

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE INGENIERIA EN ALIMENTOS

**Efectividad de la Aplicación de Solución de Miel como
Coadyuvante en el Control de la Mastitis Bovina**

Tesis presentada como parte de los
requisitos para optar al grado de
licenciado en Ciencias de los Alimentos.

Paulina Alejandra Moraleda Muñoz

VALDIVIA – CHILE

2005

PROFESOR PATROCINANTE

Sra. Luz Haydée Molina Carrasco
Profesora de Biología y Química
Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos
Facultad de Ciencias Agrarias

PROFESOR INFORMANTE

Sra. Renate Schöbitz Twele
Tecnólogo Médico, Master of Science en Microbiología de los Alimentos
Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos
Facultad de Ciencias Agrarias

PROFESOR INFORMANTE

Sr. Bernardo Carrillo López
Ingeniero Agrónomo, Master en Ciencia e Ingeniería de Alimentos
Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos
Facultad de Ciencias Agrarias

ÍNDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	Antecedentes generales	3
2.2	Mastitis	5
2.2.1	Definición	5
2.2.2	Epidemiología de la mastitis	5
2.2.3	Características microbiológicas de los principales agentes causales de mastitis bovina	6
2.2.3.1	Género <i>Staphylococcus</i>	6
2.2.3.2	Género <i>Streptococcus</i>	7
2.2.3.3	Género <i>Corynebacterium</i>	8
2.2.3.4	Mycoplasmas	9
2.2.3.5	Coliformes	10
2.2.3.5.1	<i>Escherichia coli</i>	11
2.2.3.5.2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	11
2.2.3.6	Género <i>Pseudomonas</i>	11
2.2.4	Formas clínicas de presentación de la mastitis	12
2.2.5	Factores involucrados en la producción de mastitis y mecanismos reguladores	13
2.2.5.1	Anatomía básica de la ubre	14
2.2.5.2	Invasión de la ubre	14
2.2.5.3	Mecanismos de defensa y protección de la ubre bovina	15
2.3	Rol de las células somáticas	18
2.4	Métodos de diagnóstico de mastitis, mediante recuento de células somáticas en leche	23

2.4.1	California Mastitis Test (CMT)	24
2.4.2	Citometría de flujo	25
2.4.3	Método de microscopía directa	26
2.4.4	Prueba de Wisconsin	27
2.4.5	Test DCC (Delaval Direct Cell Counter)	28
2.4.6	Prueba de conductividad eléctrica	29
2.4.7	Fossomatic	29
2.5	Aspectos terapéuticos en el manejo de la mastitis	30
2.5.1	Uso de antibióticos en el tratamiento de la mastitis bovina	30
2.5.2	Dipping para el control de la mastitis	35
2.5.3	La miel como agente terapéutico	36
2.5.3.1	Definición de miel	36
2.5.3.2	Producción y cosecha de la miel	37
2.5.3.3	Características organolépticas y físico-químicas de la miel de abeja	37
2.6	Miel y su uso en medicina	38
3	MATERIAL Y MÉTODO	47
3.1	Muestras y materiales	47
3.1.1	Muestreo	47
3.1.2	Equipos y materiales	47
3.1.3	Reactivos	48
3.2	Diseño experimental	48
3.3	Prueba preliminar de estudio de capacidad antibacteriana de la miel	49
3.4	Efectividad de miel diluida al 30% (p/p) en la inhibición <i>in vitro</i> de cepa causante de mastitis	49
3.4.1	Preparación de cepa bacteriana para la prueba de inhibición	49
3.4.2	Preparación de la dilución de miel	50
3.4.3	Análisis de inhibición del desarrollo bacteriano	50

3.4.4	Control de la concentración del cultivo	50
3.4.5	Medición de la inhibición	51
3.5	Grado de disminución del recuento de células somáticas en leche de diez vacas con mastitis tratadas con dipping utilizando solución de miel al 30% (p/p)	51
3.6	Análisis estadístico	52
4	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	53
4.1	Estudio preliminar del recuento total de células somáticas en muestras de leche provenientes de tres vacas con mastitis	53
4.2	Prueba de inhibición de <i>Staphylococcus aureus in vitro</i>	55
4.3	Estudio en diez vacas con diferentes grados de mastitis y en tres vacas sanas, mediante el recuento de células somáticas en leche	56
4.3.1	Recuento de células somáticas en leche de vacas sanas	56
4.3.2	Grado de variación en el recuento total de células somáticas en leche de vacas con mastitis	59
5	CONCLUSIONES	73
6	RESUMEN	74
	SUMMARY	75
7	BIBLIOGRAFÍA	76
	ANEXOS	88

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Tipo de reacción del Mastitis California Test (CMT) y su relación con los rangos de recuentos de células somáticas (cél/mL).	25
2	Interpretación de la prueba de Wisconsin modificada	28
3	Interpretación de la prueba de Wisconsin	28
4	Principales enzimas presentes en la miel	38
5	Diseño experimental para cada etapa del estudio	48
6	Promedios y desviaciones estándar de los recuentos de células somáticas (cél/mL) en leche de 3 vacas con mastitis al inicio y término del estudio preliminar	53
7	Resultados de la prueba de inhibición <i>in vitro</i> con solución de miel al 30% (p/p) sobre la cepa <i>S. aureus</i> 2-Sa	55
8	Disminución del recuento de células somáticas en vacas con mastitis comparando su condición al inicio y término del estudio	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Esquema del Citómetro de flujo	26
2	Medición del halo de inhibición	51
3	Evolución en el tiempo del recuento total de células somáticas (cél/mL) en leche de 3 vacas con mastitis	54
4	Promedio de recuento de células somáticas en leche de la vaca sana número 1655 durante el tiempo total de estudio	57
5	Promedio de recuento de células somáticas en leche de la vaca sana número 1614 durante todo el período de estudio	57
6	Promedio de recuento de células somáticas en leche de la vaca sana número 642 durante el tiempo de estudio	58
7	Promedio de recuento de células somáticas en leche de la vaca número 844 con mastitis durante el tiempo de estudio	59
8	Promedio de recuento de células somáticas en leche de la vaca número 2030 con mastitis durante el tiempo de estudio	60
9	Promedio de recuento de células somáticas en leche de la vaca número 288 con mastitis durante el tiempo de estudio	61
10	Promedio de recuento de células somáticas en leche de la vaca número 1243 con mastitis durante el tiempo de estudio	62
11	Promedio del recuento de células somáticas en leche de la vaca número 1631 con mastitis durante el tiempo de estudio	63
12	Promedio de recuento de células somáticas en leche de la vaca número 1609 con mastitis durante el tiempo de estudio	64

13	Promedio de recuento de células somáticas en leche de la vaca número 756 con mastitis durante el tiempo de estudio	64
14	Promedio de recuento de células somáticas en leche de la vaca número 659 con mastitis durante el tiempo de estudio	65
15	Promedio de recuento de células somáticas en leche de la vaca número 1584 con mastitis durante el tiempo de estudio	66
16	Promedio de recuento de células somáticas en leche de la vaca número 1264 con mastitis durante el tiempo de estudio	66
17	Distribución de vacas con mastitis, de acuerdo al recuento de células somáticas en leche, al inicio y término del estudio	67

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Zona geográfica y vegetación predominante en el área de extracción de la miel utilizada en el estudio	89
2	Leche cruda – Determinación de células somáticas – Método A: Método microscópico de referencia (CHILE, INN 1998)	90
3	Procedimiento para el estudio de inhibición de cepa bacteriana causante de mastitis	93
4	Caracterización de vacas en estudio	95
5	Resultados de la prueba preliminar respecto al grado de disminución del recuento de células somáticas en leche de 3 vacas con mastitis	96
6	Análisis estadístico para prueba preliminar del grado de disminución del recuento de células somáticas en leche de 3 vacas con mastitis	97
7	Análisis estadístico para prueba de inhibición de desarrollo bacteriano para cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> 2-Sa	98
8	Recuento de células somáticas (cél/mL de leche), media aritmética y desviación estándar en leche de cada vaca sana durante los 9 muestreos del estudio	99
9	Recuento de células somáticas (cél/mL de leche), media aritmética y desviación estándar en leche de cada vaca con mastitis durante los 9 muestreos del estudio	102
10	Valores promedio de recuento de células somáticas en leche de 3 vacas sanas y 10 vacas con mastitis durante el tiempo de estudio	112
11	Análisis estadístico para estudio del grado de disminución del recuento de células somáticas (células/mL) en leche de 3 vacas sanas y 10 vacas con mastitis	113

12	Porcentaje de variación comparativa en los recuentos de células somáticas en leche de vacas con mastitis, respecto a cada tiempo de muestreo.	114
13	Valores de pH en las muestras de leche provenientes de vacas sanas y con mastitis durante cada muestreo realizado en el estudio	115
14	Cálculo de la repetibilidad del método microscópico de referencia para determinación de células somáticas	116

1. INTRODUCCIÓN

Los procesos inflamatorios constituyen uno de los grupos de enfermedades más frecuentes en los animales, siendo la mastitis uno de los más representativos por el alto costo económico que ello representa en el proceso de producción lechera a pequeña, mediana y gran escala.

Se entiende por mastitis a la inflamación de la glándula mamaria, pudiendo ésta tener manifestaciones subclínicas y clínicas de acuerdo a los distintos microorganismos causantes, a las diferencias epidemiológicas existentes entre ellas y a los mecanismos inmunológicos puestos en marcha por el organismo invadido.

El desafío planteado frente a esta patología está orientado a un diagnóstico precoz y oportuno por una parte, y por otra, al establecimiento de un tratamiento adecuado, con una eficiente relación costo versus beneficio. Esto incluye métodos diagnósticos de rápida aplicación, alta sensibilidad y especificidad junto a esquemas de tratamientos seguros, con la menor pérdida de producción lechera y los menores efectos colaterales para los consumidores.

El tratamiento de la mastitis incorpora habitualmente el uso de antibióticos, los que no están exentos de efectos secundarios relacionados con la modificación de alguna de las características organolépticas del producto y al paso de sus residuos o metabolitos al consumidor del producto lácteo.

Diversos esquemas terapéuticos, con diferentes grados de rendimiento se han empleado en distintas circunstancias y latitudes; cada uno de ellos con resultados favorables, pero no exentos de efectos secundarios, planteándose

desafíos permanentes en busca de la mejor terapia. En este contexto se sitúa la presente investigación, orientada a probar la efectividad de la miel de abejas diluida al 30% (p/p) y aplicada en forma de dipping para el control de la mastitis bovina y la prevención de neoinfecciones con los menores efectos secundarios.

Este estudio se plantea bajo la hipótesis de que el uso de miel diluida al 30% (p/p), mediante su aplicación tópica sobre los pezones de vacas con mastitis, participa como prevención en la disminución del recuento de células somáticas en la leche.

El objetivo de la presente investigación fue evaluar la efectividad de la aplicación de dipping con solución de miel en el control de la mastitis, utilizando sus propiedades terapéuticas sobre los procesos inflamatorios.

Los objetivos específicos del estudio fueron:

- Evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de la miel en soluciones diluidas al 30% (p/p) mediante el método de difusión en agar.
- Determinar el porcentaje de reducción de células somáticas en muestras de leche de vacas con mastitis por efecto de la aplicación tópica de solución de miel al 30% (p/p).

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Antecedentes generales

La mastitis bovina es una inflamación de la glándula mamaria producida principalmente por microorganismos patógenos (CARRILLO y MOLINA, 1997). Por otra parte, WOLTER *et al.* (2002), la definen como un complejo singular de enfermedades, que causa una gran cantidad de pérdidas económicas a nivel mundial y en especial en las regiones con una producción lechera intensiva.

En Estados Unidos, se ha estimado que el costo de la mastitis es de US\$ 225 vaca/año, mientras que en Suecia las estimaciones de pérdida anual por esta enfermedad ascienden a US\$ 60 millones (CHILE, MINISTERIO DE AGRICULTURA, FUNDACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA, FIA, 2003). Respecto a la situación en Chile, en la publicación precedente se mencionan estudios comunicados por Kruze, en los que se señala que las pérdidas, sólo por concepto de mastitis subclínica, representan una pérdida anual equivalente al 10% de la producción lechera del país, alrededor de US\$ 33 millones.

Estudios realizados en Escocia por YALCIN (2000), respecto a costos por mastitis, revelaron que en promedio fueron de £140 por vaca/año durante 1996; sin embargo llegaron a ser tan bajos como £69 por año/vaca en rebaños de baja incidencia de mastitis subclínica y del orden de £228 en rebaños con elevada incidencia de este tipo de mastitis.

La expresión de la mastitis se puede manifestar como formas clínicas y subclínicas, siendo estas últimas las de mayor prevalencia en los distintos centros de producción lechera (CHILE, FIA 2003). Considerando que la mayoría de los casos son subclínicos, se estima que por cada caso de mastitis

clínica existirían en promedio entre 20 a 40 casos subclínicos (AGROBIT, 1998).

El control de la mastitis en el hato y su incidencia en la prevención de nuevas infecciones, posee un beneficio mayor que intentar curar los casos clínicos, en opinión de autores como WATTIAUX (2000).

El contenido de células somáticas en la leche cruda es considerado como un parámetro que expresa el grado de irritación mamaria de los cuartos afectados y proporciona, además, una información indirecta sobre la pérdida de producción y las modificaciones en la composición física y química de la leche perteneciente a esos cuartos (MAGARIÑOS, 2000).

Por otra parte, existen al menos tres fuentes de contaminación microbiana de la leche cruda, siendo éstas: (1) a partir del interior de la ubre, (2) el exterior de pezones y ubre, y (3) a partir de equipos de ordeña y recolección de la leche (SLAGHUIS, 1996), todas ellas a tener en cuenta al momento de hacer una evaluación de riesgo para la masa bovina y su producto.

Aún cuando los casos graves de mastitis se manifiestan por la inflamación de la ubre y la aparición de grumos e incluso sangre en la leche, son los casos de mastitis subclínica, los que siendo más numerosos, requieren necesariamente de pruebas diagnósticas de laboratorio (AMIOT, 1991).

Existen estudios que correlacionan el recuento de células somáticas (RCS), el California mastitis test (CMT) y estudios bacteriológicos, evaluando muestras de leche de 2714 cuartos provenientes de 1491 vacas (JANOSI y BALTAY, 2004). En dicho estudio se observó que todos los patógenos se correlacionaron con una elevación en el recuento de células somáticas bajo 400.000 cél/mL en presencia de gérmenes como *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus coagulasa negativos*. Por otra parte, en el 11% de las muestras procedentes de vacas infectadas, estos recuentos fueron inferiores a 100.000 cél/mL. En

opinión de estos autores, los recuentos seriados de células somáticas en el tiempo, convierten a este método en un procedimiento confiable como indicador de infección intramamaria crónica.

2.2 Mastitis

De acuerdo a SAN MARTÍN *et al.* (2002), entre las enfermedades más importantes que afectan al ganado bovino se encuentra la mastitis, patología mundialmente reconocida por causar grandes pérdidas económicas tanto al productor como a la industria vinculada con el procesamiento de lácteos y derivados.

2.2.1 Definición. Según el grupo de expertos -A2 de la Federación Internacional de Lechería, la mastitis se define como una reacción inflamatoria de la glándula mamaria y su etiología puede ser de origen infeccioso, traumático o tóxico (RAMÍREZ *et al.*, 2001).

2.2.2 Epidemiología de la mastitis. De acuerdo con el hábitat de los microorganismos causantes de la enfermedad y los mecanismos de transmisión, desde el punto de vista epidemiológico las mastitis se clasifican, de acuerdo a lo señalado por COTRINO (2003), en:

Mastitis contagiosa: El agente infeccioso habita en el interior de la glándula de los animales enfermos de mastitis clínica o subclínica y se transmite de vaca a vaca o de pezón a pezón por las manos del ordeñador y la pezonera, o bien, cuando en el equipo de ordeño se generan problemas de reflujo. Pertenecen a esta categoría *Streptococcus agalactiae*, *S. aureus*, *Mycoplasma bovis* y *Corynebacterium bovis*.

Mastitis originada en la piel de los pezones: Infecciones causadas por *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus bovis*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus hyicus* y *Staphylococcus*

simulans. Este tipo de mastitis ha adquirido mayor importancia por su estrecha relación con el estado de la piel de los pezones, afectada en muchos casos por el uso de desinfectantes inadecuados.

Mastitis ambiental: Es producida por bacterias que habitualmente tienen su hábitat en el ambiente de la explotación lechera, como la cama, el piso y corrales, entre otros. Pertenecen a este grupo, principalmente bacilos Gram negativos de los géneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Pseudomonas*.

Mastitis iatrogénica: El uso inadecuado de sondas intramamarias y/o la aplicación de medicamentos por esta vía, sin cumplir con las medidas antisépticas requeridas, es el origen de esta clase de mastitis, con la consecuente aparición de Mohos y Levaduras.

2.2.3 Características microbiológicas de los principales agentes causales de mastitis bovina. Se describen los más importantes referidos al tema.

2.2.3.1 Género *Staphylococcus*. Son cocos Gram positivos, anaerobios facultativos que se desarrollan en racimos irregulares. Su hábitat natural primario es la superficie corporal de los mamíferos, donde se encuentran en grandes cantidades; su agresividad latente se manifiesta sólo si la barrera de la superficie se rompe a causa de un traumatismo o mediada por cirugía, logrando de esta manera alcanzar y desarrollarse en el tejido subyacente (JOKLIK *et al.*, 1997).

S. aureus es un coco inmóvil de 0,8 a 1 μm de diámetro, que se divide en tres planos para formar grupos de células irregulares semejantes a racimos de uvas. Aún cuando es un microorganismo Gram positivo, las células viejas y los microorganismos fagocitados se tiñen como Gram negativos. Siendo un anaerobio facultativo, su desarrollo es más abundante en condiciones de aerobiosis. La proliferación ocurre dentro de un amplio espectro de temperaturas, desde 6,5 hasta 46°C, siendo óptima para su crecimiento entre

30 y 37°C y con pH de 7 a 7,5. Los estafilococos presentan requerimientos nutricionales complejos, pero se desarrollan bien en casi todos los medios de laboratorio de rutina, como lo es por ejemplo, agar nutritivo o agar soya tripticasa. Para el aislamiento primario, a partir de materiales clínicos, se recomienda el agar con sangre de oveja, no debiendo utilizarse sangre humana en la preparación de agar sangre porque ésta contiene inhibidores o anticuerpos no específicos (JOKLIK *et al.*, 1997).

2.2.3.2 Género *Streptococcus*. Los estreptococos, son microorganismos Gram positivos de forma esférica a ovalada y de menos de 2 μm de diámetro. Cuando proliferan en medios líquidos forman pares o cadenas y el largo de la cadena varía de acuerdo con la especie y con la composición del medio de cultivo. Son anaerobios facultativos con metabolismo fermentativo. La fermentación es sobre todo homoláctica y no se produce gas. Son catalasa negativos, siendo esta una propiedad importante que permite diferenciar inicialmente entre estafilococos y estreptococos. Uno de los esquemas más útiles para la clasificación preliminar de los estreptococos se basa en el tipo de hemólisis que se produce en las placas de agar sangre. Algunos estreptococos producen una zona clara de hemólisis (β -hemólisis) alrededor de la colonia como consecuencia de la lisis completa de los glóbulos rojos. Otros estreptococos producen una zona de hemólisis parcial, con una coloración verdosa del medio (α -hemólisis); existen también otras especies no hemolíticas (γ -hemólisis) que no producen hemólisis en agar sangre (JOKLIK *et al.*, 1997). Por otra parte, la separación de estreptococos en especies requiere de una serie de pruebas bioquímicas más específicas (JAWETZ *et al.*, 1995).

Entre los estreptococos de interés veterinario, por su capacidad de producir mastitis, se mencionan *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* y *S. uberis* (BIBERSTEIN y CHUNG, 1994). De los gérmenes anteriormente descritos, *S. agalactiae* por su morfología no puede ser diferenciado de otros estreptococos β -hemolíticos; sin embargo, en medios líquidos tienden a proliferar como diplococos o en

cadenas cortas. Las colonias en agar sangre son grandes y mucoides de 1 a 2 mm, con una zona de β -hemólisis relativamente pequeña. Es posible observar una doble zona de hemólisis en el agar sangre de conejo cuando la sangre es refrigerada después de la incubación inicial. El 97% de las cepas producen pigmento amarillo, rojo o anaranjado cuando son incubadas en anaerobiosis en un medio adecuado. Estos pigmentos, llamados carotenoides, están asociados con la fracción de la membrana celular; la producción de pigmentos puede ser suprimida por el sólo agregado de glucosa al medio (JOKLIK *et al.*, 1997). La identificación presuntiva de *S. agalactiae* es posible de realizar dada su capacidad de hidrolizar el hipurato sódico y por una prueba CAMP positiva [Christie, Atkins, Munch-Peterson], (JAWETZ *et al.*, 1995).

La única reserva de *S. agalactiae*, es la leche procedente de las ubres infectadas, pero también pueden encontrarse en superficies que han estado en contacto reciente con leche contaminada, incluyendo el equipo de ordeña y las manos del ordeñador (PHILPOT y NICKERSON, 1992).

2.2.3.3 Género *Corynebacterium*. Son bacilos Gram positivos que no forman esporas. Miden de 0,5 a 1 μm de diámetro y varios micrómetros de largo; presentan dilataciones irregulares características en uno de sus polos, lo cual les da una apariencia de masa. Irregularmente distribuido dentro del bacilo se encuentran gránulos, los que se tiñen intensamente con los colorantes de anilina (gránulos metacromáticos), dando al bacilo una apariencia de rosario (JAWETZ *et al.*, 1995).

Respecto a la especie *Corynebacterium b. bovis*, su posición taxonómica de es incierta, a pesar de lo cual en la actualidad se le considera dentro del género *Corynebacterium*. Es un microorganismo lipofílico, que requiere para su desarrollo la presencia de ácidos grasos insaturados de cadena larga (con más de 12 átomos de carbono en su estructura). Es un comensal en la ubre bovina,

pudiendo llegar a ser un ocasional agente causal de mastitis en las vacas (JOKLIK et al., 1997).

Entre las pruebas bioquímicas que permiten su diferenciación con otras corinebacterias patógenas, cabe mencionar que los *C. bovis* son: Catalasa (+), Hemólisis (-), Proteolisis (-), Ureasa (-), Nitratasa (-), Ácido de la glucosa (+), de acuerdo a lo señalado por BIBERSTEIN y CHUNG (1994).

Brotes de mastitis causados por *C. bovis*, han sido reportados en hatos donde no se practica sistemáticamente el sellado de los pezones después del ordeño; se cree que su reserva principal son las ubres infectadas y los canales de los pezones y, al parecer, la contaminación se produce por el traspaso de vaca a vaca (PHILPOT y NICKERSON, 1992)

2.2.3.4 Mycoplasmas. Son bacterias muy pleomórficas (distintas formas), debido a que carecen de una pared celular y semejan a las formas L que se producen por eliminación de la pared celular de las eubacterias (JAWETZ et al., 1995).

Los mycoplasmas se caracterizan por las siguientes cuatro propiedades: (1) carecen de mecanismo genético para formar la pared celular; (2) habitualmente forman colonias en forma de huevo frito de 0,001 a 1,00 mm de diámetro, que crecen introduciéndose en el medio del agar; (3) son filtrables y (4) no revierten a las formas bacterianas con pared celular cuando se hacen pases en un medio no inhibitor (BIBERSTEIN y CHUNG, 1994).

La mayoría de los mycoplasmas son microorganismos exigentes, que para crecer necesitan de un medio de cultivo base complejo, suplementado con suero y extracto de levadura. Los ácidos grasos no saturados y los precursores de ellos son factores esenciales para su crecimiento. Para su desarrollo, la mayoría de los mycoplasmas necesitan colesterol, el cual es aportado por el suero. El pH óptimo de los medios en los cuales crecen es de 7,5, salvo para el

Ureaplasma que requiere un pH de 6,0. La temperatura óptima de crecimiento es de 37 a 39°C, son aerobios facultativos o microaerófilos, salvo el género Anaeroplasma que es anaerobio estricto (BIBERSTEIN y CHUNG, 1994).

Mycoplasma bovis son microorganismos de un tamaño intermedio entre una bacteria y un virus. Se sospecha de ellos como agentes causales de mastitis, cuando en presencia de síntomas clínicos, los estudios microbiológicos habituales realizados en leches procedentes de varios cuartos son negativos (PHILPOT y NICKERSON, 1992). La mastitis provocada por este microorganismo se caracteriza por su manifestación súbita, formación de una secreción purulenta en los cuartos afectados, contagio rápido en el hato, gran reducción en la producción y resistencia a la terapia con antibióticos. Los organismos pueden ser cultivados a partir de muestras de estiércol, sangre, o procedentes del tracto respiratorio y útero de las vacas infectadas (PHILPOT y NICKERSON, 1992).

2.2.3.5 Coliformes. Los coliformes son bacterias Gram negativas de forma tubular. Estos microorganismos viven en el estiércol, en el agua contaminada, en la tierra y en los materiales usados en las camas. Las formas más comunes de mastitis por coliformes, son aquellas causadas por *E. coli*, que son de origen animal, y por *Klebsiella pneumoniae*, que se origina en contaminaciones a partir del suelo (PHILPOT y NICKERSON, 1992).

Siendo los coliformes, anaerobios facultativos, para crecer utilizan diversos sustratos sencillos; en anaerobiosis, su crecimiento depende de la existencia de carbohidratos fermentables en el medio. En aerobiosis, la gama de sustratos apropiados para su crecimiento incluye ácidos orgánicos, aminoácidos y carbohidratos; los productos resultantes de la fermentación de los azúcares son de utilidad para establecer diagnósticos. Todos los coliformes carecen de citocromo C, razón por la cual son oxidasa negativos (BIBERSTEIN y CHUNG, 1994).

El género *Escherichia* consta de varias especies, pero solamente *E.coli* es un patógeno importante en los animales. Esta especie, la principal bacteria Gram negativa anaerobia facultativa, entre las que forman parte del tracto gastrointestinal, puede ser agente causal de enfermedades septicémicas de muchos mamíferos (BIBERSTEIN y CHUNG, 1994).

2.2.3.5.1 *Escherichia coli*. Se desarrolla bien en medios de cultivo de uso común y, en los medios para aislamiento de bacilos entéricos, la mayor parte de las cepas aparecen como colonias fermentadoras de lactosa (JOKLIK *et al.*, 1997). Esta bacteria produce de manera característica pruebas bioquímicas positivas a indol, descarboxilasa de la lisina y fermentación del manitol, así como también, generación de gas a partir de la glucosa. El microorganismo aislado de la orina puede ser identificado con facilidad, porque es capaz de producir hemólisis en agar sangre y por la morfología típica de sus colonias, con generación de un resplandor iridiscente en los medios diferenciales como agar EAM y prueba de indol positiva (JAWETZ *et al.*, 1995).

2.2.3.5.2 *Klebsiella pneumoniae*. Forma parte de una de las cinco especies de *Klebsiella*, junto a *K. oxytoca*, *K. planticola*, *K. terrigena* y *Klebsiella* grupo 47. La mayoría de las especies de *Klebsiella* se presentan como colonias fermentadoras de lactosa en los medios diferenciales para aislamiento de bacilos entéricos. Todas las especies de *Klebsiella* son inmóviles. La presencia de una gran cápsula hace que las colonias que se desarrollan en agar se vean grandes, húmedas y mucoides. *K. pneumoniae* dentro de las pruebas bioquímicas que la diferencia de otras especies de su género revela: Indol (-), Voges-Proskauer (+), Ornitina descarboxilasa (-), Malonato (+) y Desarrollo a 50°C (-), (JOKLIK *et al.*, 1997).

2.2.3.6 Género *Pseudomonas*. El género *Pseudomonas* es un complejo compuesto por muchas especies de bacilos Gram negativos, son aerobios y no fermentadores que habitan en los suelos y el agua. En su hábitat natural, estos

microorganismos que se encuentran ampliamente distribuidos, desempeñan un papel importante en la descomposición de la materia orgánica (JOKLIK *et al.*, 1997). Existen 27 especies de *Pseudomonas*, pero sólo tres de ellas tienen importancia veterinaria [*Pseudomonas aeruginosa*, *mallei* y *pseudomallei*], (BIBERSTEIN y CHUNG, 1994).

Entre las distintas especies, *P. aeruginosa* raramente está implicada como agente causal primario de una enfermedad, pero adquiere importancia por su capacidad de contaminar un sitio comprometido y por ser cepas resistentes a los agentes antimicrobianos de uso habitual (BIBERSTEIN y CHUNG *et al.*, 1994). Son bacilos Gram negativos de 0,5 a 1,0 μm . y probablemente sean capaces de formar cápsula; todos los microorganismos son móviles por medio de flagelos polares (BIBERSTEIN y CHUNG, 1994).

El aislamiento de *P. aeruginosa* no requiere de procedimientos especiales, debido a que el microorganismo prolifera en casi todos los medios de uso común; puede aislarse de cualquier muestra que haya sido apropiadamente recogida y transportada. Es posible diferenciarla de los microorganismos entéricos por una prueba de oxidasa positiva y por su metabolismo oxidativo (JOKLIK *et al.*, 1997).

2.2.4 Formas clínicas de presentación de la mastitis. La expresión de la enfermedad está condicionada por los factores que regulan la llegada del o los agentes patógenos y por la respuesta del huésped, pudiéndose presentar como:

Mastitis clínica: En esta forma clínica, el cuarto infectado en general se encuentra inflamado, en las vacas se puede apreciar dolor a la palpación de la zona afectada y, por otra parte, la leche está visiblemente alterada por la presencia de coágulos, descamaciones o suero descolorido y en oportunidades, con presencia de sangre. En casos de mastitis más severas, las vacas muestran signos generalizados de enfermedad: fiebre, pulso acelerado,

pérdida de apetito y reducción aguda de la producción de leche (AGROBIT, 1998).

Mastitis subclínica: Habitualmente la vaca se ve saludable, la ubre no muestra signos de inflamación y la leche tiene un aspecto macroscópico normal (AGROBIT, 1998). El recuento elevado de células somáticas en la leche es aceptado, internacionalmente, como un buen indicador de mastitis subclínica en los rebaños (CHILE, FIA, 2003).

2.2.5 Factores involucrados en la producción de mastitis y mecanismos reguladores. La mastitis en raras ocasiones es el resultado de un solo factor de manejo, sino más bien, es la consecuencia de varios de ellos que interactúan conjuntamente para incrementar la exposición de la ubre y los pezones a la acción de los organismos causantes de mastitis. De esta manera, predisponen a las vacas a infecciones intramamarias, reduciendo con ello su resistencia natural a la enfermedad (PHILPOT, 2001).

Para simplificar la comprensión del complejo proceso de la mastitis, es útil considerar los tres principales factores que están involucrados en esta enfermedad, de acuerdo a como lo describe SCHROEDER (1997):

- **Los microorganismos como agente causal:** En el momento actual, se reconoce la existencia de más de 140 microorganismos identificados como causantes de mastitis, considerándose que de ellos *S. uberis* y *E. coli*, son responsables de aproximadamente el 60% de las mastitis clínicas en muchos países (PHILPOT, 2002).
- **La vaca como huésped:** El animal contrae la infección de la ubre a diferentes edades y en distintos estados del ciclo de lactación; existiendo también variaciones en su capacidad para superar la infección una vez que ésta se ha establecido. Es por ello, que se acepta que la vaca juega un activo rol en el desarrollo de la mastitis.

- **El ambiente que puede influir sobre la vaca y los microorganismos:** El ambiente de la vaca influye tanto en el número como en los tipos de microorganismos capaces de producir enfermedad. Sin embargo, se acepta que a través de un adecuado manejo del ambiente, éste puede ser controlado, reduciendo la exposición al riesgo de enfermar y favoreciendo la resistencia natural por parte del animal a contraer la infección.

2.2.5.1 Anatomía básica de la ubre (PHILPOT y NICKERSON, 1992). El interior de cada cuarto se compone de la cisterna del pezón, la cisterna de la glándula, los ductos de la leche y el tejido productor. Estos tejidos contienen millones de sacos microscópicos llamados alvéolos. Cada alvéolo se alinea con las células productoras de la leche y está rodeado, a su vez, por células musculares que se contraen y se cierran para extraer la leche durante el ordeño. En el intervalo de los ordeños, la leche se acumula en los espacios alveolares, en los ductos de la leche y en las cisternas. Durante el ordeño, el líquido acumulado sale a través de los canales del pezón.

2.2.5.2 Invasión de la ubre. La mastitis es el resultado del paso de microorganismos a través del canal del pezón, sobrepasando los mecanismos de defensa y su posterior multiplicación. El canal del pezón es la principal defensa de la vaca contra los microorganismos que causan la mastitis. Los microorganismos pueden irrumpir en el canal del pezón de varias maneras: una de ellas, es la entrada al canal del pezón en el período entre ordeños multiplicándose luego dentro del canal, o bien, por movimientos físicos resultado de la presión localizada en el pezón cuando la vaca se mueve. Durante el ordeño mecánico, los microorganismos impulsados hacia el canal penetran la cisterna del pezón. Este es el resultado de los retroimpactos en la punta del pezón causados por el deslizamiento de las pezoneras. Las infecciones causadas por este mecanismo son muy raras y habitualmente ocurren cuando no hay flujo de leche en el pezón, siendo mayor el potencial de

infección para los microorganismos que residen en el canal del pezón. (PHILPOT y NICKERSON, 1992).

Posterior al proceso de ordeño, el canal permanece dilatado por una a dos horas, e inclusive cuando el canal del pezón está dañado, puede permanecer parcial o totalmente abierto por tiempo más prolongado. Dada esta condición los organismos del ambiente o aquellos que se encuentran en lesiones de la piel en la punta del pezón, pueden invadir fácilmente el canal (AGROBIT, 1998).

2.2.5.3 Mecanismos de defensa y protección de la ubre bovina. La glándula mamaria de los rumiantes tiene dos mecanismos de defensa: la inmunidad humoral no heredada y la inmunidad específica adquirida, correspondiendo los factores físicos del pezón a los inespecíficos (PYÖRÄLÄ, 2002a). Este mecanismo de defensa local puede evitar la entrada de un agente patógeno extraño desde el canal del pezón hacia el sistema de conductos de la ubre, protegiéndose de esta forma del riesgo de infección (WOLTER *et al.*, 2002).

El esfínter del pezón representa la primera línea de defensa contra cualquier infección. El interior del canal del pezón está compuesto por un tejido muscular que sirve de válvula, cuya función es mantener el canal del pezón cerrado, evitando así el flujo de leche hacia el exterior y la entrada de bacterias hacia el interior de la ubre. Las células que componen el interior del canal del pezón producen una sustancia llamada queratina, compuesta por un material fibroso proteico y ácidos grasos que en su conjunto poseen un fuerte poder antibacteriano (LOOR y JONES, 1998).

La respuesta inflamatoria se inicia una vez que la bacteria ingresa en la ubre, constituyendo ésta la segunda línea de defensa contra infecciones. Dentro de la ubre, las bacterias se multiplican produciendo toxinas, enzimas y otras sustancias que estimulan la producción de una serie de compuestos químicos

por parte de las células inflamatorias de la vaca, los que a su vez son utilizados para prevenir la inflamación del tejido mamario (LOOR y JONES, 1998).

La naturaleza y magnitud de la transmisión de inmunidad por la glándula mamaria, desde la madre a su progenie, está relacionada con los niveles de traspaso durante la vida fetal. En los mamíferos con permeabilidad placentaria a las inmunoglobulinas, la inmunidad sistémica de la madre es transferida durante la vida fetal; en cambio en los Arciodáctilos, que no poseen esta capacidad, la inmunidad sistémica es transmitida después del nacimiento mediante el aporte de calostro enriquecido en inmunoglobulinas, las que son absorbidas por su intestino (SALMON, 2004).

Las células somáticas presentes en la leche proveniente de una vaca sana, corresponden mayoritariamente a macrófagos (66-88%), siendo las restantes, neutrófilos, células epiteliales y mononucleares. La proporción de neutrófilos fluctúa entre 1 y 11% en un cuarto sano, pero puede aumentar al 90% o más en un cuarto con infección intramamaria (PYÖRÄLÄ, 2003).

En un estudio comunicado por RAINARD y RIOLLET (2003), se señala que el recuento de células somáticas es un factor clave para asegurar la calidad de leches de rebaño, siendo empleado para establecer el pago de leches y para el monitoreo de programas de mastitis. En el mismo estudio, se indica que la elevación en la cantidad de neutrófilos se correlaciona con el aumento de células somáticas, al comparar cuartos infectados versus cuartos sanos. A este respecto, se menciona que en un meta-análisis de publicaciones previas a 1971, los valores de recuento de células somáticas fueron de 68.000 cél/mL (promedios geométricos) para los cuartos bacteriológicamente negativos versus 333.000; 1.129.000; 547.000; 1.024.000; 4.196.00; 155.000 y 164.000 para los cuartos infectados con *S. aureus*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, coliformes (*E. coli* o *Klebsiella* spp.), *Staphylococcus coagulasa* negativos, o *Corynebacterium bovis*, respectivamente.

PAAPE *et al.* (2003), describen a los neutrófilos como leucocitos polimorfonucleares que conforman la primera línea de defensa celular contra la invasión de patógenos. Los polimorfonucleares (PMN), se caracterizan por sus núcleos polimorfos y segmentados; la presencia en ellos de numerosos gránulos citoplasmáticos les proporcionan componentes que participan en la muerte de bacterias, con grandes depósitos de glicógeno que aportan una fuente de energía y cuya superficie altamente plegada es empleada para el proceso de fagocitosis de bacterias y la formación de vacuolas fagocíticas intracelulares.

Por otra parte, de acuerdo a la descripción de PAAPE *et al.* (2003), en la superficie de los PMN se encuentran numerosos receptores, algunos de los cuales tienen la propiedad de actuar como elementos de atracción quimiotáctica para atraer a los leucocitos hacia las áreas de inflamación. La adhesión de los receptores en la superficie, sirve como base para facilitar los movimientos que permiten atravesar la pared del endotelio y favorecer con ello la llegada de los PMN al sitio de infección.

En el momento actual, se tiene una idea vaga acerca de los mecanismos involucrados en la migración de los PMN desde la sangre hacia la leche en la glándula mamaria. Al respecto, se sabe que el tiempo de tránsito de los neutrófilos desde la circulación sanguínea a la leche, es de alrededor de 2 horas luego de la infusión de endotoxinas en la cisterna del pezón, de acuerdo a los estudios realizados por Persson, citados por RAINARD y RIOLLET (2003). El proceso involucra atravesar dos barreras, el endotelio vascular y otras estructuras tales como el tejido conjuntivo y la lámina propia antes de lograr atravesar el epitelio intramamario.

En la mastitis, ya definida como inflamación de la glándula mamaria, el proceso inflamatorio es inducido por mediadores químicos, los que son liberados como consecuencia de la infección de la ubre para ayudar a frenar la alteración

tisular, pero también son capaces de modificar la leche secretada por el tejido mamario. El daño de la ubre puede ocurrir en tiempo variable respecto al momento en que puedan ser detectados los signos de enfermedad, situación en la cual ya han pasado a la leche una serie de proteínas indicadoras de procesos inflamatorios, las que pueden alterar la calidad de la leche (FITZPATRICK *et al.*, 1998).

El sistema complemento, compuesto por proteínas, la mayor parte de ellas sintetizadas en el hígado, juega un rol importante en la inmunidad innata contra diversos microorganismos a través de sus actividades bactericidas, opsónicas (facilitador del proceso de fagocitosis) y antiinflamatorias. La cantidad de complemento en la glándula mamaria de vacas lecheras sanas es baja, pero una vez que se establece el fenómeno inflamatorio, grandes cantidades de complemento son movilizadas desde la sangre hacia el tejido mamario, llegando a jugar un papel importante en el proceso de respuesta inmune específica (RAINARD, 2003).

2.3 Rol de las células somáticas

Los términos células leucocitarias, conteos celulares o conteos celulares somáticos (CCS) en la leche, significan lo mismo. Se refieren a la cuenta total de células leucocitarias provenientes de la sangre y que se encuentran en la leche, correspondiendo en un porcentaje aproximado al 98% a macrófagos, linfocitos y neutrófilos y el restante 2% está conformado por células epiteliales del tejido mamario (AGUADO, 2004).

Las células somáticas juegan un rol protector contra la enfermedad infecciosa en la glándula mamaria bovina; la llegada de neutrófilos a la glándula infectada forma parte del mecanismo de defensa normal de la vaca, siendo muy eficientes para erradicar la mayoría de las infecciones (MARCUS y KEHRLI, 1994). Esta condición, ha sido determinante para llegar a un consenso respecto a aceptar que un elevado número de células en la leche es indicador de la

existencia de un proceso inflamatorio en la ubre y, por lo tanto, ha llegado a jugar un rol importante en el diagnóstico de mastitis (AHLNER, 2003).

Las concentraciones de células en la leche, como contrapartida al recuento de células bacterianas, se ha usado durante largo tiempo como un marcador de inflamación y un indicador de infección intramamaria (RAINARD y RIOLLET, 2003). En tal sentido en estudios experimentales publicados por Jain en 1971 y Schalm en 1976, ambos citados por RAINARD y RIOLLET (2003), demuestran el prominente rol que los neutrófilos juegan luego de la administración intravenosa de suero equino anti-leucocitario en el desarrollo de mastitis por *Klebsiella* o por *S. aureus*. En este estudio, la posterior inoculación de coliformes a las glándulas mamarias condujo a una menor respuesta inflamatoria en vacas que tenían bajos recuentos de neutrófilos inducidos por la administración previa de suero anti-leucocitario, comparados con los animales controles. Simultáneamente los recuentos de neutrófilos medidos en leche fueron muy inferiores, resultando producto de ello que el número de bacterias en la leche alcanzó a billones por mililitro, produciéndose además necrosis del tejido mamario. Por otra parte, en la experiencia con inoculación de *S. aureus* la mastitis subclínica crónica evolucionó hacia una mastitis gangrenosa.

Los componentes antibacterianos de la leche están constituidos por factores específicos e inespecíficos. Las inmunoglobulinas forman parte de los componentes específicos y penetran al interior de la ubre principalmente durante la inflamación, pudiendo éstas también ser formadas localmente en el epitelio mamario. Son agentes opsonizantes, con capacidad para prevenir la colonización bacteriana y neutralizar toxinas, según lo señalado por Burnevich, citado por PYÖRÄLÄ (2002a). El mismo autor destaca, que otros factores de defensa inespecíficos de la ubre lo constituyen el sistema complemento, lisozima, sistema lactoperoxidasa-tiocianato y lactoferrina. El complemento es un complejo de proteína, el cual está presente en el suero y la leche, su función se expresa incrementando el proceso de fagocitosis. La lisozima, es una

proteína bactericida presente en la leche, actúa destruyendo la pared peptidoglicana de las bacterias Gram positivas y la membrana externa de las bacterias Gram negativas. *In vitro*, esta enzima inhibe el desarrollo de *E. coli* incubada en leche, en presencia de complemento e inmunoglobulina A.

RIVAS *et al.* (2000), han destacado la importancia de los recientes conocimientos de Inmunología, para comprender los fenómenos inflamatorios relacionados con la mastitis bovina. En un estudio longitudinal evaluaron el perfil de los distintos fenotipos de linfocitos medidos en sangre periférica y en glándula mamaria como respuesta a la mastitis inducida por *S. aureus*. Encontraron incrementos en los porcentajes de linfocitos CD4, tanto en leche como en sangre, entre los días primero y octavo posterior a la inoculación, sin que existieran diferencias significativas entre ambas. Estos autores destacan al mismo tiempo, que en el recuento de leucocitos en sangre y leche, la relación de linfocitos CD4/CD8 y linfocitos CD4+ en leche entregan una mayor información que el sólo recuento de células somáticas totales para identificar las fases inflamatorias tempranas. Concluyen, que los linfocitos CD4+ juegan un rol protector en las etapas precoces de la mastitis inducida por *S. aureus*. Señalan, además, que en la leche de animales sanos el porcentaje de linfocitos CD8+ es mayor que el de CD4+, invirtiéndose dicha relación al comienzo de una mastitis infecciosa.

En otro estudio de RIVAS *et al.* (2002b), se evaluó el número y función de fagocitos de la glándula mamaria bovina con mastitis. Los macrófagos y los PMN se midieron por citología convencional, citometría de flujo, inmunofluorescencia y recuento de células somáticas. Se concluyó que el estudio de PMN por inmunofluorescencia resulta ser el único indicador valedero para el diagnóstico de mastitis, con un 100% de sensibilidad y especificidad.

Por otra parte, RIVAS *et al.* (2002b) señalan en el mismo estudio, que lo relevante no es medir el número total de fagocitos, sino el porcentaje de

aquellos que tienen una mayor capacidad fagocitaria. Estos hallazgos, también aportan evidencias que indican que el recuento de células somáticas totales, es una medida insuficiente para predecir la habilidad que tiene un animal para eliminar en forma precoz las bacterias invasoras.

En todos los países productores de leche, se coincide en señalar que los buenos recuentos deben ser inferiores a 250.000 cél/mL. Actualmente todos los países Nórdicos tienen recuentos muy bajos, destacando entre ellos: Dinamarca 250.000/mL; Suecia 200.000; Noruega < 150.000 y Finlandia < 150.000. La cifra máxima aceptable para la Unión Europea es de 400.000/mL y en Chile, el promedio estimado de recuento de células somáticas en los estanques enfriadores prediales es de alrededor de 600.000 cél/mL, lo que indicaría una prevalencia de mastitis subclínica del orden del 50 - 60% (CONCHA, 2001)

Lo anterior, tiene relación directa con la producción de leche, habiéndose logrado establecer que existe un 2,5% de pérdida en la producción de leche, asociada con cada incremento de 100.000 cél/mL por sobre un nivel basal de 200.000/ml (PHILPOT, 2002).

Los cambios en la composición de la leche causados por la mastitis están asociados a los patógenos más comunes, produce un cambio significativo en la composición de la leche, incluido un aumento en el recuento de células somáticas. Estos cambios tienen relación con el nivel de células somáticas y están ligados al germen presente en la ubre, particularmente en los casos de mastitis clínica. El umbral de células somáticas en la leche normal difiere de acuerdo a distintos autores, pero en general, no sobrepasa las 100.000 cél/mL, de acuerdo a lo señalado por LE ROUX *et al.* (2003), representando un adecuado marcador del estado de la ubre del animal y un buen indicador de la composición bioquímica de la leche obtenida de cuartos aislados. Los mismos autores señalan, además, que para leches obtenidas de estanques, la

composición de ésta es similar a la de cuartos aislados, implicando menos riesgos de cambios bioquímicos si estos recuentos son inferiores a 200.000 cél/mL.

Las proteínas presentes en la leche de vacas con mastitis sufren cambios importantes, es así como el nivel de caseína, la proteína de mayor calidad nutricional para humanos, disminuye y, en cambio, se produce un aumento en la concentración de otras proteínas en el suero (albúmina, lactoferrina e inmunoglobulinas), las que afectan la calidad de los productos lácteos, influyendo, entre otros, en la calidad y sabor del queso (HARMON, 1994).

En los casos de mastitis, se ha demostrado que albúmina, inmunoglobulinas, transferrina, y otras proteínas del suero sanguíneo, son secretadas en la leche debido a cambios en la permeabilidad vascular del tejido mamario (HARMON, 1994). El mismo autor señala, que la lactoferrina, la principal proteína de ligamiento de hierro en secreciones mamarias, incrementa su concentración probablemente derivado del hecho que su producción en el tejido mamario es mayor. La destrucción de ciertas proteínas comúnmente encontradas en la leche, también ocurre en vacas infectadas con mastitis clínica o subclínica, ello debido a la presencia de sustancias que provocan su degradación. La actividad de la plasmina se incrementa sustancialmente durante un episodio de mastitis; ésta y otras enzimas que son producidas por las células somáticas, pueden causar la destrucción completa de la caseína en la ubre, mucho antes de que la leche sea escurrida. El deterioro de la proteína en la leche de vacas con mastitis, puede continuar aún durante el procesamiento y almacenaje del producto. La mastitis, por otra parte, también incrementa la conductividad de la leche, lo que provoca un aumento en su concentración de sodio y cloro; se produce además, disminución en la concentración de potasio, el mineral de más alta concentración en la leche proveniente de vacas sanas. Debido a que la mayor parte del calcio está asociado con la caseína, la interrupción en la síntesis de caseína contribuye a bajar los niveles de calcio en la leche

(HARMON, 1994). A lo anterior se debe agregar, que tanto las toxinas producidas por los microorganismos como los mediadores químicos de inflamación, dañan el tejido productor de leche, dando como resultado una disminución en la producción láctea. Por otra parte, la disminución de la concentración de lactosa en la leche, es un claro indicador de la disminución de la capacidad de síntesis por parte de las células de la glándula mamaria (LE ROUX *et al*, 2003).

En estudios realizados por COULON *et al.* (2002), se demuestra que las modificaciones en la composición química de la leche, están relacionadas con los gérmenes causantes de mastitis, siendo estos cambios más acentuados en los casos de mastitis clínica al ser comparados con aquellos que ocurren en las infecciones subclínicas. Por otra parte, estos autores señalan que *E. coli*, es el agente asociado con los mayores cambios, tanto en los volúmenes de producción como en la composición de la leche.

HURLEY y MORIN (2002), resumen algunos cambios producidos en la leche provocados por la mastitis, señalando que existe disminución en la síntesis de lactosa, la caseína se ve alterada por agentes proteolíticos como la plasmina previamente activada en la sangre y por enzimas proteolíticas producidas por los leucocitos y bacterias; la grasa se ve alterada debido a que la membrana del glóbulo graso se torna más susceptible a la acción de lipasas.

2.4 Métodos de diagnóstico de mastitis, mediante recuento de células somáticas en leche

En vacas, y más recientemente en ovejas lecheras, el recuento de células somáticas se ha convertido en un elemento válido de predicción de inflamación intramamaria, y por lo tanto, ha pasado a ser un importante indicador de la calidad e higiene de la leche y un procedimiento a tener en cuenta en los programas de control de mastitis (GONZALO *et al.*, 2003).

2.4.1 California Mastitis Test (CMT). Fue desarrollado como método de terreno, para determinar en forma rápida la presencia de mastitis subclínica en cada uno de los cuartos de vacas lecheras. Siendo una prueba de bajo costo y de fácil aplicación, no permite conocer el grado en que se afecta la producción y composición de la leche (MANSILLA *et al.*, 2001).

Respecto al fundamento técnico de esta prueba, Odierno y Noquera citados por CEPERO *et al.* (2005), señalan que el reactivo empleado, lauril sulfato de sodio al 3%, posee un tenso-activo que disminuye la tensión superficial de los leucocitos presentes en la leche con mastitis, provocando de esta manera un estallido de los leucocitos liberando el ADN, el que al ponerse en contacto con productos proteicos de la leche forman una gelatina. El grado de reacción evidenciada en esta prueba, es directamente proporcional al número de células somáticas presente en la leche y al nivel de afección que presenta la glándula mamaria, pudiéndose interpretar de esta forma, el grado de inflamación. Por otra parte, el mismo autor plantea que el Test de Mastitis California permite la detección de más de un 75% de mastitis subclínica.

Esta prueba se realiza después que la ubre ha sido preparada para el ordeño y se han desechado dos o tres chorros de leche inicial proveniente de cada cuarto. De cada uno se hacen fluir dos o tres chorros de leche hacia el compartimiento apropiado en la paleta CMT, luego ésta se inclina a una posición casi vertical para permitir que escurra casi toda la leche. El paso siguiente es añadir el reactivo de prueba directamente a la muestra en estudio, en volumen similar al de ésta en cada compartimiento; luego se observan las reacciones producto de la acción del reactivo sobre el material nuclear de las células somáticas, luego de hacer rotar suavemente la paleta. Cuando hay un elevado número de células, se desarrolla una sustancia gelatinosa. Mientras mayor sea el número de células en la muestra de leche, mayor será la cantidad de gelatina formada (HURLEY y MORIN, 2002).

En el CUADRO 1 se presentan rangos de recuentos de Células Somáticas según el grado de reacción por el método CMT.

CUADRO 1 Tipo de reacción del Mastitis California Test (CMT) y su relación con los rangos de recuentos de células somáticas (cél/mL).

CMT	Tipo de Reacción	RCS
N (Negativo)	Mezcla permanente líquida	< 200.000
T (Trazas)	Ligeramente viscosa	150.000 - 500.000
1	Mezcla viscosa	400.000 - 1.500.000
2	Viscosidad franca	1.500.000 - 5.000.000
3	Gel adherido al fondo	> 5.000.000
N= Cuarto sano; T= Mastitis subclínica; 1= Mastitis subclínica; 2= Infección seria y 3= Infección seria.		

FUENTE: COTRINO (2003).

La prueba no tiene reacciones que sean falsos negativos, pero sí puede presentar falsos positivos en vacas con menos de 8 días posparto o con lactancias superiores a los 10 meses. En estos casos, la reacción de viscosidad es muy similar en los cuatro cuartos y ello es producto del incremento de las células epiteliales presentes en la leche, situación que fisiológicamente se da en estos dos períodos de lactancia (COTRINO, 2003).

SHITANDI y KIHUMBU (2004), evaluaron el uso del CMT en el diagnóstico de mastitis, pero orientada a descartar errores de interpretación diagnóstica debido a la presencia de residuos de sustancias antimicrobianas en la leche, concluyendo los autores que dichos riesgos no existían.

2.4.2 Citometría de flujo. Es una técnica que permite obtener información acerca de distintas poblaciones celulares en un estudio individualizado, a partir de un gran número de células. Es un método de lectura rápido, que posibilita el análisis de un elevado número de células (10.000 a 50.000 para cada

anticuerpo monoclonal), proporcionando un registro computarizado de los resultados. Los citómetros de flujo analizan células en suspensión, las que interfieren de forma individual con una fuente de luz. La intersección de cada célula con la luz láser provoca la emisión de una serie de señales luminosas que permiten diferenciar poblaciones celulares dentro de la muestra analizada, ya sea, por su tamaño relativo, por sus granulaciones o bien por su reactividad con fluorocromos, previa incubación con diversos anticuerpos monoclonales. Por otra parte, la citometría de flujo permite la determinación de antígenos celulares de superficie y tiene, por lo tanto, utilidad en la identificación inmunológica de células en diferentes enfermedades, entre ellas, leucemias (GASCÓN, 1998); también permite la cuantificación de ADN y la determinación de la actividad proliferativa de las distintas poblaciones celulares.

En el ámbito de las investigaciones de diferentes poblaciones celulares, involucradas en el proceso inflamatorio de la glándula bovina con mastitis, esta técnica con citometría de flujo (FIGURA 1), ha sido ampliamente empleada, entre otros investigadores, por RIVAS *et al.* (2002a; 2002b).

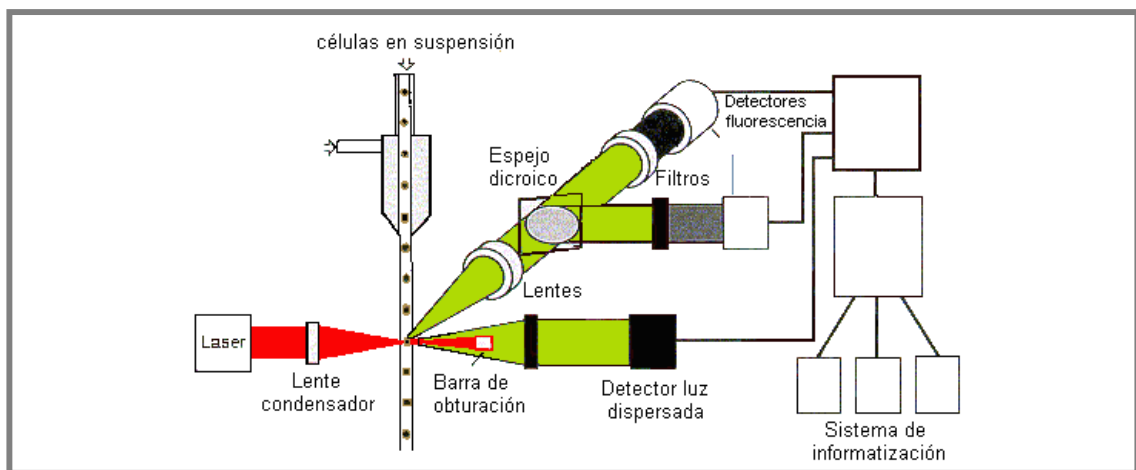


FIGURA 1 Esquema del Citómetro de flujo.

FUENTE: GASCÓN (1998).

2.4.3 Método de microscopía directa. Es un método muy confiable, pero poco práctico, especialmente si se desea realizar un examen individual por

cada vaca, ya que es un procedimiento muy lento y tedioso en su realización (AGUADO, 2004).

BLANCO (2001), al describir la técnica de microscopía directa, señala que para su realización es necesario calibrar cada uno de los microscopios a utilizar. Para ello se toma una laminilla graduada en milímetros, luego se coloca en la platina para su posterior enfoque con el objetivo de seco débil y luego se localizan las graduaciones. Posteriormente, el objetivo se cambia a seco fuerte, y se procede a estudiar la calibración lineal, midiendo con exactitud el campo microscópico en milímetros. Luego se procede a calcular el factor microscópico, determinando el área del campo. Para cuyo efecto, se divide 100 entre el área del campo microscópico y este resultado se multiplica por 100, obteniéndose de esta manera el factor microscópico. Después de teñidas las muestras de leche, en el frotis se cuenta el número de células por campo y se multiplica por el factor microscópico calculado, obteniéndose así el número de células por mililitro. Para una mejor observación y un adecuado teñido de la muestra se recomienda utilizar el reactivo de Newman-Lambert que permite observar las células somáticas de color naranja en el frotis.

2.4.4 Prueba de Wisconsin. Para realizar esta prueba, se requiere de una gradilla con 12 tubos de plástico de 15 mL y graduación de 1 a 6 mL; presentan un orificio aireador con un diámetro de 3,15 mm situado lateralmente. Los tapones de hule llevan un orificio central de 1,10 mm. El reactivo utilizado es similar empleado para el Test de Mastitis California, pero diluido con agua destilada en proporción de 1:1. Para la realización de esta prueba, en cada tubo se mezclan 3 mL de leche con 3 mL del reactivo, posteriormente se agita durante 10 segundos y la mezcla se deja reposar por 15 segundos, luego se invierte por otros 15 segundos para finalmente proceder a realizar la lectura (BLANCO, 2001).

CUADRO 2 Interpretación de la prueba de Wisconsin modificada.

mL de gel en tubo	Células por mL de leche
0,0	1-100.000
1,1 – 1,5	100.000 – 500.000
1,6 – 1,8	500.000 – 700.000
1,9 – 2,0	700.000 – 1.000.000
2,1 – 2,5	1.000.000 – 1.700.000
2,6 – 3,0	1.700.000 – 2.500.000
3,1 – 6,0	Más de 2.500.000

FUENTE: BLANCO (2001).

Por otra parte, BLANCO (2001), señala que si se utiliza el procedimiento específico de la prueba de Wisconsin colocando 2 mL de leche y 2 mL del reactivo, se debiera utilizar el CUADRO 3 para una correcta interpretación.

CUADRO 3 Interpretación de la prueba de Wisconsin.

mL de gel en tubo	Células por mL de leche
0,5	0 – 75 000
1,0	75.555 – 190.000
1,5	190.000 – 350.000
2,0	350.000 – 570.000
2,5	570.000 – 830.000
3,0	830.000 – 1.200.000
Más de 3,0	Más de 1.500.000

FUENTE: BLANCO (2001).

2.4.5 Test DCC (Delaval Direct Cell Counter). De acuerdo a lo descrito por SIRVÉN (2004), se consta de una cámara digital que toma fotos del núcleo de las células somáticas las cuales son colocadas en un cartucho con un reactivo fluorescente específico y cuenta los núcleos celulares uno por uno. Este es un test desarrollado y empleado para un recuento rápido de células somáticas, permite realizar en menos de 1 minuto un conteo en un rango que puede ir de

10.000 a 40.000.000 de cél/mL. Según las pruebas realizadas por el equipo de investigación de Ruegg, citado por SIRVÉN (2004), la correlación entre el recuento de células somáticas (RCS) estándar y el DCC fue de 0,92; no lográndose establecer diferencias significativas entre ambos métodos.

2.4.6 Prueba de conductividad eléctrica. Se fundamenta en el aumento en la concentración de iones de sodio y cloro en la leche, como consecuencia de la lesión del tejido glandular, lo cual se traduce en una elevación de la conductividad eléctrica de la leche (COTRINO, 2003).

Las concentraciones iónicas de la leche producida por vacas con mastitis cambian debido al incremento de la permeabilidad de los capilares sanguíneos, a la destrucción de las uniones celulares y la destrucción de los sistemas de transporte iónico (NIELEN *et al.*, 1992).

MILNER *et al.* (1997), demostraron la utilidad de la prueba de conductividad eléctrica en el diagnóstico precoz de la mastitis bovina. Ellos hicieron mediciones en leche y las compararon con el método convencional de diagnóstico clínico para establecer el momento oportuno para instaurar un tratamiento antibiótico. Las decisiones derivadas de un diagnóstico precoz dieron como resultado la reducción en un 50% el uso de antibióticos vía intramamaria, comparada con la cantidad requerida posterior a un diagnóstico convencional.

2.4.7 Fossomatic. Es un contador específico de DNA, basado en un principio óptico de fluorescencia. Se fundamenta en el hecho que el colorante bromuro de etidio penetra al interior de la célula y forma un complejo fluorescente con el DNA nuclear, con lo cual cada célula emite un impulso eléctrico el cual es amplificado y registrado por instrumentos computacionales (MARTÍNEZ *et al.*, 2003).

2.5 Aspectos terapéuticos en el manejo de la mastitis

El principio más importante para el control de la mastitis, es la aplicación de medidas de prevención de las infecciones intramamarias, a pesar de lo cual, la aparición de nuevos casos hace necesario establecer un tratamiento específico. Para este efecto, se han mencionado cuatro estrategias tendientes a controlar la mastitis: la cura espontánea, la eliminación de los animales afectados, el uso de antibióticos durante la lactación y el tratamiento antibiótico durante el período seco (NICKERSON, 2002).

SAN MARTIN *et al.* (2002), señalan que la terapia antimicrobiana, en medicina humana y veterinaria, es la principal herramienta terapéutica frente a los microorganismos patógenos causantes de enfermedades infecciosas; sin embargo, con su empleo durante años se ha observado la aparición de cepas de bacterias multiresistentes, lo cual exige la búsqueda de nuevas alternativas.

2.5.1 Uso de antibióticos en el tratamiento de mastitis bovina. La mastitis bovina ha sido tratada con antibióticos por más de 50 años, siendo ésta la razón más frecuente para el uso de antibióticos en rebaños lecheros PYÖRÄLÄ (2002b). En el tratamiento de la mastitis bovina con uso de antibióticos, se debe tener en cuenta la cantidad de fármaco que puede pasar a la leche, lo cual dependerá del tipo de preparado, de su componente activo y vehículo de administración, dosis y forma de aplicación, producción de leche por parte del animal bajo la acción del medicamento, grado de afección mamaria y tiempo transcurrido entre el tratamiento y el momento del ordeño (MAGARIÑOS, 2000). El mismo autor destaca que la administración de antibióticos por vía oral, intramuscular o intravenosa, tiene menos importancia desde el punto de vista de higiene de la leche, que la aplicación de éstos por vía intramamaria. Antecedente importante a destacar, debido a que esta vía es la más usada para el tratamiento de la mastitis.

En opinión de RUÍZ *et al.* (2001), la identificación de la bacteria que causa la mastitis en las vacas y los patrones de su susceptibilidad antibiótica son necesarios para elegir un antibiótico apropiado para el tratamiento. Es prudente además, monitorear periódicamente las bacterias aisladas de mastitis bovina en cuanto al patrón y rango de susceptibilidad a los distintos antibióticos. El mismo autor señala, que las variaciones en la susceptibilidad de las bacterias están relacionadas con las medidas terapéuticas y el uso frecuente de determinados antibióticos en zonas geográficas definidas.

Las ventajas del uso de antibióticos por vía intramamaria, entre otras, es su elevada concentración alcanzada en el compartimiento lácteo de la glándula mamaria y los requerimientos de menor cantidad de drogas antimicrobianas (PYÖRÄLÄ, 2002b). Por otra parte, este autor señala que entre las desventajas, se debe destacar la irregular distribución del fármaco en la ubre, el riesgo de provocar contaminación al administrar la droga a través del canal de la ubre y posibles irritaciones del tejido mamario causado por este procedimiento.

PYÖRÄLÄ (2002b), comenta que algunos autores han sugerido el uso de preparaciones con combinación de 2 o 3 antibióticos para su administración intramamaria en el tratamiento de la mastitis; se fundamenta en que su acción sinérgica podría cubrir a todos los patógenos, incluidas las bacterias Gram negativas. Al respecto, este autor señala que no hay evidencias suficientes que demuestren que ello sea eficaz para tratar las mastitis por coliformes y, por otra parte, esta acción sinérgica nunca ha podido ser demostrada *in vivo*.

Respecto a la acumulación de los antibióticos en el compartimiento lácteo, o en el tejido de la ubre, se ha señalado que esto va a depender del tipo y magnitud de la infección. Se sabe, que en la mastitis estreptocócica, el germen permanece en el compartimiento lácteo, pero en las mastitis por *S. aureus*, éstos pueden penetrar al interior del tejido de la ubre y causar infecciones

profundas. En cambio los coliformes, generalmente son eliminados espontáneamente a través de la ubre y los antibióticos no necesariamente pudieran ser requeridos; sin embargo en los casos graves puede haber riesgo de infección generalizada, lo cual apoyaría la administración sistémica y no local de antibióticos (PYÖRÄLÄ, 2002b).

En algunos países, se ha recomendado el uso de drogas de amplio espectro antibacteriano, como lo son las cefalosporinas de tercera o cuarta generación (Ceftriaxona, Cefotaxina, Cefixina, Cefoperazona y Ceftazidima) para el tratamiento de todo tipo de mastitis, sugerencia que no parece ser prudente por el riesgo de generar bacterias resistentes productoras de beta-lactamasa. Por esta razón, en el caso de mastitis estreptocócicas, excluidos los enterococos, y aquellas por estafilococos sensibles a la penicilina G, ésta debiera ser la droga de primera elección (PYÖRÄLÄ, 2002b).

Fracciones de los antibióticos utilizados para tratar la mastitis y otras enfermedades infecciosas, pasan a la secreción láctea cualquiera sea la vía de administración. Por lo tanto, se recomienda desechar la leche producida durante las 72 horas siguientes al tratamiento o durante el tiempo de eliminación indicado en el envase del producto. Por esta razón, las mezclas de antibióticos de efecto prolongado no deben emplearse cuando la vaca está en periodo de lactación, para evitar con ello la presencia de residuos en la leche (AMIOT, 1991).

Los antecedentes señalados tienen importancia en salud pública, debido al riesgo potencial que para el consumidor pudiera tener la ingesta de alimentos contaminados, los que pueden alcanzar niveles que determinen una toxicidad de tipo crónica; se ha descrito además, la aparición de reacciones de tipo alérgica luego de un período de sensibilización, condicionada por la formación de anticuerpos específicos en el sistema retículo endotelial contra la droga administrada y la consiguiente reacción antígeno-anticuerpo (ALAIS, 1985). El

mismo autor señala, por otra parte, que los antibióticos presentes en la leche pueden provocar otros efectos en el consumidor, tales como alteración de la flora intestinal, estimulación del desarrollo de bacterias antibiótico-resistentes, desarrollo de microorganismos con mayor poder patógeno y reducción de la síntesis de vitaminas en el organismo.

Por otra parte, la presencia de antibióticos y antisépticos en la leche pueden llegar a ser un grave inconveniente en los procesos tecnológicos conducentes a la fabricación de quesos, debido a que su presencia inhibe en mayor o menor grado la fermentación láctica (AMIOT, 1991).

En el mismo sentido, se ha destacado, que la producción de productos fermentados es la más afectada cuando están presentes en la leche residuos de antibióticos, provocando grandes pérdidas por los cambios en su calidad y el consiguiente daño económico para el productor (ALAIS, 1985). MAGARIÑOS (2000), señala además que las bacterias empleadas en la fabricación de yogurt, *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* resultan ser unas de las más sensibles a los antibióticos; por otra parte, las bacterias por efecto de los antibióticos presentan cambios morfológicos pudiendo conducir a una situación en que los cultivos iniciadores sean reemplazados por microorganismos indeseables, provocando la inutilización del producto o convirtiendo a éstos en peligrosos para el consumo. ALAIS (1985), señala que las bacterias lácticas, especialmente estreptococos son muy sensibles a los antibióticos utilizados en medicina veterinaria; cuando ellos son inhibidos se retrasa la acidificación. Por otra parte, las bacterias Gram negativas son más resistentes, especialmente las del grupo *E. coli*, las que pueden desarrollarse rápidamente y provocar alteraciones muy graves.

El problema derivado de la presencia de antibióticos en la leche, no se resuelve con los tratamientos térmicos a los cuales es sometida, es así como su pasteurización sólo destruye un 8% de la penicilina presente y requiere de

temperaturas tan elevadas como 100°C durante 30 minutos para que su destrucción sea del 50%. Respecto a otros antimicrobianos, tales como estreptomina, neomicina, clortetraciclina, oxitetraciclina y cloranfenicol, la pasteurización tiene nulos efectos en términos de destrucción o inactivación de los residuos de antibióticos (MAGARIÑOS, 2000).

Entre otros efectos secundarios inducidos por el uso de antibióticos por vía intramamaria en el tratamiento de mastitis, HOEBEN *et al.* (1998), describen que estos pueden afectar la función y concentración que pueden alcanzar los neutrófilos en la glándula mamaria producto de repetidas administraciones locales.

BIGGS (2002), en una revisión acerca del uso de antibióticos en mastitis clínica y subclínica, concluye que junto a los efectos positivos del empleo de éstos se deben mencionar, incremento en la posibilidad de establecer terapia exitosa frente a infecciones, particularmente por gérmenes Gram positivos, reducción en la excreción de bacterias en la leche, mayor rapidez en la resolución de los signos clínicos, mejoría en la calidad de la grasa, lactosa y caseína de la leche y reducción de infecciones recurrentes, también se deben tener en cuenta y valorar los aspectos negativos. Entre estos últimos destacan, costos del tratamiento, pérdidas por contaminación de leche, riesgos de incrementar resistencia bacteriana a los antibióticos, respuestas no siempre satisfactorias frente a infecciones por gérmenes Gram negativos.

NICKERSON (2002), comenta que se han planteado alternativas para evitar el uso o potenciar la acción de los antibióticos, señalando el uso de oxitocina, corticoides, solución salina hipertónica, probióticos y productos homeopáticos, entre otros, sin que ninguno de ellos haya dado resultados convincentes; quedando por lo tanto, abiertas las posibilidades al empleo de nuevos recursos terapéuticos.

2.5.2 Dipping para el control de la mastitis. KRUIZE (1998), entre las sugerencias orientadas a prevenir la mastitis, recomienda que inmediatamente después de finalizada la ordeña y retiradas las pezoneras, se deben desinfectar todos los pezones con una solución antiséptica apropiada y de eficacia probada. Existen numerosas evidencias, en distintos países, respecto a que la desinfección de los pezones post ordeña, práctica conocida como "dipping", es capaz de reducir entre un 50-90% las neo-infecciones intramamarias causadas por patógenos contagiosos, constituyendo por lo tanto, la medida higiénica individual más importante en un programa de control de mastitis.

De acuerdo a la experiencia de Bramley y Dodd, citados por KRUIZE (1998), se ha demostrado que la contaminación de los pezones con bacterias patógenas puede originar una infección intramamaria y causar mastitis; es por ello que la práctica del "dipping" es recomendable porque destruye las bacterias que quedan en el pezón después de la ordeña, previniendo y potenciando la cura de las lesiones de la piel del pezón. Reduce considerablemente la colonización bacteriana del orificio del pezón y deja un residuo del germicida en la punta de éste. De esta forma, protege del riesgo de contaminación a la vaca cuando ésta sale del recinto de ordeña, estando aún abierto el conducto del pezón. En los rebaños donde no se practica "dipping", las lesiones del pezón se transforman en una importante fuente de infección, especialmente por *S. aureus*, y de este modo, las vacas mantienen su propio reservorio de patógenos mamarios, no siendo necesaria la ordeña como mecanismo para que se produzca una neo-infección.

El método convencional de aplicación de la solución desinfectante, es la inmersión de los pezones en algún tipo de copa o aplicador que contenga el producto. El diámetro y profundidad de este receptáculo debe asegurar una cobertura total del pezón, permitiendo una adecuada desinfección de la piel y penetración al sitio donde se encuentran las lesiones del pezón. Para este

efecto, es recomendable una profundidad de 10 cm y un diámetro de 5,5 cm, de acuerdo a lo señalado por Shearn, citado por KRUZE, (1998).

Según Pankey *et al.*, y Saran, ambos citados por KRUZE (1998), entre los productos más utilizados para "dipping" post ordeña, se encuentran los compuestos yodados (yodóforos con 0,1-1,0% de yodo disponible), compuestos clorados (hipoclorito de sodio con 0,1-4,0% de cloro disponible) y clorhexidina (0,35-0,55% gluconato de clorhexidina). Por otra parte, muchos otros productos han sido utilizados en diferentes países, entre ellos, amonio cuaternario, ácido dodecil bencil sulfónico, ácido peracético, glutaraldehído, nisina, ambicina N y ambicina L.

2.5.3 La miel como agente terapéutico. En los últimos años se ha reconocido el valor terapéutico de la miel en el tratamiento de distintas enfermedades, lo cual hace necesario disponer de información acerca de sus principales propiedades y características físico-químicas.

2.5.3.1 Definición de miel: “Se entiende por miel a la sustancia dulce producida por las abejas obreras a partir del néctar de las flores o de exudaciones de otras partes vivas de las flores o presentes en ellas, que dichas abejas recogen, transforman y combinan con sustancias específicas y almacenan después en panales” (BIANCHI, 1990).

2.5.3.2 Producción y cosecha de la miel. En el “Manual suizo de alimentos comestibles” (MANUEL SUISSE DES DENREES ALIMENTAIRES, 2003), se describe este proceso destacando los siguientes aspectos: La transformación desde el néctar a la miel es un proceso de concentración en el que se reduce el contenido de agua desde un 70-92% hasta un 17% aproximadamente. Se trata de un proceso físico y químico, en el que se reduce la sacarosa, transformándose en fructosa y glucosa mediante la enzima invertasa que está presente en la saliva de las abejas. Este proceso lo inicia la abeja recolectora,

la cual con su buche completo de néctar y mezclado con invertasa, al llegar a la colonia lo traspasa a una obrera almacenadora, la que a su vez, también lo almacena en el buche aumentando hasta en 20 veces la concentración de invertasa. Debido a que en el interior de la colonia la temperatura es elevada, se produce una deshidratación natural del néctar. Este traspaso del néctar, con sucesivas mayores concentraciones entre las distintas obreras de la colonia, finaliza cuando la última obrera lo deposita en una celdilla, a un tercio de su capacidad. En su interior continúa el proceso enzimático y el néctar pierde agua hasta que completa su maduración. Una vez madurada, la obrera añade el segundo tercio continuando de esta forma el proceso hasta su completa elaboración, momento en el cual la celdilla es operculada.

2.5.3.3 Características organolépticas y físico-químicas de la miel de abeja. Dependiendo del sitio y variedades de plantas de las cuales las abejas extraen el néctar, la miel tendrá diferentes características en lo referente a color, olor y sabor (LESSER, 2001). Por otra parte, el contenido de azúcar invertido será distinto, si se compara la miel de flores con la miel de ligamasa o mielada, con concentraciones de azúcar cercanas al 60 y 70% respectivamente (GARCÍA *et al.*, 1986).

Debido a que la miel es una solución saturada, la mayoría de ellas cristalizan a temperatura normal, siendo su grado de cristalización inversamente proporcional a la concentración de agua, y por otra parte, producto de su elevado poder higroscópico puede retener humedad, propiedad deseable para usos en pastelería y panadería (KRELL, 1996). La baja tensión superficial de la miel permite que sea un excelente humectante incorporado a productos cosméticos, probablemente condicionado por sus sustancias coloidales, las que también varían de acuerdo al origen de la miel (KRELL, 1996).

La miel también contiene proteínas, aminoácidos, ácidos orgánicos, sustancias minerales, polen y otras sustancias; pudiendo además contener sacarosa,

maltosa, melicitosa y otros oligosacáridos como dextrinas, así como también, vestigios de hongos, algas, levaduras y partículas sólidas que resultan del proceso de obtención de la miel (BIANCHI, 1990).

Las funciones de las principales enzimas presentes en la miel se muestran en el CUADRO 4.

CUADRO 4 Principales enzimas presentes en la miel.

ENZIMAS	FUNCIÓN
Invertasa	Convierte la sacarosa en glucosa y fructosa
Amilasa o Diastasa	Hidroliza el almidón a dextrinas y/o azúcares
Glucosa oxidasa	Convierte la glucosa a gluconolactona, la cual se convierte en ácido glucónico y peróxido de hidrógeno
Catalasa	Convierte al peróxido en agua y oxígeno
Fosfatasa ácida	Remueve fosfatos inorgánicos a partir de fosfatos orgánicos

FUENTE: NATIONAL HONEY BOARD (1996).

2.6 Miel y su uso en medicina

La miel ha sido empleada como recurso terapéutico en la práctica médica tradicional por muchas culturas desde tiempos antiguos, entre otras por los egipcios, de cuyas experiencias han quedado testimonios en muchos papiros (OVINGTON, 1999).

En los últimos años, la miel ha sido redescubierta como un arma terapéutica y aceptada como un agente antibacteriano para el tratamiento de úlceras y otras

afecciones de la piel originadas en heridas expuestas o quemaduras infectadas (MOLAN, 1992b).

En una revisión realizada por MOLAN (1992a), se destaca que en 1937 Dold, *et al.* dieron el inicio a intensos estudios acerca de la actividad antibacteriana de la miel y designaron con el nombre de “inhibina” a la sustancia que tenía esas propiedades terapéuticas.

El peróxido de hidrógeno generado en la miel, es el responsable de alguno de los efectos terapéuticos observados en el tratamiento de las heridas, así como también de su conocida actividad antibacteriana, estimulando además el crecimiento de las células responsables del reemplazo del tejido dañado (MOLAN, 2000).

De acuerdo a lo descrito por FENNEMA (1993) y KERKVLIT (1996), la actividad antibacteriana que posee la enzima glucosa oxidasa, se debe a que al ser diluida la miel con el agregado de agua, da origen a peróxido de hidrógeno de acuerdo a la reacción siguiente:



Otros factores que explican las propiedades terapéuticas de la miel incluyen, su elevada presión osmótica, baja actividad de agua, pH bajo, contenido bajo en proteínas, elevada relación carbón/nitrógeno, bajo potencial óxido-reducción condicionado por su alto contenido de azúcares reductores, su propiedades de viscosidad que limita la disolución de oxígeno y otros agente fotoquímicos (MOLAN, 1992a). El mismo autor, ha hecho una extensa revisión acerca de las investigaciones relacionadas con el estudio de las propiedades antimicrobianas de la miel, y de ellos destaca los siguientes aspectos:

- La miel es una solución con una baja actividad de agua (a_w), lo cual hace que esté disminuida su disponibilidad para el crecimiento de bacterias y levaduras. Algunas especies crecen con a_w entre 0,94 y 0,99; en cambio

esta actividad en la miel madura es de 0,56 a 0,62, no favoreciendo por lo tanto, el desarrollo de levaduras. Las mieles diluidas, al tener una actividad de agua más elevada, no serían efectivas para inhibir el desarrollo de aquellas bacterias que crecen con mayor rapidez en un medio con aw de 0,99.

- La acidez natural de la miel inhibiría el desarrollo de muchos patógenos. El valor mínimo de pH para el crecimiento de algunas especies que comúnmente infectan las heridas está en rangos de 4,0 a 4,5. La dilución de la miel, especialmente con fluidos corporales, elevaría el pH y en esas condiciones perdería su efectividad antibacteriana.
- La glucoxidasa, es una enzima que se encuentra en la miel, siendo secretada por las abejas luego de ser sintetizada a partir del néctar. Esta enzima convierte a la glucosa en presencia de agua y oxígeno en ácido glucónico más peróxido de hidrógeno. La acidez resultante y el peróxido de hidrógeno preservan y esterilizan a la miel durante el proceso de maduración. La dilución de la miel incrementa entre 2.500 y 50.000 veces la actividad de esta enzima y la convierte en un antiséptico de liberación lenta sin provocar daño al tejido.
- Los sistemas que generan peróxido en la miel, no explican el total de su actividad antibacteriana, por lo que sería la presencia de una serie de otras sustancias en pequeñas cantidades, las que contribuirían a potenciar dicha acción. Apoyan la existencia de estos componentes, con actividad distinta a la del peróxido, los reportes que señalan que la miel conserva su actividad antibacteriana luego de ser sometida a la acción del calor para inhibir la actividad enzimática de la miel.

En estudios recientes realizados en Malasia por ALJADY y JUSSOF (2003), se investigaron las propiedades antibacterianas de componentes distintos a la

peroxidasa, los que también se encuentran presentes en la miel. Los autores concluyen que los ácidos fenólicos son responsables, al menos en parte, de dicha actividad antibacteriana.

La eficacia terapéutica de la miel administrada por vía oral y su aplicación tópica en la curación de heridas provocadas en ratas, fue estudiada por ALJADY *et al.* (2000). Evaluaron la curación de las heridas, midiendo la velocidad de reducción y regeneración de tejido, cuantificando además, el ácido urónico, hexosamina, DNA y contenido de colágeno en tejido de granulación y, a su vez, compararon estos resultados con los obtenidos en animales control que sólo recibieron solución salina. Se demuestra en este estudio, que la miel estimula la función de los fibroblastos (células cicatrizantes), incrementa la síntesis de glucosaminoglicanos y el depósito de glicógeno. También aumenta la velocidad de contracción y regeneración del tejido, habiendo mejorado por otra parte, el estado nutricional de los animales que recibieron miel por vía oral.

Estos resultados son concordantes con publicaciones de MOLAN (2001), quien señala respecto a la efectividad de la aplicación tópica de la miel en el tratamiento de heridas y quemaduras, que ésta se manifestaría por: “proporcionar una humedad de curación ambiental adecuada, una rápida limpieza de la infección, junto con la reducción de la inflamación y exudación de fluidos; todo esto aumentaría la velocidad de curación por estimulación en la formación de nuevos vasos sanguíneos, granulación y mayor velocidad en la formación de epitelio en los tejidos, con excelentes resultados cosméticos”.

ASADI-POOYA *et al.* (2003) estudiaron *in vitro*, la sensibilidad de una *Mycobacteria* causante de tuberculosis a la acción bactericida de miel a distintas concentraciones. Demostraron que la bacteria no creció en medios de cultivo con concentraciones de miel entre 10 y 20%, en cambio sí hubo desarrollo a concentraciones de 1; 2,5 y 5%. Con estos resultados, los autores

concluyen que la miel por tener una buena actividad antibacteriana, un bajo costo y por su fácil disponibilidad, surge como un agente antibacteriano ideal.

La capacidad antibacteriana de la miel para inhibir el desarrollo de distintas cepas de gérmenes Gram positivos y negativos, fue estudiada por JEDDAR *et al.* (1985), en pruebas experimentales *in vitro*, encontrando que el desarrollo de las bacterias se inhibió cuando fueron expuestas a concentraciones de miel de 40% o superiores a éstas.

COOPER *et al.* (1999), compararon la actividad antibacteriana de miel de manuka versus miel polifloral contra cepas de *S. aureus* coagulasa positivas, las que fueron obtenidas de heridas infectadas. Encontraron que hubo pequeñas diferencias en las concentraciones de miel necesarias para inhibir el desarrollo bacteriano, siendo ellas de 2 a 3% y 3 a 4% (v/v), para miel de manuka y polifloral, respectivamente. Destacan los autores, que la miel polifloral, con propiedades para generar peróxido de hidrógeno, y la miel de manuka con factores antibacterianos fotoquímicos que son diferentes al peróxido, ambas empleadas a bajas concentraciones, son igualmente efectivas para controlar el desarrollo de este tipo de bacterias.

MOLAN y ALLEN (1996), evaluaron el efecto que sobre la actividad antibacteriana de la miel tienen métodos de esterilización, tales como la irradiación gamma. La miel fue testada contra *S. aureus*, demostrándose que ésta no perdía su actividad antibacteriana al ser previamente irradiada con dosis de 25 y 50 Gy.

La administración de miel por vía oral, sin tratamientos de esterilización previa, puede representar riesgos para la salud humana, en el caso que ésta sea portadora de esporas de *Clostridium botulinum* (DE CENTORBI *et al.*, 1997); pudiendo en estos casos, provocar botulismo infantil en niños menores de un año, debido a que a esta edad la capacidad de defensa y filtro específico de la

mucosa intestinal es insuficiente, favoreciendo con ello el desarrollo de la bacteria (FENICIA *et al.*, 1993).

MULU *et al.* (2004), estudiaron *in vitro*, la actividad antibacteriana de dos muestras de miel empleadas a distintas concentraciones, sobre gérmenes patógenos que con mayor frecuencia se encuentran en seres humanos. Las bacterias evaluadas fueron: *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Salmonella Typhi*, *Shigella shiga*, *Klebsiella aerogenes*, *Proteus vulgaris* y *Proteus mirabilis*. Los autores encontraron que las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de miel, para el 90% de los gérmenes testeados, se lograron con concentraciones de 6,25% (v/v) y 7,5% (v/v) para *P. aeruginosa*. Por otra parte, las concentraciones bactericidas mínimas (CBM) de miel para el 70% de los organismos estudiados se obtuvieron con concentraciones de 6,25% (v/v). Las CBM de miel para *S. shiga* (germen test estándar) y *P. aeruginosa* (tanto en aislamiento clínico como de control) fueron de 7,5% (v/v). Se concluye, que la miel producida por las abejas *Apis mellifera*, posee actividad bacteriostática y bactericida cuando es testada *in vitro*.

MUNDO *et al.* (2002), evaluaron *in vitro* la actividad antimicrobiana de dos variedades americanas de miel, frente a seis patógenos y seis microorganismos esporulados que habitualmente están presentes en alimentos. Con las dos variedades de miel se demostró actividad antibacteriana, tanto peroxidásica como no peroxidásica, la que varió sólo de acuerdo a la fuente floral. Los dos tipos, "Tarwood" y "Montana buckwheat" respectivamente, fueron efectivos para impedir el desarrollo de *Listeria monocytogenes* con diluciones de 1:4 y 1:8 respectivamente. A mayores concentraciones, ambos tipos de miel impidieron el desarrollo de *Lactobacillus*, *Bacillus*, *E. coli* y *Salmonella*; requiriendo concentraciones aún mayores para *E. coli* y *Salmonella* con la variedad "buckwheat". Por lo tanto, se puede deducir, que la actividad antimicrobiana parece variar de acuerdo al tipo de bacterias, siendo necesaria miel con altas concentraciones de azúcar para inhibir el desarrollo de bacterias Gram

negativas. Por otra parte, los niveles umbrales requeridos son diferentes para prevenir el desarrollo de bacterias Gram positivas. En base a estos antecedentes, los autores sugieren que la adición de miel a los alimentos pudiera aumentar su estabilidad, sin requerir el uso de otros preservantes.

NZEAKO y HAMDI (2000), realizaron un estudio orientado a evaluar la efectividad antibacteriana de la miel, usando como organismos estándar a cepas de *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*, las que fueron expuestas a la acción de muestras de miel previamente sometidas a la acción de temperaturas entre 2 y 8°C durante seis meses y otras a temperaturas de ebullición durante 15 minutos. El estudio mostró, que al igual que lo que acontece con los antibióticos, hay variabilidad entre los diferentes gérmenes en cuanto al grado de sensibilidad y resistencia a la acción del calor. Por otra parte, los autores destacan que la actividad antibacteriana de la miel no se afecta necesariamente por la acción de temperaturas bajas o elevadas, lo cual estaría demostrando que dicha actividad no dependería sólo de sus componentes termolábiles, como lo son el ácido ascórbico y los componentes enzimáticos.

La actividad antifúngica de la miel fue evaluada por THEUNISSEN *et al.* (2001), al estudiar su efecto sobre el desarrollo de *Cándida albicans* empleando concentraciones de miel desde 0 hasta 25% (v/v); encontrando que con concentraciones de 25% se logra inhibir su crecimiento en un 29,4%.

En medicina humana, cada vez aparecen nuevas publicaciones que dan a conocer la experiencia clínica referida al uso de la miel como recurso terapéutico. VARDI *et al.* (1998), presentaron su experiencia en relación a nueve niños que fueron sometidos a cirugía en el período de recién nacido y cuyas heridas sufrieron infecciones. En ellos hubo fracaso al tratamiento antibiótico clásico y al empleo de clorhexidina tópica en solución al 0,05% (v/v). En uno de los niños se evidenció notable mejoría al cabo de 5 días de tratamiento, mediante la aplicación de volúmenes, entre 5 y 10 mL dos veces al

día, de miel fresca no procesada sobre la herida. Las heridas cerraron en todos los niños después de 21 días de tratamiento, sin que se evidenciaran reacciones adversas al tratamiento.

En un estudio de ALLEN y MOLAN (1997), se evaluó la sensibilidad a la actividad antibacteriana de la miel de siete especies de bacterias consideradas como las causantes más frecuentes de mastitis bovina. Se observó, que el crecimiento de las siete especies estudiadas fue completamente inhibido por la acción de miel clásica, con una actividad antibacteriana atribuible a su contenido de peróxido de hidrógeno, empleando concentración de miel al 10% (v/v) sobre placas de agar y en dos de ellas con concentraciones al 5%. Por otra parte, seis de las especies fueron completamente inhibidas en presencia de miel de manuka, con actividad antibacteriana atribuible al contenido de componentes distintos al peróxido, en concentraciones al 5% (v/v). Sólo una de las especies fue inhibida por la acción de miel artificial al 10%. Los autores destacan, por otra parte, que debido a que la miel es inofensiva para los tejidos, sería de interés evaluar su uso en el tratamiento de la mastitis clínica, considerando sus aparentes nulos efectos secundarios.

La sensibilidad a la acción de la miel por parte de 44 cepas de *P. aeruginosa* multiresistentes a drogas y aisladas de quemaduras infectadas, fue evaluada por SUBRAHMANYAM *et al.* (2003). Para todas las cepas se demostró que fueron sensibles a la acción de la miel, obteniéndose concentraciones inhibitorias mínimas con concentraciones de miel al 25% para todas ellas; en 39 cepas las concentraciones requeridas fue de 20%; y finalmente en 15 y 3 cepas las concentraciones de miel requeridas fue de 15% y 10% respectivamente. Se plantea en este estudio, que la miel siendo de fácil obtención y sin efectos tóxicos, debiera ser considerada como un recurso en el tratamiento de quemaduras infectadas.

DOMINGO y LÓPEZ (2003), resumen los fundamentos para la utilización de la miel en el tratamiento de heridas infectadas, basados en las siguientes razones: “Proporciona una barrera protectora que previene la infección de la herida; promueve un ambiente húmedo que permite que la piel crezca sin formar cicatriz; la miel estimula el crecimiento del tejido fino bajo la piel, y tiene acción antiinflamatoria que reduce la hinchazón y el dolor; también mejora la circulación, lo que acelera la curación; y actúa como desinfectante, eliminando las bacterias que pueden infectar las heridas”.

Por otra parte, también existen estudios orientados a evaluar la utilidad de la miel en enfermedades digestivas. SOMAL *et al.* (1994), teniendo en cuenta que *Helicobacter pylori* es una bacteria que juega un rol importante en la generación de úlcera gástrica y duodenal, estudiaron su sensibilidad a la acción antibacteriana de miel de manuka. Demostraron que el desarrollo de la bacteria se inhibía con concentraciones de miel al 20% (v/v), pero que esta inhibición no ocurría a concentraciones tan bajas como al 5%.

Estudios realizados en ratas por ALI *et al.* (1997), respecto al rol que juega la miel para prevenir la disminución en la irrigación de la mucosa gástrica y su eventual riesgo de hemorragia, fueron positivos. Se señala que esta acción podría ser atribuida a su efecto antioxidante sobre la mucosa, cumpliendo una función semejante a la acción del sucralfato, medicamento actualmente en uso para el tratamiento de gastritis y úlcera gástrica.

En otro aspecto, la miel podría ser de utilidad para el tratamiento del estreñimiento en individuos normales, dado que tiene reconocido efecto laxante, probablemente debido a la absorción incompleta de la fructosa a nivel intestinal (LADAS *et al.*, 1995).

3. MATERIAL Y MÉTODO

3.1 Muestras y materiales

El estudio se realizó en el Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICYTAL), Laboratorio de Microbiología y Fundo Santa Rosa, todas dependencias de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile, en Valdivia.

3.1.1 Muestreo. Para la toma de muestras se seleccionaron 10 vacas Frisón Negro del fundo Santa Rosa, con distinto grado de mastitis y sin tratamiento antibiótico y 3 vacas sanas sometidas a dipping con solución yodada, las que fueron utilizadas como grupo control. De cada vaca se obtuvieron muestras de leche semanalmente durante tres semanas, con tres repeticiones cada una, todo lo cual reportó un total de 156 muestras.

El diagnóstico de mastitis fue realizado por el funcionario que desempeña las funciones de Jefe de ordeña en el fundo Santa Rosa, mediante la aplicación del Mastitis California Test (CMT). Las vacas con mastitis fueron sometidas a la aplicación de dipping con miel en solución al 30% (p/p) sobre sus pezones, realizándose dos aplicaciones diarias después de cada ordeña durante todo el período de estudio.

3.1.2 Equipos y materiales. Se utilizaron los siguientes equipos y materiales, todos ellos proporcionados por el Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos: Baño termorregulador de $45 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, estufa de incubación de $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$, campana de flujo laminar, microscopio Leica Modelo DM/LS serie 199227, placas petri de 9 y 14 cm de diámetro, tubos de ensayo de 10 y 20 mL, pipetas de 0,1, 1 y 10 mL, portaobjetos de microscopio.

La miel utilizada en el estudio correspondió a la cosecha en Marzo del año 2004 y Febrero del año 2005 y provino de la localidad de Futrono, situada en la zona pre-cordillerana de la Décima Región de Chile, área en la que la flora predominante es el ulmo (ANEXO 1). La miel se encontraba envasada en potes plásticos de 650 g y no fue sometida a tratamientos térmicos previos a su empleo.

3.1.3 Reactivos. Los reactivos requeridos fueron caldo soya triptica, agar, buffer fosfato de sodio, colorante Newman Lambert.

3.2 Diseño experimental

En el CUADRO 5 se presentan los diseños experimentales de la prueba preliminar, la que fue desarrollada para comprobar la capacidad antibacteriana de la miel en tres vacas con mastitis, así como también la prueba de inhibición sobre una cepa bacteriana causante de mastitis y el grado de disminución del recuento de células somáticas de leche de 10 vacas con mastitis.

CUADRO 5 Diseño experimental para cada etapa del estudio.

	MUESTRA	FACTOR	VARIABLE DE RESPUESTA
Prueba de inhibición bacteriana	Solución de miel al 30% (p/p)	<i>Staphylococcus aureus</i> 2-Sa (M.O. sensible)	Halo de inhibición
Recuento de células somáticas en 3 vacas con mastitis (preliminar)	Vacas 1 2 3	<ul style="list-style-type: none"> • Tiempo (días) • Vacas tratadas con solución de miel (3) 	Porcentaje de disminución en recuento células somáticas
Recuento de células somáticas en 10 vacas con mastitis	Vacas 1 . . . 13	<ul style="list-style-type: none"> • Tiempo (semanas) • Vacas tratadas con solución de miel (10) • Vacas sanas tratadas mediante aplicación de dipping con solución yodada y no sometidas a solución de miel (3) 	Porcentaje de disminución en recuento células somáticas

3.3 Prueba preliminar de estudio de capacidad antibacteriana de la miel

En el estudio se utilizaron soluciones de miel al 30% (p/p), dilución a la cual, de acuerdo a lo señalado por Crane, citado por MONTESINOS (2001), se ha logrado establecer que ésta mantiene rangos de concentración de azúcar que permiten que la enzima glucosa oxidasa tenga su mayor grado de actividad.

Se midió el grado de efectividad que la miel diluida al 30% (p/p) tiene sobre la reducción de las células somáticas en leche procedente de cada una de las vacas estudiadas. Esta solución se aplicó dos veces al día durante 8 días mediante el método de dipping, en 3 vacas con mastitis (CUADRO 4). Para el recuento de células somáticas se utilizó el Método Microscópico de Referencia NCh 1746. Of 1998 (CHILE, INN 1998), (ANEXO 2).

Los muestreos de la etapa preliminar se realizaron los días 12, 17 y 20 de Enero del año 2005.

3.4 Efectividad de miel diluida al 30% (p/p) en la inhibición *in vitro* de cepa causante de mastitis

En el estudio se trabajó con la cepa de *Staphylococcus aureus* 2-Sa, proveniente del cepario del laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

3.4.1 Preparación de cepa bacteriana para la prueba de inhibición. La cepa de *Staphylococcus aureus*, aislada de mastitis bovina, se sembró por medio de un asa en un tubo que contenía 10 mL de caldo soya tripticasa, luego se incubó durante 48 horas a 36°C, hasta lograr observar turbidez en el caldo. Posteriormente, se realizó el traspaso de 0,1 mL de muestra a un tubo que contenía 10 mL de caldo soya tripticasa, procediéndose a incubar nuevamente a 36°C durante 24 horas. Al término del período de incubación, se hizo un recuento bacteriológico del cultivo (ANEXO 3).

3.4.2 Preparación de la dilución de miel. Para la obtener la solución de miel al 30% (p/p) se utilizó agua destilada.

3.4.3 Análisis de inhibición del desarrollo bacteriano. Para este procedimiento, se aplicó el método de difusión en agar descritos por AHN y STILES (1990) y MOLAN (1992a). Se utilizaron placas de 14 cm de diámetro, conteniendo 48 mL de agar soya tripticasa; en cada una de ellas se hicieron pocillos de 8 mm de diámetro empleando un sacabocado artesanal de acero inoxidable estéril, los que luego fueron sellados con una gota del mismo medio de cultivo. En cada pocillo se depositaron 100 μ L de solución de miel diluida al 30% (p/p), dejándose difundir durante 2 horas. El cultivo se obtuvo mediante la inoculación de una muestra equivalente a 1,7 mL de un cultivo de 24 horas de la cepa de *Staphylococcus aureus* 2-Sa, (3.4.1), la que fue previamente diluida en buffer fosfato hasta lograr un césped bacteriano de 10^5 ufc/mL, en un tubo que contenía 17 mL de agar Soya Tripticasa semi-sólido con una concentración de agar del 0,75% (ANEXO 3).

Una vez transcurrido el tiempo de difusión de la solución de miel en los respectivos pocillos, las placas se cubrieron con el césped del microorganismo en estudio y luego se incubaron a 36°C por un tiempo suficiente hasta lograr la visualización de halo de desarrollo.

3.4.4 Control de la concentración del cultivo. Luego de inoculada la cepa en caldo soya tripticasa e incubada a 36°C durante 24 horas, se realizó una tinción de Gram para verificar la pureza del cultivo. Posteriormente, se hicieron diluciones en buffer fosfato, para luego proceder a sembrar las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} en agar soya tripticasa. Las placas fueron incubadas a 36°C durante 24 horas, posterior a lo cual se procedió a realizar el recuento de *S. aureus* (ANEXO 3).

3.4.5 Medición de la inhibición. Para cuantificar la inhibición, se midió el halo alrededor del pocillo, considerándose como tal al espacio de radio anular existente entre el borde del pocillo y el borde externo del halo (FIGURA 2).

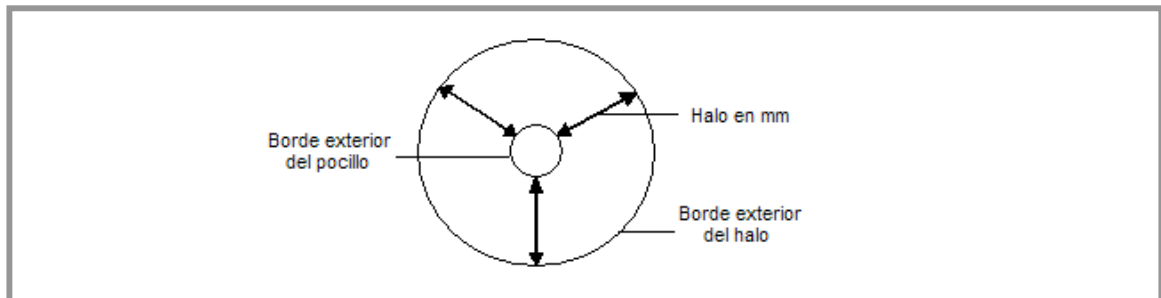


FIGURA 2 Medición del halo de inhibición.

FUENTE: MONTESINOS (2001).

Las mediciones de los halos se efectuaron luego de transcurridas 24 horas de incubación de las placas. Se realizaron tres mediciones de cada uno de los halos, utilizando para ello un pie de metro y expresando los resultados en milímetros.

3.5 Grado de disminución del recuento de células somáticas en leche de diez vacas con mastitis tratadas con dipping utilizando solución de miel al 30% (p/p)

Se aplicó un diseño experimental en bloques de 13 x 3 x 9, correspondiendo a diez muestras de leche procedentes de cada vaca en estudio, con tres repeticiones, las que se tomaron una vez por semana durante 9 semanas, t_0 , t_1 , t_2 , t_3 , t_4 , t_5 , t_6 , t_7 y t_8 . Para su comparación se tomaron tres vacas sanas sin tratamiento antibiótico y sin aplicación de solución de miel, pero sí con solución yodada aplicada mediante el método de dipping. Las muestras de leche se tomaron con la misma secuencia empleada para el caso de las vacas con mastitis (CUADRO 5). Los muestreos de leche de las vacas en estudio se realizaron cada 7 días, de acuerdo al siguiente cronograma:

t_0 = 26 de Abril de 2005

t_5 = 31 de Mayo de 2005

t_1 = 05 de Mayo de 2005

t_2 = 10 de Mayo de 2005

t_3 = 17 de Mayo de 2005

t_4 = 24 de Mayo de 2005

t_6 = 07 de Junio de 2005

t_7 = 14 de Junio de 2005

t_8 = 21 de Junio de 2005

Entre el primer y segundo muestreo existió un intervalo de 10 días por razones de fuerza mayor, no atribuibles al investigador.

Para la obtención de las muestras de leche, se realizó una ordeña manual durante la mañana, eliminando los primeros chorros y recolectando volúmenes de 100 mL para cada muestra.

El recuento de células somáticas se realizó mediante el método de recuento microscópico directo, consultado en Referencia NCh 1746. Of 1998, citado en CHILE, INN (1998), (ANEXO 2).

3.6 Análisis estadístico

Los resultados de los recuentos de células somáticas fueron analizados a través de:

- Promedio y desviación estándar entre las repeticiones para los tiempos del análisis.
- Test de homoscedasticidad de varianzas, para verificar si se puede aplicar test de varianza.
- Análisis de varianza (ANOVA) de una vía, por comparación múltiple de promedios para determinar si existe diferencia estadísticamente significativa entre los tiempos de muestreo.
- Sobre los valores de recuento de células somáticas obtenidos en los diferentes tiempos de muestreo se aplicó la distribución t-student para datos pareados obtenidos en el tiempo inicial y final del estudio.

Se utilizó el programa estadístico Statgraphics Plus versión 5.1 para realizar las pruebas estadísticas.

4. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Estudio preliminar del recuento total de células somáticas en muestras de leche provenientes de tres vacas con mastitis

En el CUADRO 6 se presentan los promedios de recuentos de células somáticas para 3 repeticiones en muestras de leche de 3 vacas con mastitis, al inicio y al término del ensayo utilizando solución de miel al 30% (p/p) mediante el método de dipping, posterior a las ordeñas de la mañana y tarde.

CUADRO 6 Promedios y desviaciones estándar de los recuentos de células somáticas (cél/mL) en leche de 3 vacas con mastitis al inicio y término del estudio preliminar.

CÓDIGO VACA	TIEMPO (DÍAS)	
	TIEMPO 0	TIEMPO 8
1875	4.017.963 ± 141.094,0 (a)	724.220 ± 45.103,9 (b)
1388	9.446.603 ± 93.796,2 (a)	837.253 ± 51.147,4 (b)
1113	2.996.896 ± 42.334,5 (a)	1.658.889 ± 30.333,7 (b)

*Letras distintas en filas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

En la FIGURA 3 se grafica la evolución en el tiempo, de los recuentos de células somáticas realizados en muestras de leche provenientes de las vacas estudiadas, en donde se observa una disminución de 89,51%, 62,56% y 36,09% en el recuento de células somáticas para las vacas 1388, 1875 y 1113 en los primeros 5 días del empleo de solución de miel al 30% (p/p) mediante dipping (ANEXO 5.2). Hubo una disminución menos acentuada para las vacas 1388 y 1113 entre el quinto y octavo día, no así para la vaca 1875, en la que la reducción fue de un 51,86%.

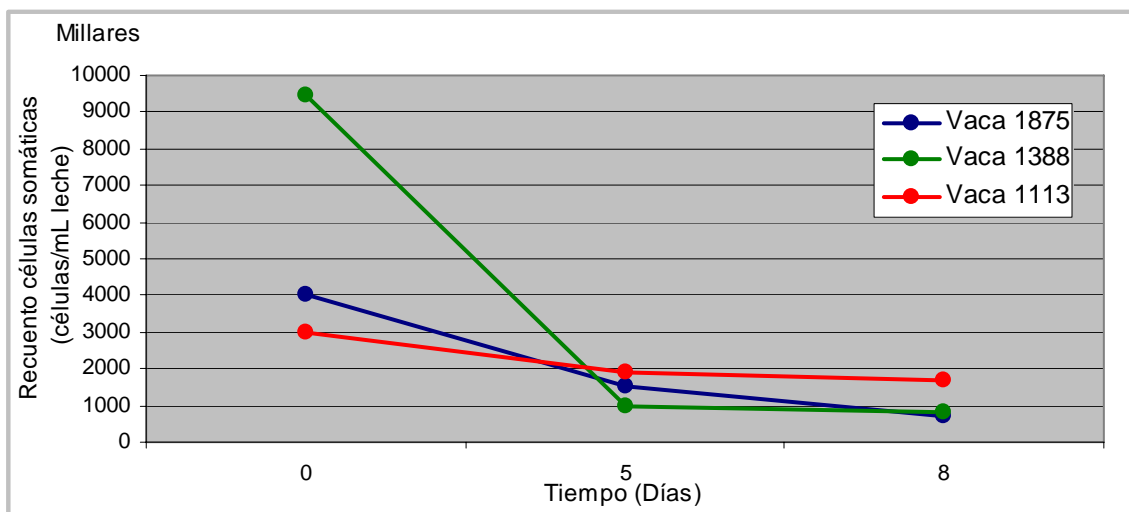


FIGURA 3 Evolución en el tiempo del recuento total de células somáticas (cél/mL) en leche de 3 vacas con mastitis.

Por otra parte, se observó que en la vaca número 1388 el porcentaje de disminución del recuento de células somáticas, atribuible al uso de solución de miel, fue superior en un 26,95% y 53,42% respecto a las vacas número 1875 y 1113 en los primeros 5 días de aplicación de miel.

Realizando una comparación entre los recuentos de células somáticas (cél/mL leche) de vacas con mastitis para el inicio y el final (día 0 y 8 respectivamente) del estudio preliminar, la vaca 1388 es la que presenta mayor grado de disminución comparado con el resto de las vacas con mastitis, siendo ésta de un 91,14%, por otra parte, las vacas 1875 y 1113 presentaron porcentajes de disminución de 81,98 y 44,55 respectivamente (ANEXO 5.3).

El análisis estadístico, aplicando la prueba de t-student, demostró que con un nivel de confianza de 95% se rechaza la hipótesis nula de igualdad de medias entre los recuentos de células somáticas en muestras de leche para el tiempo inicial y final del preensayo para las vacas 1875, 1388 y 1113 (ANEXO 6). Esto demuestra que existe una disminución significativa en el recuento de células somáticas presentes en la leche de todas las vacas al término del preensayo.

4.2 Prueba de inhibición de *Staphylococcus aureus in vitro*.

En el CUADRO 7 se presentan los resultados de la prueba de inhibición de *Staphylococcus aureus* 2-Sa por acción de solución de miel al 30% (p/p), de acuerdo a procedimiento descrito (ANEXO 3).

CUADRO 7 Resultados de la prueba de inhibición *in vitro* con solución de miel al 30% (p/p) sobre la cepa *S. aureus* 2-Sa.

PLACAS	PROMEDIO DIMENSIÓN DE HALO (mm)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
Placa 1	2,78 (a)	0,1905
Placa 2	2,44 (a)	0,1963
Placa 3	2,89 (a)	0,1905

*Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

La inhibición de la cepa de *Staphylococcus aureus* 2-Sa, por acción de la miel *in vitro* no fue total, ya que los halos formados en las placas no fueron completamente transparentes. Esto pudiera ser explicado por la existencia de algún grado de resistencia bacteriana a la acción bactericida de la miel. Además, este desarrollo pudo estar condicionado por la presencia de otros microorganismos en la miel, debido a que ésta no fue sometida a un proceso de esterilización previa para preservar su capacidad inhibitoria por acción enzimática. Al respecto, investigadores como MOLAN (1992b), han señalado que esta propiedad se pierde en forma completa cuando la miel es sometida a la acción de temperaturas de 100°C durante 5 minutos, o si ella es sometida a temperaturas inferiores por tiempos más prolongados. La transparencia parcial de los halos, también podría corresponder a un fenómeno físico condicionado por la viscosidad de la solución de miel. A pesar de las observaciones anteriores, sí fue posible establecer los límites de los halos de inhibición. En este sentido, se debe señalar, que en un estudio realizado por MONTESINOS (2001), ésta no observó total transparencia en los halos de inhibición del desarrollo de una cepa de *Staphylococcus aureus*, en placas tratadas con

solución de miel al 30% (p/p), con una metodología similar a la aplicada en el presente estudio.

El análisis estadístico mostró que no existe diferencia significativa ($p \leq 0,05$) al comparar la magnitud de los halos de inhibición de desarrollo de *Staphylococcus aureus* formados en las placas tratadas con solución de miel (ANEXO 7).

4.3 Estudio en diez vacas con diferentes grados de mastitis y en tres vacas sanas, mediante el recuento de células somáticas en leche

4.3.1 Recuento de células somáticas en leche de vacas sanas. En el ANEXO 8, se presentan resultados promedios y desviaciones estándar del recuento de células somáticas en muestras de leche provenientes de vacas sanas no sometidas a la acción de la solución de miel al 30% (p/p), pero tratadas con solución yodada.

En la FIGURAS 4, 5 y 6 se representan los resultados de los recuentos de células somáticas (cél/mL de leche) medidos en leche de vacas sanas 1655, 1614 y 642 respectivamente, durante las 8 semanas del estudio y cuyo resumen se presenta en el ANEXO 10.1.

En los muestreos de la vaca 1655 se observa que entre el primer y segundo recuento hubo un aumento inicial de células somáticas, seguido por un descenso significativo entre los muestreos 2 y 5, permaneciendo en niveles bajos hasta el término del estudio (FIGURA 4). Los recuentos iniciales pueden ser explicados por factores medioambientales, los que sin embargo no llegaron a condicionar un estado de enfermedad por acción de los mecanismos inmunes del animal, lo cual queda evidenciado por los recuentos bajos en las semanas siguientes. Esta condición de respuesta inmune ha sido señalada por algunos autores como AMIOT (1991).

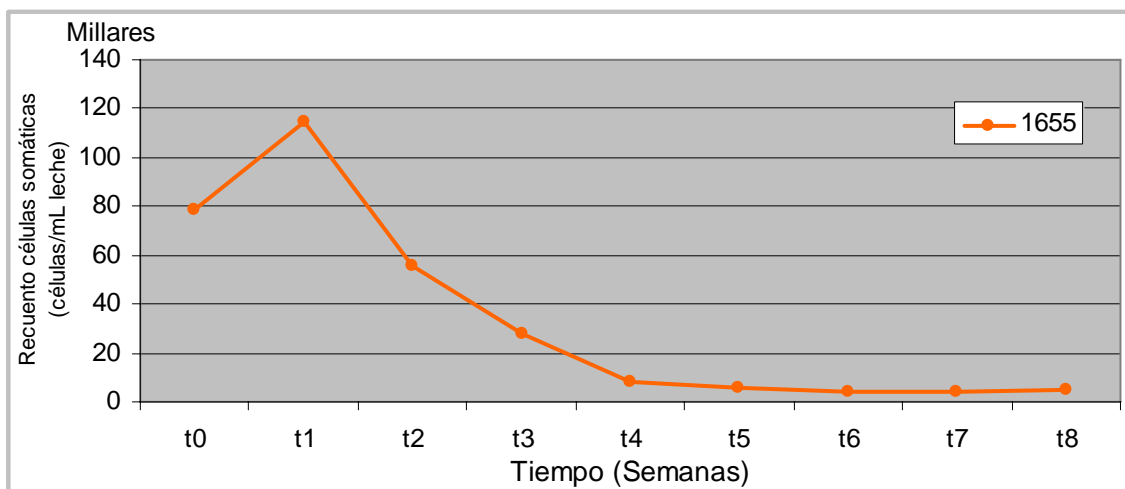


FIGURA 4 Promedio de recuento de células somáticas en leche de la vaca sana número 1655 durante el tiempo total de estudio.

Respecto a la vaca sana 1614, se observa un significativo descenso en el recuento de células somáticas entre el primer y segundo muestreo, con un descenso menos acentuado hasta el cuarto muestreo, a partir del cual se mantiene en recuentos bajos hasta el término del estudio (FIGURA 5).

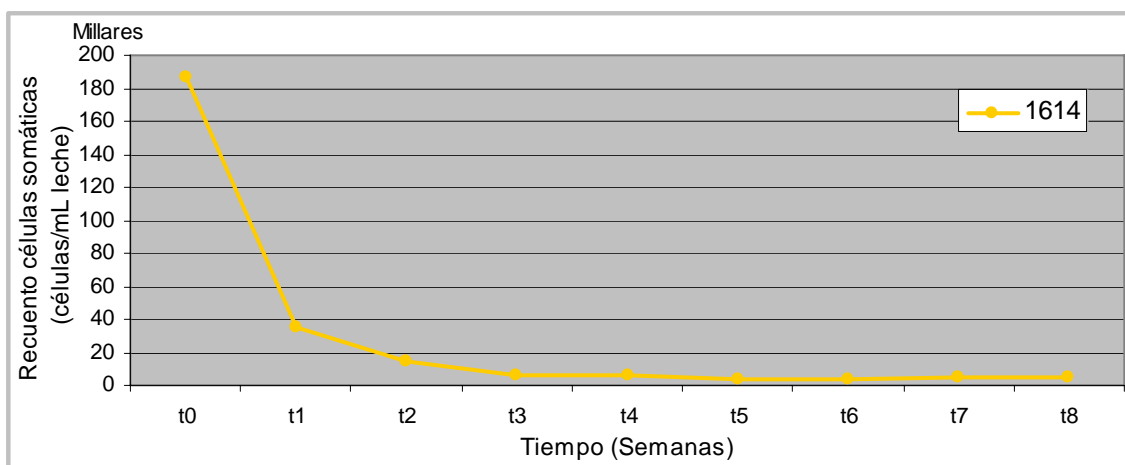


FIGURA 5 Promedio de recuento de células somáticas en leche de la vaca sana número 1614 durante todo el periodo de estudio.

En el muestreo de la vaca 642, hay una disminución gradual del recuento de células somáticas entre el primer y cuarto muestreo, a partir del cual y hasta el séptimo, el recuento celular se mantuvo en niveles bajos, luego del cual se observa un considerable incremento entre el séptimo y octavo muestreo. Este

valor, no congruente con los precedentes, puede ser atribuido a un error en la toma y/o preparación de la muestra, ya que aparece como un valor aislado, que no tiene relación con el recuento realizado una semana después (FIGURA 6).

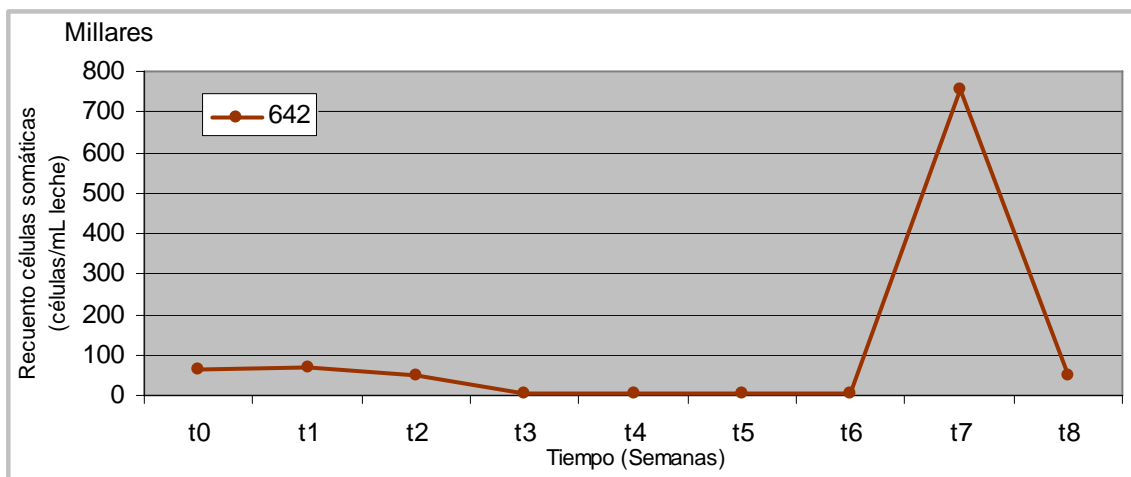


FIGURA 6 Promedio de recuento de células somáticas en leche de la vaca sana número 642 durante el tiempo de estudio.

Los descensos en los recuentos de células somáticas, observados en las tres vacas sanas, las que sólo fueron sometidas a la acción de la solución yodada, pueden ser atribuidos a los mecanismos de defensa ya sea específicos como inespecíficos inherentes a los animales aparentemente sanos, lo cual ha sido descrito por distintos autores, (FITZPATRICK *et al.*, 1998; PYÖRÄLÄ, 2002b; RAINARD, 2003).

El análisis estadístico, utilizando la prueba de t-student ($p \leq 0,05$), demostró que se rechaza la hipótesis nula de igualdad de medias para los recuentos de células somáticas en muestras de leche medidas al inicio y término del estudio, indicando una disminución significativa del recuento celular (ANEXO 11.1).

4.3.2 Grado de variación en el recuento total de células somáticas en leche de vacas con mastitis. En el ANEXO 9, se presenta un cuadro resumen con los resultados promedios y desviaciones estándar de los distintos

recuentos de células somáticas encontradas en muestras de leche de cada una de las vacas con mastitis, medidas semanalmente durante un período de 8 semanas.

En las FIGURAS 7 a 16, se muestra el comportamiento individual del recuento promedio de células somáticas en cada una de las 10 vacas con mastitis durante todo el período de estudio, cuyo resumen se presenta en el ANEXO 10.2.

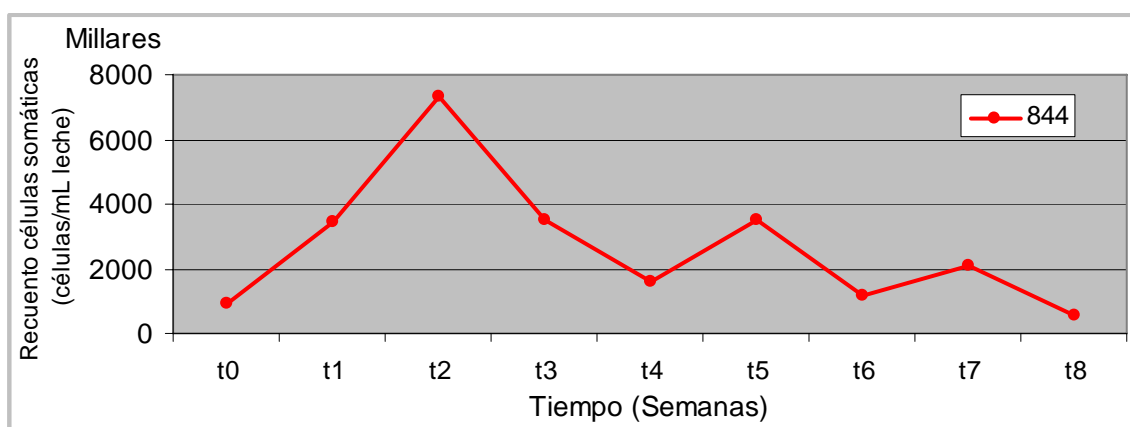


FIGURA 7 Promedio de recuento de células somáticas en leche de la vaca número 844 con mastitis durante el tiempo de estudio.

El recuento promedio de células somáticas de la vaca 844, muestra un alza considerable entre la primera y tercera semana de muestreo. En las siguientes hubo un descenso, pero con algunas fluctuaciones hasta el término del estudio en que estos recuentos fueron significativamente bajos. En la última semana se logró un descenso de un 42,19% en el recuento de células somáticas respecto a los valores del inicio del estudio (CUADRO 8). El ascenso inicial en el recuento celular (FIGURA 7), puede ser explicado por factores ambientales adversos, entre ellos, condiciones de hacinamiento y bajas temperaturas, producidas en un período de latencia respecto al momento del inicio efectivo de la acción de la miel. Al respecto, KRUIZE (1998) señala que entre los factores

que predisponen a la mastitis se pueden encontrar algunos de los antes mencionados.

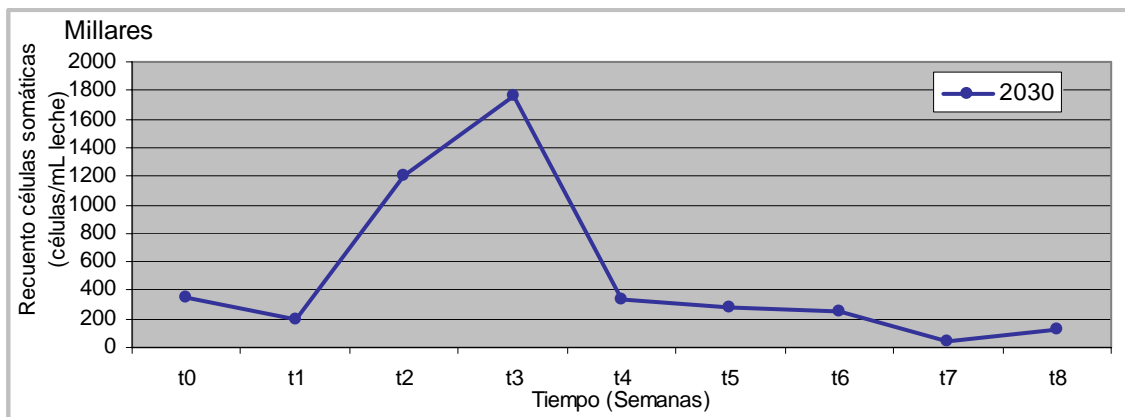


FIGURA 8 Promedio de recuento de células somáticas en leche de la vaca número 2030 con mastitis durante el tiempo de estudio.

En los muestreos de la vaca 2030, se observa una leve disminución del recuento celular en las dos primeras semanas, seguida por un incremento considerable entre la segunda y cuarta semana. Posterior a ello, se produjo una reducción importante en la cuarta y quinta, manteniéndose con un leve descenso en las semanas siguientes (FIGURA 8). La reducción del recuento fue de un 62,68% al comparar la primera y última semana del estudio (CUADRO 8).

El incremento en la segunda semana de muestreo puede ser explicado por condiciones adversas a las que estuvo expuesto el animal, tales como lluvias, heladas y estado de hacinamiento, los que pueden ocasionar algún grado de estrés con la consiguiente disminución de la respuesta inmunológica (AGUADO, 2001). Por otra parte, el pick de recuento observado en el tiempo 3, se podría atribuir al estrés provocado a la vaca, por el corte de energía eléctrica en la sala de ordeña el día previo a este muestreo, debido a que ello retrasó en forma importante los tiempos de ordeña, modificando a su vez las condiciones fisiológicas del animal, condición que también pudo haber afectado a otros animales evaluados en el estudio. En este contexto, KRUIZE (1998) ha descrito

que los factores estresantes pueden interferir con una adecuada ordeña por la liberación de adrenalina, hormona que interfiere con la bajada de la leche al inhibir la oxitocina, dando por resultado una ordeña incompleta y una mayor incidencia de mastitis clínica. Aún cuando esta condición también pudo haber afectado al total de las vacas, se debe tener en cuenta que las respuestas a estímulos externos por parte de los organismos vivos son individuales, las que pueden estar influenciadas por múltiples factores.

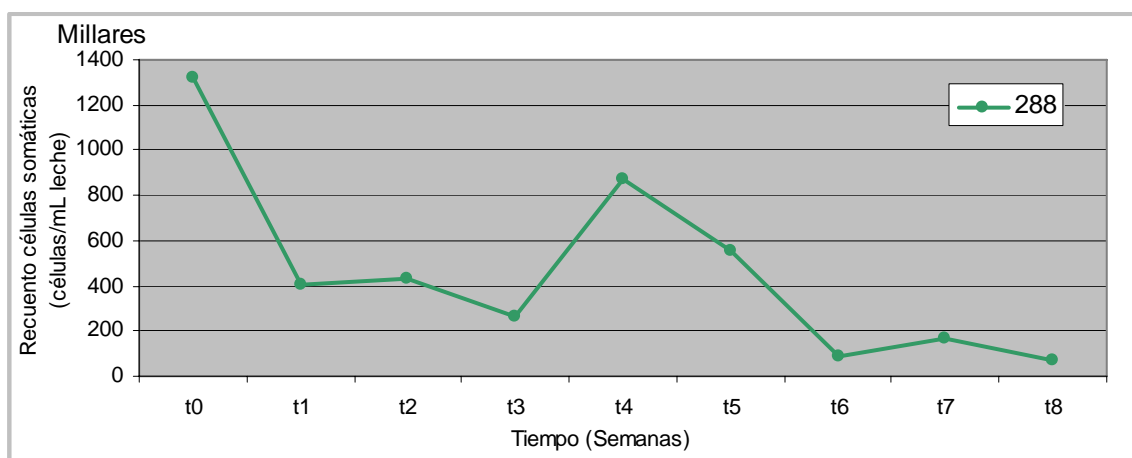


FIGURA 9 Promedio de recuento de células somáticas en leche de la vaca número 288 con mastitis durante el tiempo de estudio.

En los muestreos de la vaca 288 (FIGURA 9), se observa un marcado descenso del recuento al término de la primera semana, la que luego de mantenerse asciende en la quinta semana de muestreo, pero con posteriores descensos en los recuentos celulares los que fueron inferiores a 200.000 cél/mL a partir del séptimo muestreo y hasta el término del estudio. Tal como aconteció en algunos de los casos anteriormente comentados, los incrementos intermedios en el recuento de células somáticas, se pueden atribuir a condiciones medioambientales desfavorables tales como variaciones de temperatura, humedad y la condición de hacinamiento producto de la época estacional. Los recuentos de células somáticas de la última semana representaron un descenso de un 95,01% respecto a los del inicio del estudio (CUADRO 8).

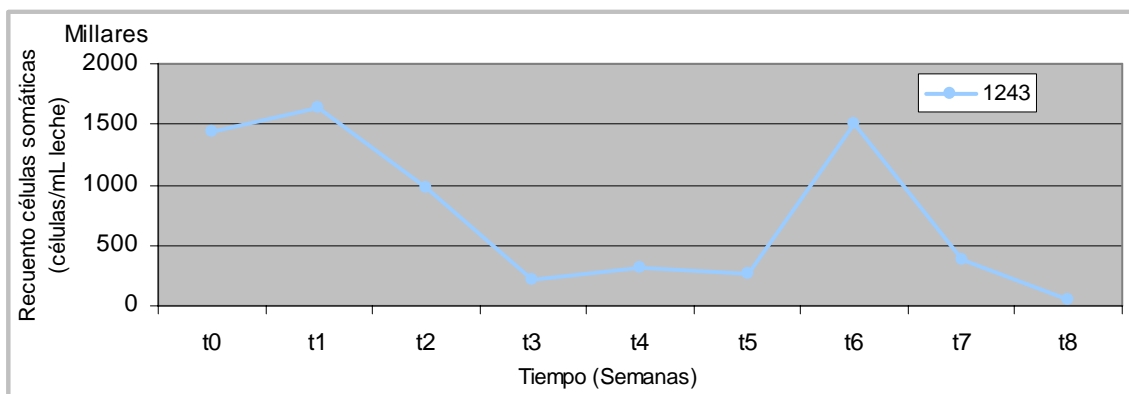


FIGURA 10 Promedio de recuento de células somáticas en leche de la vaca número 1243 con mastitis durante el tiempo de estudio.

En el comportamiento de la vaca 1243 (FIGURA 10), se observa que luego de un leve incremento en la segunda semana de muestreo se produjo un descenso significativo desde 1.628.317 a 211.688 células/mL de leche. Sin embargo, esto fue seguido por un marcado aumento celular entre la sexta y séptima semana de muestreo, la que disminuyó a valores inferiores a 400.000 células/mL de leche a partir de la octava semana de estudio. El pick observado en la sexta semana de muestreo puede ser atribuido a un error en la preparación de la muestra, ya que aparece como un valor aislado que no tiene relación con el recuento celular posterior realizado una semana después, al igual que en el caso de una de las vacas sanas (FIGURA 6).

Para la vaca 1243, el descenso de células somáticas entre la primera y última semana fue de 96,78% (CUADRO 8).

El coeficiente de variación obtenido en el presente estudio, utilizando el método microscópico directo con lectura de cuatro campos por frotis, dio un valor de 4,44% y con una repetibilidad general de 188.382 cél/mL de leche al considerar todas las muestras. Las muestras se analizaron en triplicado y para el cálculo de la repetibilidad se consideró la diferencia mayor y menor entre dos muestras (ANEXO 14). Sin embargo, la NCh 1746. Of 1998, indica que para el cálculo de repetibilidad existen rangos de células somáticas por mL de leche. De acuerdo

a este criterio, para el rango entre 100.000 a 200.000 cél/mL de leche se obtuvo una repetibilidad de 16.900 cél/mL de leche y entre 400.000 a 500.000 ésta fue de 17.887 cél/mL de leche, ambos valores dentro de los rangos mencionados en la Norma Chilena.

En la FIGURA 11, se aprecia una disminución gradual del recuento celular de la vaca 1631 en las tres primeras semanas, con un ascenso en la cuarta semana y un posterior descenso hacia sexta semana en la que se obtienen recuentos inferiores a 250.000 cél/mL. El incremento celular observado en la cuarta semana de muestreo, puede ser atribuido a la condición comentada para el caso de la vaca 2030, condicionado por el corte de luz eléctrica ocurrido el día previo al muestreo.

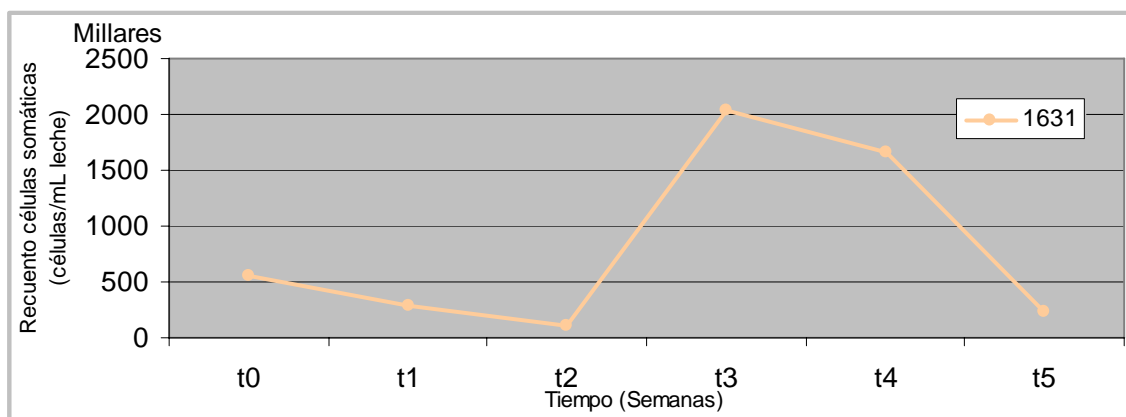


FIGURA 11 Promedio del recuento de células somáticas en leche de la vaca número 1631 con mastitis durante el tiempo de estudio.

Entre la cuarta y la sexta semana de muestreo se produjo una disminución muy significativa en el recuento celular, pero posteriormente la vaca presentó un proceso de secado ocurrido a la sexta semana de muestreo (FIGURA 11). La reducción en el recuento entre la primera y última semana de estudio fue de un 35,39% (CUADRO 8); pero al ser comparado con el tiempo 3, la disminución fue de 88,44%.

En la FIGURA 12, se observa que en las primeras 4 semanas de muestreo los recuentos fueron elevados y con valores relativamente similares; luego se produjo un descenso progresivo hasta la sexta semana, en la que los recuentos fueron inferiores a 200.000 cél/mL de leche manteniéndose hasta el término del estudio.

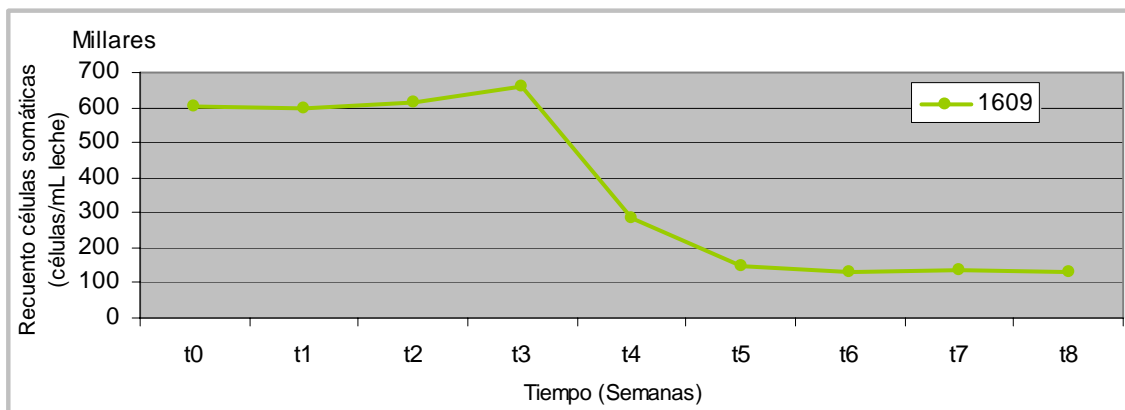


FIGURA 12 Promedio de recuento de células somáticas en leche de la vaca número 1609 con mastitis durante el tiempo de estudio.

Este comportamiento del recuento celular en las primeras cuatro semanas, como ya se ha postulado, puede corresponder al período de latencia de la respuesta inmune del animal. La reducción en el recuento de células somáticas entre la primera y última semana fue de un 78,03% (CUADRO 8).

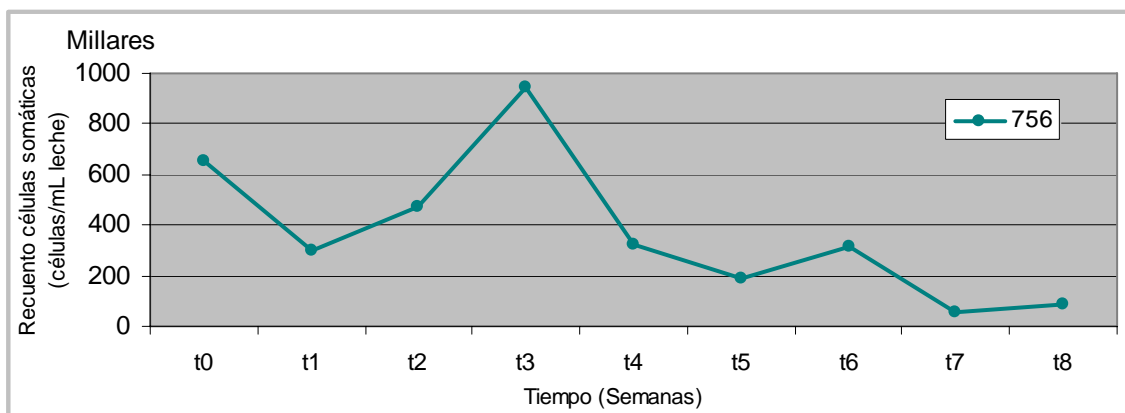


FIGURA 13 Promedio de recuento de células somáticas en leche de la vaca número 756 con mastitis durante el tiempo de estudio.

En la FIGURA 13 se aprecia, que luego de un descenso del recuento en las 2 primeras semanas de muestreo, se produjo un incremento celular entre la segunda y cuarta semana. El marcado ascenso en la cuarta semana de muestreo, al igual que en otros casos precedentes, puede ser atribuido al efecto del corte de energía eléctrica ocurrido el 16 de mayo de 2005 (día previo al muestreo). A partir de la quinta semana el descenso fue gradual, pero con leves fluctuaciones. La disminución del recuento celular en la vaca 756, entre la primera y última semana de estudio, fue de un 87,40% (CUADRO 8).

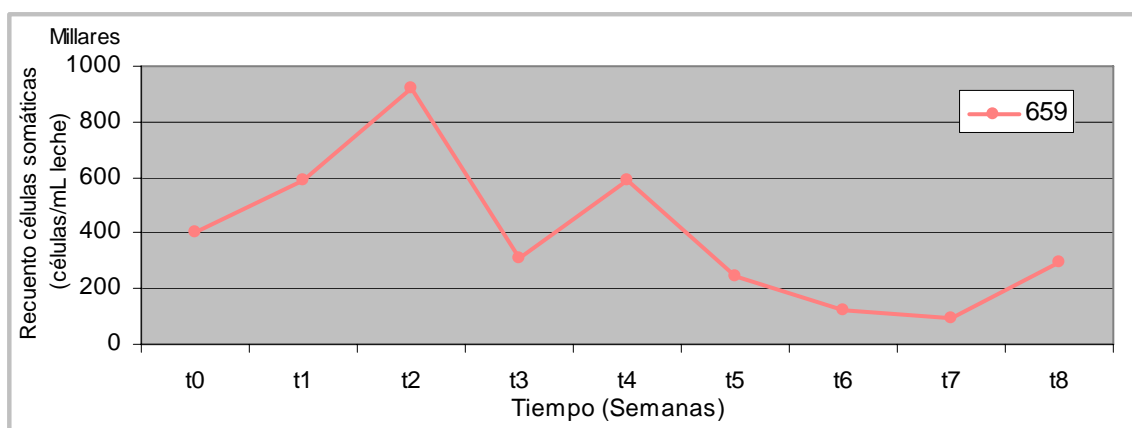


FIGURA 14 Promedio de recuento de células somáticas en leche de la vaca número 659 con mastitis durante el tiempo de estudio.

En el recuento promedio de células de la vaca 659, se observa un aumento durante las tres primeras semanas de muestreo, el cual fue seguido de un descenso entre la tercera y cuarta semana, con un posterior incremento transitorio seguido por un descenso entre la quinta y octava semanas de muestreo y con ascenso cercano a 300.000 cél/mL de leche en el recuento de la última semana (FIGURA 14). Este comportamiento variable en el recuento celular, pudiera ser explicado por cambios en las condiciones meteorológicas ocurridas durante el período del estudio (heladas, lluvias), con respuestas individuales de adaptación por parte de cada animal, tal como lo señala AGUADO (2001). La comparación entre la primera y última semana indicó un descenso de un 27,72% en el recuento celular (CUADRO 8).

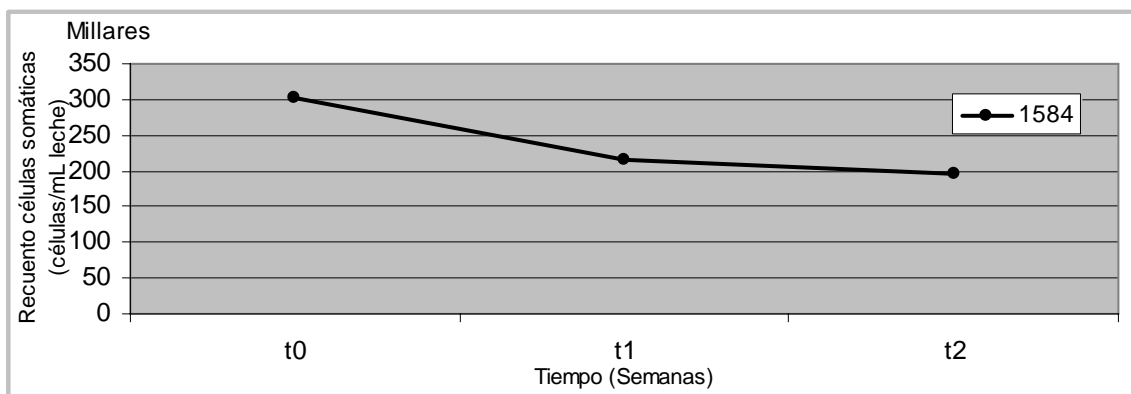


FIGURA 15 Promedio de recuento de células somáticas en leche de la vaca número 1584 con mastitis durante el tiempo de estudio.

Habiéndose producido una disminución del recuento celular en la leche de la vaca 1584 durante las tres últimas semanas de lactancia (FIGURA 15), y debido a la evidente expresión de un proceso de secado en la tercera semana de muestreo, no fue posible continuar el estudio con este animal por no ajustarse a los requisitos establecidos en el diseño experimental. La disminución en los recuentos celulares entre la primera y tercera semana de muestreo fue de 54,26% (CUADRO 8).

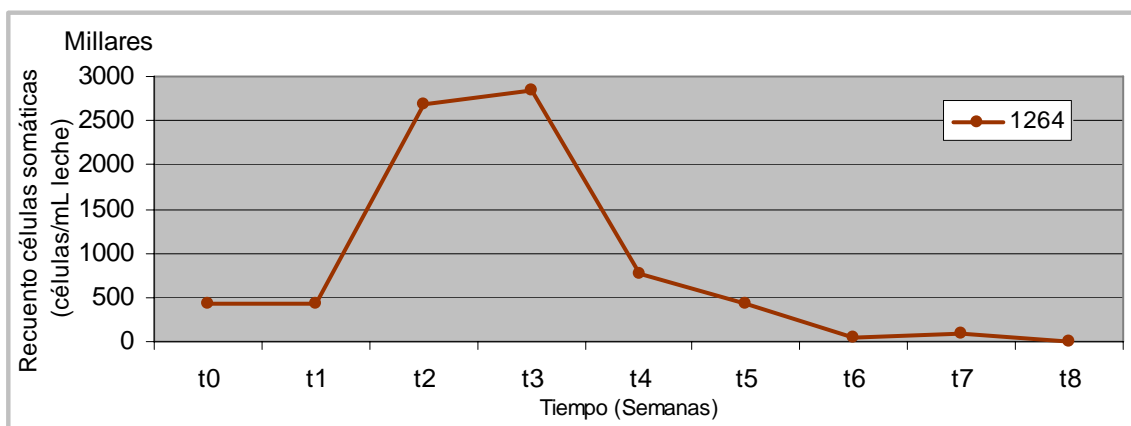


FIGURA 16 Promedio de recuento de células somáticas en leche de la vaca número 1264 con mastitis durante el tiempo de estudio.

Para la vaca 1264, se muestra que luego de 2 primeras semanas con recuentos relativamente bajos (inferiores a 500.000 cél/mL de leche), entre la segunda y

cuarta semanas de muestreo se produjo un aumento del recuento, el que luego descendió a valores normales a partir de la séptima semana de muestreo. El comportamiento del recuento en esta vaca, salvo pequeñas diferencias, es similar a lo mostrado en la FIGURA 8, y en un grado menor homologable a lo ocurrido con los otros animales, condicionado por causas multifactoriales difíciles de poder precisar. La reducción en el recuento fue de un 98,81% entre la primera y última semana del estudio (CUADRO 8).

En el análisis estadístico, de acuerdo a la prueba de t-student a un nivel de confianza de 95%, se establece que se rechaza la hipótesis nula de igualdad para las medias de los recuentos de células somáticas obtenidos en el tiempo inicial y final del estudio para las muestras de leche de cada vaca con mastitis. Esto demuestra, que hubo una disminución significativa en el recuento de células somáticas al finalizar el estudio (ANEXO 11.2).

En la FIGURA 17, se presenta la distribución de las vacas con mastitis, en relación al recuento de células somáticas en sus respectivas muestras de leche, obtenidas al inicio y al término del estudio.

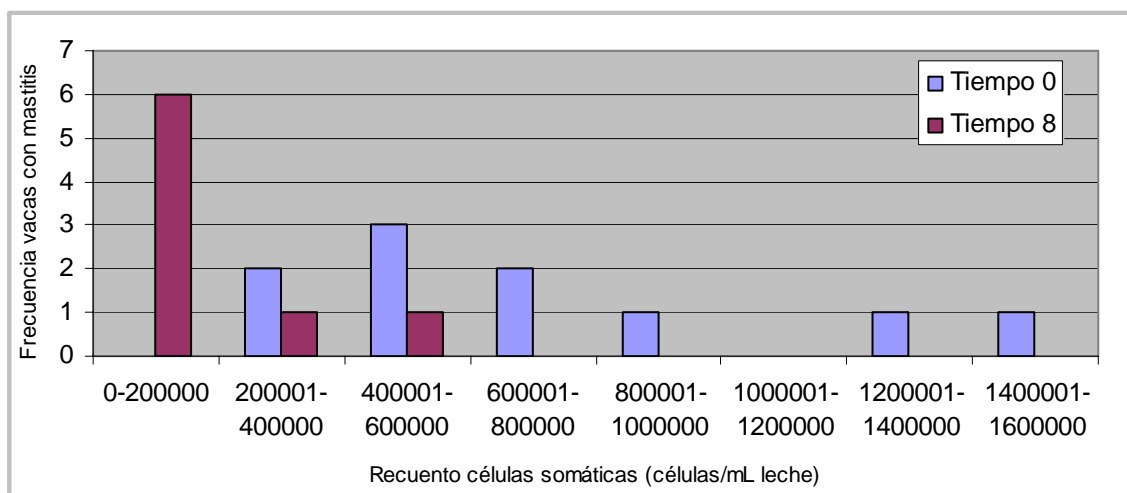


FIGURA 17 Distribución de vacas con mastitis, de acuerdo al recuento de células somáticas en leche, al inicio y término del estudio.

El 60% de las vacas (6 de 10) quedaron en una condición de recuentos igual o inferiores a 200.000 cél/mL de leche, y la totalidad de ellas se situaron en rangos de recuentos de células somáticas igual o inferiores a 600.000 cél/mL de leche. Este cambio observado, podría ser atribuido a la acción de la respuesta inmunológica de los animales, y por otra parte, a la acción bactericida de la solución de miel al 30% (p/p) sobre los microorganismos presentes en la superficie de los pezones de la ubre, evitando de esta forma la colonización de ellos al interior del canal del pezón. De esa forma, la miel constituiría un método de prevención al actuar como una barrera, impidiendo la proliferación de agentes patógenos que pudieran contribuir a la aparición nuevas infecciones. En tal sentido KRUIZE (1998), señala que la contaminación de los pezones con bacterias patógenas puede originar una infección mamaria y causar mastitis, recomendando la práctica del dipping porque destruye las bacterias que quedan en el pezón después de la ordeña, previniendo y potenciando la cura de las lesiones de la piel del pezón.

Por las características de la solución de miel, como agente bactericida, y por otras cualidades mencionadas en el estudio, podría ser de utilidad como un agente sellador efectivo para ser aplicado al término de la ordeña.

Considerando que el único “tratamiento” realizado, fue la aplicación de solución de miel diluida al 30% (p/p) sobre la superficie de los pezones de la vacas por el método de dipping, se podría deducir que este método resultó ser efectivo para el control de vacas con mastitis, en ausencia de otros procedimientos, como coadyuvante a la respuesta inmunológica de animales sometidos a la acción de un agente patógeno.

Por otra parte, se debe considerar que en el 20% de las vacas (2 de 10) se produjo un secado de lactancia, cuya condición sería normal de acuerdo a lo descrito por ALAIS (1985), quien señala que el período normal de lactación de las vacas es de 305 días.

Respecto a los efectos negativos de la mastitis sobre la capacidad de producir leche por parte de las vacas, PHILPOT (2002), ha señalado que la producción láctea se reduce en un 2,5% por cada incremento de 100.000 cél/mL en los recuentos de células somáticas presentes en la leche por sobre un nivel basal de 200.000 cél/mL. No obstante lo anterior, cabe mencionar que los recuentos finales en las dos vacas que sufrieron proceso de secado lácteo fueron inferiores a las 240.000 cél/mL de leche, representando disminuciones de 35,39 y 54,26% en el recuento celular respecto a los niveles iniciales.

CUADRO 8 Disminución del recuento de células somáticas en vacas con mastitis comparando su condición al inicio y término del estudio.

CÓDIGO VACA	RCS (cél/mL leche) EN TIEMPO 0	RCS (cél/mL leche) EN TIEMPO 8	% DISMINUCIÓN RCS TIEMPO 0 A TIEMPO 8
844	953.544	551.262	42,19
2030	344.667	128.627	62,68
288	1.324.971	66.060	95,01
1243	1.431.894	46.126	96,78
1631	552.887	235.222*	35,39
1609	604.836	132.883	78,03
756	656.549	82.711	87,40
659	404.558	292.410	27,72
1584	302.419	195.372 **	54,26
1264	427.168	5.082	98,81

* Vaca seca a la 6ta semana de muestreo.

** Vaca seca a la 3ra semana de muestreo.

En el CUADRO 8 se evidencia que en todas las vacas con mastitis y sometidas a la aplicación de solución de miel al 30% (p/p), se produjo una disminución en

el recuento de células somáticas en las muestras de leche, lo cual queda en evidencia al comparar los niveles de recuento al inicio y término del estudio.

Las variaciones respecto al aumento y disminución del recuento de células somáticas en muestras de leche a través del tiempo, se presentan en el ANEXO 12.

En el ANEXO 13 se muestran los valores de pH de las muestras de leche provenientes tanto de vacas sanas como de vacas con mastitis durante cada uno de los muestreos realizados en el estudio. Se observa que con pH más alcalinos los recuentos de células somáticas fueron más elevados, tal como se muestra en la vaca 844, cuya leche tuvo pH de 7,04, con recuento celular de 3.475.090 cél/mL de leche y, por otra parte, la vaca 1631 tuvo un pH de 6,95 y un recuento de 2.039.350 cél/mL de leche, de esta forma estos resultados son congruentes con lo señalado por AMIOT (1991), quien destaca que en leches provenientes de vacas con mastitis el pH se encuentra incrementado.

De los resultados del estudio, se podría postular que como consecuencia de no haber administrado fármacos u otras sustancias distintas a la miel, de reconocida acción bactericida a los animales con mastitis clínica y subclínica sometidos al estudio, en teoría se pudiera esperar una agravación de su cuadro clínico, en el caso que la respuesta inmunológica no fuese efectiva. Esta condición se debiera expresar por la acentuación de los síntomas y por recuentos de células somáticas persistentemente elevados, además de cambios macroscópicos evidentes en la leche (AGROBIT, 1998). Esta situación no pareciera ser factible en la presente experiencia, sin que mediara una reducción importante en la condición de lactación de los bovinos y probablemente requeriría de un mayor tiempo de recuperación, salvo en los casos de mastitis leves por coliformes, en los que los microorganismos pueden ser eliminados espontáneamente a través de la ubre, sin requerir el empleo de antibióticos, no así en los casos graves en que se corre el riesgo de infecciones

generalizadas (PYÖRÄLÄ, 2002a). Por otra parte, se puede plantear la ocurrencia de una recuperación espontánea, en la cual jugarían un rol importante los factores antibacterianos presentes en la ubre y la leche, inmunoglobulinas, lisozima, sistema lactoperoxidasa-tiocianato, lactoferrina y sistema complemento, entre otros, (PYÖRÄLÄ, 2002a) y la función antibacteriana de los neutrófilos (RAINARD y RIOLLET, 2003).

La acción antibacteriana de la miel, aparece como una variable constante evaluada durante el tiempo de estudio de los animales sometidos a la presente experiencia. En todos ellos, se produjo un descenso en el recuento de células somáticas presentes en las muestras de leche, aún cuando hubo fluctuaciones en los recuentos. Es conocido el rol terapéutico que la miel juega en la recuperación de afecciones que comprometen distintos tejidos en humanos (MOLAN, 1992a) y otros mamíferos ALJADY *et al.* (2003), como así también por sus cualidades de preservar las condiciones de la piel, producto de sus propiedades astringentes (MOLAN, 2001).

Las concentraciones de miel empleadas en el presente estudio (30% p/p), se encuentran dentro de los rangos en que distintos investigadores han demostrado su efectividad para inhibir el desarrollo de diversas bacterias, *Staphylococcus aureus* coagulasa positivos (COOPER *et al.*, 1999), *Mycobacteria* (ASADI-POOYA *et al.*, 2003), *E. coli*, *S. aureus*, *Oseudomona aeruginosa*, *S. tiphy*, *S. shiga*, *Klebsiella aerogenes*, *Proteus vulgaris* y *Proteus mirabilis* (MULU *et al.*, 2004), así como también para la actividad antifúngica, estudiada en *Cándida albicans* (THEUNISSEN *et al.*, 2001).

Los principios activos de la miel empleada en el estudio fueron preservados, evitando para ello ser sometida a procedimientos que pudieran alterar o inhibir algunas de sus propiedades. Entre los más importantes se destaca la acción del peróxido de hidrógeno (FENNEMA, 1993; KERKVLIT, 1996), al cual se le atribuyen propiedades responsables de su actividad terapéutica en la curación

de las heridas, por su actividad antibacteriana y por ser un factor estimulante en el crecimiento de tejidos de reemplazo (MOLAN, 2000). Por otra parte, la baja actividad de agua presente en la miel sin diluir, actúa como un potente inhibidor en el desarrollo de microorganismos, sumado a las propiedades otorgadas por su pH, la acción de algunas enzimas como la glucoxidasa y otras sustancias, cuyas acciones antibacterianas han sido demostradas al emplear mieles sometidas a la acción de altas temperaturas (MOLAN, 1992b).

Todos los antecedentes analizados, permitirían apoyar la premisa en el sentido que la miel diluida al 30% (p/p), aplicada en forma tópica mediante la técnica de dipping, conservaría sus propiedades antibacterianas y sería efectiva para el control de la mastitis en bovinos. Esto evitaría el uso de otros productos selladores con acción antibacteriana, tales como yodóforos, hipoclorito de sodio, clorhexidina, entre otros, cuyos residuos potencialmente podrían pasar a la leche y modificar en parte sus características organolépticas, o bien provocar daño local sobre la superficie de los pezones. La miel, por ser una sustancia orgánica, se podría degradar sin generar la presencia de residuos no deseables en el caso de pasar a convertirse en un contaminante de la leche.

Los resultados de la presente experiencia son auspiciosos en el sentido de motivar nuevas investigaciones, las que con estudios bacteriológicos paralelos, podrían permitir conocer la etiología y la respuesta clínica a la acción antibacteriana de la miel en el control de la mastitis y eventualmente otras enfermedades de causa infecciosa.

Las ventajas comparativas del uso de la miel respecto a otras sustancias químicas usadas como selladores en el control de la mastitis, más que de orden económico, como ya se ha señalado, lo constituyen sus propiedades fisicoquímicas que permitirían preservar la calidad bacteriológica y composición de la leche, evitando de esta forma la presencia de sustancias contaminantes.

5. CONCLUSIONES

En la etapa preliminar del estudio se probó que la miel es efectiva para inhibir *in vitro* el desarrollo de *Staphylococcus aureus* 2-Sa, cepa aislada de mastitis bovina.

Los elevados recuentos iniciales se redujeron a niveles promedios inferiores a 200.000 cél/mL después de la sexta semana de aplicación de solución de miel al 30% (p/p), en 6 de 8 vacas, cuyo seguimiento se logró realizar hasta el término del estudio. Sólo en las vacas sanas los recuentos de células somáticas mostraron una reducción constante en el tiempo, en cambio en las vacas con mastitis los recuentos presentaron fluctuaciones variables, pero llegando a tener valores bajos al término del estudio.

Se estableció que el uso de dipping con miel al 30% (p/p), aplicada diariamente sobre los pezones de vacas, reduce significativamente el recuento de células somáticas en leche proveniente de vacas con mastitis, al ser aplicada durante tiempo prolongado.

6. RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivos, evaluar *in vitro* la actividad inhibitoria de la miel en dilución al 30% (p/p) sobre *Staphylococcus aureus* 2-Sa, cepa aislada de mastitis bovina, y la efectividad del empleo de miel en condiciones similares y aplicada por el método de dipping sobre los pezones de vacas con mastitis, como agente externo para el control de la mastitis.

En el estudio, se consideraron 10 vacas con mastitis, para cuyo diagnóstico se emplearon los criterios convencionales y 3 vacas sanas sólo manejadas con aplicación de solución yodada. La aplicación de solución de miel se realizó dos veces al día durante un período total de 56 días. Durante la investigación, dos vacas fueron apartadas del estudio por sufrir proceso de secado lácteo.

El estudio de inhibición bacteriana *in vitro*, reveló que la solución de miel fue efectiva para conseguir dicho efecto. El recuento de células somáticas en muestras de leche, usado para el diagnóstico y evaluación del grado de mejoría de los animales, descendió a cifras inferiores a 200.000 cél/mL a la sexta semana de aplicación de solución de miel en 6 vacas, en otra a la séptima y una de ellas mantuvo recuentos del orden de 551.000 cél/mL hasta el término del estudio.

Estos resultados, permiten postular que el uso de miel tópica, en ausencia del empleo de antibióticos, es un eficiente recurso preventivo de nuevas infecciones en el manejo de la mastitis bovina sin los efectos secundarios atribuibles a otras sustancias.

SUMMARY

The objective of this study was to evaluate the *in vitro* inhibitory activity of a 30% (p/p) concentration honey solution on a *Staphylococcus aureus 2-Sa* strain isolated of bovine mastitis, and the effectiveness of the use of honey in similar conditions, applied by the dipping method on teats of cows with mastitis, like a external agent for mastitis control.

The study considered 10 dairy cows with mastitis, conventional criteria were used for its diagnostic and 3 healthy dairy cows. The application of honey solution at a concentration of 30% (p/p) was done twice a day for 56 days. Two cows were retreated from the study because they had a milky dryness.

The *in vitro* bacterial inhibition study showed the effectivity of honey to get this effect. The somatic cell counts in milk samples, used for diagnostic and evaluation of improvement level of animals, decreased to values smaller than 200.000 cel/mL at the sixth week of treatment in six cows; in another cow at the seventh week and one of them had counts around 551.000 cel/mL until the end of the study.

This result, permits to postulate that the topic use of honey, instead antibiotics, is an efficient preventive resource of new infections in the management of bovine mastitis and with no secondary effects.

7. BIBLIOGRAFÍA

- AGROBIT. 1998. Mastitis: enfermedad y transmisión. Disponible en: http://www.agrobit.com.ar/info_tecnica/ganaderia/enfermedades!mastitis.htm. Consultado el 21.01.05
- AGUADO, J. 2004. Conteos somáticos en leche. Disponible en: <http://www.ecampo.com/sections/news/display.php/uuid.15529430-7682-4B25-B0566714B13B1854/>. Consultado el 01.02.05.
- AHN, C y STILES, M. 1990. Plasmid-associated bacteriocin production by a strain of *Carnobacterium piscicola* from meat. Applied and Environmental Microbiology. 58(8):2503-2510.
- AHLNER, S. 2003. Prevalence of sub-clinical mastitis in Uruguay. Faculty of Veterinary Medicine, Uppsala, Sweden. 31 p. Disponible en: <http://epsilon.slu.se/archive/00000029/01/Ahlner-ex.pdf>. Consultado el: 05.02.05.
- ALAIS, CH. 1985. Ciencia de la Leche: Principios de Técnica Lechera. Editorial Reverté. Barcelona (España). 873 p.
- ALI, A., SWAYEH, O., al-HUMAYYD., MUSTAFA, A., al-RASHED, R. y al-TUWAIJIRI. 1997. Natural honey prevents ischaemia-reperfusion-induced gastric mucosal lesions and increased vascular permeability in rats. Eur. J. Gastroenterol Hepatol. 9(11):1101-1107.
- ALJADY, A., KAMARUDDIN, M., JAMAL, A. y YASSIM, M. 2000. Biochemical Study on the Efficacy of Malaysian Honey on Inflicted Wounds: An Animal Model. Medical Journal of Islamic of Sciences 13(3):125-132.

- ALJADY, A. y YUSSOF, K. 2003. Isolation and Identification of Phenolic Acids in Malaysian Honey with Antibacterial Properties. *Turk J. Med. Sci.* 33(4):229-236.
- ALLEN, K. y MOLAN, P. 1997. The sensitive of mastitis-causing bacteria to the antibacterial activity of honey. *New Zealand Journal of Agricultural Research.* 40(4):537-540.
- AMIOT, J. 1991. *Ciencia y Tecnología de la Leche.* Editorial Acribia, S.A., Zaragoza (España). 114 p.
- ASADI-POOYA, A., PNJEHSHAHIN, M. y BEHESHTI, S. 2003. The Antimycobacterial Effect of Honey: An in vitro Study. *Rivista di Biologia/ Biology Forum* 96(3):491-496.
- BIANCHI, E. 1990. Control de Calidad de la Miel y Cera. *Boletín de Servicios Agrícolas de la FAO. Bull.* 68/3. 69 p.
- BIBERSTEIN, E. y CHUNG, Y. 1994. *Tratado de microbiología veterinaria.* 1ª Edición, Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. 673 p.
- BIGGS, A. 2002. Practical use of antibiotics in clinical and sub-clinical mastitis. *Proceedings of the British Mastitis Conference, Brockworth. Institute for Animal Health/Milk Development Council.* 37-50. Disponible en: <http://www.iah.bbsrc.ac.uk/bmc/2002/2002%20papers/Papers%20-%20PDF/pp37-50%20Biggs.pdf>. Consultado el 23.07.05.
- BLANCO, M. 2001. Diagnóstico de la mastitis subclínica bovina. *III Congreso Nacional de Mastitis y Calidad de la Leche.* México. 7 p.
- CARRILLO, B. y MOLINA L. 1997. Acciones para mejorar la calidad de leche de los pequeños productores de centros de acopio. *Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.* 62 p.

- CEPERO, O., CASTILLO, J. y SALADO, J. 2005. Mastitis subclínica: su detección mediante diferentes técnicas diagnóstica en unidades bovinas. Revista Electrónica de Veterinaria. 6(3). Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n030305.html>. Consultado el 15.04.05.
- CHILE, INSTITUTO GEOGRAFICO MILITAR. 1994. Atlas geográfico de Chile para la educación. Editorial Instituto Geográfico Militar, Santiago. 143 p.
- CHILE, INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN (INN). NCh 1746.Of.1998. Leche cruda - Determinación de células somáticas - Método A: método microscópico de referencia. 11 p.
- CHILE, MINISTERIO DE AGRICULTURA, FUNDACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA, FIA. 2003. Bovinos de carne y de leche. Imprenta Salesianos S.A. pp 15-16.
- CONCHA, C. 2001. Consideraciones sobre la salud del rebaño lechero de Chile. TECNO VET. 7(1). Disponible en: http://bellota.sisib.uchile.cl/Tecnovet/CDA/tecnovet_articulo/0,1409,SCID%253D9407%2526ISID%253D465,00.html. Consultado el: 21.01.05.
- COOPER, R., MOLAN, P. y HARDING, K. 1999. Antibacterial activity of honey against strains of *Staphylococcus aureus* from infected wounds. J. R. Soc. Med. 92(6):283-285.
- COTRINO, V. 2003. Diagnóstico de Mastitis. Disponible en: <http://lmvltada.com/programas/ar16.html>. Consultado el: 21.01.05.
- COULON, J., GASQUI, P., BARNOUIN, A., PRADEL, P. y POMIES, D. 2002. Effect of mastitis and related-germ on yield and composition during naturally-occurring udder infections in dairy cows. Animal. Res. 51(5):383-393.

- DE CENTORBI, O., SATORRES, S., CENTORBI, H. y FERNÁNDEZ, R. 1997. Detection of *Clostridium botulinum* in honey. Rev. Argent. Microbiol. 29(3):147-151.
- DOMINGO, D. y LÓPEZ, M. 2003. Plantas con acción antibacteriana. Rev. Esp. quimioterap. 16(4):385-303.
- FENNEMA, O. 1993. Química de los alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza. España. 1097 p.
- FENICIA, L., FERRINI, A. y POCECCO, M. 1993. A case of infant botulism associated with honey feeding in Italy. Eur. J. Epidemiol. 9(6):671-673.
- FITZPATRICK, J., YOUNG, F., ECKERSALL, D., LOGUE, D., KNIGHT, C. y NOLAN, A. 1998. Recognizing and Controlling Pain and Inflammation in Mastitis. Animal Health, pp 36-44.
- GARCÍA, A., SOTO, D. y ROMO, C. 1986. La miel de abejas, composición química, propiedades y usos industriales. Rev. Chil. Nutr. 14(3):183-191.
- GASCÓN, A. 1998. Citometría de Flujo. Boletín Oncológico. 1(8). Disponible en: <http://www.opolanco.es/Apat/Boletin2/CITOFUJO.htm>. Consultado el 26.01.05.
- GONZALO, C., MARTÍNEZ, J., CARRIEDO, J. y SAN PRIMITIVO, F. 2003. Fossomatic Cell-Counting on Ewe Milk: Comparison with Direct Microscopy and Study of Variation Factors. J. Dairy Sci. 86(1):138-145.
- HARMON, R. 1994. Physiology of Mastitis and Factors Affecting Somatic Cell Counts. J Dairy Sci. 77(7):2103-2112.
- HOEBEN, D., BURNEVICH, C. y HEYNEMAN, R. 1998. Antibiotics Commonly Used to Treat Mastitis and Respiratory Burst of Polymorphonuclear Leukocytes. J. Dairy Sci. 81(12):403-410.

- HURLEY, W. y MORIN, D. 2002. Mastitis Lesson A. Lactation Biology Disponible en: <http://classes.aces.uius.edu/AnSci308/mastitisa.html>. Consultado el 21.01.05.
- JANOSI, S. y BALTAY, Z. 2004. Correlations among the somatic cell count of individual bulk milk, result of the California Mastitis Test and bacteriological status of the udder in dairy cows. *Acta Veterinaria Hungarita*. 52(2):173-183.
- JAWETZ, E., MELNICK, J. y ADELBERG, E. 1995. *Microbiología Médica*. 14ª Edición, Editorial El Manual moderno, México, D.F. 700 p.
- JEDDAR, A., RAMSAROOP, U., BHAMJEE, A., HAFFJEE, I. y MOOSA A. 1985. The antibacterial action of honey. An in vitro study. *S. Afr. Med. J.* 67(7):257-258.
- JOKLIK, W., WILLET, H., AMOS, D. y WILFERT, C. 1997. *Zinsser Microbiología*. 20ª Edición, Editorial Médica Panamericana S.A. Madrid, España. 1696 p.
- KERKVLIT, J. 1996. Screening method for the determination of peroxide accumulation in honey an the relation with HMF content. *Journal of Apicultural Research*. 35(5):110-117.
- KRELL, R. 1996. Value-added Products from Beekeeping. *FAO AGRICULTURAL SERVICES BULLETIN* N° 124. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/w0076e/w0076e00.htm#com>. Consultado el 03.02.05.
- KRUZE, J. 1998. La rutina de ordeño y su rol en los programas de control de mastitis bovina. *Arch. Med. Vet.* 30(2):7-16.

- LADAS, S., HARITOS, D. y RAPTIS, S. 1995. Honey may have a laxative effect on normal subjects because of incomplete fructose absorption. *Am J. Clin. Nutr.* 62(6):1212-1215.
- LE ROUX, Y., LAURENT, F. y MOUSSAOUI, F. 2003. Polymorphonuclear proteolytic and milk composition change. *Vet. Res.* 34:629-645.
- LESSER, R. 2001. *Manual de Apicultura Moderna*. 3ª Ed. Editorial Universitaria, Santiago, Chile. 213 p.
- LOOR, J. y JONES, G. 1998. Aspectos Básicos Sobre el Desarrollo de Mastitis. Virginia Cooperative Extensión, Publication 404-233 W. Disponible en: <http://www.ext.vt.edu/pubs/dairy/404-233/404-233w.pdf>. Consultado el: 03.02.05.
- MAGARIÑOS, H. 2000. Producción higiénica de la leche cruda. Producción y Servicios Incorporados S.A. Guatemala. 95 p. Disponible en: http://www.science.oas.org/OEA_GTZ/LIBROS/LA_LECHE/leche_all.pdf. Consultado el: 14.04.05.
- MANSILLA, A., PEDRAZA, C., FAJARDO, P. y AGÜERO, H. 2001. Métodos de estimación del nivel de mastitis en vacas lecheras a partir de la determinación del test de California para mastitis (CMT) de sus cuartos individuales. *Agricultura Técnica*. 61(2):162-170.
- MANUEL SUISSE DES DENREES ALIMENTAIRES, MSDA 2003. Miel. 23B. Disponible en: http://www.apis.admin.ch/fr/bienenprodukte/docs/lebensmittelgesetz/23A_honig_f.pdf. Consultado el: 07.02.05.
- MARCUS, E. y KEHRLI, J. 1994. Factors Affecting Milk Somatic Cells and Their Role in the Bovine Mammary Gland. *J. Dairy Sci.* 77(2):619-627.

- MARTINEZ, J., GONZALO, C., CARRIEDO, J. y SAN PRIMITIVO, F. 2003. Effect of Freezing on Fossomatic Cell Counting in Ewe Milk. *J. Dairy Sci* 86(8):2583-2587.
- MILNER, P., PAGE, L. y HILLERTON, J. 1997. The Effects of Early Antibiotic Treatment Following Diagnosis of Mastitis Detected by a Change in the Electrical Conductivity of Milk. *J. Dairy Sci.* 80(5):859-863.
- MOLAN, P. 2001. Potential of honey in the treatment of wounds and burns. *Am J. Dermatol.* 2(1):13-19.
- MOLAN, P. 2000. Establishing Honey as a Recognized Medicine. *The Journal of the American Apitherapy Society.* 7(1):7-9
- MOLAN, P. y ALLEN, K. 1996, The effect of gamma-irradiation activity of honey. *J. Pharm Pharmacol.* 48(11):1206-1269.
- MOLAN, P. 1992a. The antibacterial activity of honey. 1 The nature of the antibacterial activity. *Bee World* 73(1):5-28.
- MOLAN, P. 1992b. The antibacterial activity of honey. 2 Variation in the potency of the antibacterial activity. *Bee World* 73(2):59-76.
- MONTESINOS, N. 2001. Actividad antibacteriana de la miel y su relación con la actividad de glucosa oxidasa. Tesis Lic. Ing. Alimentos. Valdivia. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. 121 p.
- MULU, A., TESSEMA B. y DERBIE, T. 2004. In vitro assessment of the antimicrobial potential of honey on common human pathogens. *Ethiop. J. Health Dev.* 18(2):107-111.
- MUNDO, M., PADILLA-ZAKOUR, O. y WOROBO, R. 2002. Antimicrobial activity of honey against food pathogens and food spoilage microorganisms. Presented at Ann. Mtg., Inst. of Food Technologists,

Anaheim, CA, June 15-19. Disponible en: http://ift.confex.com/ift/2002/techprogram/paper_11581.htm. Consultado el 29.01.05.

NATIONAL HONEY BOARD. 1996. Definition of Honey and Honey Products. Disponible en: <http://www.nhb.org/foodtech/defdoc.html>. Consultado el 03.02.05.

NICKERSON, S. 2002. Rol of Therapy in Mastitis Control. 2° Panamerican Congress on Milk Quality and Mastitis Control, Brasil 24-25 November, pp 99-111.

NIELEN, M., DELUYKER, H., SCHUKKEN, H. y BRAND, A. 1992. Electrical Conductivity of Milk: Measurement, Modifiers, and Meta Analysis of Mastitis Detection Performance. J. Dairy Sci. 75(2):606-614.

NZEAKO, B. y HAMDI, J. 2000. Antimicrobial potential of honey on some microbial isolates. Medical Sciences 2:75-79.

OVINGTON, L. 1999. Honey: Ancient cure or modern alternative? Wound Care. Newsletter 4(1). Disponible en: <http://www.woundcare.org/newsvol4n1/prpt3.htm>. Consultado el: 03.02.04.

PAAPE, M., BANNERMAN, D., ZHAO, X. y WEI, J. 2003. The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. Vet. Res. 34(5):597-627.

PHILPOT, W. 2002. Milk Quality and Mastitis Control: Past, Present, and Future. 2nd Panamerican Congress on Milk Quality and Mastitis Control, Brasil, 24-27 November, pp 39-53.

- PHILPOT, W. 2001. Relación entre el manejo del hato y la mastitis. Disponible en: <http://www.ganaderia.com.mx/articulos/sanidad/?tema=san004>. Consultado el: 23.01.05.
- PHILPOT, W. y NICKERSON, S. 1992. Mastitis: el contra ataque. Una estrategia para combatir la mastitis. Babson Bros. Co., Naperville Illinois, E.U.A. 149 p.
- PYÖRÄLÄ, S. 2003. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. Vet. Res. 34(5):565-578.
- PYÖRÄLÄ, S. 2002a. New Strategies to Prevent Mastitis. Reprod. Dom. Animal. 37(4):211-216.
- PYÖRÄLÄ, S. 2002b. Antimicrobial treatment of Mastitis - Choice of the Route of Administration and Efficacy. Institute of Animal Health/Milk Development Council. Proceeding of the British Mastitis Conference. pp 20-29.
- RAINARD, P. 2003. The complement in milk and defense of the bovine mammary gland against infections. Vet. Res. 34(5):647-670.
- RAINARD, P. y RIOLLET, C. 2003. Mobilization of neutrophils and defense of the bovine mammary gland. Reprod. Nutr. Dev. 43(5):439-457.
- RAMÍREZ, N., GAVIRIA, G., ARROYAVE, B. y BENJUMEA, J. 2001. Prevalencia de mastitis en vacas lecheras lactantes en el municipio de San Pedro de los Milagros, Antioquia. Rev. Col. Cienc. Pec. 14(1):76-87.
- RIVAS, A., TADEVOSYAN, R., QUIMBY, F. y LEIN, D. 2002a. Blood and milk immune responses of mastitic non-periparturient cows inoculated with *Staphylococcus aureus*. Can. J. Vet. Res. 66(2):125-131.

- RIVAS, A., TADEVOSYAN, R., QUIMBY, F., COKSAYGAN, T. y LEIN, D. 2002b. Identification of subpopulations of bovine mammary-gland phagocytes and evaluation of sensitivity and specificity of morphologic and functional indicators of bovine mastitis. *Can J Vet Res.* 66(3):165-172.
- RIVAS, A., QUIMBY, F., OLMSTEAD, L. y LEIN, D. 2000. Longitudinal evaluation of CD4+ and CD8+ peripheral blood and mammary gland lymphocytes in cows experimentally inoculated with *Staphylococcus aureus*. *Can. J. Vet. Res.* 64(4):232-237.
- RUÍZ, J., RAMÍREZ, N. y ORROYAVE, O. 2001. Determinación de concentraciones inhibitorias mínimas a algunos antibióticos de las bacterias aisladas de glándula mamaria bovina en San Pedro de los Milagros, Antioquia. *Rev. Col. Cienc. Pec.* 14(2):143-154.
- SALMON, H. 2004. Immunophysiology of the mammary gland and transmission of immunity to the young. *Repro. Nutr. Dev.* 43(5):471-475.
- SAN MARTÍN, B., KRUIZE, J., MORALES, M., AGÜERO, H., LEÓN, B., ESPINOZA, S., IRAGÜEN, D., PUGA, M. y BORIE, C. 2002. Resistencia bacteriana en cepas patógenas aisladas de mastitis en vacas lecheras de la V Región, Región Metropolitana y Xª Región, Chile. *Arch. M. V.* 34(2):221-234.
- SCHROEDER, J. 1997. Mastitis Control Programs: Bovine Mastitis and Milking Management. NSDU Extensión Service North Dakota State University. Disponible en: <http://www.ext.nodak.edu/extpubs/ansci/dairy/as1129w.htm>. Consultado el 03.02.05.

- SHITANDI, A. y KIHUMBU, G. 2004. Assessment of the California mastitis test usage in smallholder dairy herds and risk of volatile antimicrobial residues. *J. Vet. Sci.* 5(1):5-9.
- SIRVÉN, M. 2004. Pruebas Diagnósticas para Mastitis Subclínica. *Super Campo*. Año XI, N° 123. Disponible en: http://www0.supercampo.uol.com.ar/edicion_0123/nota_04.htm. Consultado el: 05.02.05.
- SLAGHUIS, B. 1996. Sources and significance of contaminants on different levels of raw milk production. Symposium on Bacteriological Quality of Raw Milk. International Dairy Federation. Wolpassing, Austria. 13-15 March 1996. pp 19-27.
- SOMAL, N., COLEY, K., MOLAN, P. y HANCOCK, B. 1994. Susceptibility of *Helicobacter pylori* to the antibacterial activity of manuka honey. *Journal of the Royal Society of Medicine*. 87(1):9-12.
- SUBRAHMANYAM, M., HEMMADY, A. y PAWAR, S. 2003. The sensitivity to honey of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from infected burns. *Annals of burn and fire disasters*. 16(2). Disponible en: http://www.medbc.com/annals/review/vol_16/num_2/text/vol16n2p84.asp. Consultado el 26.01.05.
- THEUNISSEN, A., GROBLER, S. y GEDALIA I. 2001. The antifungal action of three South African honeys on *Candida albicans*. *Apidologie* 32(4):371-380.
- VARDI, A., BARZILAY, Z., LINDER, N., COHEN, H., PARET, G. y BARZILAI, A. 1998. Local application of honey treatment of neonatal postoperative wound infection. *Acta Paediatr.* 87(4):429-432.

WATTIAUX, M. 2000. Mastitis: prevención y detección. Disponible en: <http://babcock.cals.wisc.edu/downloads/de/24.es.pdf>. Consultado el: 23.01.05.

WOLTER, W; CASTAÑEDA, V; KLOPPERT, B. y ZSCHOECK, M. 2002. La mastitis bovina. Disponible en: <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2002/912/pdf/p020003.pdf>. Consultado el: 23.01.05.

YALCIN, C. 2000. Cost of Mastitis in Scottish Dairy Herds with Low and High Subclinical Mastitis Problems. Turk J. Vet. Anim. Sci. 24(5):465-472.

ANEXOS

ANEXO 1. Zona geográfica y vegetación predominante en el área de extracción de la miel utilizada en el estudio



FUENTE: CHILE, INSTITUTO GEOGRAFICO MILITAR (1994).

La zona geográfica de extracción de miel se encuentra localizada al noroeste de la localidad de Futrono.



En la zona precordillerana, la flora predominante es el ulmo.

**ANEXO 2. Leche cruda – Determinación de células somáticas – Método A:
Método microscópico de referencia (CHILE, INN 1998)**

Principio del método. Distribución de alícuota de la muestra de leche, equivalente a 0,01 mL, sobre un portaobjeto de microscopio el cual se encuentra aplicado sobre una plantilla marcada con cuatro cuadrados de 1cm² de superficie cada uno. Secado y teñido del frotis con posterior recuento de las células teñidas, usando para ello un microscopio óptico. El número de células somáticas contadas en un área definida, multiplicado por el factor de trabajo del microscopio, corresponderá al número de células presentes por mililitro.

Procedimiento. Para este proceso se seguirán los siguientes pasos:

A. Preparación de la muestra: Calentar la muestra de leche en un baño de agua a 30°C - 40°C, agitarla cuidadosamente y enfriar a la temperatura a la cual la microjeringa ha sido calibrada, por ejemplo a 20°C.

B. Análisis de la muestra:

- a) Limpiar los portaobjetos con etanol u otro solvente equivalente, secar con papel libre de partículas, flamear y enfriar.
- b) Tomar 0,01 mL de la muestra para análisis usando una microjeringa. Limpiar cuidadosamente el exterior de la jeringa, en contacto con la leche.
- c) Colocar la alícuota de muestra sobre el portaobjeto limpio y delineando primero el entorno del marco (10 mm · 10 mm). Preparar tres áreas (en el mismo portaobjeto) y rellenarlas lo más homogéneamente posible. Secar completamente el frotis sobre una placa eléctrica nivelada. Se puede obtener un mejor resultado secando los frotis a temperatura ambiente durante varias horas. Si fuese necesario, completar el secado con un ventilador.

(Continuación ANEXO 2)

- d) Sumergir el portaobjeto totalmente seco en la solución colorante durante 30 minutos. Completar el secado con el ventilador si fuese necesario, luego sumergir el portaobjeto con la muestra en agua corriente hasta la completa eliminación del exceso de colorante. Secar y guardar protegido del polvo.

C. Recuento y expresión de resultados

- a) Determinación: Contar con el microscopio los núcleos de células en el frotis (a lo menos 400). Éstos son claramente reconocibles y a lo menos la mitad deberán ser visibles en el campo microscópico. Realizar el recuento en franjas en cruz, evitar el recuento en franjas seleccionadas exclusivamente del área periférica del frotis. Prepara nuevos frotis si con el anterior no se alcanzó recuento de 400 células.
- b) Cálculo del factor microscópico (FM): Para calcular el factor microscópico, usar un micrómetro ocular con divisiones en 0,1 mm y 0,01 mm para medir el radio del campo ocular y usar la siguiente fórmula:

$$FM = \frac{10.000}{3,1416 \cdot r^2}$$

- c) Método de cálculo: El número de células somáticas contadas es multiplicado por el factor microscópico, para obtener el número de células por mililitro de leche.

Obtener el número de leucocitos por mililitro, mediante la siguiente expresión:

$$L = \frac{N^{\circ} \text{ de leucocitos contabilizados} \cdot FM}{N^{\circ} \text{ de campos observados}}$$

En que:

L = número de leucocitos por mililitro de leche

FM = factor microscópico

Promediar el resultado de los tres frotis

(Continuación de ANEXO 2)**D. Preparación de solución colorante**

Composición

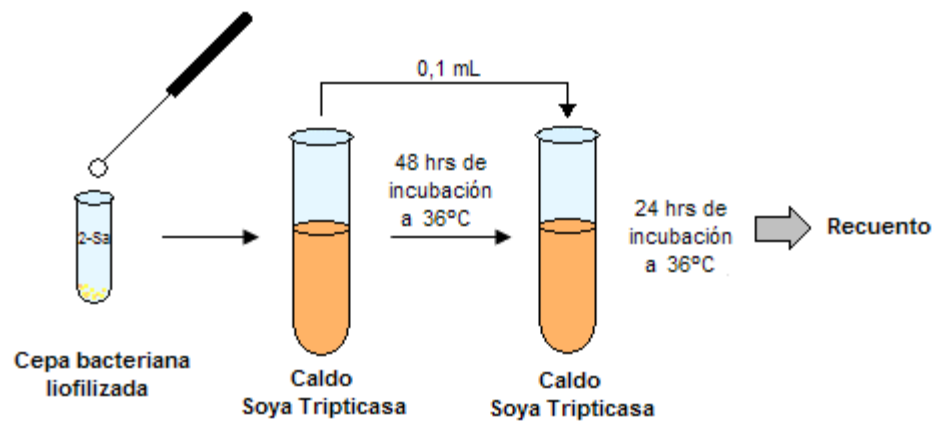
Etanol, 95% (v/v)	: 54,0 mL
Tetracloroetano	: 40,0 mL
Azul de metileno para microscopía	: 0,6 g
Acido acético glacial	: 6,0 mL

Mezclar el etanol y tetracloroetano en una botella y calentar en un baño de agua 60 - 70°C. Agregar azul de metileno, mezclar cuidadosamente, enfriar e refrigerador a 4°C a lo menos durante 12 horas y luego agregar ácido acético glacial. Filtrar la solución por papel filtro apropiado (con un tamaño de poro de 10 - 12 μm o inferior) y guardar en un frasco con tapa hermética. Si fuese necesario, filtrar una vez más antes de usar.

ANEXO 3. Procedimiento para el estudio de inhibición de cepa bacteriana causante de mastitis

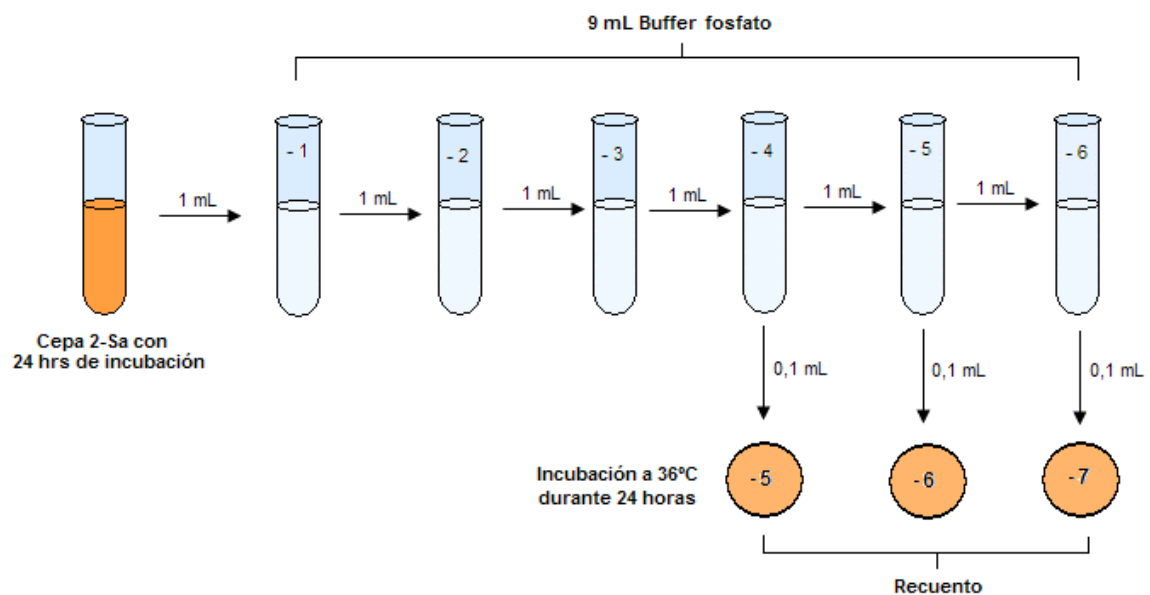
A. Preparación de cepa

Cepa: *Staphylococcus aureus* 2-Sa



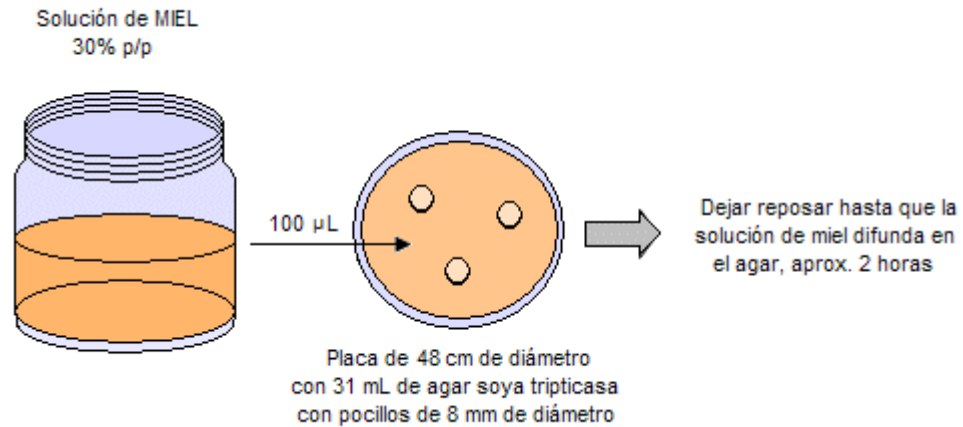
Recuento aproximado luego de 24 horas de incubación a 36°C del inóculo al 1% en caldo soya tripticasa: $1,6 \times 10^8$ ufc/mL.

B. Control de la concentración de los cultivos

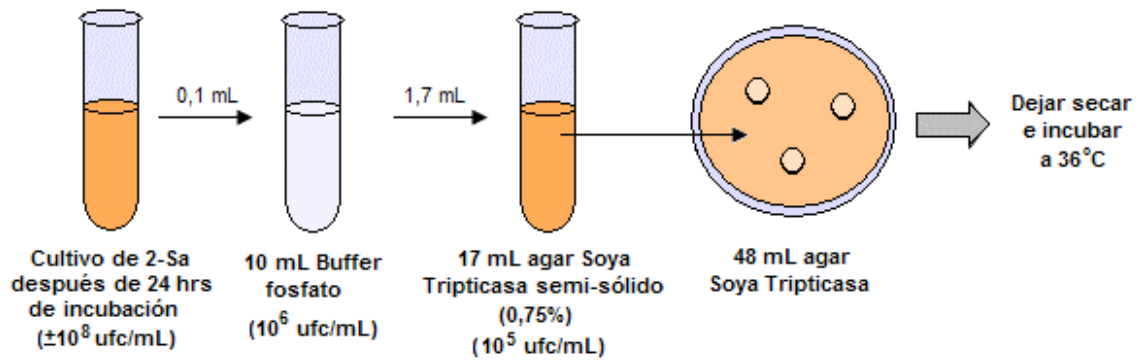


(Continuación de ANEXO 3)

C. Preparación de placas y aplicación de solución de miel al 30% p/p



D. Preparación del césped y difusión en placa



ANEXO 4. Caracterización de vacas en estudio

CÓDIGO VACA	FECHA DE NACIMIENTO	EDAD (MESES) *	FECHA ÚLTIMO PARTO	NÚMERO DE LACTANCIAS **	MESES DE LACTANCIA	GRADO DE MASTITIS EN t ₀ ***
844	30/03/99	74	27/02/05	4	2	Subclínica
2030	30/07/96	107	30/08/04	5	8	Subclínica
288	20/08/95	118	03/10/04	6	7	Clínica
1243	29/03/98	86	23/08/04	4	8	Clínica
1631	03/06/02	35	04/07/04	1	10	Subclínica
1609	26/04/02	37	10/08/04	1	9	Subclínica
756	26/07/98	82	09/08/04	4	9	Subclínica
659	19/03/98	87	25/02/05	5	2	Subclínica
1584	08/04/02	37	16/06/04	2	10	Subclínica
1264	16/04/98	86	24/08/04	4	8	Subclínica
1655	19/07/02	34	24/12/04	1	4	Sin mastitis
1614	02/05/02	36	09/02/05	1	2	Sin mastitis
642	11/03/98	87	28/03/05	5	1	Sin mastitis

* Calculado a partir del 30 de Abril de 2005.

** Calculado a partir de 26 de Abril de 2005.

*** De acuerdo a COTRINO, (2000).

Alimentación recibida: 50 Kg de ensilaje + 5 Kg aprox. de concentrado + afrecho de soya o lupino + 200 g/vaca de sales minerales durante las 9 semanas de muestreo.

ANEXO 5. Resultados de la prueba preliminar respecto al grado de disminución del recuento de células somáticas en leche de 3 vacas con mastitis

5.1 Promedios y desviaciones estándar de los recuentos de células somáticas (cél/mL) en leche de 3 vacas con mastitis en un período de 8 días.

CÓDIGO VACA	TIEMPO 0	TIEMPO 5	TIEMPO 8
1875	4.017.963 ± 141.094,0	1.504.522 ± 26.764,0	724.220 ± 45.103,9
1388	9.446.603 ± 93.796,2	991.407 ± 42.398,2	837.253 ± 51.147,4
1113	2.996.896 ± 42.334,5	1.915.326 ± 42.715,8	1.658.889 ± 30.333,7

5.2 Disminución del recuento de células somáticas en vacas con mastitis, comparando su condición al inicio y al quinto día del estudio preliminar.

CÓDIGO VACA	RCS (cél/mL leche) EN TIEMPO 0	RCS (cél/mL leche) EN TIEMPO 5	% DISMINUCIÓN RCS TIEMPO 0 A TIEMPO 5
1875	4.017.963 ± 141.094,0	1.504.522 ± 26.764,0	62,56
1388	9.446.603 ± 93.796,2	991.407 ± 42.398,2	89,51
1113	2.996.896 ± 42.334,5	1.915.326 ± 42.715,8	36,09

5.3 Disminución del recuento de células somáticas en vacas con mastitis, comparando su condición al inicio y término del estudio preliminar.

CÓDIGO VACA	RCS (cél/mL leche) EN TIEMPO 0	RCS (cél/mL leche) EN TIEMPO 8	% DISMINUCIÓN RCS TIEMPO 0 A TIEMPO 8
1875	4.017.963 ± 141.094,0	724.220 ± 45.103,9	81,98
1388	9.446.603 ± 93.796,2	837.253 ± 51.147,4	91,14
1113	2.996.896 ± 42.334,5	1.658.889 ± 30.333,7	44,65

**ANEXO 6. Análisis estadístico para prueba preliminar del grado de
disminución del recuento de células somáticas en leche de 3 vacas con
mastitis**

- **Test de t-Student para recuento de células somáticas de cada vaca con mastitis en el tiempo inicial y final del estudio preliminar.**

Hipótesis alternativa: $\mu_{\text{tiempo 0 de cada vaca con mastitis}} = \mu_{\text{tiempo 8 de cada vaca con mastitis}}$

Hipótesis alternativa: $\mu_{\text{tiempo 0 de cada vaca con mastitis}} \neq \mu_{\text{tiempo 8 de cada vaca con mastitis}}$

Código vaca	Valor t	Valor P	Aceptación o Rechazo de hipótesis nula
1875	38,5136	0,0000027148	Se rechaza
1388	139,578	1,58027E-8	Se rechaza
1113	44.4987	0.0000015251	Se rechaza

ANEXO 7. Análisis estadístico para prueba de inhibición de desarrollo bacteriano para cepa de *Staphylococcus aureus* 2-Sa

➤ **Chequeo de varianza para garantizar el análisis**

Contraste de varianza C de Cochran = 0,679487

Valor P = 0,0747914

Contraste de Bartlett = 1,34597

Valor P = 0,129193

Hay igualdad de varianza de las mediciones de los halos de inhibición, por lo que es posible realizar el ANOVA.

➤ **Análisis de varianza**

Tabla de Andeva

Fuente	Sumas de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Valor F	Valor P
Entre grupos*	1,0	2	0,5	0,58	0,5736**
Intra grupos	13,0	15	0,866667		
Total (Corr.)	14,0	17			

* Los grupos fueron considerados para cada placa (triplicados)

** El valor $P > 0,05$ indica que no existe diferencia estadísticamente significativa entre las mediciones de los halos de inhibición de la cepa bacteriana *S. aureus* 2-Sa, a un nivel del 95% de confianza.

ANEXO 8 Recuento de células somáticas (cél/mL de leche), media aritmética y desviación estándar en leche de cada vaca sana durante los 9 muestreos del estudio

CÓDIGO VACA	TIEMPO (Semanas)	RECUESTO CELULAR	MEDIA ARITMETICA	DESVIACIÓN ESTANDAR
1655	0	78.493	78.524,0	8.908,54
		87.448		
		69.631		
	1	111.457	114.486,0	8.665,11
		107.742		
		124.259		
	2	57.818	55.394,0	2.542,84
		55.617		
		52.747		
	3	28.842	27.800,0	911,857
		27.410		
		27.148		
	4	8.228	8.327,0	429,151
		7.956		
		8.797		
	5	5.535	5.322,0	211,516
		5.112		
		5.319		
	6	4.098	4.108,0	8,7178
		4.112		
		4.114		
	7	4.405	4.389,0	58,66
		4.324		
		4.438		
	8	4.405	4.506,0	98,5951
		4.602		
		4.511		

(Continuación de ANEXO 8)

CÓDIGO VACA	TIEMPO (Semanas)	RECuento CELULAR	MEDIA ARITMETICA	DESVIACIÓN ESTANDAR
1614	0	181.103	186.664,0	6.220,09
		193.381		
		185.508		
	1	34.263	35.749,0	1.435,49
		35.856		
		37.128		
	2	15.019	14.098,0	877,366
		14.003		
		13.272		
	3	5.786	5.668,0	629,352
		6.230		
		4.988		
	4	5.828	5.797,0	83,9107
		5.702		
		5.861		
	5	3.953	4.048,0	83,9107
		4.112		
		4.079		
	6	3.628	3.861,0	222,394
		3.884		
		4.071		
	7	5.327	5.448,0	104,848
		5.512		
		5.505		
8	4.336	4.343,0	122,65	
	4.469			
	4.224			

(Continuación de ANEXO 8)

CÓDIGO VACA	TIEMPO (Semanas)	RECUESTO CELULAR	MEDIA ARITMETICA	DESVIACIÓN ESTANDAR
642	0	61.671	64.405,0	5.028,34
		70.208		
		61.336		
	1	72.165	69.786,0	3.176,04
		66.862		
		70.331		
	2	49.677	50.473,0	2.053,18
		52.805		
		48.937		
	3	4.971	4.850,0	196,731
		4.623		
		4.956		
	4	3.504	3.567,0	90,7359
		3.671		
		3.526		
	5	4.887	4.649,0	225,714
		4.622		
		4.438		
	6	4.343	4.322,0	89,37
		4.224		
		4.399		
	7	745.266	525.802,0	389.457,0
		761.38		
		756.002		
8	48.827	48.159,0	2453,19	
	45.441			
	50.209			

ANEXO 9. Recuento de células somáticas (cél/mL de leche), media aritmética y desviación estándar en leche de cada vaca con mastitis durante los 9 muestreos del estudio

CÓDIGO VACA	TIEMPO (Semanas)	RECUENTO CELULAR	MEDIA ARITMETICA	DESVIACIÓN ESTANDAR
844	0	964.234	953.543,0	17.268,4
		962.774		
		933.621		
	1	3.378.752	3,47509E6	95.896,1
		3.570.538		
		3.475.980		
	2	7.297.324	7,30753E6	109.562,7
		7.303.190		
		7.322.061		
	3	3.484.740	3,49561E6	11.595,3
		3.494.283		
		3.507.816		
	4	1.612.986	1,6021E6	9.902,57
		1.599.683		
		1.593.628		
	5	3.463.567	3,50196E6	33.753,4
		3.526.958		
		3.515.364		
	6	1.156.413	1,16221E6	31.480,7
		1.196.185		
		1.134.029		
	7	2.123.832	2,11893E6	23.621,6
		2.093.246		
		2.139.721		
	8	578.697	557.929,0	19.818,5
		555.868		
		539.221		

(Continuación de ANEXO 9)

CÓDIGO VACA	TIEMPO (Semanas)	RECUESTO CELULAR	MEDIA ARITMETICA	DESVIACIÓN ESTANDAR
2030	0	321.214	344.667,0	20.748,0
		360.630		
		352.157		
	1	203.453	195.220,0	18.577,2
		173.949		
		208.258		
	2	1.173.776	1,20424E6	38.865,1
		1.207.216		
		1.231.731		
	3	1.710.715	1,75899E6	68.459,6
		1.782.309		
		1.783.958		
	4	350.126	341.970,0	12.451,3
		327.638		
		348.146		
	5	290.010	275.561,0	15.688,2
		258.874		
		277.799		
	6	265.965	255.529,0	9.503,08
		253.248		
		247.374		
	7	52.013	47.825,0	3.700,64
		46.466		
		44.996		
8	132.714	90.938,0	67.924,1	
	125.630			
	127.537			

(Continuación de ANEXO 9)

CÓDIGO VACA	TIEMPO (Semanas)	RECUESTO CELULAR	MEDIA ARITMETICA	DESVIACIÓN ESTANDAR
288	0	1.292.761	1,32497E6	32.425,1
		1.324.545		
		1.357.607		
	1	415.107	403.565,0	18.577,2
		392.192		
		403.396		
	2	445.416	435.602,0	17.883,7
		414.960		
		446.430		
	3	245.206	262.859,0	16.609,1
		265.194		
		278.177		
	4	895.011	872.133,0	22.150,4
		850.790		
		870.598		
	5	550.652	558.517,0	6.888,21
		563.476		
		561.423		
	6	83.949	84.000,0	186,6083
		83.951		
		84.100		
	7	165.040	171.587,0	6.784,85
		178.587		
		171.134		
8	68.398	66.060,0	3.559,07	
	67.818			
	61.964			

(Continuación de ANEXO 9)

CÓDIGO VACA	TIEMPO (Semanas)	RECUESTO CELULAR	MEDIA ARITMETICA	DESVIACIÓN ESTANDAR
1243	0	1.522.790	1,43189E6	78.987,2
		1.379.933		
		1.392.959		
	1	1.626.251	1,62832E6	184.490,0
		1.653.122		
		1.605.578		
	2	980.568	973.479,0	13.827,2
		957.545		
		982.324		
	3	224.193	211.688,0	13.276,1
		197.756		
		213.115		
	4	318.105	306.217,0	10.359,9
		301.428		
		299.118		
	5	248.318	262.739,0	12.493,7
		270.295		
		269.604		
	6	1.489.096	1,50141E6	19.289,6
		1.523.637		
		1.491.485		
	7	355.822	383.333,0	24.108,3
		393.405		
		400.772		
8	48.689	46.126,0	2.577,62	
	43.534			
	46.155			

(Continuación de ANEXO 9)

CÓDIGO VACA	TIEMPO (Semanas)	RECuento CELULAR	MEDIA ARITMETICA	DESVIACIÓN ESTANDAR
1631	0	573.298	552.887,0	29.262,8
		542.272		
		543.091		
	1	277.378	286.501,0	8.445,65
		288.078		
		294.047		
	2	108.304	111.889,0	14.917,2
		99.091		
		128.272		
	3	2.033.176	2,03935E6	52.665,3
		2.094.833		
		1.990.047		
	4	1.647.693	1,6557E6	24.272,8
		1.636.437		
		1.682.961		
	5	255.132	235.565,0	17.089,9
		223.565		
		227.998		
	6	---	---	---

	7	---	---	---

8	---	---	---	

(Continuación de ANEXO 9)

CÓDIGO VACA	TIEMPO (Semanas)	RECUENTO CELULAR	MEDIA ARITMETICA	DESVIACIÓN ESTANDAR
1609	0	617.537	604.836,0	26.638,4
		605.517		
		591.454		
	1	585.894	597.051,0	2.157,23
		651.035		
		554.224		
	2	635.765	613.321,0	27.045,6
		583.293		
		620.905		
	3	689.967	659.922,0	32.025,2
		663.570		
		626.229		
	4	293.470	286.890,0	12.745,8
		272.199		
		295.001		
	5	155.996	148.774,0	9.234,52
		138.369		
		151.957		
	6	121.355	130.325,0	11.926,8
		125.760		
		143.860		
	7	148.037	139.011,0	9.467,76
		139.840		
		129.156		
8	134.483	132.883,0	5.534,27	
	126.725			
	137.441			

(Continuación de ANEXO 9)

CÓDIGO VACA	TIEMPO (Semanas)	RECUESTO CELULAR	MEDIA ARITMETICA	DESVIACIÓN ESTANDAR
756	0	636.003	656.549,0	17.840,9
		668.124		
		665.520		
	1	295.384	301.063,0	10.384,9
		313.049		
		294.756		
	2	477.239	469.854,0	18.705,8
		448.583		
		483.740		
	3	950.832	945.921,0	18.856,4
		925.095		
		961.836		
	4	337.042	323.141,0	12.746,9
		320.379		
		312.001		
	5	189.937	192.668,0	14.509,6
		208.349		
		179.718		
	6	315.147	312.190,0	18.141,2
		292.752		
		328.671		
	7	52.356	52.671,0	327,107
		52.648		
		53.009		
8	81.149	82.711,0	1.517,64	
	82.804			
	84.180			

(Continuación de ANEXO 9)

CÓDIGO VACA	TIEMPO (Semanas)	RECUENTO CELULAR	MEDIA ARITMETICA	DESVIACIÓN ESTANDAR
659	0	396.026	404.558,0	9.604,52
		414.960		
		402.688		
	1	609.263	586.399,0	23.163,1
		552.948		
		596.986		
	2	945.427	922.503,0	27.201,9
		892.445		
		929.637		
	3	298.512	309.743,0	15.664,9
		327.638		
		303.079		
	4	569.007	586.517,0	15.801,9
		590.828		
		599.716		
	5	248.481	247.543,0	6.107,27
		241.021		
		253.127		
	6	111.498	125.876,0	12.743,2
		130.355		
		135.775		
	7	93.569	90.787,0	2.880,6
		87.817		
		90.975		
8	279.136	292.410,0	12.862,0	
	304.816			
	293.278			

(Continuación de ANEXO 9)

CÓDIGO VACA	TIEMPO (Semanas)	RECuento CELULAR	MEDIA ARITMETICA	DESVIACIÓN ESTANDAR
1584	0	295.692	302.419,0	15.454,6
		320.097		
		291.468		
	1	221.274	214.713,0	5.743,97
		210.591		
		212.274		
	2	192.316	195.372,0	9.071,64
		205.577		
		188.223		
	3	---	---	---

	4	---	---	---

	5	---	---	---

	6	---	---	---

	7	---	---	---

8	---	---	---	

(Continuación de ANEXO 9)

CÓDIGO VACA	TIEMPO (Semanas)	RECUESTO CELULAR	MEDIA ARITMETICA	DESVIACIÓN ESTANDAR
1264	0	412.479	427.168,0	12.800,7
		435.938		
		433.087		
	1	459.679	433.485,0	23.806,2
		427.609		
		413.167		
	2	2.693.046	2,67542E6	19.979,3
		2.653.715		
		2.679.490		
	3	2.858.990	2,83225E6	117.957,0
		2.934.538		
		2.703.216		
	4	748.684	773.366,0	21.479,9
		783.589		
		787.825		
	5	457.306	428.521,0	25.284,6
		409.900		
		418.357		
	6	51.898	51.788,0	819,555
		50.919		
		52.547		
	7	76.140	54.596,0	40.238,9
		81.720		
		79.476		
8	4.972	5.082,0	174,33	
	4.991			
	5.283			

(---) : Proceso de secado de vaca

ANEXO 11. Análisis estadístico para estudio del grado de disminución del recuento de células somáticas (cél/mL) en leche de 3 vacas sanas y 10 vacas con mastitis

11.1 Prueba de t-Student para 3 vacas sanas sometidas a tratamiento convencional con solución yodada al inicio y al final del estudio.

Hipótesis alternativa: $\mu_{\text{tiempo 0 de cada vaca sana}} = \mu_{\text{tiempo 8 de cada vaca sana}}$

Hipótesis alternativa: $\mu_{\text{tiempo 0 de cada vaca sana}} \neq \mu_{\text{tiempo 8 de cada vaca sana}}$

Código vaca	Valor t	Valor P	Aceptación o Rechazo de hipótesis nula
1655	14,3901	0,000135529	Se rechaza
1614	50,7593	9,01487E-7	Se rechaza
642	5,02943	0,00733633	Se rechaza

11.2 Prueba de t-Student para 10 vacas con mastitis sometidas a tratamiento con solución de miel al 30% (p/p) al inicio y al final del estudio.

Hipótesis alternativa: $\mu_{\text{tiempo 0 de cada vaca con mastitis}} = \mu_{\text{tiempo 8 de cada vaca con mastitis}}$

Hipótesis alternativa: $\mu_{\text{tiempo 0 de cada vaca con mastitis}} \neq \mu_{\text{tiempo 8 de cada vaca con mastitis}}$

Código vaca	Valor t	Valor P	Aceptación o Rechazo de hipótesis nula
844	26,0677	0,0000128673	Se rechaza
2030	6,1878	0,0034668	Se rechaza
288	66,8458	3,00057E-7	Se rechaza
1243	30,3713	0,00000700101	Se rechaza
1631	22,3509	0,0000237242	Se rechaza
1609	57,6501	5,42095E-7	Se rechaza
756	55,5094	6,30579E-7	Se rechaza
659	12,1008	0,00026753	Se rechaza
1584	10,3464	0,000492513	Se rechaza
1264	57,1069	5,62994E-7	Se rechaza

ANEXO 12 Porcentaje de variación comparativa en los recuentos de células somáticas en leche de vacas con mastitis, respecto a cada tiempo de muestreo

CÓDIGO VACA	% VARIACIÓN							
	t0 a t1	t1 a t2	t2 a t3	t3 a t4	t4 a t5	t5 a t6	t6 a t7	t7 a t8
844	+264,44	+ 110,28	- 52,16	- 72,56	+ 118,59	+ 109,05	+ 82,32	- 54,25
2030	- 43,36	+ 516,86	+ 46,07	+ 76,55	- 19,42	- 31,54	- 81,28	+ 24,10
288	- 69,54	+ 7,94	- 39,66	+ 228,32	- 35,96	+ 65,72	+ 104,18	+ 56,15
1243	+ 13,72	- 40,22	- 78,25	- 12,06	- 14,20	+ 359,86	- 74,47	+ 16,55
1631	- 48,18	- 60,95	+1722,66	+ 92,98	- 85,79	- 94,51	---	---
1609	- 1,29	+ 2,73	+ 7,60	+ 1,30	- 48,14	- 7,06	+ 6,66	+ 92,84
756	- 54,14	+ 56,07	+ 101,32	+ 118,08	- 41,02	- 50,33	- 83,13	+ 69,55
659	+ 44,95	+ 57,32	- 66,42	- 31,01	- 57,79	+ 197,83	- 27,88	+ 136,94
1584	- 29,00	- 9,01	---	---	---	---	---	---
1264	+ 1,48	+ 517,19	+ 5,86	- 1,46	- 44,59	- 5,54	+ 52,76	+80,47

(+) : Incremento en el recuento de células somáticas.

(-) : Disminución en el recuento de células somáticas.

(---) : Proceso de secado de vaca.

ANEXO 13 Valores de pH en las muestras de leche provenientes de vacas sanas y con mastitis durante cada muestreo realizado en el estudio

13.1 Valores de pH de las muestras de leche provenientes de vacas sanas durante cada muestreo realizado en el estudio.

CÓDIGO VACA	MUESTREO								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
1655	---	6,68	6,65	6,64	6,62	6,61	6,60	6,60	6,60
1614	---	6,65	6,63	6,61	6,61	6,60	6,60	6,61	6,60
642	---	6,65	6,65	6,61	6,60	6,61	6,61	6,84	6,65

--- : Medición no realizada.

13.2 Valores de pH en las muestras de leche provenientes de vacas con mastitis durante cada muestreo realizado en el estudio.

CÓDIGO VACA	MUESTREO								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
844	---	7,04	7,36	7,05	6,93	7,05	6,91	6,97	6,84
2030	---	6,83	6,90	6,91	6,83	6,77	6,74	6,65	6,68
288	---	6,84	6,84	6,77	6,86	6,83	6,67	6,69	6,66
1243	---	6,93	6,90	6,75	6,81	6,77	6,92	6,84	6,65
1631	---	6,74	6,67	6,95	6,88	6,73	*	*	*
1609	---	6,85	6,83	6,83	6,84	6,77	6,69	6,67	6,67
756	---	6,82	6,84	6,89	6,82	6,69	6,81	6,65	6,63
659	---	6,83	6,89	6,81	6,83	6,74	6,68	6,67	6,75
1584	---	6,75	6,74	**	**	**	**	**	**
1264	---	6,82	6,97	6,98	6,84	6,82	6,65	6,66	6,63

--- : Medición no realizada.

* : Vaca seca a la tercera semana de muestreo.

** : Vaca seca a la sexta semana de muestreo.

ANEXO 14 Cálculo de la repetibilidad del método microscópico de referencia para determinación de células somáticas

MUESTRA	Wi recuento células somáticas	(Wi²)
1	39.416	1.553.621.056
2	34.309	1.177.107.481
3	22.488	505.710.144
4	31.136	969.450.496
5	16.591	275.261.281
6	7.017	49.238.289
7	7.084	50.183.056
8	32.915	1.083.397.225
9	31.470	990.360.900
10	32.971	1.087.086.841
11	1.151	1.324.801
12	13.547	18.3521.209
13	6.434	41.396.356
14	26.437	698.914.969
15	18.987	360.506.169
16	21.977	482.988.529
17	64.950	4.218.502.500
18	5.155	26.574.025
19	46.669	2.177.995.561
20	29.181	851.530.761
21	31.567	996.475.489
22	32.802	1.075.971.204
23	17.627	310.711.129
24	42.505	1.806.675.025
25	18.881	356.492.161
26	10.716	114.832.656
27	17.665	312.052.225
28	35.157	1.236.014.649

(Continuación ANEXO 14)

MUESTRA	Wi recuento células somáticas	(Wi²)
29	25.041	627.051.681
30	28.631	819.734.161
31	35.919	1.290.174.561
32	653	426.409
33	3.031	9.186.961
34	18.934	358.496.356
35	29.126	848.323.876
36	12.106	146.555.236
37	24.277	589.372.729
38	5.752	33.085.504
39	25.680	659.462.400
40	28.629	819.619.641
41	10.683	114.126.489
42	17.354	301.161.316
43	23.459	550.324.681
44	46.512	2.163.366.144
45	47.406	2.247.328.836
46	1.628	2.650.384
47	5.580	31.136.400
48	311	96.721
49	17.817	317.445.489
50	16.517	272.811.289
51	5.071	25.715.041
52	1.694	2.869.636
53	841	707.281
54	423	178.929
55	316	99.856
56	114	12.996
57	297	88.209
58	12.278	150.749.284
59	3.865	14.938.225

(Continuación ANEXO 14)

MUESTRA	Wi recuento células somáticas	(Wi²)
60	1.747	3.052.009
61	598	357.604
62	459	210.681
63	259	67.081
64	443	196.249
65	385	148.225
66	245	60.025
67	8.872	78.712.384
68	6.303	39.727.809
69	3.868	14.961.424
70	548	300.304
71	467	218.089
72	449	201.601
73	375	140.625
74	4.768	22.733.824
75	46.315	2.145.079.225
76	52.982	2.807.092.324
77	70.709	4.999.762.681
78	29.141	849.197.881
79	16.114	259.660.996
80	32.121	1.031.758.641
81	36.741	1.349.901.081
82	16.460	270.931.600
83	39.476	1.558.354.576
84	44.221	1.955.496.841
85	14.824	219.750.976
86	24.779	613.998.841
87	26.083	680.322.889
88	52.472	2.753.310.784
89	63.738	4.062.532.644
90	41.026	1.683.132.676

(Continuación ANEXO 14)

MUESTRA	Wi recuento células somáticas	(Wi ²)
91	69.331	4.806.787.561
92	81.322	6.613.267.684
93	93.156	8.678.040.336
94	93.156	8.678.040.336
95	71.955	5.177.522.025
96	84.846	7.198.843.716
97	142.857	20.408.122.449
98	33.541	1.124.998.681
99	191.786	36.781.869.796
100	324.737	1,05454E+11
101	223.076	49.762.901.776
102	119.358	14.246.332.164
103	363.391	1,32053E+11
104	246.475	60.749.925.625
105	217.544	47.325.391.936
106	204.786	41.937.305.796
107	116.524	13.577.842.576
108	332.43	1.105.097.049
$\sum Wi^2$		6,25694E + 11

14.1 Repetibilidad del método microscópico de referencia para determinación de células somáticas.

$$Sr = \left[\left(\frac{1}{2 \cdot q} \right) \cdot \sum Wi^2 \right]^{\frac{1}{2}}$$

$$r = 2,83 \cdot Sr$$

donde:

- r : Repetibilidad
- Sr : Desviación estándar de la repetibilidad
- q : Número de muestras
- W : Diferencia entre duplicados

(Continuación ANEXO 14.1)

$$Sr = \left[\left(\frac{1}{2 \cdot q} \right) \cdot \sum Wi^2 \right]^{\frac{1}{2}}$$

$$Sr = \left[\left(\frac{1}{2 \cdot 108} \right) \cdot 6,25694E + 11 \right]^{\frac{1}{2}}$$

$$Sr = 53.821,29$$

$$r = 2,83 \cdot Sr$$

$$r = 2,83 \cdot 53.821,29$$

$$r = 152.314 \text{ células/mL de leche}$$

$$CV = \frac{Sr}{\bar{x}} \cdot 100 = \frac{53.821,29}{1.211.408} \cdot 100 = 4,44\%$$