bial, A. (2002). *Aspergillus fumigatus*. Revista Iberoamericana de Micología, 1era edición 2002, País Vasco, España.

Blood, D. C., Radostits. O. M. (1992). **Medicina Veterinaria**, McGraw-Hill Interamericana. Healthcare Group. Volumen II Séptima edición. Pp. 539-602

Blowey R, Edmondson P. (2010). **Mastitis Control in Dairy Herds**. 2nd Edition Consultado: 23, Mar 2021.

Boscán, J. (2011). **Manejo de la Mastitis Bovina y Programas de Control. Cuadernos Científicos GIRAZ 10**. Cuaderno científico a la LIX Reunión Girarz, Ediciones Astro Data S.A. 22 de octubre, Maracaibo, Venezuela, Pp. 27-38.

Chaves, J. (2004). **Mastitis Bovina: su Control y Prevención es una Tarea Permanente**. [Documento en Línea]: <http://www.aprocal.com.ar>. Consultado: 16 Jul, 2019.

Castillo, M ; Suniaga, J; Rojas, G y Hernández, J. (2008). **Prevalencia de Mastitis Subclínica en las Zona Alta del Estado Mérida**. Universidad de los Andes. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Vol.13 [Repositorio] <http://www.saber.ula.ve/handle/123456789/27876>. (Consultado Febrero 2022). Mérida-Venezuela.

Celis-Enríquez A, Chantre-González ND, Gaviria-Bejarano E, Daza-Bolaños (2020). **Perfil de sensibilidad in vitro de Staphylococcus spp. aislados de muestras en pioderma canino en la ciudad de Popayán**. [Documento en línea]: <https://doi.org/10.16925/2382-4247.2020.01.02>. Spei Domus.;16(1): 1-13

Concha C. (2007). **Mastitis bovina: Nuevos Aspectos de Diagnóstico, Tratamiento y Control**. [Documento en línea]: [https://www.uchile.cl/.../mastitis-bovina-nuevos-aspectos-de-diagnostico-tratamiento-y-control\\_58331\\_8.pdf](https://www.uchile.cl/.../mastitis-bovina-nuevos-aspectos-de-diagnostico-tratamiento-y-control_58331_8.pdf) Consultado el: 23 Sep. 2017.

Constitución de la República Bolivariana de Venezuela, 1999.

Corbellini, C. (2014). **La Mastitis Bovina y su Impacto sobre la Calidad de la Leche**. Instituto nacional de Tecnología Agropecuaria Proyecto Lechero, E.E.A. INTA Pergamino, [Documento en Línea]: <https://www.agro.uba.ar/sites/files/agronomia>.

- Cuenca, M. (2017). **Control de mastitis subclínica bovina con una solución de propóleo y matico (*Piper aduncum*)**. Avances en Medicina Veterinaria, Centro de Investigación y Desarrollo Ecuador (CIDE) y Centro de Estudios Transdisciplinarios Bolivia (CET- BOLIVIA). Edición Ecuador. Fecha de publicación: 7 de noviembre de 2017.
- Crea, P. (1993). "**Propóleo y demás productos de la Colmena**", Ed. Continente - PROAPI (INTA). La Habana, Cuba.
- De Los Reyes Rodríguez. (1991). **Estudio del efecto inmunorregulador de un medicamento elaborado a base de propóleos en niños con trastornos de la inmunidad**. In: 1er Taller Internacional de Apiterapéuticos. La Habana, Cuba.
- De Lima, W.(2015). **In Vitro Activity of Propolis: Synergism in Combination whit Antibiotics Against *Staphylococcus spp.*** Africans Journal of Microbiology Research. Vol. 9 (1) pp, 1-5 7Janaury 2015.
- FAO & ODS, (2017).**Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura y Objetivos de Desarrollos Sostenibles, Indicadores de Seguimiento de la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible**. [Repositorio]: [www.fao.org](http://www.fao.org). Consultado, Ene 2021.
- Fernández, O.F., Trujillo, J.E., & Peña, J.J., Cerquera, J. Granja, Y.T. (2012). **Mastitis bovina: generalidades y métodos de diagnóstico**. Revista Electrónica de Veterinaria REDVET 13 (11), [Documento en línea] <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111112/111202.pdf>. Consultado, 18 Abr, 2020. pp. 1-20.
- Ferraro, L., (1992). **Análisis de la prevalencia de Mastitis Subclínica mediante la prueba de California Mastitis Test (C.M.T) y Bacteriología**. [Documento en Línea]: <http://www.serbi.luz.edu.ve/scielo.php>. Extraído el día 17 de diciembre de 2018.
- Ferraro, L., Scaramelli, A., & Troya, H. (1999). **Prevalencia de la mastitis subclínica bovina en Venezuela y evaluación de la prueba de Mastitis de California (CMT) como prueba diagnóstica**. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias*, 9(2), 81. [Documento de línea]: <https://link.gale.com/apps/doc/A498674929/IFME?u=anon~81fd1010&sid=googleScholar&xid=88ecb780>. Consultado, 11, May, 2019.
- Fiordalisi S, Honorato L, Loiko M, Avancini C, Veleirinho M, Machado L, Kuhnen S. (2016). **The effects of Brazilian propolis on etiological agents of mastitis and the viability of bovine mammary gland explants**. *Journal of Dairy Science*, Vol. 99, Issue 3. [Documento en línea]. En <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030215009418> Consultado el: 23 Dic. 2020. p2308–2318

- Forbes, B. (2009). **Diagnostico Microbiológico**. Departamento de Anatomía Patológica. Medical College of Virginia Campus. Virginia Commonwealth University Medical Center. Richmond, Virginia, Estados Unidos. Editorial: Editorial Médica Panamericana, S. A. Colección: 12ª Edición / 1160 págs. / Cartoné / Castellano / Libro.
- Geoambiental, (2011). Informe Geoambiental. Instituto Nacional de Estadística. Gerencia de Estadísticas Ambientales. Estado Barinas.
- Gil M, Perelli A, Alvarado R, Arias Y, Blumenthal E. (2012). **Actividad bacteriostática y bactericida de la tintura de propóleos sobre bacterias enteropatógenas**. Revista Salus-online, 16 (3). [Documento en línea]: <http://ve.scielo.org>. Consultado: 1 Feb.2021.
- Gómez R.G. (2008). **Mastitis Bovina**. Comité Editorial de la FMVZ Universidad Autónoma de México. Obtenido de Enciclopedia Bovina. [Documento en Línea]: [http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/e\\_bovina/04MastitisBovina.pdf](http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/e_bovina/04MastitisBovina.pdf).
- Guacara, A. y Palomino, D. (2018). **Estudio de la Composición Química y Actividad Antibacteriana de muestras de Propóleo de Diferente Localización Geográfica**. Tesis para la obtención del Grado de Magister en Ciencias Cosméticas. Universidad Politécnica Salesiana, Ecuador. [Documento en Línea] <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/UPS-CT007559PDF>.
- Gonsales, G. Orsi, R., Fernandez, A., Rodriguez, P., Funari, S. (2005). **Antibacterial Activiti of Ptopolis Collected in Different Regions of Brazil**. Toxins incl. Trop. Dis. V.12, n.2, p.276-284, 2006. [Documento en línea]: <https://www.scielo.br/j/jvatitd/a/LBhqPTyWfQHz6fkm89k3z7Q/?lang=en>. Consultado, 06 Abr 2020.
- Hernández C, Hernández R, Fernández C, Baptista P. (2010). **Metodología de la Investigación**. Cuarta edición. McGraw-Hill Interamericana. México.
- Kartal M, Yildiz S, Kaya S, Kurucu S, Topçu G (2003). **Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia**. J Ethnopharmacol. 86(1):69-73. doi: 10.1016/s0378-8741(03)00042-4. PMID: 12686444. May 2003.
- Kushikawa E, Mello E, Maikle R, Sussumu L. (2011). **Mastitis bovina por *Staphylococcus aureus*: sensibilidade as drogas antimicrobianas e ao extrato alcoolico de propolis** [Documento en línea] <https://periodicos.ufersa.edu.br/index.php/acta/article/view/2172> Consultado, 21 Jul.2020.

- Laguens, R. (2016). **Relationship between animal welfare and the use of antibiotics in food animals**. Federation of Veterinarians of Europe. FVE/015/doc/063 Adopted at the FVE General Assembly of 3 June 2016.
- Ley Orgánica de Seguridad y Soberanía Agroalimentaria, (2008). **Gaceta Oficial de la Republica Bolivariana de Venezuela**, N°5891 de Fecha 31 de Julio del 2008.
- Mantilla, L. (2018). **Efecto de Propóleos en búfalas con cuadros de mastitis subclínica** Caso de estudio: Finca Parcela 7 ubicada en la zona norte del estado Táchira. Tesis de Grado no publicada.
- Martin, D. (2017). **Los Compuestos Fenólicos: Un Acercamiento a su Biosíntesis, Síntesis y Actividad Biológica**. Revista de Investigación Agraria y Ambiental. Vol. 9, Núm. 1 (2018) [Documento en Línea]: <https://doi.org/10.22490/21456453.1968>. Consultado, 31 Feb, 2020.
- Medina, C. M. y Montaldo, V. H. (2003). **El uso de la prueba de conductividad eléctrica y su relación con la prueba de California para mastitis**. IV Congreso Nacional de Control de Mastitis. Aguascalientes, Aguascalientes. México. pp. 21-23.
- Mendoca, J. (2017). **Composição química e atividade biológica das própolis brasileiras: verde e vermelha**. Revista Electronica, Acta Apicola Brasilica, Editorial Verde. ISSN 2358-2375 [Documento en Línea]: <http://www.gvaa.com.br/revista/index.php/APB>
- Moscoso, J. y Pinzón, P. (2014) **Determinación de la Prevalencia de Mastitis Clínica y Subclínica en Búfalas Lecheras (*Bubalus bubalis*) en un hato Búfalero del Magdalena medio y uno de los Llanos Orientales**, Colombia. Universidad de La Salle: [Documento en Línea] : <https://www.ciencia.lasalle.edu.co › cgi › viewcontent>.
- Najmadden H, kakamand F. (2009). **Antimicrobial activity of propolis collected in different regions of Sulaimani province-Kurdistan region/Iraq** j Duhok univ.12(1):233-239.[Documento en línea] [https://www.researchgate.net/publication/317548911\\_Antibacterial\\_activity\\_of\\_propolis\\_on\\_bacteria\\_isolated\\_from\\_children\\_with\\_impetigo](https://www.researchgate.net/publication/317548911_Antibacterial_activity_of_propolis_on_bacteria_isolated_from_children_with_impetigo).
- Neacato, S. (2005). **Uso de Extractos Etanólicos de Propóleo para el Control de staphylococcus aureus in Vitro Obtenidos de Leche de Vacas con Mastitis**. Tesis de Grado no Publicada. [Repositorio] <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/2593.Consulta>: 14 Jun, 2019.
- Norma COVENIN, (1993). **La Comisión Venezolana de Normas Industriales, "Leche Cruda"** .N°903-87.Fecha 13-10-1993

- Norma COVENIN, (1994). **La Comisión Venezolana de Normas Industriales, "Leche Cruda"** .N°798-94.Fecha 13-10-1994
- Ortega, J.I. y Vanegas, N.A. (2006). **Utilización de propolina en el control de la mastitis bovina en fincas del municipio de Muy Muy**, Departamento de Matagalpa. Tesis de Pre-Grado. [Repositorio] <http://repositorio.una.edu.ni/1359/1/tnl73o77p.pdf>. Consulta: 03 de Mar, 2020.
- Principal J., Barrios C., Pacheco N., Corrales F., Moreno F. (2005). **Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico del propóleo sobre una cepa clínica de *Staphylococcus áureus***. Gaceta de Ciencias Veterinarias Vol. 11 N° 1. Pp. 31-36.
- Palella, S y Martins, F (2012). **Metodología de la investigación cuantitativa**. Editorial FEDUPEL. Caracas-Venezuela.
- Paredes, D.A. (2013). **Tratamientos alternativos en el control de la mastitis clínica bovina; plasma marino, propóleos y chichipince (*hamelia patens*)** (Tesis de Pre-grado). Recuperado de [https://www.usam.edu.sv/resultadobusqueda?searchword=tratamientos%20alternativos%20en%20el%20control%20de%20la%20mastitis%20cl%C3%8dnica%20bovina;%20plasma%20marino,%20prop%C3%93leos%20y%20chichipince%20\(hamelia%20patens\).&ordering=newest&searchphrase=all&limit=20](https://www.usam.edu.sv/resultadobusqueda?searchword=tratamientos%20alternativos%20en%20el%20control%20de%20la%20mastitis%20cl%C3%8dnica%20bovina;%20plasma%20marino,%20prop%C3%93leos%20y%20chichipince%20(hamelia%20patens).&ordering=newest&searchphrase=all&limit=20).
- Paredes, M. (2017). **Comparación del efecto de tres concentraciones de propóleos en el tratamiento de mastitis subclínica de vacas lecheras**. Tesis de Grado no publicada. Universidad Central de Ecuador [ Documento en línea] <https://docplayer.es/91576779-Universidad-central-del-ecuador.html>
- Plan de la Patria 2019-2025.
- Plan del Sistema Creación Intelectual 2019-2025 del Vicerrectorado de la Planificación y Desarrollo Social de la UNELLEZ. **(PSCI 2019-2025 VPDS/UNELLEZ** Abril, 2019.
- Pérez CG, Bedolla CC, Castañeda VH. 2005. **Importancia del conteo de células somáticas en la cría sustentable de vacas productoras de leche**. Sustentabilidad. Vol III, No 1. Universidad de Guadalajara, Jalisco., México. pp. 86-94.
- Pinzon, C., Cabrera, V., Ruegg, L., (2011). **Decision tree analysis of treatment strategies for mild and moderate cases of clinical mastitis occurring in early lactation**. © American Dairy Science Association®, [Documento en Línea] Recuperado en <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21426977/>.
- Riera, M. 2020) **Prevalencia e Índices de Mastitis Subclínica y Clínica en Vacas**

**de la Raza Carora.** Revista Electrónica Engormix. [Documento en Línea] <https://www.engormix.com/ganaderia-leche/articulos/prevalencia-indice-mastitis-subclinica-t46254.htm>.

Propuesta de las **Líneas de Creación Intelectual para el Periodo 2020-2025 de la Universidad Nacional Experimental de los Llanos Occidentales “Ezequiel Zamora”**, Artículo 14 N°27 del Reglamento General de la Institución.

Ruegg, P. **Microbiología de la leche.** 2004. [Documento en Línea] Consultado en: <http://www.solomamitis.com/actualidad/articul09.Htm>

Sánchez, T. (2021). **Cinco claves para el control de la mastitis bufalina.** Universidad del Zulia. Facultad de Ciencias Veterinarias. @saucow33 (Consultado, Enero 2022).

Vera, C. (2020) **Preparados Organicos (Croton lechleri y Propolis de Apis mellifera) en el Tratamiento de Mastitis Clínica y Subclínica en Bovinos de Leche.** Tesis de pregrado para optar al título de Médico Veterinario, ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA AGROPECUARIA DE MANABÍ MANUEL FÉLIX LÓPEZ, ECUADOR.

Vissio, C., Agüero, DA., Raspanti, CG., Odierno, LM., Larriestra, AJ.(2015) **Pérdidas productivas y económicas diarias ocasionadas por la mastitis y erogaciones derivadas de su control en establecimientos lecheros de Córdoba, Argentina.** Archivos de Medicina Veterinaria, 47, 7-14 [Documento en Línea] : <https://www.researchgate.net/publication/280350007>

Wolter W, Fernández A, Flavio PR. (2012). **Mastitis bovina. Prevención, diagnóstico y tratamiento.** Mastitis bovina. Jalisco. Editorial Universitaria. Universidad de Guadalajara.

Wolter, W., Lear, M.C., y Kriting, L. **“La mastitis bovina”.** [Documento en Línea] Revista electrónica Instituto Estatal de Investigaciones de Hess. (2000): 1, 5, 9, 12, 15, 16, 19, 20, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 36, 47, 54. Consultado en: <http://80.33.188.46/pbcnes/Avances%20en>.

## **ANEXOS**

### Anexo 1 Lista de Cotejo.

Especies:		Fecha:		Responsable	
<b>N° Animal</b>					
A <input type="radio"/> B <input type="radio"/>					
C <input type="radio"/> D <input type="radio"/>					
<b>N° Animal</b>					
A <input type="radio"/> B <input type="radio"/>					
C <input type="radio"/> D <input type="radio"/>					

### Anexo 2 Registro Anecdótico

Unidad de Producción: _____ Fecha: _____	
N° del Animal: _____ Edad: _____ Raza: _____	
Grupo Etareo: _____	
Descripción del Evento	Diagnostico

**Anexo 3 Muestreo General**

Muestra	Especie	Identificación	A	B	C	D
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						

#### Anexo 4 Asignación de Tratamientos

Tratamiento	Especie	Nº Animal	A (anterior derecho)	B(posterior derecho)	C (anterior izquierdo)	D(posterior izquierdo)
<b>T 0</b>						
<b>T 1</b>						
<b>T 2</b>						
<b>T 3</b>						
<b>T 3</b>						
<b>T 2</b>						
<b>T 1</b>						
<b>T 0</b>						



**Anexos 6 Registros Fotográficos.****Fig.17 Procesamiento del Propóleo.****Fig.18 Test de California.****Fig.19 Mastitis Subclínica grado +****Fig.20 Toma de muestras en vacas**



**Fig.21 Toma de muestras en Búfalas.**

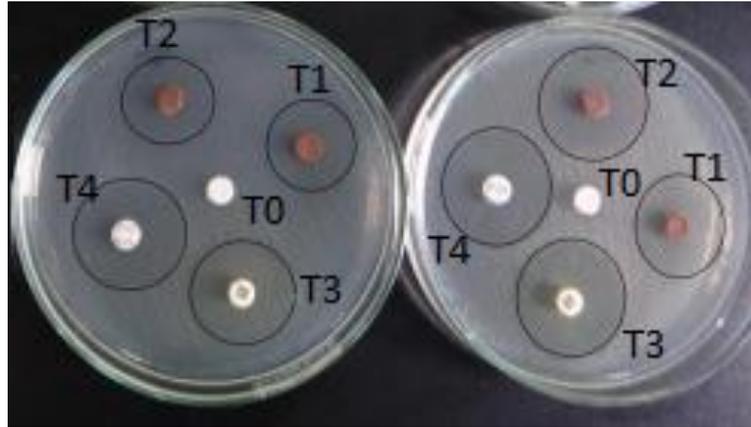


**Fig.22 Mastitis subclínica grado ++**



**Fig.23 Toma de muestras en Búfalas.**

**Anexo 7 Antibiogramas muestras de leche en Vacas grado ++ y +++**



**Anexo 8 Antibiogramas muestras de leche en Búfalas ++ y +++**

