

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS



CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**“EFECTO DEL ÁCIDO HIPOCLOROSO COMO ALTERNATIVA
TERAPÉUTICA EN EL CONTROL DE MASTITIS SUBCLÍNICA EN
VACAS LACTANTES”**

AUTOR:

Ana Belén Toasa Canseco

TUTOR:

Dr. Efraín Lozada Salcedo. Mg.

Cevallos – Ecuador

2022

CEVALLOS, 29 DE JULIO DEL 2022

APROBACIÓN DEL TUTOR

“EFECTO DEL ÁCIDO HIPOCLOROSO COMO ALTERNATIVA
TERAPÉUTICA EN EL CONTROL DE MASTITIS SUBCLÍNICA EN VACAS
LACTANTES”

REVISADO POR:



Firmado electrónicamente por:
**EUCLIDES EFRAIN
LOZADA SALCEDO**

Dr. Efraín Lozada Salcedo. Mg.

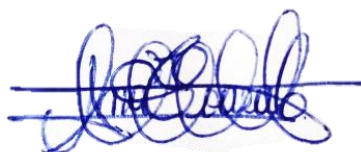
TUTOR TRABAJO TITULACIÓN

DERECHOS DE AUTOR

Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado **“EFECTO DEL ÁCIDO HIPOCLOROSO COMO ALTERNATIVA TERAPÉUTICA EN EL CONTROL DE MASTITIS SUBCLÍNICA EN VACAS LACTANTES”** como uno de los requisitos previos para la obtención del Título de grado de Medicina Veterinaria Zootecnista, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura según las normas de la Universidad.

Estoy de acuerdo que se realice cualquier copia de este Informe Final, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no ponga una ganancia económica potencial y se respete los derechos de propiedad intelectual del proyecto al cual está asociado, así como al director de este.

Sin perjuicio de ejercer mi derecho de autor, autorizo a la Universidad Técnica de Ambato la Publicación de este Informe Final, o parte de él.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Ana Belén Toasa Canseco', written over a horizontal line.

ANA BELÉN TOASA CANSECO

CI: 1804722393

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

“EFECTO DEL ÁCIDO HIPOCLOROSO COMO ALTERNATIVA TERAPÉUTICA EN EL CONTROL DE MASTITIS SUBCLÍNICA EN VACAS LACTANTES”

APROBADO POR:

FECHA:

.....

19/09/2022

Ing. Marco Pérez, PhD

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

.....

19/09/2022

Dr. Marco Rosero Peñaherrera

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

.....

19/09/2022

Ing. Gonzalo Aragadvay Yungán

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

DEDICATORIA

“A la cima no se llega pasando por encima de los demás sino superándote a ti mismo”.
Por esta razón me dedico este trabajo de investigación porque ante las adversidades he aprendido a ser resiliente y perseverante.

El primer paso a la superación personal es confiar en ti mismo.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mi madre por su apoyo incondicional en todo momento durante mis estudios en la carrera.

A mis hijos, Juan Pablo y Hernán Alejandro por siempre estar a mi lado y llenar de alegría mi vida con sus travesuras y ocurrencias. Gracias mis muñecos por motivarme a seguir en adelante y cumplir una meta más en mi vida.

Al Dr. Efraín Lozada y Dr. Marco Rosero por brindarme su guía y apoyo con sus conocimientos en la realización de este trabajo investigativo.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

RESUMEN EJECUTIVO	XIII
ABSTRACT	XIV
CAPÍTULO I.....	15
MARCO TEÓRICO.....	15
1.1. Introducción.....	15
1.2. Antecedentes investigativos	16
1.3. Marco Teórico	24
1.3.1. Mastitis bovina	24
1.3.2. Etiología	25
1.3.3. Epidemiología	26
1.3.4. Patogenia.....	26
1.3.5. Clasificación de la mastitis de acuerdo al grado de inflamación	28
1.3.6. Métodos de detección para mastitis bovina	31
1.3.7. Tratamiento para mastitis.....	34
1.3.8. Ácido hipocloroso	35
1.3.9. Producción orgánica de ácido hipocloroso	36
1.3.10. Métodos químicos de obtención.....	36
1.3.11. Usos del ácido hipocloroso	38
1.4. Objetivos.....	39
1.4.1. Objetivo general	39
1.4.2. Objetivos específicos	39
CAPÍTULO II	40
METODOLOGÍA	40
2.1. Ubicación del experimento.....	40
2.2. Características del lugar	40

2.3. Equipos, materiales y reactivos	41
2.4. Factores de estudio	41
2.5. Tratamientos	42
2.5.1. Esquema de la distribución de los tratamientos.....	42
2.7.1. Tamaño de muestra.....	43
2.7.2. Tipos de muestreo.....	44
2.7.3. Prueba de California para mastitis (CMT).....	44
2.7.5. Cultivo bacteriológico.....	48
2.7.6. Antibiograma	50
2.7.8. Recuento de unidades formadoras de colonias (UFC).....	50
2.7.9. Aplicación del tratamiento.....	50
2.8. Variables respuesta.....	51
2.8.1. Células somáticas, Ccs/mL	51
2.8.2. Unidades Formadoras de Colonias, UFC/ml	52
2.8.3. Acción antimicrobiana de los tratamientos, %	52
2.9. Procesamiento de la información.....	52
CAPÍTULO III.....	53
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53
3.1. Análisis y discusión de resultados	53
3.1.1. Determinación del grado de mastitis subclínica por medio del conteo de células somáticas (Ccs/ml) pre y postratamiento.....	53
3.1.2. Efectividad de los tratamientos en vacas con mastitis subclínica grado I	55
3.1.3. Efectividad de los tratamientos en vacas con mastitis subclínica grado II	56
3.1.4. Efectividad de los tratamientos en vacas con mastitis subclínica grado III	57
3.1.6. Acción antimicrobiana de los tratamientos sobre <i>Staphylococcus aureus</i> en vacas con mastitis subclínica grado I.....	59

3.1.7. Acción antimicrobiana de los tratamientos sobre <i>Streptococcus</i> spp. en vacas con mastitis subclínica grado I.....	60
3.1.8. Acción antimicrobiana de los tratamientos sobre <i>Escherichia coli</i> en vacas con mastitis subclínica grado I.....	61
3.1.9. Acción antimicrobiana de los tratamientos sobre <i>Staphylococcus aureus</i> en vacas con mastitis subclínica grado II.....	62
3.1.10. Acción antimicrobiana de los tratamientos sobre <i>Streptococcus</i> spp. en vacas con mastitis subclínica grado II	63
3.1.11. Acción antimicrobiana de los tratamientos sobre <i>Escherichia coli</i> en vacas con mastitis subclínica grado II	64
3.1.12. Acción antimicrobiana de los tratamientos sobre <i>Staphylococcus aureus</i> en vacas con mastitis subclínica grado III	65
3.1.13. Acción antimicrobiana de los tratamientos sobre <i>Streptococcus</i> spp. en vacas con mastitis subclínica grado III	66
3.1.14. Acción antimicrobiana de los tratamientos sobre <i>Escherichia coli</i> en vacas con mastitis subclínica grado III	67
3.2. Discusión	68
3.3. Verificación de hipótesis	70
CAPÍTULO IV	71
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	71
4.1. Conclusiones.....	71
4.2. Recomendaciones	72
CAPÍTULO V	73
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Patógenos contagiosos y ambientales productores de mastitis bovina	25
Tabla 2 Interpretación de resultados de la Prueba de California para Mastitis.....	33
Tabla 3 Condiciones meteorológicas	40
Tabla 4 Distribución de los tratamientos.....	42
Tabla 5 Interpretación de los métodos de evaluación de mastitis y puntajes de CMT	46
Tabla 6 Clasificación de mastitis según Mellenbeger y Roth (2000)	48
Tabla 7 Numero y porcentaje de vacas clasificadas según el grado de mastitis subclínica de acuerdo a conteo de células somáticas (Ccs/ml) pre y post tratamiento	55
Tabla 8 Conteo de células somáticas postratamiento en vacas con mastitis subclínica grado I	56
Tabla 9 Conteo de células somáticas postratamiento en vacas con mastitis subclínica grado II.....	57
Tabla 10 Conteo de células somáticas postratamiento en vacas con mastitis subclínica grado III	58

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Porcentaje y conteo de UFC/ml de los agentes bacterianos causantes de mastitis subclínica en el hato lechero previo al tratamiento	59
Gráfico 2 Porcentaje y conteo de UFC/ml para <i>Staphylococcus aureus</i> pre y postratamiento en vacas con mastitis subclínica grado I	60
Gráfico 3 Porcentaje y conteo de UFC/ml para <i>Streptococcus</i> spp. pre y postratamiento en vacas con mastitis subclínica grado I	61
Gráfico 4 Porcentaje y conteo de UFC/ml para <i>Escherichia coli</i> pre y postratamiento en vacas con mastitis subclínica grado I	62
Gráfico 5 Porcentaje y conteo de UFC/ml para <i>Staphylococcus aureus</i> pre y postratamiento en vacas con mastitis subclínica grado II	63
Gráfico 6 Porcentaje y conteo de UFC/ml para <i>Streptococcus</i> spp. pre y postratamiento en vacas con mastitis subclínica grado II	64
Gráfico 7 Porcentaje y conteo de UFC/ml para <i>Escherichia coli</i> pre y postratamiento en vacas con mastitis subclínica grado II	65
Gráfico 8 Porcentaje y conteo de UFC/ml para <i>Staphylococcus aureus</i> pre y postratamiento en vacas con mastitis subclínica grado III	66
Gráfico 9 Porcentaje y conteo de UFC/ml para <i>Streptococcus</i> spp. pre y postratamiento en vacas con mastitis subclínica grado III	67
Gráfico 10 Porcentaje y conteo de UFC/ml para <i>Escherichia coli</i> pre y postratamiento en vacas con mastitis subclínica grado III	68

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Predios e instalaciones de la granja “Santa Clara”	80
Anexo 2 Realización del California Mastitis Test (CMT).....	80
Anexo 3 Toma de muestras para conteo de células somáticas y cultivo bacteriológico	81
Anexo 4 Pruebas de laboratorio.....	82
Anexo 5 Administración del ácido hipocloroso (HClO)	82
Anexo 6 Resultados del California Mastitis Test	83
Anexo 7 Cuadro de resumen del conteo de células somáticas (Ccs/ml) y análisis microbiológico (UFC/ml) de las vacas utilizadas en el estudio.....	88
Anexo 8 Análisis de varianza del conteo de células somáticas (Ccs/ml) postratamiento de las vacas con mastitis subclínica grado I.....	90
Anexo 9 Análisis de varianza del conteo de células somáticas (Ccs/ml) postratamiento de las vacas con mastitis subclínica grado II.....	90
Anexo 10 Análisis de varianza del conteo de células somáticas (Ccs/ml) postratamiento de las vacas con mastitis subclínica grado III	91

RESUMEN EJECUTIVO

La presente investigación tuvo como objetivo determinar el efecto del ácido hipocloroso como alternativa terapéutica en el control de mastitis subclínica en vacas lactantes. El estudio se llevó a cabo en la hacienda “Santa Clara”, en un hato lechero de 340 vacas lactantes de raza Holstein, se muestreó un total de 150 animales de los cuales 36 fueron seleccionados para el experimento. Se empleó un diseño experimental a base de un modelo estadístico completamente al azar (D.C.A) para evaluar la eficacia de 3 dosis de ácido hipocloroso (HClO): T1= 10 ml de HClO, 450 ppm, vía intramamaria, por 5 días; T2= 20 ml de HClO, 450 ppm, vía intramamaria, por 5 días y T3= 30 ml de HClO, 450 ppm, vía intramamaria, por 5 días) frente a un tratamiento convencional o testigo (T0= 10 ml de Cefalexina 200 mg + Kanamicina 100.000 UI, vía intramamaria por 3 días) en vacas lactantes que presentaron tres diferentes grados de mastitis subclínica, con 3 repeticiones por cada tratamiento. Las variables analizadas fueron: el conteo de células somáticas (Ccs/ml) como indicativo de inflamación, el recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC/ml) y la acción antimicrobiana de los tratamientos aplicados. Al administrarse dosis de 30 ml de HClO (T3) por vía intramamaria, tras la aplicación de este producto se registró un conteo celular menor a 200.000 Ccs/ml en los tres grados de mastitis subclínica. Se identificaron tres tipos de agentes bacterianos: *Staphylococcus aureus* en un 66%, *Streptococcus* spp. 24% y *Escherichia coli* 10%. En relación a la acción antimicrobiana del ácido hipocloroso, se obtuvo una mejor respuesta en la reducción de colonias de *Staphylococcus aureus* con una dosis de 30 ml, compartiendo niveles de respuesta antimicrobiana del 100% en vacas con mastitis subclínica grado I y II con una ligera reducción en el control de *S. aureus* para vacas grado III. Para *Streptococcus* spp. la respuesta antimicrobiana fue de 100% en las tres dosis de HClO y con el tratamiento convencional en vacas grado II y III. No obstante, se registró un caso aislado donde la respuesta de T2 descendió ligeramente (91,8%), pudiéndose atribuir a situaciones de manejo ajenas al experimento. Por último, la efectividad bactericida en colonias de *E. coli* fue la misma en todos los tratamientos aplicados (100%).

Palabras clave: Mastitis subclínica, ácido hipocloroso, tratamiento

ABSTRACT

The objective of this research was to determine the effect of hypochlorous acid as a therapeutic alternative in the control of subclinical mastitis in lactating cows. The study was carried out at the "Santa Clara" farm, in a dairy herd of 340 Holstein lactating cows, a total of 150 animals were sampled, of which 36 were selected for the experiment. An experimental design based on a completely random statistical model (D.C.A) was used to evaluate the efficacy of 3 doses of hypochlorous acid (HClO): T1= 10 ml of HClO, 450 ppm, intramammary route, for 5 days; T2= 20 ml of HClO, 450 ppm, intramammary route, for 5 days and T3= 30 ml of HClO, 450 ppm, intramammary route, for 5 days) compared to a conventional or control treatment (T0= 10 ml of Cephalexin 200 mg + Kanamycin 100,000 IU, intramammary route for 3 days) in lactating cows that presented three different degrees of subclinical mastitis, with 3 repetitions for each treatment. The variables analyzed were: the somatic cell count (Ccs/ml) as an indication of inflammation, the Colony Forming Units count (CFU/ml) and the antimicrobial action of the applied treatments. When doses of 30 ml of HClO (T3) were administered intramammary, after the application of this product, a cell count of less than 200,000 Ccs/ml was recorded in the three degrees of subclinical mastitis. Three types of bacterial agents were identified: *Staphylococcus aureus* in 66%, *Streptococcus* spp. 24% and *Escherichia coli* 10%. In relation to the antimicrobial action of hypochlorous acid, a better response was obtained in the reduction of *Staphylococcus aureus* colonies with a dose of 30 ml, sharing levels of antimicrobial response of 100% in cows with grade I and II subclinical mastitis with a slight reduction in the control of *S. aureus* for grade III cows. For *Streptococcus* spp. the antimicrobial response was 100% in the three doses of HClO and with the conventional treatment in grade II and III cows. However, an isolated case was recorded where the T2 response decreased slightly (91.8%), which could be attributed to handling situations unrelated to the experiment. Finally, the bactericidal effectiveness in *E. coli* colonies was the same in all the applied treatments (100%).

Keywords: Subclinical mastitis, hypochlorous acid, treatment

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Introducción

La mastitis bovina se presenta como un proceso inflamatorio a nivel de las glándulas mamarias, provocando cuadros de dolor, molestia y estrés en el ganado. Su prevalencia en explotaciones bovinas desencadena un descenso en la producción y alteraciones en la calidad de la leche. Con respecto a su aparición se le atribuyen numerosas causas, entre las que figuran: lesiones físicas, malas prácticas de ordeño, agentes químicos e infecciones provocadas por bacterias especialmente *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Mycoplasma* spp. y *Corinebacterium* spp.

Generalmente esta patología se clasifica en: clínica (sintomática) y subclínica (asintomática), esta última al no poder ser detectada tiende a pasar desapercibida. La mastitis bovina en su forma subclínica tiene un alto grado de presentación con un 98,6% en relación a la forma clínica que representa apenas un 0,66%.

La terapia antibiótica para el tratamiento de mastitis subclínica representa un gasto adicional para los productores, disminuyendo el margen de ganancia en la explotación ganadera. El uso continuo de fármacos antibacterianos genera resistencia microbiana reduciendo de manera significativa su capacidad bactericida. Posterior al tratamiento con fármacos antimastóticos, el irrespeto de los tiempos de retiro de los medicamentos empleados llega a generar residuos en la leche, convirtiéndose en un problema de salud pública, afectando también al ganadero, quien se ve en la obligación de desechar todo su producto.

En relación a la problemática expuesta el ácido hipocloroso (HClO) figura como una alternativa novedosa en el tratamiento de esta enfermedad. Este producto es un ión no

disociado el cloro, no llega a ser corrosivo ni caustico, convirtiéndose en un potente desinfectante. En el campo de la medicina, el ácido hipocloroso se ha empleado en el cierre de heridas y en el tratamiento de úlceras en la piel y mucosas, su aplicación en estas circunstancias resulta factible gracias a su excelente función cicatrizante y por su amplio margen de seguridad.

En respuesta a esta problemática, la presente investigación tuvo por objetivo determinar el efecto del ácido hipocloroso (HClO) como alternativa terapéutica en el control de mastitis subclínica mediante su aplicación intramamaria, permitiendo reducir de manera significativa la presencia de agentes infecciosos a nivel de la glándula mamaria, aprovechando su capacidad de no generar residuos en la leche no siendo necesario el retiro pos tratamiento.

1.2. Antecedentes investigativos

Las administraciones terapéuticas de ácido hipocloroso surgen como alternativa en el tratamiento de la mastitis, debido a que no generan residuos en la leche, minimizando su impacto en la salud humana y animal. El estudio realizado por **Qetin et al (2018)** tuvo por objetivo investigar la eficacia del uso de ácido hipocloroso (HClO) intramamario en bovinos con mastitis subclínica. La investigación se realizó en dos granjas diferentes con 227 y 64 vacas de raza Holstein, donde a cada animal se le realizó una prueba de CMT para el diagnóstico de mastitis subclínica. Se determinó mastitis subclínica en 69 cuartos mamarias de 40 vacas procedentes de la primera granja lechera y 5 cuartos mamarias de 5 vacas de la segunda granja. El tratamiento consistió en administración de 100 ml de ácido hipocloroso intramamario 3 veces con intervalos de 12 horas a las glándulas mamarias con mastitis subclínica después del ordeño. Así también, se recolectaron muestras de 10 vacas sanas negativas al CMT de cada granja para el análisis microbiológico, designándolas como grupo control. Los resultados obtenidos indicaron que, en la primera granja, previo a la administración del tratamiento, el análisis microbiológico fue positivo en 46 de las 69 muestras y que posterior a las 3 administraciones de HClO los resultados del análisis microbiológico

fueron negativos en 29 de 46 muestras. En la segunda granja los resultados del análisis microbiológico fueron positivos en 3 de 5 glándulas mamarias con mastitis subclínica y el análisis microbiológico fue negativo luego de administrar las 3 dosis de HClO. En adición a esto, durante el estudio se compararon el número de células somáticas antes y después de la administración de HClO, mismas que se redujeron al cabo de una semana de culminado el tratamiento.

Boddie y Nickerson (1996) evaluaron la eficacia de dos productos para baños de pezones que contenían un germicida a base de ácido hipocloroso contra el desafío experimental causado por *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*. En el estudio, se probaron dos formulaciones para la inmersión de pezones que contenían: dicloro de sodio isocianurato (NaDCC), el cual liberaba ácido hipocloroso (2800 ppm) funcionando como ingrediente activo. Los productos se evaluaron en dos ensayos: el producto 1, a manera de tableta efervescente que contenía 2,5 g de NaDCC. El producto 2 de las mismas características que su similar contenía 3,0 g de NaDCC. En cada formulación se agregó 3,78 L de agua y 28 ml de una solución que contenía un tinte y acondicionador de piel. El producto 1 se probó durante 5 semanas en 139 vacas y el producto 2, durante 9 semanas en 75 vacas en el ordeño de la tarde, sumergiendo todos los pezones. El producto 1 redujo el número de *S. aureus* en un 73,6% y de *S. agalactiae* 65,1%, por otro lado, el producto 2 de 69,0% y 63,5% respectivamente. En adición a esto no se observaron efectos adversos en el pezón y condición de piel.

Un estudio similar fue realizado por **Soto y González (2016)** para evaluar el efecto del ácido hipocloroso como presellador en un grupo de vacas lecheras. En esta investigación se emplearon 20 vacas lecheras de raza Holstein divididas en dos grupos, cada uno integrado por 10 animales. El grupo A, fue tratado con un pre sellador a base de ácido hipocloroso (HClO) en una concentración de 450 ppm y el grupo B con uno a base de amonio cuaternario en una concentración del 1,0 % posteriormente la evaluación de cada producto se realizó en 20 a 30 segundos previos al ordeño. Los parámetros analizados fueron los siguientes: residuos de HClO en leche, cantidad de mesófilos, aerobios, coliformes, hongos y levaduras en piel a nivel de la ubre. El

tratamiento con HClO provocó una reducción de coliformes (*E. coli*, *Enterobacter aerogenes* y *Klebsiella*) en un 88,3% en comparación con el amonio cuaternario con alrededor del 24,2%. Adicionalmente, se evidenció una efectividad moderada contra hongos y levaduras por parte del HClO mismo que, no generó ningún tipo de residuos en concentraciones iguales o inferiores a 450 ppm. Recomendando este producto para emplearlo como desinfectante en el pre sellado de vacas lecheras.

Otra investigación que demostró la capacidad antimicrobiana del ácido hipocloroso y su uso como alternativa terapéutica ante enfermedades reproductivas en el ganado bovino fue la realizada por **Fuentes (2018)** que tuvo por objetivo evaluar el efecto del ácido hipocloroso en el tratamiento de 32 vacas lecheras que presentaron endometritis posparto. En esta investigación se emplearon cuatro tratamientos: T1= Oxitetraciclina al 5%, por 10 minutos, vía intrauterina; T2= Oxitetraciclina al 5% por 15 minutos, vía intrauterina; T3= Ácido hipocloroso al 0,5% por 10 minutos, vía intrauterina y T4= Ácido hipocloroso al 0,5% por 15 minutos, vía intrauterina. Los resultados del estudio evidenciaron una mejor respuesta involutiva del proceso inflamatorio con el tratamiento T4. Así también, presentó una mejor respuesta antimicrobiana ante cultivos de *E. coli* y *Actinomyces pyogenes* responsables de este proceso infeccioso. El estudio determinó que la administración intrauterina durante 15 minutos de ácido hipocloroso al 0,5%, conduce a la obtención de una mejor respuesta paliativa para el tratamiento de la endometritis posparto, pudiéndose apreciar una reducción en el proceso de involución uterina lo cual conduce a resultados positivos tanto reproductivos como productivos.

El ácido hipocloroso se ha empleado como terapia alternativa para reducir el uso de antimicrobianos en el tratamiento de patologías infecciosas con desarrollo de úlceras en la ganadería bovina. En relación con este tema, **Caballero et al. (2017)** sugieren que, el ácido hipocloroso puede emplearse como coadyuvante en casos compatibles de papilomatosis bovina debido a su fácil aplicación y ausencia de efectos adversos. Para llegar a esta conclusión, se realizó un estudio donde se tomaron dos casos clínicos correspondientes a dos novillas de raza Holstein de 22 y 25 meses de edad que

presentaban extensas lesiones dérmicas a nivel de la ubre (compatible con papilomatosis). Los dos animales habían recibido un tratamiento previo, con hemoterapia, histovacuna y diaceturato de diazonamibenzidamidina más cobre, vía subcutánea por 45 días. Debido a que, no se observó un cambio favorable, se procedió a instaurar un protocolo de aspersión empleando agua super-electrolizada con ácido hipocloroso a una concentración de 450 ppm una vez al día, abarcando toda la extensión de la lesión por cinco meses. Posteriormente, al cabo de los 5 meses de iniciado el tratamiento, se evidenció la resolución de gran parte de las lesiones de manera completa, sumado a la ausencia de úlcera o efectos secundarios, como fiebre, anorexia o lesiones compatibles en otras regiones del cuerpo.

En este mismo contexto, **Gard et al. (2016)**, evaluaron la eficacia terapéutica del uso de HClO en spray para el tratamiento de queratoconjuntivitis infecciosa bovina (QIB) inducida experimentalmente provocada por *Moraxella bovis*. El estudio comprendió en dos ensayos: en la prueba 1, se emplearon 18 terneros, con 6 animales por grupo, y en la prueba 2, se utilizó 12 terneros, integrando a 4 animales por grupo. Para ambos grupos se inoculó tópicamente con $1,0 \times 10^7$ de *M. bovis*, no obstante, para el grupo 2 solo se inoculó el ojo izquierdo. En el grupo 1 y 2 se aplicó 2 ml de ácido hipocloroso al 0,009%, en los cuales se roció tópicamente en la córnea de cada ternero dos veces al día durante 10 días. En cada animal se puntuó el dolor ocular dos veces al día, para luego recolectar muestras de todos los ojos en los días -7, 0, 1, 4 y 10 y con esto realizarse cultivos. Los ojos de los terneros fueron teñidos con fluoresceína tomándose fotografías de la lesión para evaluar la curación de la córnea. En cuanto a la puntuación promedio del dolor y los días de curación, fueron menores para el grupo 2, sugiriendo que el HClO en spray como terapia alternativa en el tratamiento de esta patología, permite reducir el dolor, grado de infección y tiempo de curación de las lesiones corneales.

Moreno (2006) realizó un estudio con el propósito de evaluar la efectividad farmacológica de un tratamiento a base de ácido hipocloroso en caninos que fueron inoculados experimentalmente con *Helicobacter pylori*. Para esta investigación se

analizó un grupo conformado por 32 perros dividido en dos: grupo 1 (experimental) y grupo 2 (control). En ambos grupos se inoculó por vía oral 3ml de la suspensión de *Helicobacter pylori* en una concentración de 9×10^8 UFC a cada animal. El diagnóstico confirmativo se realizó mediante una endoscopia a los 15 días post inoculación, así mismo, se efectuó la prueba de ureasa en los dos grupos. En cada endoscopia que se realizó se evidenciaron petequias, congestión y moco derivado de la mucosa gástrica. Para los perros del grupo experimental se administró 1 mg/kg/día de ácido hipocloroso (HClO) en una concentración de 400 ppm en tres tomas por 15 días. Posteriormente a los 20 días se llevó a cabo una endoscopia y prueba de ureasa para el grupo experimental y control. Los resultados obtenidos reflejaron que, en el grupo experimental, el ácido hipocloroso mostró una efectividad del 100% para la eliminación del *Helicobacter pylori*, con una cicatrización del 93%, cambio de coloración de mucosa en 81% y reflujo del 12%. Por otro lado, el grupo control (sin tratamiento) mostró una reducción del *H. pylori* en un 43%, cicatrización del 13%, sumado a un 25% de cambio de coloración de mucosa. En relación al tratamiento con HClO ante una infección de *Helicobacter pylori*, se evidencia una efectividad del 95% debido a que uno de los perros tratados no presentó respuesta en la cicatrización de tejido gástrico, no obstante, se obtuvo una reducción de bacterias y en relación al aspecto del tejido gástrico en los perros tratados se observó una recuperación de la mucosa gástrica, contribuyendo al tratamiento en cuadros de gastritis.

En un estudio comparativo realizado por **Paredes (2018)**, se analizó el efecto antibacteriano del peróxido de hidrógeno al 3,18%, hipoclorito de sodio al 1,85% y ácido hipocloroso en concentraciones de 125 y 500 ppm contra cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus mutans*. El estudio experimental *in vitro* inició con la activación de cepas microbianas provenientes de un medio de refrigeración a 5°C, realizando un total de 10 cultivos de agar sangre en una cámara de flujo laminar (5 cultivos de *S. aureus* y 5 de *S. mutans*). En cada cultivo se colocaron los discos de inhibición que contenían las sustancias antisépticas a evaluar, se incubaron a una temperatura de 35°C por 24, 48 y 72 horas. A continuación, por medio de la prueba de Kruskal Wallis, se obtuvieron los resultados en dos grupos, uno con valores bajos para el peróxido de hidrógeno y para el ácido hipocloroso a una concentración de 125 ppm

y otro con valores altos para el hipoclorito de sodio y el ácido hipocloroso en una concentración de 500 ppm. Las conclusiones del estudio indican que, el ácido hipocloroso a una concentración de 500 ppm presenta una mayor capacidad antiséptica, frente a otras sustancias analizadas como el peróxido de hidrógeno al 3,18%, ácido hipocloroso a una concentración de 125 ppm y el hipoclorito de sodio al 1,85%.

En el campo de la medicina el ácido hipocloroso se ha convertido en una alternativa terapéutica para el control de infecciones y reparación de heridas, este producto forma parte de un novedoso conglomerado de agentes antimicrobianos conocidos como “moléculas no antibióticas”. En base a esto, **Lafaurie et al. (2009)** evaluaron la eficacia del ácido hipocloroso contra microorganismos con una elevada capacidad patogénica presentes en la cavidad oral (cepas bacterianas ATCC y en *Candida albicans* ATCC 90028). La efectividad antimicrobiana y antifúngica del HClO se evaluó con diferentes concentraciones de este producto (25, 250, 500, 100 y 1500 ppm) y con intervalos para tiempo de acción diferentes (1, 5 10 y 15 minutos) El ácido hipocloroso a una concentración de 500 ppm durante 1 minuto alcanzó la inhibición bacteriana de: *S. sanguis*, *S. faecalis*, *S. mutans*, *S. corrodens*, *C. rectus*, *F. nucleatum*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae* y *K. oxytica*, demostrando una elevada capacidad patogénica para microorganismos de la cavidad oral pero con un bajo poder antifúngico. En concentraciones más bajas se requieren tiempos de acción más prolongados y para alcanzar la inhibición *Candida albicans* es necesaria la administración de ácido hipocloroso a una concentración superior a las 500 ppm con un tiempo de acción de 10 minutos.

Continuando con esta temática, se presenta el estudio realizado por **Naranjo, Acevedo y Calderón (2006)** que tuvo por objetivo demostrar la utilidad del ácido hipocloroso en el manejo de úlceras en miembros inferiores. En esta investigación se evaluaron 958 pacientes atendidos en consulta externa por parte de los autores. El tratamiento a base de este compuesto se aplicó de forma tópica local 6-8 veces al día sobre gasas y elásticos, mismos que permanecieron en las úlceras constantemente durante 24 horas,

facilitando la actividad del ácido hipocloroso de forma continua. Los resultados obtenidos del tratamiento para estas úlceras venosas al aplicar HClO en 490 pacientes, reflejaron el cierre de lesiones ulcerosas hasta en un 97,14% (476 pacientes) al cabo de 6 meses. Por lo que, es recomendable el uso de ácido hipocloroso, como terapia coadyuvante en el tratamiento local de úlceras.

Sakarya et al. (2014) investigaron el efecto de una solución de ácido hipocloroso (HClO) sobre la tasa de destrucción, formación de biopelículas y actividad antimicrobiana dentro del biofilm contra microorganismos frecuentemente aislados, así como en la tasa de migración de fibroblastos y queratinocitos. Para el estudio se utilizó ácido hipocloroso con una concentración de 218 ppm a un pH DE 7,1. Se realizaron cultivos de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Candida albicans*. Luego de la aplicación de HClO, la actividad antimicrobiana se hizo evidente al cabo de 12 segundos en gran parte de los microorganismos. La solución estabilizada de ácido hipocloroso tuvo un efecto antimicrobiano favorable y en dependencia de la dosis, la migración de fibroblastos y queratinocitos también se vio afectada, en comparación con otros medios, convirtiéndolo en un agente ideal para el cuidado de heridas

El ácido hipocloroso empleado para la desinfección de superficies y maquinas en producciones pecuarias se deriva del agua electrolizada. El agua electrolizada ligeramente ácida (SAEW) se obtiene a través del proceso de electrólisis de una solución diluida de cloruro de sodio (NaCl) o ácido clorhídrico (HCl). Su alto efecto bactericida responde a la disponibilidad de cloro a manera de: ácido hipocloroso (HClO), hipoclorito (ClO^-) y cloro diatómico (Cl_2) (**Chen y Wang, 2022**).

En este contexto, el estudio realizado por **Kawai et al. (2017)** evaluó el efecto desinfectante del agua electrolizada ligeramente ácida (SAEW) utilizada en el control de mastitis de un hato lechero con una alta incidencia de infección por *Pseudomonas*. A pesar de la terapia antibiótica y el cese completo de los cuartos de ordeño infectados, se produjeron numerosas infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* provocando

cuadros nuevos y recurrentes de mastitis clínica (5,8-7,1% de los casos de mastitis clínica) en la granja entre los años 2003 y 2005. Los cambios realizados en los procedimientos y las modificaciones del equipo de ordeño no mejoraron la contaminación ambiental o la incidencia de mastitis por esta bacteria. De tal forma que, para llevar a cabo un proceso de descontaminación más acentuado en la sala de ordeño se instaló un sistema a base de agua electrolizada ligeramente ácida en 2006. La esterilización con SAEW (pH 5-6,5 y cloro disponible 12 ppm) se realizó en todo el equipo de ordeño y en el entorno de la sala antes y durante la rutina de ordeño. Luego de adoptar el sistema SAEW, la incidencia de mastitis clínica y subclínica por *Pseudomonas* se redujo significativamente.

En este mismo ámbito se detalla la investigación de **Nan et al, (2010)** que tuvo por objetivo estudiar el efecto desinfectante y aplicación de agua electrolizada generalmente ácida (SIEW) en una granja de ganado lechero. Se comparó la eficacia de desinfección de este producto en la inmersión de pezones con el uso de povidona yodada. Los resultados del estudio demostraron que el índice bactericida para la SIEW aumentaba a medida que se incrementaba la concentración de cloro disponible (CCD) y el tiempo de baño al mojar los pezones. El índice bactericida promedio para microorganismos aerobios totales alcanzó hasta 2.2 logUFC/cm² usando agua electrolizada generalmente ácida con una concentración de cloro disponible de 60 mg/L a un tiempo de baño de 15 segundos, mientras que la povidona yodada presentó un índice bactericida de 1,52 logUFC/cm² en el mismo tiempo de exposición, convirtiendo a la SIEW en una buena alternativa para la desinfección de ubres y con ello prevenir la aparición de infecciones futuras.

Por otra parte, **Zheng et al. (2016)** realizaron un estudio con el fin de optimizar los parámetros operativos (diámetro del orificio de la boquilla y presión del rociado) para la aspersion de SAEW en función de la distribución del tamaño de los aerosoles en aspersion, pérdida de cloro disponible y eficiencia en la reducción de bacterias cultivables (CB) transportadas en el aire. En seis ensayos de aspersion de SAEW realizados bajo diferentes parámetros operativos se empleó una dosis de 80 ml/m²

administrados en la cámara de aspersión del generador de nebulización. La aspersión de SAEW con aerosoles rociados de mediano tamaño ($Dv(50) = 86,62 \mu\text{m}$, $67,94 \mu\text{m}$ y $54,53 \mu\text{m}$) presentó eficiencias significativamente más altas para la reducción de bacterias cultivables en el aire, a diferencia de los aerosoles grandes y de tamaño pequeño. Por último, los parámetros operativos de aspersión que proporcionan aerosoles de tamaño mediano ($Dv(50) \sim 60-90 \mu\text{m}$) se recomiendan en la aspersión de SAEW en establos de animales.

Así también, **Hakim et al. (2016)** evaluaron la capacidad del agua con ácido hipocloroso ligeramente ácido (SAHW) para la inactivación de bacterias en superficies y con ello mejorar la bioseguridad en una planta avícola. La SAHW con 50 o 100 ppm de cloro, a un pH de 6 pudo inactivar cepas bacterianas de *Escherichia coli* y *Salmonella infantis* desde niveles inferiores a detectables ($\leq 2.6 \log_{10}$ UFC/ml) tras 5 segundos de exposición. Adicionalmente, se evaluó la capacidad del agua con ácido hipocloroso ligeramente ácidas, aplicándola con un nebulizador en una caja que contenía estas bacterias presentes en las superficies de placas de vidrio y láminas de rayón. En este caso la SAHW fue capaz de inactivar las especies bacterianas en estos dos objetos en 5 minutos tras la nebulización. Por último, en una prueba de corrosividad se pudo constatar que el SAHW, no corroe objetos metálicos, inclusive en un tiempo de exposición prolongado (83 días).

1.3. Marco Teórico

1.3.1. Mastitis bovina

Es una reacción inflamatoria a nivel de la glándula mamaria, generalmente es producto de una infección de carácter microbiano inducida por patógenos que penetran en la glándula mamaria por medio del canal del pezón (**Fernández et al., 2012**).

Es considerada como una de las enfermedades con mayor importancia en la industria lechera debido a las graves pérdidas económicas que genera a los productores de leche por la reducción en la producción láctea, el incremento en los costos por tratamientos clínicos y reemplazo temprano de vacas (**Bedolla, 2017**).

1.3.2. Etiología

Existe una amplia variedad de agentes causantes de mastitis bovina, pues se han identificado hasta 140 especies, subespecies y serovariedades microbianas que provocan una infección intramamaria (**Quevedo, 2018**). La mayoría de casos de mastitis bovina responden a infecciones provocadas por especies de estreptococos, estafilococos y bacterias Gram-negativas, entre las que se incluyen a las coliformes (**Mera et al., 2017**). Tradicionalmente se ha dividido a estos microorganismos en patógenos contagiosos y ambientales, tomando como base su asociación epidemiológica con esta enfermedad, así como la proclividad de ocasionar una infección oportunista (**Bedolla, 2017**). Estos microorganismos se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1 *Patógenos contagiosos y ambientales productores de mastitis bovina*

Patógenos contagiosos	Patógenos ambientales
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Klebsiella</i> spp.
<i>Corynebacterium bovis</i>	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>
<i>Mycoplasma</i> spp.	<i>Streptococcus uberis</i>
<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Enterococcus</i> spp.
<i>Candida albicans</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>Prototheca zopfii</i>	<i>Pseudomonas auruginosa</i>
	<i>Arcanobacter pyogenes</i>

Fuente: Mera et al., 2017

- **Patógenos contagiosos causantes de mastitis bovina**

Entre los patógenos contagiosos más importantes se encuentran los siguientes: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corinebacterium* spp. y *Mycoplasma* spp (Riffon et al., 2001). La transmisión de estos organismos es de vaca a vaca, donde el animal infectado sirve de reservorio primario siendo responsable de albergar los patógenos (Bedolla, 2017).

- **Patógenos ambientales causantes de mastitis bovina**

Los patógenos ambientales son transmitidos entre los ciclos de ordeño, a través del ambiente, integrando este medio como una fuente de infección para los animales. En este grupo se encuentran los bacilos entéricos Gram-negativos como *E. coli* y *Klebsiella* spp., *Streptococcus uberis*, *Enterococcus* spp. y *Streptococcus dysgalactiae* (Rossito et al., 2002).

1.3.3. Epidemiología

Generalmente la infección en la glándula mamaria se lleva a cabo en el conducto del pezón por medio de la ubre infectada, así como en el ambiente donde se encuentra el animal. Por estas razones, de acuerdo a la epidemiología la mastitis se clasifica como contagiosa o ambiental. La incidencia de cada uno de estos tipos etiológicos varía dependiendo del tipo de microorganismo que esté actuando para llegar a establecer una infección en el tejido mamario (López, 2014).

1.3.4. Patogenia

Tras el proceso de infección en el canal del pezón, el curso de esta enfermedad puede variar desde subclínica a agudo supurativo o crónico, en dependencia de la dosis

infectante, la cepa actuante y la resistencia del hospedador (**Moreno et al., 2007**). Los agentes etiológicos mencionados anteriormente llegan a la ubre por medio del contacto con las manos del ordeñador, máquina de ordeño, fómites, entre otros. Estos microorganismos se localizan preferentemente en la punta del pezón, lugar donde empieza la colonización (**Zurita, 1982**). De acuerdo a **Zurita (1982)** esta infección puede suceder en el momento de la preordeña, ordeña o postordeña

- **Preordeña**

Cuando la glándula mamaria se encuentra repleta de leche, el conducto del pezón tiende a sufrir un acortamiento real, de una longitud promedio de 8 a 10 mm hasta llegar a los 4 o 5 mm, este fenómeno se produce por la presión que ejerce la leche sobre la extremidad proximal tomando la forma de “embudo” lo cual le permite su acortamiento. En las primeras etapas del ordeño, durante la eliminación de los primeros chorros, los microorganismos llegan a colonizar la porción distal del conducto por medio de fenómenos de difusión y capilaridad, logrando que estos puedan ascender y con ello propagarse a los otros compartimentos superiores.

- **Ordeña**

En este proceso los microorganismos presentes en la primera porción del conducto del pezón por medio de fenómenos de difusión y capilaridad tienden a ingresar con mayor facilidad. Las deficiencias en el equipo de ordeño tienen un papel importante en esta fase de la infección.

- **Postordeña**

En el caso de que no se hayan realizado las medidas de control para la mastitis, en lo que respecta a medidas de higiene al término del ordeño, los gérmenes residuales que

han permanecido en el pezón llegan a diseminarse en forma ascendente, debido a que este se encuentra ampliamente dilatado, luego de que la ubre ha sido ordeñada.

1.3.5. Clasificación de la mastitis de acuerdo al grado de inflamación

De manera general la mastitis bovina se clasifica en: mastitis subclínica y mastitis Clínica.

a) Mastitis subclínica

La mastitis subclínica se produce cuando un patógeno infecta a uno o más cuartos, sin embargo, no llega a provocar un daño considerable en los alveolos y para el operario es de difícil observación, pues todos los cuartos se muestran normales y la leche tiene una apariencia normal (**Pinzón, Moreno y Rodríguez, 2009**). Es de larga duración, no presenta cambios que puedan ser visibles a nivel de la ubre o en la leche, apenas se puede percibir una reducción en la producción de leche, sin embargo, el recuento de células somáticas tiende a aumentar (**Abebe et al. 2016**).

Algunos autores conciben a este tipo de mastitis con el nombre de mastitis catarral, debido a que los gérmenes causantes de esta enfermedad se desarrollan en gran medida a nivel del epitelio que revisten los canales galactóforos. **Martínez (2016)** señaló que, alrededor del 95% de los cuadros de mastitis subclínica son producidas por cocos patógenos grampositivos, particularmente por estreptococos y estafilococos, un 3% por *Corynebacterium pyogenes*, el 1% de estos por coliformes y otro 1% por levaduras.

La mastitis subclínica limita la producción de leche y representa un obstáculo importante para la economía ganadera rentable en todo el mundo (**Shittu et al., 2012**). De acuerdo con **Mungube et al (2005)** la mastitis subclínica es considerada como el tipo de mastitis más importante desde el punto de vista económico debido a su mayor

prevalencia y efectos devastadores a largo plazo que produce en las explotaciones lecheras en relación con la mastitis clínica.

Ante cuadros de mastitis subclínica, la identificación de los cuartos afectados a través de la palpación manual de la ubre y mediante el examen visual con la copa sobre un fondo oscuro presenta algunas dificultades. En respuesta a estas situaciones, la prueba de CMT (California Mastitis Test) es uno de los métodos diagnósticos más empleados para este tipo de mastitis debido a que otorga, un primer acercamiento del grado de infección subclínica que se está presentando (**Blood y Radostits, 1992**).

El efecto de este tipo de mastitis en la productividad del hato ha sido subestimado, puesto que el número de animales subclínicamente enfermos frecuentemente llega a ser superior al número de animales clínicamente enfermos (**Pinzón, Moreno y Rodríguez, 2009**).

b) Mastitis clínica

Este tipo de mastitis se puede identificar por la presencia de anomalías visibles en la glándula mamaria o en la leche, las cuales pueden variar enormemente en su severidad con respecto al curso de la enfermedad (**Martínez, 2015**).

La mastitis clínica se caracteriza por la aparición súbita, disminución de la producción de leche, alteraciones en la composición y apariencia de la misma, sumado a la presencia de signos cardinales relacionados a un proceso inflamatorio en los cuartos mamarios afectados (**Birhanu, et al. 2017**).

La mastitis clínica establece una condición de inicio repentino, que presenta tumefacción, enrojecimiento o dolor a nivel de la ubre (**Tollesrud et al., 2000**). En algunos casos pueden evidenciarse signos clínicos como aumento de la temperatura rectal, anorexia, letargo y en cuadros más severos puede provocar la muerte del animal;

por otra parte, la producción y calidad de la leche se ve afectada a razón de una elevada colonización bacteriana (**Harmon, 1994**).

Según **Martínez (2015)** la mastitis clínica de acuerdo a su gravedad se clasifica en:

- **Mastitis clínica subaguda**

Esta forma se la puede interpretar como medianamente clínica, debido a que en la leche presenta alteraciones menores como, flóculos pequeños, escamas, coágulos o secreciones desprovistas de color. En este caso, los cuartos afectados se aprecian levemente inflamados, sensibles y con una leve reducción en la producción y con la ausencia de problemas sistémicos.

- **Mastitis clínica aguda**

En esta forma de inflamación se pueden constatar el apareamiento repentino de manifestaciones clínicas como: tumefacción, dolor, calor, enrojecimiento, endurecimiento y secreción anormal de la glándula mamaria. La leche adquiere un aspecto purulento o sanguinolento, se observa una reducción considerablemente de la producción y otros signos de trastornos sistémicos como: diarrea, pulso débil, temblores, depresión, postración, anorexia y reducción de la actividad ruminal (**Durán, 2016**).

- **Mastitis clínica hiperaguda**

Es una forma de presentación poco común, se caracteriza por el desarrollo y rápido apareamiento de los mismos signos clínicos descritos en la mastitis clínica aguda, aunque también se puede incluir: fiebre, fibrosis de la ubre, extremidades frías y diarreas.

- **Mastitis clínica crónica**

En este tipo de inflamación los signos clínicos se presentan de manera repentina e intermitente, es de larga duración y se la puede establecer dentro de cualquiera de las formas clínicas descritas anteriormente. Generalmente se evidencia un desarrollo progresivo de tejido cicatrizante que altera la forma y tamaño de la ubre, reduciendo así la producción láctea.

1.3.6. Métodos de detección para mastitis bovina

a) Observación y palpación de la ubre

En los casos de mastitis subclínica, la ubre aparentemente presenta un aspecto sano, la leche se ve alterada, a simple vista se aprecia una leche normal. No obstante, ante una infección incipiente el tejido glandular puede encontrarse dañado y provocar alteraciones en la calidad de la leche (**Pérez, Bedolla y Castañeda, 2005**). La infección desencadenará en la inflamación de uno o varios cuartos o de toda la glándula, dolor, enrojecimiento de la zona y aumento de la temperatura del área afectada (**Fernández et al 2012**). En el caso de que se encuentren todos o algunos de estos síntomas descritos se puede interpretar como un posible caso de mastitis clínica, los cuales sumados a cambios importantes en la calidad de la leche producto del daño en el tejido son indicativos de un proceso inflamatorio a nivel de ubre (**Pérez, Bedolla y Castañeda, 2005**).

b) Prueba de conductividad eléctrica en leche (PCE)

La PCE se ha empleado como un indicador de mastitis bovina dentro de las salas de ordeño, aunque también se lo encuentra en forma portátil para el análisis individual por cuartos. Esta prueba se basa en el aumento de conductividad eléctrica de la leche

dado por el mayor contenido electrolítico que esta posee, especialmente en iones de sodio y de cloro (**Fernández et al 2012**).

Según lo expuesto por **Blood y Radostits (1992)** la importancia de esta técnica radica en la medida de la lesión, como sucede en la prueba del recuento celular. No obstante, las limitaciones a su uso en vacas de alta producción que se mantienen en pequeños rebaños. Para la detección de mastitis subclínica se puede combinar esta técnica tomándola como base, sumando con el análisis de la producción láctea, número de partos y días de lactación a manera de un modelo logístico de regresión para emplearse como instrumento en el diagnóstico en rebaños con una alta incidencia de mastitis subclínica.

c) Prueba de California para mastitis (CMT)

Es la prueba de campo más utilizada para el diagnóstico preliminar de mastitis subclínica en hatos lecheros desde tiempos remotos y aún en la actualidad se sigue usando frecuentemente. Es relativamente sencilla, muy útil para la detección de mastitis subclínica pues permite obtener a breves rasgos el recuento de células somáticas en leche. La prueba de CMT no proporciona un resultado numérico, sino más bien funciona como indicativo para el recuento de células somáticas; si este se encuentra alto o bajo (**Hernández y Bedolla, 2008**).

Los resultados pueden ser interpretados en cinco clases (Tabla 2), desde un resultado negativo donde la leche y el reactivo se mantienen con una consistencia acuosa, hasta un conteo elevado de células somáticas donde se aprecia una solidificación entre la leche y el reactivo

Tabla 2 Interpretación de resultados de la Prueba de California para Mastitis

Score	Significado	Descripción de la reacción	Interpretación (Rcs/mL)
N	Negativo	La mezcla permanece en estado líquido y homogéneo.	0-200.000
T	Trazas	Se aprecia algo de engrosamiento. Esta reacción es reversible y la viscosidad observada por primera vez tiende a desaparecer.	200.000-400.000
1	Ligeramente positivo	La mezcla se ve espesa, pero no hay formación de gel en la parte céntrica de la paleta. Sin embargo, aún se aprecia una persistente viscosidad. Esta mezcla tiende a caerse de manera progresiva.	400.000-1'200.000
2	Positivo	El gel se formará en la parte central de la paleta cuando se efectúen movimientos giratorios. En la parte inferior de la paleta, el gel comienza a acumularse al momento en que se interrumpe el movimiento giratorio. Al verter la mezcla, la masa gelatinosa cae y se puede apreciar un poco de líquido en el cuarto de la paleta.	1'200.000-5.000.000
3	Muy positivo	Se llegará a desarrollarse gel en la región céntrica de la paleta para luego pegarse en el fondo del pocillo. En el momento que se vierte la mezcla, esta se cae evitando dejar residuos de líquido en el pocillo.	>5.000.000

Fuente: Fernández et al. 2012.

d) Prueba de Wisconsin

Es una prueba diseñada para laboratorio y se emplea para el conteo de células somáticas en muestras procedentes de leche fresca mezclada o de leche de tanques de

enfriamiento, así también se la utiliza para el muestreo de vacas individuales. En esta prueba se emplea una solución similar a la del CMT, pero a diferencia de esta, los resultados se miden de manera cuantitativa en dependencia de la viscosidad **(Fernández et al., 2012)**. Los resultados se relacionarán con una escala graduada en ml y su valor de células somáticas.

e) **Conteo de células somáticas por microscopia directa**

El recuento microscópico directo para células somáticas en leche, se denomina también como método óptico, aunque en la actualidad es de poca utilidad cuando se trata de un número extenso de muestras, mantiene su importancia para trabajos de investigación. En este caso el “recuento directo” se realiza empleando un microscopio con un objetivo de 500x. Este ensayo cuantitativo de laboratorio emplea frotis teñidos de leche problema y bajo un microscopio se cuenta el número de células somáticas **(Hernández y Bedolla, 2008)**.

1.3.7. Tratamiento para mastitis

Para los productores el tratamiento tiene por finalidad la rápida resolución de los signos clínicos y consecuentemente obtener un menor recuento de células somáticas (RCS) **(Fernández et al., 2012)**. Generalmente para la terapia antibiótica de mastitis se recomienda la administración por vía sistémica o local de: aminoglucósidos, beta-lactámicos, tetraciclinas, lincosamidas y macrólidos y fluoroquinolonas **(Andresen, 2001)**.

En el caso de mastitis clínicas se debe considerar los tratamientos parenterales debido a que estos presentar una mayor efectividad con respecto a los fármacos intramamarios, donde la distribución de los antibióticos a nivel del tejido mamario tiende a producir edema e inflamación **(Concha, 2008)**.

1.3.8. Ácido hipocloroso

El ácido hipocloroso (HClO) es un compuesto inorgánico de carácter bactericida que integra un novedoso grupo de sustancias microbicidas denominadas como “moléculas antimicrobianas no antibióticos”, caracterizado por poseer un elevado margen de seguridad, amplio espectro y rápida acción (**Henao, Sierra y Gaitán, 2003**). Esta sustancia es un ion no disociado del cloro, que se deriva de la unión entre el óxido del cloro y el agua (H₂O). El ácido hipocloroso se identifica con varias denominaciones, monoxoclorato de hidrógeno o clorado de hidrógeno con un peso molecular de 52,46 mg/mol (**Lafaurie et al. 2015**).

Según **Armstrong et al. (2015)** en el campo de la medicina el uso del ácido hipocloroso se centra en el tratamiento del cierre de heridas y úlceras en la piel y mucosas que se encuentren o no infectadas, debido a que posee una excelente capacidad cicatrizante.

El mecanismo bactericida del ácido hipocloroso (HClO) responde a una disolución en agua a un pH menor a 7,5 lo que le permite penetrar fácilmente en el interior de la célula bacteriana a través de la membrana citoplasmática; actuando sobre las proteínas y ácidos nucleicos presentes en esta (**Henao, Sierra y Gaitán, 2003**). El ácido hipocloroso se encarga de oxidar los grupos sulfhídricos y a su vez que ataca a los grupos aminos, índoles así también al hidroxifenol de la tirosina (**Coronado et al. 2015**).

En el momento que el cloro se disuelve en agua se forman dos compuestos: el ácido clorhídrico y ácido hipocloroso consiguiendo un equilibrio entre las distintas sustancias, entre todas estas la forma no disociada es la que se presenta activa frente a microorganismos (**Henao, Sierra y Gaitán, 2003**)

1.3.9. Producción orgánica de ácido hipocloroso

El ácido hipocloroso se produce de manera fisiológica y forma parte de un grupo de moléculas conocidas como “agnósidos” o especies reactivas del oxígeno (ROS), estas sustancias son sintetizadas de forma natural en el fagosoma de las células del sistema inmune (neutrófilos, macrófagos y células de Von Kupffer) en el proceso inmunológico conocido como “estallido respiratorio”, que sucede producto de la fagocitosis; cuenta con un mecanismo oxidante que permite destruir una gran variedad de microorganismos que llegan a afectar a los tejidos vivos además de permitir la activación del sistema de defensa (Cevallos, 2014).

En el organismo humano la producción de este compuesto incluye al peróxido de hidrógeno y a la mieloperoxidasa como elementos previos, donde la célula se encarga de utilizar el oxígeno molecular (O_2) con el fin de producir peróxido de hidrógeno (H_2O_2) empleando la enzima nicotinamida-adenina dinucleótido fostato oxidasa (NADPH). Por otro lado, la enzima mieloperoxidasa (MPO) se deposita a nivel de los gránulos azurófilos catalizando la reacción entre el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el cloro (Cl) para producir el ácido hipocloroso (HClO). Esta reacción se lleva a cabo en el lumen del fago lisosoma, mismo que se va acidificando progresivamente conforme el proceso avanza, para estabilizar y optimizar la actividad antimicrobiana de la molécula de ácido hipocloroso (Lafaurie et al. 2015).

1.3.10. Métodos químicos de obtención

Existen diversos métodos para la obtención del HClO, favorablemente gran parte de estos permiten obtener soluciones de baja estabilidad, con una actividad microbicida moderada y con un reducido porcentaje de ácido hipocloroso libre. Entre estos métodos se encuentran los siguientes:

a) Hidrólisis de gas de cloro

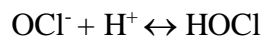
Este proceso consiste en añadir cloro gaseoso (Cl_2) directamente en el agua, produciéndose dos reacciones: una de hidrólisis y otra de ionización. La reacción de hidrólisis se define de la siguiente forma:



Este método se emplea para la desinfección de aguas en piscinas, acueductos y en la industria. No obstante, su utilidad clínica es limitada, debido a las altas concentraciones de especies cloradas a nivel de la solución, además de la inestabilidad que refleja el producto final. La producción de ácido hipocloroso e hipoclorito de sodio se detiene cuando el electrolito se satura con el cloro además el cloro gaseoso llega a evolucionar ante un pH de 2-3.

b) Acidificación del hipoclorito

Por otro lado, la ionización se produce mediante la acidificación del hipoclorito de sodio debido a que este compuesto se torna más ácido en presencia de iones de hidrógeno reduciendo su pH mediante la siguiente reacción:

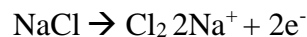
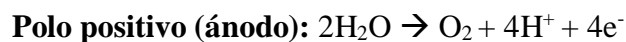
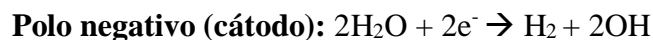


Dada la disponibilidad comercial del hipoclorito, este método se lo considera como el más conveniente y controlable ya que permite una mayor generación de ácido hipocloroso en una solución determinada con un potencial “redox” de entre 1000 mV a 1200 mV. Desafortunadamente en la mayoría de los casos, las soluciones que se

obtienen no poseen una estabilidad considerable para ser utilizado de manera prolongada.

c) **Electrólisis de solución de sal**

Este proceso emplea sistemas de electrolisis salina que generan cloro partiendo de la sal común disuelta en agua, se hace circular una corriente eléctrica de forma continua por medio de una disolución salina, en la superficie de los electrodos presentes en la célula de electrolisis se lleva a cabo las siguientes reacciones químicas:



Este método permite la obtención de ácido hipocloroso y demás especies cloradas de forma *in situ*, para ser utilizadas en un tiempo menor a 6 horas, produciendo formulaciones a base de ácido hipocloroso útiles para la desinfección de superficies, dispositivos médicos, equipos quirúrgicos, de consulta entre otros (Cevallos, 2014).

1.3.11. Usos del ácido hipocloroso

La producción electroquímica del ácido hipocloroso permite cambios en su concentración lo que hace que su uso pueda ser muy amplio en los seres humanos y animales en el tratamiento de úlceras a nivel de piel y mucosas, así como en la desinfección de la cavidad oral, material quirúrgico, fómites e inclusive instalaciones de diversa índole (Henaó, Sierra y Gaitán, 2003). Esta variedad en sus funciones, confieren a la molécula de HClO su facilidad de uso, debido al manejo en su concentración, costo relativamente bajo, alta eficiencia y un reducido efecto residual (Lafaurie et al. 2015)

Cevallos (2014) manifiesta que el HClO sirve como un oxidante bactericida, altamente reactivo, considerado como el más fuerte de los ácidos halogenados y entre uno de los más poderosos de los metales clorados, presenta una alta estabilidad en soluciones diluida, puras y frías

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

- Determinar el efecto del ácido hipocloroso como alternativa terapéutica en el control de mastitis subclínica en vacas lactantes

1.4.2. Objetivos específicos

- Identificar el grado de mastitis subclínica a través de la cuantificación de células somáticas mediante microscopia directa en frotis.
- Determinar la dosis terapéutica de ácido hipocloroso para el control de mastitis subclínica.
- Evaluar la acción antimicrobiana del ácido hipocloroso mediante la cuantificación del número de unidades formadoras de colonias (UFC) en cultivos microbiológicos a partir de muestras de leche.

Hipótesis

H0: El ácido hipocloroso actúa de manera efectiva en el control de mastitis subclínica en vacas lactantes.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1. Ubicación del experimento

La presente investigación se llevó a cabo en la hacienda “Santa Clara” ubicada en el sector de “Huapante Grande” perteneciente a la parroquia San Andrés, cantón Píllaro. Este lugar se encuentra ubicado en las coordenadas 1°04'30.1"S 78°32'48.5"W o -1.075031, -78.546806.

2.2. Características del lugar

El sector de Huapante Grande, lugar donde se realizó el estudio, posee las siguientes condiciones meteorológicas descritas en la Tabla 3.

Tabla 3 *Condiciones meteorológicas*

Características	Descripción
Temperatura, °C	11-14
Precipitación Anual, mm	458,10
Clima	Templado-frío
Humedad relativa, %	78-92
Altitud, msnm	2946

Fuente: (INAMHI, 2015; GAD parroquial de San Andrés, 2021)

2.3. Equipos, materiales y reactivos

Materiales de campo	Materiales de laboratorio
<ul style="list-style-type: none">• 36 vacas lecheras de raza Holstein• Overol• Botas• Guantes de examinación• Nariguera• Jeringas descartables de 10 y 10 ml.• Frascos estériles para recolección de muestras	<ul style="list-style-type: none">• Microscopio• Portaobjetos• Cámara de Neubauer
Materiales de escritorio	Reactivos
<ul style="list-style-type: none">• Libreta de apuntes• Esferos• Laptop	<ul style="list-style-type: none">• Ácido hipocloroso (HClO) en concentración de 450 ppm• Cefalexina 200 mg + Kanamicina 100.000 UI Reactivo California Mastitis Test• Agar base sangre• Agar MacConkey• Agar chocolate• Müller Hinton

2.4. Factores de estudio

Dosis de los productos

D0: 10 ml de Cefalexina + Kanamicina

D1: 10 ml de HClO, 450 ppm

D2: 20 ml de HClO, 450 ppm

D3: 30 ml de HClO, 450 ppm

2.5. Tratamientos

T0: 10 ml de Cefalexina 200 mg + Kanamicina 100.000 UI, vía intramamaria, por 3 días

T1: 10 ml de HClO, 450 ppm, vía intramamaria, por 5 días

T2: 20 ml de HClO, 450 ppm, vía intramamaria, por 5 días

T3: 30 ml de HClO, 450 ppm, vía intramamaria, por 5 días

2.5.1. Esquema de la distribución de los tratamientos

Tabla 4 *Distribución de los tratamientos*

Grado de mastitis	Tratamiento	Repeticiones	Tamaño de la unidad experimental
G1 (leve)	T0	3	3
	T1	3	3
	T2	3	3
	T3	3	3
G2 (moderado)	T0	3	3
	T1	3	3
	T2	3	3
	T3	3	3
G3 (grave)	T0	3	3
	T1	3	3
	T2	3	3
	T3	3	3
Total			36

2.6. Diseño experimental

Para el presente estudio se empleó un diseño experimental a base de un modelo estadístico completamente al azar (D.C.A), con el fin de evaluar la eficacia de 3 dosis de ácido hipocloroso (T1: 10 ml de HClO, 450 ppm, vía intramamaria, por 5 días; T2: 20 ml de HClO, 450 ppm, vía intramamaria, por 5 días y T3: 30 ml de HClO, 450 ppm, vía intramamaria, por 5 días) frente a un tratamiento convencional o testigo (T0: 10 ml

de Cefalexina 200 mg + Kanamicina 100.000 UI, vía intramamaria, por 3 días) en vacas lactantes que presentaron tres diferentes grados de mastitis subclínica, con 3 repeticiones por cada tratamiento dando un total de 36 unidades experimentales, integrando una vaca en cada unidad experimental. En adición a esto, se llevó a cabo un análisis de varianza (ADEVA) para determinar si existió o no diferencias entre las medias de los tratamientos aplicando una prueba de Tukey al 5% de significación.

2.7. Manejo del experimento

2.7.1. Tamaño de muestra

Se obtuvo a partir de un hato lechero compuesto por 340 vacas de raza Holstein en período de lactancia pertenecientes a la hacienda “Santa Clara”. El cálculo del tamaño de muestra se basó en un modelo estadístico utilizado para poblaciones finitas. Para este proceso se empleó la siguiente fórmula:

$$n = \frac{N * Z_{\alpha}^2 * p * q}{d^2 * (N - 1) + Z_{\alpha}^2 * p * q}$$

Donde:

N = Total de población (340)

$Z_{\alpha} = 1,96$ al cuadrado (nivel de confianza del 95%)

p = proporción esperada (50% = 0,50)

q = 1 – p (probabilidad que no ocurra el evento) 1- 0,50 = 0,50

d= nivel de precisión (6% = 0,06)

$$n = \frac{340 * 1,96_{\alpha}^2 * 0,50 * 0,50}{0,06^2 * (340 - 1) + 1,96_{\alpha}^2 * 0,50 * 0,50}$$

$$n = 149,73$$

El tamaño de muestra para el estudio fue de 150 vacas en lactancia.

2.7.2. Tipos de muestreo

Para la selección de animales en los que se realizó el test de California para Mastitis (CMT) se utilizó un muestreo aleatorio simple, debido a que este método permitió que todos los animales del hato lechero tuvieran la misma oportunidad de ser integrados en la muestra.

Consecuentemente se empleó la técnica de muestreo “intencional” como parte de un fundamento no probabilístico. De acuerdo a **Otzen y Manterola (2017)** esta técnica se basa en la selección de muestras representativas que cumplen ciertas características establecidas por el investigador. En este caso, de un tamaño muestral de 150 animales en los que se realizó el CMT, se seleccionaron 36 vacas mismas que, al realizar las pruebas de laboratorio pertinentes, presentaron un conteo celular de entre 200.000 a 5'000.000 de Ccs/ml para luego ser clasificadas en tres grupos de acuerdo a los grados de mastitis subclínica (Grado I, II y III) en los que se integró 12 vacas por cada grupo.

2.7.3. Prueba de California para mastitis (CMT)

Se realizó la prueba de California Mastitis Test en cada una de las vacas lactantes, de una muestra de 150 animales. Previo a este examen, se secaron y desinfectaron los pezones para evitar que exista contaminación al momento de la toma de muestras.

La forma de realizar este procedimiento fue la siguiente:

- ✓ El CMT se lo realizó en el primer ordeño y antes de efectuarse el CMT fue importante descartar los primeros chorros de leche
- ✓ Se extrajo aproximadamente 2 ml de leche para cada compartimento (cuarterones) los cuales se encontraban marcados con las letras A, B, C y D, para su correcta identificación y de esta forma proceder a la lectura de estos.
- ✓ Se agregó en cada compartimiento la misma cantidad del reactivo de CMT.

- ✓ Luego se mezcló el contenido de cada uno de los compartimentos rotando la paleta con movimientos lentos y circulares. Se evitó realizar movimientos bruscos y mover la paleta por más de 10 segundos.
- ✓ Se procedió a la lectura del Test. Este paso se lo realizó antes de los 20 segundos de aplicado el reactivo de CMT, debido a que la reacción tiende a desaparecer luego de este lapso de tiempo.
- ✓ La calificación obtenida respondió a características objetivas (cualitativas) dependiendo en gran parte del criterio del observador puesto que de acuerdo a **Espizona y Mier (2013)** entre más gel llegue a generarse la mastitis tiende a ser más avanzada encaminándose al diagnóstico de un cuadro clínico.
- ✓ Los resultados del CMT se determinaron de acuerdo a los criterios establecidos en la Tabla 5.

Tabla 5 Interpretación de los métodos de evaluación de mastitis y puntajes de CMT

Puntaje CMT	Aspectos de lectura	Rango de células somáticas	Interpretación
N (Negativo)	Sin espesamiento de la mezcla	0 – 200.000	Cuarto saludable
T (Traza)	Se presenta un ligero espesamiento de la mezcla. La reacción parece desaparecer con la rotación continua de la paleta	200.000 – 400.000	Posible mastitis
1	El espesamiento de la mezcla es distinto, aunque no llega a formarse gel. El engrosamiento tiende a desaparecer, si la paleta se gira por más de 20 segundos,	400.000 - 1'200.000	Mastitis subclínica
2	Se observa el espesamiento inmediato de la mezcla llegando a formar ligeramente gel. A medida que se agita se dirige hacia el centro de la taza, dejando al descubierto la parte inferior del borde exterior	1'200.000 – 5'000.000	Infección mastitis grave
3	Se aprecia la formación de gel y la superficie de la mezcla tiende a elevarse (a manera de un huevo frito). El pico de elevación central se mantiene incluso después que se detiene la rotación de la paleta del CMT.	Sobre 5'000.000	Infección mastitis grave

Fuente: Nan et al. (2010)

2.7.4. Cuantificación de células somáticas para la determinación de grados de mastitis subclínica

Toma de muestras

1. En primera instancia se procedió a la limpieza de la ubre. Luego del ordeño se tomaron 6 ml de leche mediante extracción manual de cada vaca positiva al CMT.
2. Las muestras se colocarán en recipientes de plástico estériles y de boca ancha.

3. Los recipientes se rotularon y ubicaron en el interior de un cooler a una temperatura de 4°C.

- **Transporte y conservación de muestra**

Tras la recolección de las muestras en el primer ordeño, estas se mantuvieron conservadas en un cooler a 4°C hasta su llegada al laboratorio clínico donde se procedió al conteo de células somáticas por microscopía directa.

Procesamiento de la muestra

Para llevar a cabo la cuantificación de células somáticas se empleó el método de microscopía directa en frotis, también conocido como “método óptico”.

Conteo de células somáticas por microscopía directa en frotis

El método tradicional para el recuento de células somáticas es el denominado “recuento directo” por microscopio, en el que se utiliza un lente de aumento de 500X. En este ensayo de laboratorio se emplearon frotis teñidos y se contaron el número de células somáticas con la ayuda de una cámara de Neubauer (**Bedolla, Castañeda y Wolter, 2007**).

Interpretación del grado de mastitis

Para la conformación de los grupos de estudio se clasificó a los animales de acuerdo al grado de mastitis subclínica que presentaron, mismo que se determinó por medio de la cuantificación del número de células somáticas como se indica en la tabla 6.

Tabla 6 *Clasificación de mastitis según Mellenbeger y Roth (2000)*

Grado de mastitis	Rango de células somáticas	Interpretación
N (Negativo)	0 – 200.000	Cuarto Sano
1	200.000 – 400.000	Mastitis subclínica
2	400.000 – 1.200.000	Mastitis Subclínica
3	1.200.000 – 5.000.000	Infección seria
Clínico	> 5.000.000	Infección seria

2.7.5. Cultivo bacteriológico

Los cultivos en laboratorio permiten identificar organismos específicos que se encuentran comprendidos en un cuadro de mastitis, con el fin de distinguir los animales sanos de aquellos que han desarrollado un cuadro subclínico. Para el estudio se realizaron cultivos bacteriológicos a partir de muestras de leche obtenidas de las vacas positivas a mastitis subclínica antes de la administración de los tratamientos y al término de estos.

Toma de muestra

- Previo a la recolección de las muestras, se llevó a cabo la limpieza de la ubre, luego de realizarse el ordeño de cada vaca, se procedió recolectar 6 ml de leche de cada vaca, positiva a mastitis subclínica por medio de extracción manual en un recipiente de plástico estéril y de boca ancha.
- Se rotularon y ubicaron los recipientes en el interior de un cooler a una temperatura de 4°C.

Transporte y conservación de muestra

El transporte al laboratorio se debe realizar lo antes posible. En el caso de que no puedan ser enviadas a las dos primeras horas tras su recolección, se mantendrán conservadas en un cooler a 4°C hasta su llegada al laboratorio clínico donde se llevará a cabo el cultivo bacteriológico y la identificación de los agentes causales de la mastitis.

Procesamiento de la muestra

1. Se colocó las muestras de leche en microtubos empleando una pipeta para luego ser rotulados.
2. La siembra se realizó mediante “inoculación directa” con un asa de 10 µl, en medios de cultivo convencionales para bacterias gram positivas aerobias y facultativas (agar Mac Conkey, sangre y chocolate).
3. Utilizando un hisopo se empapó de leche y posteriormente se colocó en un cuadrante de la caja Petri, para luego con la ayuda del asa bacteriológica realizarse la siembra en todos los cuadrantes del agar.
4. Los cultivos de leche se incubaron a una temperatura de 35-37 °C, con una atmósfera aerobia (agar sangre) o en CO₂ (agar chocolate) antes de ser interpretados. Gran parte de las bacterias causantes de infección mamaria se pudieron evidenciar de 18 a 24 horas.
5. Una vez identificadas las muestras se procedió a determinar el tipo de agente etiológico, mediante la visualización de la forma y característica de las colonias.

2.7.6. Antibiograma

1. Se lo realizó con agar Müller Hinton en cajas Petri.
2. El mechero de alcohol evitó la contaminación durante el momento de la siembra.
3. Con un hisopo se tomó una colonia para luego introducirlo en la solución para luego moverse. La siembra se realizó junto al mechero que funcionaba como barrera de protección.
4. Posteriormente se tapó momentáneamente la caja Petri.
5. Los discos de antibióticos fueron colocados sobre la superficie de la siembra empleando una pinza estéril.
6. Se identificaron e incubaron las cajas Petri a 37°C en un período de 18 a 24 horas.
7. Se midió la zona de inhibición de cada disco contra una superficie oscura bajo la luz reflejada.
8. Por último, se realizó la interpretación de resultados.

2.7.8. Recuento de unidades formadoras de colonias (UFC)

La cuantificación de microorganismos permitió identificar al agente microbiológico potencial que pudo estar causando la infección. En este caso, se aplicó la metodología del “recuento directo en placa”, que se basó en la observación de la cantidad de colonias desarrolladas en el medio de cultivo y su posterior cuantificación.

2.7.9. Aplicación del tratamiento

Una vez que se obtuvieron los resultados de la prueba de conteo de células somáticas, del laboratorio y del cultivo bacteriológico, se aplicó cuatro tratamientos: T0= 10 ml de Cefalexina 200 mg + Kanamicina 100.000 UI, por 3 días; T1= 10 ml de HClO, vía

intramamaria, por 5 días; T2= 20 ml de HClO, vía intramamaria, por 5 días; T3= 30 ml de HClO, vía intramamaria, por 5 días. Los tratamientos se aplicaron en las vacas con mastitis subclínica de la siguiente manera:

- Al término del ordeño, se procedió a la desinfección y secado del pezón, con el fin de evitar problemas de una posible infección y que los resultados del tratamiento se vean alterados.
- Posteriormente, se introdujo con cuidado la jeringa en el pezón afectado y se depositó el contenido lentamente.
- Se retiró la jeringa con cuidado, evitando lastimar el pezón y finalmente se masajó levemente de abajo hacia arriba.

2.8. Variables respuesta

2.8.1. Células somáticas, Ccs/mL

Se presentan como células blancas propias del organismo, encargadas de la defensa de la glándula mamaria contra microorganismos patógenos. La importancia en el conteo de células somáticas en la leche, radica en la evaluación del estado de salud de la ubre, y por consiguiente a una variación en la calidad de la misma.

Para el conteo de células somáticas se tomó en cuenta los siguientes rangos: 0 – 200.000 células/ml, indica una glándula mamaria sana, 200.000 – 400.000 células/ml indica una ligera infección y de 400.000 – 1.200.000 células/ml indican una mastitis subclínica; 1.200.000 – 5.000.000 células/ml una infección seria y > 5.000.000 indica una infección severa o mastitis clínica (**Hernández y Bedolla 2008**)

2.8.2. Unidades Formadoras de Colonias, UFC/ml

Para el recuento de UFC, se seleccionaron placas de la dilución que presenten un número de colonias entre 30 y 300 UFC y se calculará la media de colonias obtenidas para la dilución seleccionada con la siguiente fórmula.

UFC/ml= N° colonias en placa (entre 30 y 300) x ml sembrados x inverso de la dilución

2.8.3. Acción antimicrobiana de los tratamientos, %

La efectividad de los productos aplicados se determinó pre y post aplicación. Esta variable se obtuvo mediante el cálculo del porcentaje de reducción (%R) de la concentración de UFC, para lo cual se empleó la siguiente fórmula descrita por **Martínez (2015)**:

$$\%R = \frac{\text{Conteo UFC/ml inicial} - \text{Conteo UFC/ml final}}{\text{Conteo UFC/ml inicial}} * 100$$

2.9. Procesamiento de la información

La tabulación de los datos obtenidos se realizó en el programa Microsoft Excel 2016 y el análisis estadístico se realizó en programa Infostat 2020 (versión estudiantil). Para los datos referentes a las unidades formadoras de colonias (UFC/ml) se empleó un análisis estadístico de carácter descriptivo cuantitativo y cualitativo.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis y discusión de resultados

3.1.1. Determinación del grado de mastitis subclínica por medio del conteo de células somáticas (Ccs/ml) pre y postratamiento.

En la tabla 7 se puede apreciar que en la aplicación de T0 (10 ml de Cefalexina 200 mg + Kanamicina 100.000 UI, vía intramamaria) de las vacas analizadas (9 en total), el 33,33% presentó mastitis subclínica de grado I, el otro 33,33% mastitis subclínica grado II y el 33,33% restante correspondió a vacas con mastitis subclínica grado III. Al término del tercer día de tratamiento se evidenció un descenso en el grado de mastitis subclínica en cada uno de los grupos evaluados, 44,44% presentó mastitis subclínica grado I, el 33,33% de las vacas analizadas resultaron negativas a mastitis subclínica y el 22,22% restante de los animales evaluados reflejaron la presencia de mastitis subclínica grado II.

La tabla 7 indica que la aplicación de los tratamientos de T1 (10 ml de HClO vía intramamaria por 5 días) de las vacas analizadas (9 en total), previo al tratamiento el 33,33% presentó mastitis subclínica de grado I, el otro 33,33% mastitis subclínica grado II y 33,33% restante correspondió a vacas con mastitis subclínica grado III. Luego del quinto día de aplicación, se evidenció un leve descenso del grado de mastitis subclínica en cada uno de los grupos evaluados donde el 66,66% de las vacas analizadas presentaron mastitis subclínica grado II y el 33,33% de los animales restantes reflejaron la presencia de mastitis subclínica grado I.

En la aplicación de T2 (20 ml de HClO vía intramamaria por 5 días) de las vacas analizadas (9 en total), previo al tratamiento el 33,33% presentó mastitis subclínica de grado I, el otro 33,33% mastitis subclínica grado II y 33,33% restante correspondió a

vacas con mastitis subclínica grado III. Luego del quinto día de aplicación, se observó un descenso considerable en el grado de mastitis subclínica en cada uno de los grupos evaluado donde el 66,66% de las vacas analizadas resultaron negativas a mastitis subclínica el 33,33% restantes presentaron mastitis subclínica grado I (Tabla 7).

Los datos reflejados en la tabla 7, indicaron que en T3 (30 ml de HClO vía intramamaria por 5 días) de las vacas analizadas (9 en total), previo al tratamiento el 33,33% presentó mastitis subclínica de grado I, el otro 33,33% mastitis subclínica grado II y 33,33% restante correspondió a vacas con mastitis subclínica grado III. Luego del quinto día de aplicación se evidenció un descenso potencial en el grado de mastitis subclínica en cada uno de los grupos evaluados donde, el 100% de las vacas analizadas resultaron negativas a mastitis subclínica.

Tabla 7 Numero y porcentaje de vacas clasificadas según el grado de mastitis subclínica de acuerdo a conteo de células somáticas (Ccs/ml) pre y post tratamiento

Tratamiento	Rango de células somáticas, Ccs/ml	Grado de mastitis subclínica	Pre-tratamiento		Post-tratamiento	
			Día 0		Día 5	
			N°	%	N°	%
T0	0 – 200.000	Negativo	0	0	3	33,33
	200.000-400.000	I	3	33,33	4	44,44
	400.000-1'200.000	II	3	33,33	2	22,22
	1'200.000-5'000.000	III	3	33,33	0	0
	Total		9	100	9	100
T1	0-200.000	Negativo	0	0	0	0
	200.000-400.000	I	3	33,33	3	33,33
	400.000-1'200.000	II	3	33,33	6	66,66
	1'200.000-5'000.000	III	3	33,33	0	0
	Total		9	1	9	100
T2	0-200.000	Negativo	0	0	6	66,66
	200.000-400.000	I	3	33,33	3	33,33
	400.000-1'200.000	II	3	33,33	0	0
	1'200.000-5'000.000	III	3	33,33	0	0
	Total		9	1	9	100
T3	0-200.000	Negativo	0	0	9	100
	200.000-400.000	I	3	33,33	0	0
	400.000-1'200.000	II	3	33,33	0	0
	1'200.000-5'000.000	III	3	33,33	0	0
	Total		9	1	9	100

3.1.2. Efectividad de los tratamientos en vacas con mastitis subclínica grado I

En la tabla 8 se puede apreciar que, en las vacas con mastitis subclínica de grado I el conteo de células somáticas (Ccs/ml) mostró diferencias significativas entre las medias de los tratamientos aplicados ($p=0,001$), obteniéndose mejores resultados con T3 (26762,67 Ccs/ml), lo cual fue estadísticamente similar a los resultados obtenidos con la aplicación del tratamiento convencional ($T0= 60951,67$ Ccs/ml). Por el contrario, la aplicación de T2 a las dosis de 20 ml de HClO y T1 con 10 ml de HClO resultaron

estadísticamente inferiores donde T2 reflejó un conteo de 166619,67 Ccs/ml y difiriendo de T1 (258703,33 Ccs/ml) con el valor más elevado de Ccs/ml.

Tabla 8 *Conteo de células somáticas postratamiento en vacas con mastitis subclínica grado I*

Variable	Tratamientos				EEM	P	CV (%)
	T0	T1	T2	T3			
Ccs/ml	60951,67 ^a	258703,33 ^c	166619,67 ^b	26762,67 ^a	17977,63	0,0001	24,28

Nota: a,b,c: Medias con letras diferentes en las columnas que difieren significativamente ($P < 0,05$). EEM: error estándar de la media. P: significancia. CV: coeficiente de variación. T0: 10 ml de Cefalexina 200 mg + Kanamicina 100.000 UI, vía intramamaria, por 3 días T1: 10 ml de ácido hipocloroso vía intramamaria por 5 días T2: 20 ml de ácido hipocloroso vía intramamaria por 5 días T3: 30 ml de ácido hipocloroso vía intramamaria por 5 días

3.1.3. Efectividad de los tratamientos en vacas con mastitis subclínica grado II

En la tabla 9 se observa que en el grupo de vacas con mastitis subclínica grado II las medias de los tratamientos aplicados reflejaron diferencias significativas ($p < 0,001$) en el conteo de células somáticas (Ccs/ml). Se obtuvo mejores resultados con el T3 (53696,33 Ccs/ml) y T2 (119187 Ccs/ml) siendo este último significativamente similar con el tratamiento convencional (T0=238650,67 Ccs/ml). No obstante, los resultados difirieron con T1 donde el conteo de Ccs/ml fue superior al resto de tratamientos.

Tabla 9 *Conteo de células somáticas postratamiento en vacas con mastitis subclínica grado II*

Variable	Tratamientos				EEM	P	CV (%)
	T0	T1	T2	T3			
Ccs/ml	238650,67 ^b	824579 ^c	119187 ^{ab}	53696,33 ^a	32733,41	<0,001	18,35

Nota: a,b,c: Medias con letras diferentes en las columnas que difieren significativamente ($P < 0,05$). EEM: error estándar de la media. P: significancia. CV: coeficiente de variación. T0: 10 ml de Cefalexina 200 mg + Kanamicina 100.000 UI, vía intramamaria, por 3 días T1: 10 ml de ácido hipocloroso vía intramamaria por 5 días T2: 20 ml de ácido hipocloroso vía intramamaria por 5 días T3: 30 ml de ácido hipocloroso vía intramamaria por 5 días

3.1.4. Efectividad de los tratamientos en vacas con mastitis subclínica grado III

En lo que respecta a las vacas con mastitis subclínica grado III, los datos presentados en la tabla 10 muestran la existencia de diferencias significativas entre las medias de los tratamientos ($p < 0,001$), alcanzándose mejores resultados con T3 y T2, con 53696,33 Ccs/ml y 119187 Ccs/ml respectivamente, compartiendo este último el mismo nivel de significancia estadística con el tratamiento convencional T0. Por otro lado, los resultados obtenidos con T1 (824579 Ccs/ml) difirieron del resto de tratamientos registrando un mayor conteo de células somáticas.

Tabla 10 *Conteo de células somáticas postratamiento en vacas con mastitis subclínica grado III*

Variable	Tratamientos				EEM	P	CV (%)
	T0	T1	T2	T3			
Ccs/ml	238650,67 ^b	824579 ^c	119187 ^{ab}	53696,33 ^a	32733,41	<0,001	18,35

Nota: a,b,c: Medias con letras diferentes en las columnas que difieren significativamente (P<0,05). EEM: error estándar de la media. P: significancia. CV: coeficiente de variación. T0: 10 ml de Cefalexina 200 mg + Kanamicina 100.000 UI, vía intramamaria por 3 días T1: 10 ml de ácido hipocloroso vía intramamaria por 5 días T2: 20 ml de ácido hipocloroso vía intramamaria por 5 días T3: 30 ml de ácido hipocloroso vía intramamaria por 5 días

3.1.5. Identificación de principales agentes bacterianos causantes de mastitis subclínica en el hato lechero previo al tratamiento

Al realizar el examen microbiológico de las muestras de leche provenientes de 36 vacas positivas a mastitis subclínicas empleadas en el estudio, antes de la aplicación del tratamiento, se identificaron los siguientes agentes bacterianos: *Staphylococcus aureus* con un 66%, seguido por *Streptococcus* spp. en un 24% y *Escherichia coli* con el 10% del total de muestras analizadas (Gráfico 1).

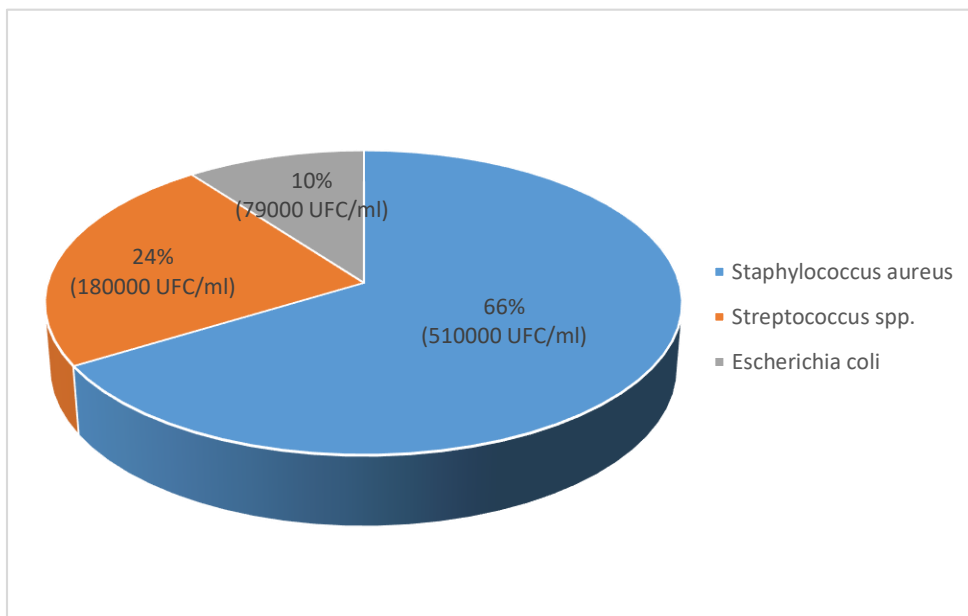


Gráfico 1 Porcentaje y conteo de UFC/ml de los agentes bacterianos causantes de mastitis subclínica en el hato lechero previo al tratamiento

3.1.6. Acción antimicrobiana de los tratamientos sobre *Staphylococcus aureus* en vacas con mastitis subclínica grado I

En el gráfico 2 se puede apreciar la respuesta antimicrobiana que se obtuvo de cada uno de los tratamientos aplicados sobre la cantidad de colonias de *Staphylococcus aureus* (UFC/ml), alcanzando una reducción significativa del agente bacteriano con la administración de T0, T1 y T3, los cuales compartieron el mismo nivel de respuesta antimicrobiana (100%). No obstante, luego de la aplicación de T2, aún existió la presencia de colonias de *S. aureus*, con un porcentaje residual del 30% correspondiente a 1000 UFC/ml y presentando una respuesta antimicrobiana del 70%.

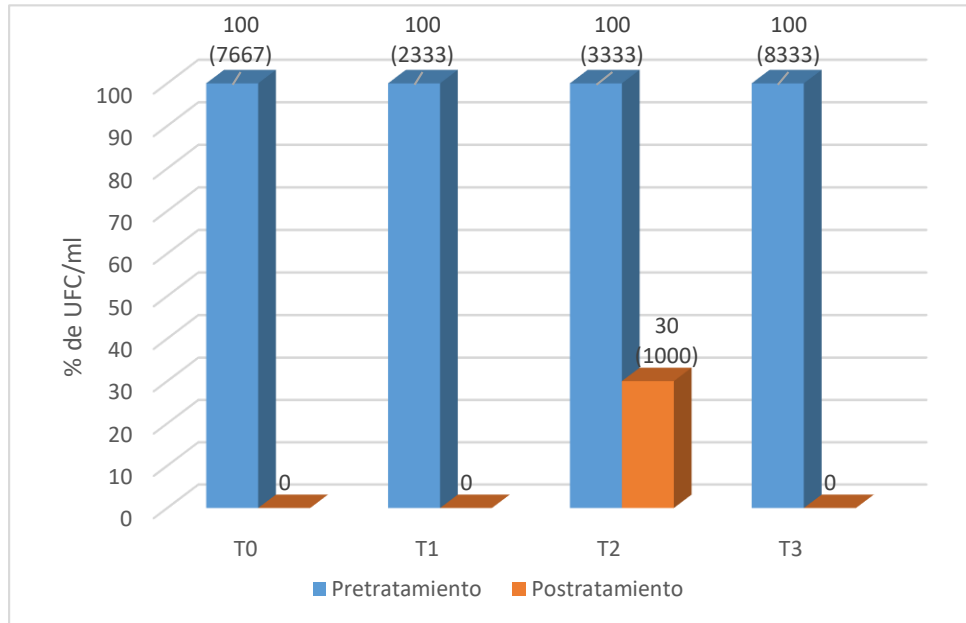


Gráfico 2 Porcentaje y conteo de UFC/ml para *Staphylococcus aureus* pre y postratamiento en vacas con mastitis subclínica grado I

3.1.7. Acción antimicrobiana de los tratamientos sobre *Streptococcus* spp. en vacas con mastitis subclínica grado I

En el gráfico 3 se indica la respuesta antimicrobiana obtenida de los tratamientos aplicados sobre la cantidad de colonias de *Streptococcus* spp. (UFC/ml). Se puede apreciar una reducción significativa del agente bacteriano tras la administración de T0, T1 y T3 compartiendo estos el mismo nivel de respuesta antimicrobiana (100%). Sin embargo, luego de la aplicación de T2, aún fue evidente la presencia de colonias de *Streptococcus* spp. con un porcentaje residual de 8,82% correspondiente a 1000 UFC/ml atribuyéndose una respuesta antimicrobiana de 91,18%.

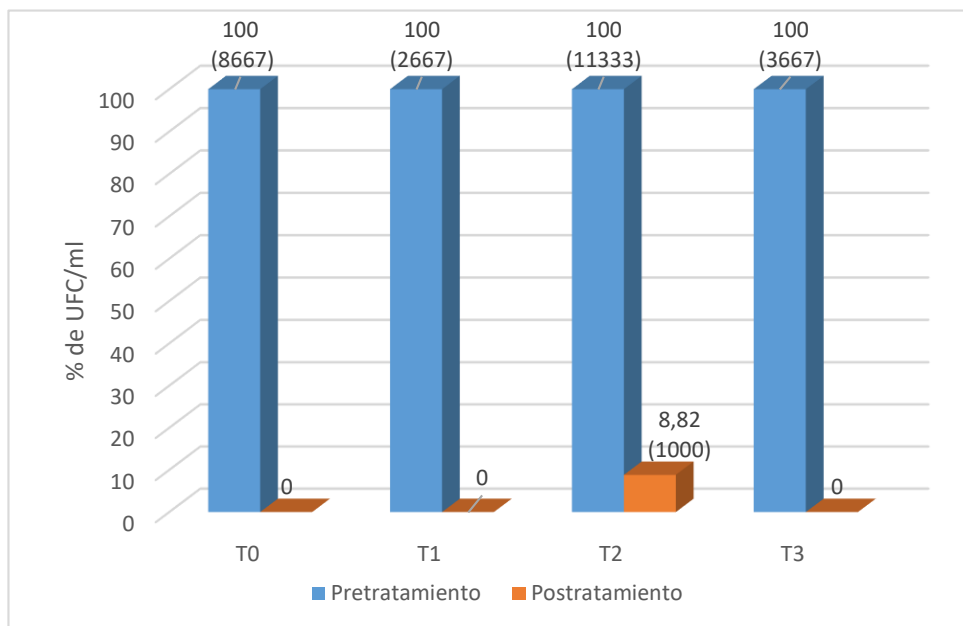


Gráfico 3 Porcentaje y conteo de UFC/ml para *Streptococcus* spp. pre y postratamiento en vacas con mastitis subclínica grado I

3.1.8. Acción antimicrobiana de los tratamientos sobre *Escherichia coli* en vacas con mastitis subclínica grado I

En el gráfico 4 se indica los resultados obtenidos de la respuesta antimicrobiana para cada uno de los tratamientos aplicados sobre la cantidad de colonias de *Escherichia coli* (UFC/ml). En este caso no existieron diferencias en el porcentaje residual de este agente bacteriano luego de la aplicación de los tratamientos debido a que, todos mostraron el mismo nivel de respuesta antimicrobiana (100%).

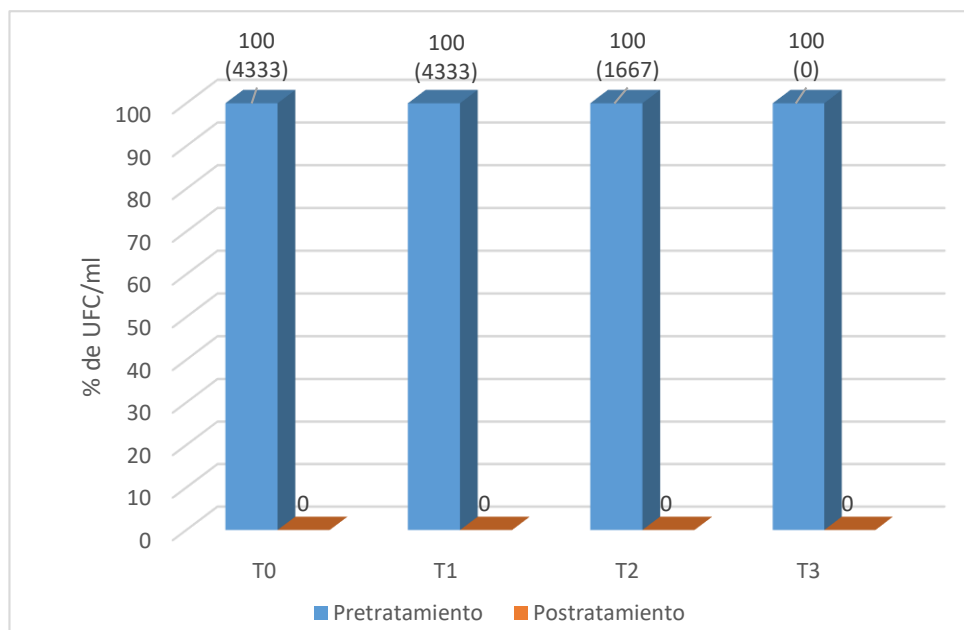


Gráfico 4 Porcentaje y conteo de UFC/ml para *Escherichia coli* pre y postratamiento en vacas con mastitis subclínica grado I

3.1.9. Acción antimicrobiana de los tratamientos sobre *Staphylococcus aureus* en vacas con mastitis subclínica grado II

En el gráfico 5 se puede observar los resultados obtenidos con relación a la respuesta antimicrobiana de los tratamientos aplicados sobre la cantidad de colonias de *Staphylococcus aureus* (UFC/ml) obteniéndose una reducción significativa del agente bacteriano tras la administración de T2 y T3 con el mismo nivel de respuesta antimicrobiana (100%). No obstante, con la aplicación de T1 y T0, aún fue notoria la presencia de colonias de *S. aureus*, con un porcentaje residual de 44,48% y 11,43% correspondiente a un conteo de 5333 UFC/ml y 2667 UFC/ml respectivamente. La respuesta antimicrobiana para T2 fue un poco más elevada que T1, atribuyéndose porcentajes de 88,57% y 51,51%.

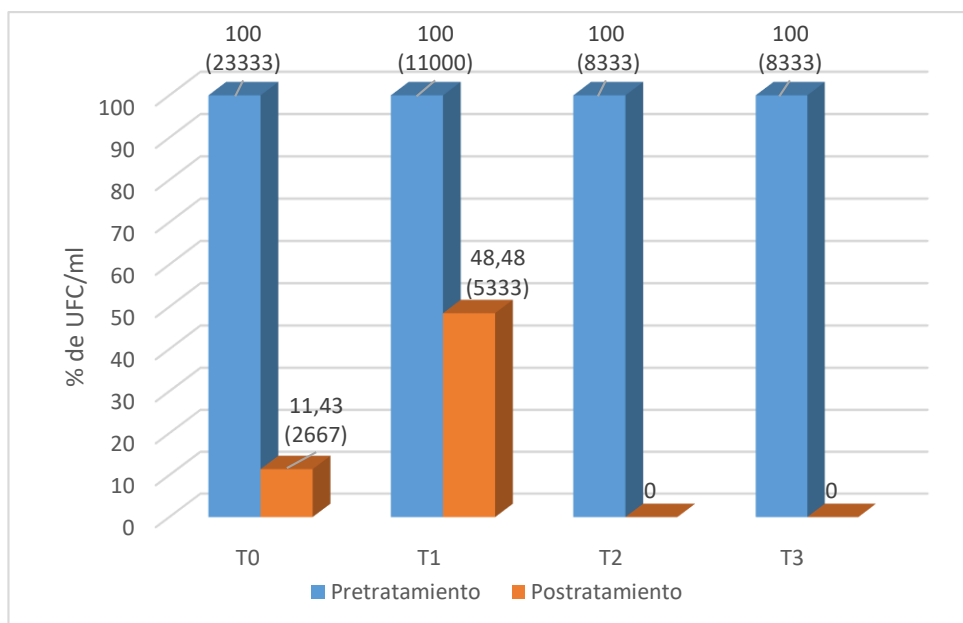


Gráfico 5 Porcentaje y conteo de UFC/ml para *Staphylococcus aureus* pre y postratamiento en vacas con mastitis subclínica grado II

3.1.10. Acción antimicrobiana de los tratamientos sobre *Streptococcus* spp. en vacas con mastitis subclínica grado II

De acuerdo al gráfico 4, los resultados obtenidos en la respuesta antimicrobiana de los tratamientos aplicados sobre la cantidad de colonias de *Streptococcus* spp. (UFC/ml), no reflejaron diferencias en el porcentaje residual de este agente bacteriano debido a que, todos los tratamientos presentaron el mismo nivel de respuesta antimicrobiana (100%).

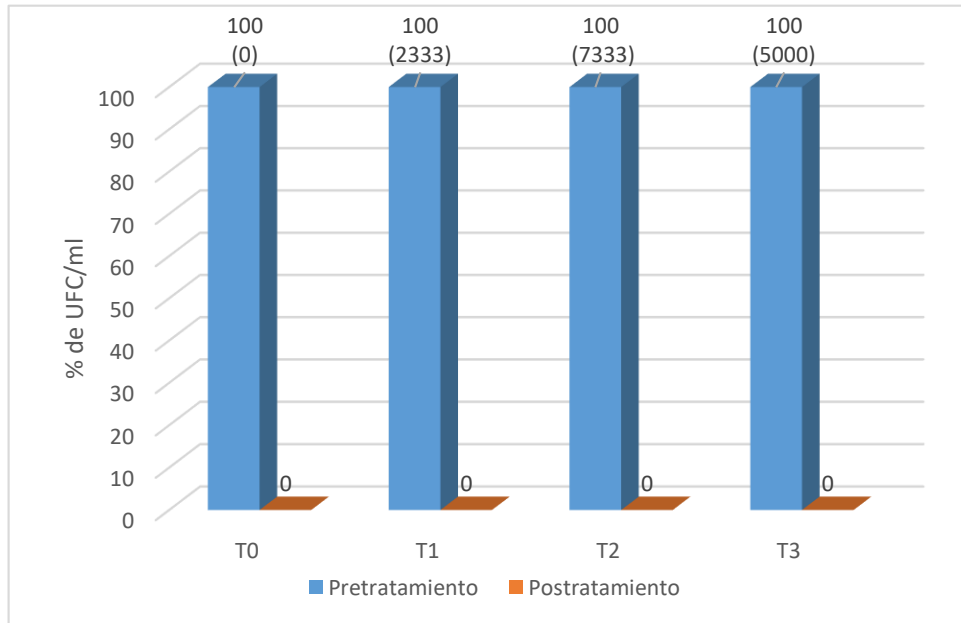


Gráfico 6 Porcentaje y conteo de UFC/ml para *Streptococcus* spp. pre y postratamiento en vacas con mastitis subclínica grado II

3.1.11. Acción antimicrobiana de los tratamientos sobre *Escherichia coli* en vacas con mastitis subclínica grado II

Como se puede apreciar en el gráfico 7 la respuesta antimicrobiana por parte de los tratamientos aplicados sobre la cantidad de colonias de *Escherichia coli* (UFC/ml) fue la misma en cada uno de estos. No existieron diferencias en el porcentaje residual de este agente bacteriano tras la aplicación de los tratamientos, con un 100% de respuesta antimicrobiana para cada uno de estos.

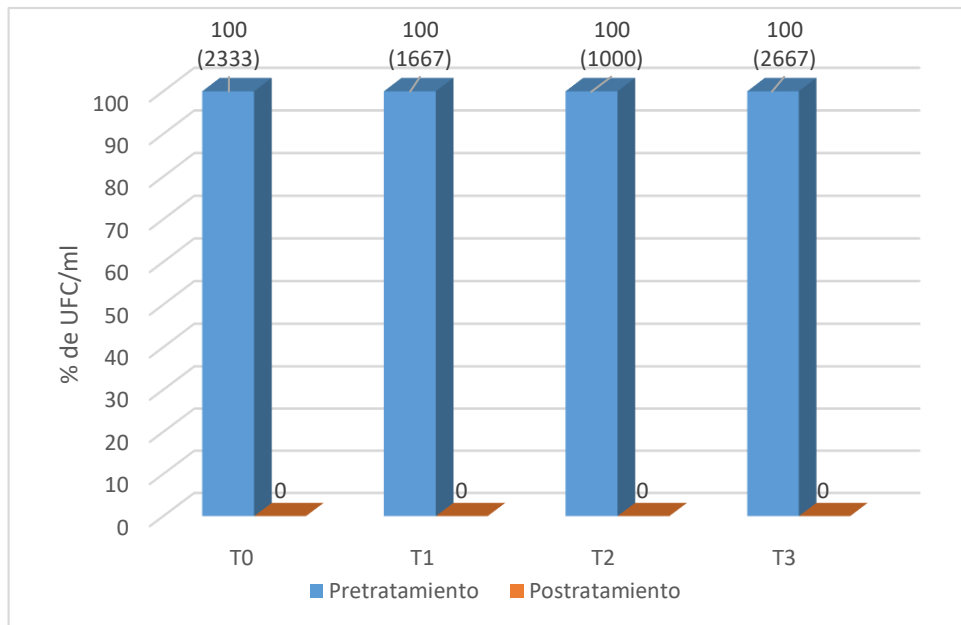


Gráfico 7 Porcentaje y conteo de UFC/ml para *Escherichia coli* pre y postratamiento en vacas con mastitis subclínica grado II

3.1.12. Acción antimicrobiana de los tratamientos sobre *Staphylococcus aureus* en vacas con mastitis subclínica grado III

En el gráfico 8, la respuesta antimicrobiana de los tratamientos aplicados sobre la cantidad de colonias de *Staphylococcus aureus* (UFC/ml) mostró diferencias entre los tratamientos. Obteniéndose una disminución significativa de este germen bacteriano tras la aplicación de T3 con nivel de respuesta antimicrobiana de 93,1% seguido por T0 y T2 con el 76,84% y 69,23% respectivamente. Por el contrario, tras la aplicación del T1, la respuesta antimicrobiana fue inferior (44,44%) en relación a la obtenido con los otros tratamientos. Así también el porcentaje residual de 55,56% de colonias de *S. aureus* fue superior con T1 correspondiéndole un conteo de 8333 UFC/ml.

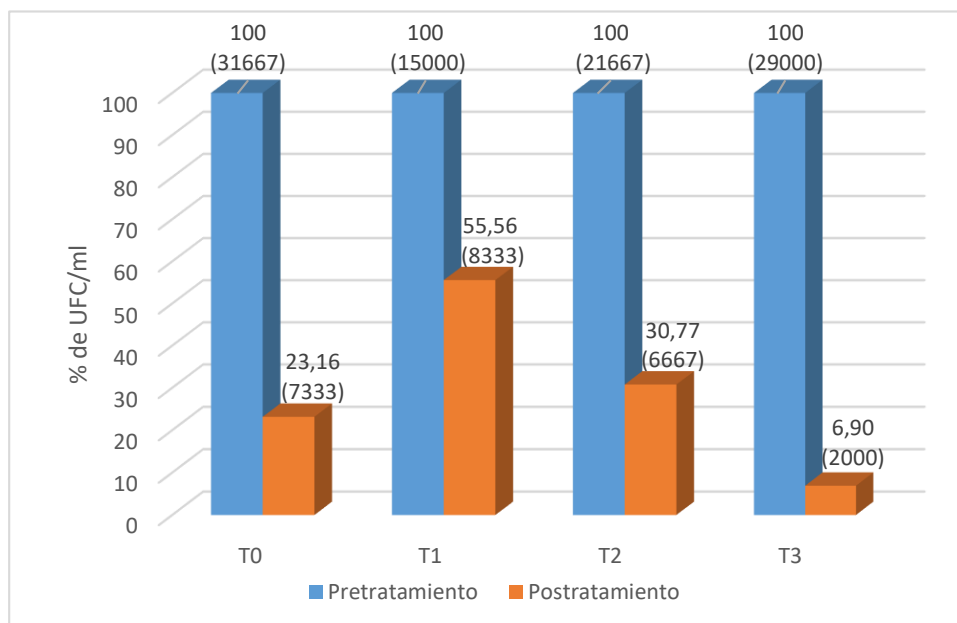


Gráfico 8 Porcentaje y conteo de UFC/ml para *Staphylococcus aureus* pre y postratamiento en vacas con mastitis subclínica grado III

3.1.13. Acción antimicrobiana de los tratamientos sobre *Streptococcus* spp. en vacas con mastitis subclínica grado III

Como se puede apreciar en el gráfico 9, la respuesta antimicrobiana de los tratamientos aplicados sobre la cantidad de colonias de *Streptococcus* spp. (UFC/ml), no presentó diferencias entre los tratamientos aplicados, donde el nivel de respuesta para cada uno de estos fue del 100%, sin evidenciarse la presencia de residuos de colonias bacterianas para este agente microbiano.

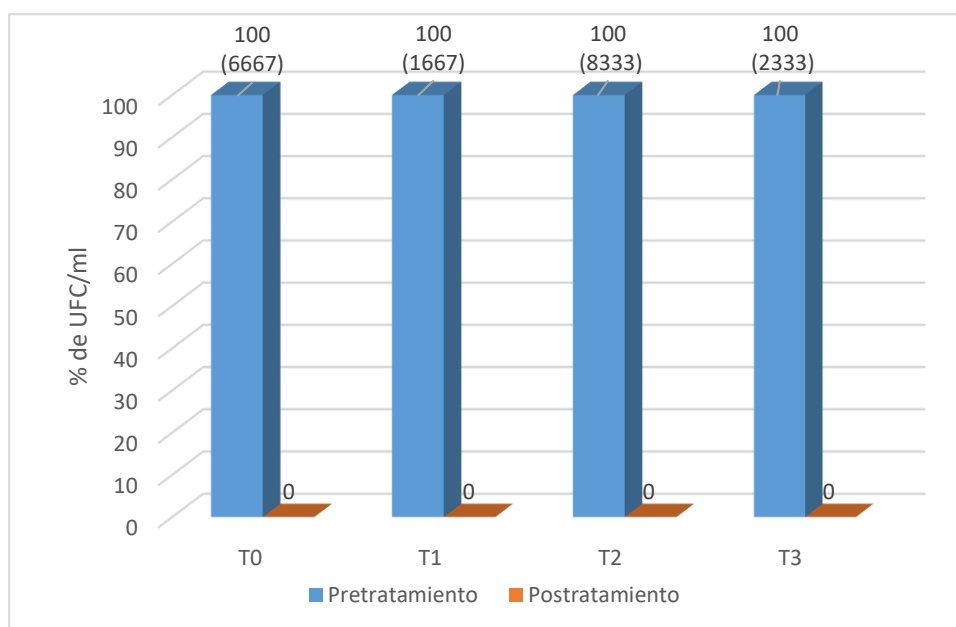


Gráfico 9 Porcentaje y conteo de UFC/ml para *Streptococcus* spp. pre y postratamiento en vacas con mastitis subclínica grado III

3.1.14. Acción antimicrobiana de los tratamientos sobre *Escherichia coli* en vacas con mastitis subclínica grado III

Tal y como se presenta en el gráfico 10 la respuesta antimicrobiana para cada uno de los tratamientos aplicados sobre la cantidad de colonias de *Escherichia coli* (UFC/ml) fue la misma. No existió diferencias en el porcentaje residual de este agente bacteriano tras la aplicación de los tratamientos, alcanzando el 100% respuesta antimicrobiana para colonias de *E. coli*.

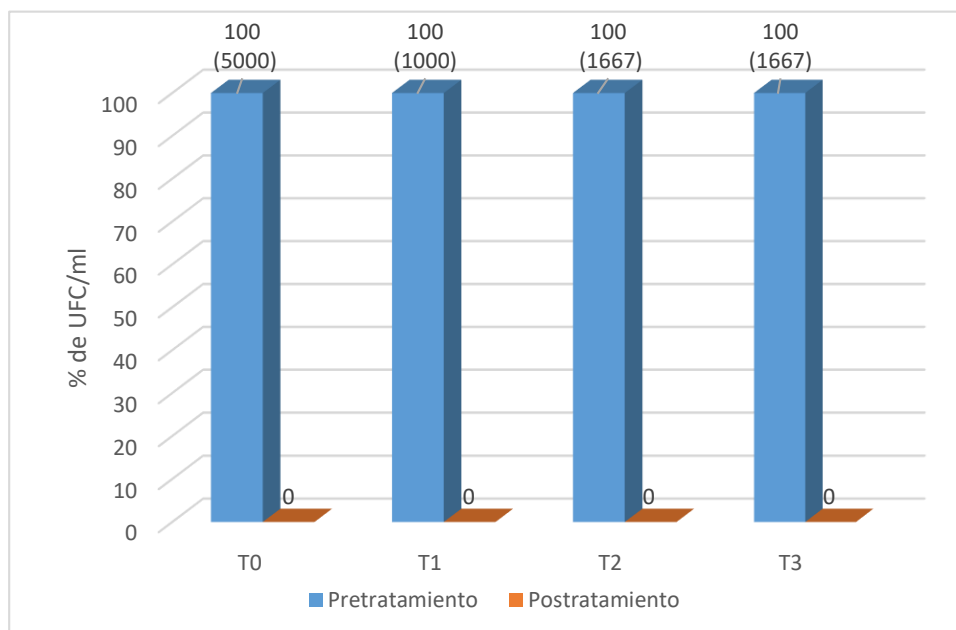


Gráfico 10 Porcentaje y conteo de UFC/ml para *Escherichia coli* pre y postratamiento en vacas con mastitis subclínica grado III

3.2. Discusión

El ácido hipocloroso utilizado por vía intramamaria para el tratamiento de mastitis subclínica clasificada para este estudio en tres grados de presentación redujo de manera considerable el conteo de células somáticas (Ccs/ml) al emplear dosis 20 y 30 ml (T2 y T3) debido a su capacidad antiinflamatoria controlando la acumulación de queratinocitos y fibroblastos en el área de inflamación (Fu et al., 2003).

No obstante, el conteo de células somáticas más bajo se obtuvo con T3 (30 ml de HClO), en cada uno de los grados de mastitis subclínica, registrando un recuento celular menor a las 200 000 Ccs/ml, clasificando al animal como negativo o sano (Mellenberger y Roth, 2000). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Qetin et al. (2018) donde se administró ácido hipocloroso a una dosis de 100 ml con intervalos de 12 horas en 3 aplicaciones a vacas diagnosticadas con mastitis subclínica

quienes, al comparar los valores de células somáticas antes y después del tratamiento observaron que estas redujeron una semana después de aplicado el tratamiento.

La identificación de los agentes bacterianos de las muestras de leche procedentes de las 36 vacas empleadas en el estudio previo a la administración de los tratamientos reveló la presencia de cocos grampositivos: *Staphylococcus aureus* 66% y *Streptococcus* spp. 24% y en menor proporción bacilos gramnegativos registrando únicamente *Escherichia coli* en un valor de 10%, resultados que difieren a los obtenidos por **Ormanza et al., (2021)** en su estudio sobre mastitis bovina realizada en el cantón Montúfar, provincia de Carchi, donde los agentes causales reconocidos fueron: *Staphylococcus aureus* en un 100%, seguido por enterobacterias con un 92%, *Escherichia coli* con 64% por último, mohos y levaduras con un porcentaje de 0,00%.

Los resultados de la administración de ácido hipocloroso (HClO) para la reducción en la carga bacteriana de los principales microorganismos causantes de mastitis subclínica identificados en el estudio, reflejaron una elevada respuesta antimicrobiana al emplearse en dosis de 30 ml para colonias de *Staphylococcus aureus* observándose una reducción significativa del conteo de UFC/ml, compartiendo una respuesta antimicrobiana similar para todos los grados de mastitis subclínica, a excepción de las vacas consideradas como grado III, donde esta respuesta descendió en un 93,1% donde dicho valor puede considerarse como aceptable. Esta respuesta antimicrobiana está relacionada con el elevado poder oxidante que tiene el ácido hipocloroso, debido a que una vez administrado en la glándula mamaria este llega a la cisterna de la leche para luego ser distribuido en el tejido glandular. Actuando sobre las bacterias presentes en la ubre gracias a su capacidad de penetrar fácilmente en la célula bacteriana a través de la membrana citoplasmática y una vez dentro de la bacteria provocar la destrucción de electrones celulares, cadenas de transporte y el grupo de nucleótidos de adenina, además de la abolición de adenosín trifosfato (**Ramey y Kinde, 2015**).

Los resultados de la efectividad antimicrobiana del ácido hipocloroso sobre colonias de *S. aureus* fueron superiores a los obtenidos en el estudio realizado por **Boddie y**

Nickerson (1996) donde se probaron dos formulaciones de baño para pezones que contenían ácido hipocloroso como ingrediente activo frente al desafío experimental de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*, obteniéndose un nivel de reducción con el producto 1 del 73,6% y 65,1% para *S. aureus* y *S. agalactiae* respectivamente y con el producto 2, se redujo el número de *Staphylococcus aureus* en un 69,0% y de *Streptococcus agalactiae* en un 64,5%

Por otro lado, la administración 10 (T1) y 20 ml (T2) de HClO no presentó resultados favorables en el control de *Staphylococcus aureus* especialmente en vacas con mastitis subclínica grado III, donde la respuesta antimicrobiana fue 44,44% y 69,23%, esté ultimo presentando valores ligeramente inferiores a los reportados por **Boddie y Nickerson (1996)**

Así también, en cuanto al control de *Streptococcus spp.* y *Escherichia. coli* todos los tratamientos reflejaron el mismo nivel de respuesta antimicrobiana, con una reducción del 100% del número de UFC/ml de estos dos tipos de bacterias con excepción al utilizarse el T2 para el control de *Streptococcus spp.* en vacas con mastitis subclínica grado I, donde este ligero descenso de la capacidad antimicrobiana del producto, posiblemente se atribuye a situaciones de manejo de los animales ajenas al experimento. No obstante, dichos resultados reflejan similitud a lo reportado por **Paredes (2018)**, el cual realizó un estudio comparativo entre el peróxido de hidrógeno al 3,18%, hipoclorito de sodio al 1,85% y ácido hipocloroso a una concentración de 500 ppm en el control de *Streptococcus mutans* y *Staphylococcus aureus*, siendo este último la sustancia con mayor capacidad antiséptica frente a las otras sustancias analizadas.

3.3. Verificación de hipótesis

Se acepta la hipótesis nula (H0) debido a que los resultados obtenidos reflejan que el ácido hipocloroso actúa de manera efectiva la mastitis subclínica en vacas lactantes.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- El presente estudio determinó que el empleo de ácido hipocloroso (HClO) para el control de mastitis subclínica en diferentes grados, puede considerarse como una alternativa terapéutica en el tratamiento de esta enfermedad.
- Se identificó el grado de mastitis subclínica mediante la cuantificación de células somáticas mediante microscopía directa en frotis, determinándose tres categorías: grado I (200.000 - 400.000 Ccs/ml), grado II (400.000 - 1'200.000 Ccs/ml) y grado III (1'200.000 – 5'000.000 Ccs/ml)
- En el conteo de células somáticas como indicativo del grado de mastitis subclínica, se obtuvo mejores resultados al administrarse dosis de 30 ml de HClO (T3) por vía intramamaria por 5 días en de cada ordeño, debido a que cada uno de los animales luego de la aplicación del tratamiento registró un conteo celular menor a las 200 000 Ccs/ml, considerándolo como negativo a mastitis subclínica.
- En relación a la capacidad antimicrobiana del ácido hipocloroso, se obtuvo una mejor respuesta en la reducción de colonias de UFC de *Staphylococcus aureus* utilizando este producto a una dosis de 30 ml compartiendo niveles de respuesta antimicrobiana del 100% en vacas con mastitis subclínica grado I y II con una ligera reducción en el control de *S. aureus* para vacas grado III. Con respecto a la reducción de colonias de *Streptococcus* spp. la respuesta antimicrobiana fue del 100% en las tres dosis de ácido hipocloroso y en el

tratamiento convencional para mastitis subclínica de grado II y III. No obstante, se evidenció un caso aislado al utilizarse 20 ml de HClO para el control de esta bacteria presente en vacas con mastitis subclínica grado I, donde esta respuesta descendió ligeramente (91,8%), dicho caso pudo atribuirse a situaciones de manejo en los animales ajenas al experimento. No obstante, el T1 (10 ml de HClO) y T3 (30 ml de HClO) mostraron una respuesta antimicrobiana del 100% para *Streptococcus* spp. en las vacas con este mismo grado de mastitis subclínica. Finalmente, en cuanto a la reducción de colonias de *Escherichia coli* el nivel de afectividad bactericida fue el mismo (100%) en todos los tratamientos aplicados.

4.2. Recomendaciones

- Administrar 30 ml de ácido hipocloroso por vía intramamaria en el tratamiento de mastitis subclínica durante 5 días en cualquier grado de infección.
- Realizar investigaciones similares con ácido hipocloroso empleados dosis superiores a los 30 ml utilizadas en el estudio durante el mismo tiempo de aplicación.
- Se recomienda administrar 20 ml de ácido hipocloroso en vacas con mastitis subclínica grado I y II con intervalos de tiempo superiores a 5 días.

CAPÍTULO V

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abebe, R., Hatiya, H., Abera, M., Megersa, B., Asmare, K. (2016). Bovine mastitis: prevalence, risk factors and isolation of *Staphylococcus aureus* in dairy herds at Hawassa milk shed, South Ethiopia. *BMC Veterinary Research*, (12), 270-281. DOI: 10.1186/s12917-016-0905-3
- Andresen, H. (2001). Mastitis: Prevención y control. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 12(2), 55-64. <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v12n2/a10v12n2.pdf>
- Armstrong, D; Bohn, G; Glat, P, Kavros, S; Kirsner, R; Snyder, Tettelbach, W. 2015. Expert Recommendations for the Use of Hypochlorous Solution: Science and Clinical Application. *Ostomy Wound Manage.* 61(5): S2-S19. https://www.researchgate.net/publication/292489936_Expert_Recommendations_for_the_Use_of_Hypochlorous_Solution_Science_and_Clinical_Application
- Bedolla, C., Castañeda, V. y Wolter, W. (2007). Métodos de detección de la mastitis bovina. *Revista Electrónica de Medicina Veterinaria*, 8(9), 1-17. https://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_leche/12-mastitis.pdf
- Bedolla, C. (2017). *Etiología de la mastitis bovina*. https://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_leche/128-Etiologia.pdf
- Birhanu, M., Leta, S., Mamo, G. y Tesfaye, S. (2017). Prevalence of bovine subclinical mastitis and isolation of its major causes in Bishoftu Town, Ethiopia. *BMC Research Notes*, (10), 1-6. DOI: 10.1186/s13104-017-3100-0
- Blood D. y Radostits. O. (1992) *Medicina Veterinaria: Mastitis Bovina*. 6ta edición, Madrid, España: McGrawHill
- Boddie, R. L. y Nickerson, S. C. (1996). Efficacy of teat dips containing a hypochlorous acid germicide against experimental challenge with

- Staphylococcus aureus and Streptococcus agalactiae. *Journal Dairy Science* (79), 1683-1688. DOI: 10.3168/JDS.S0022-0302(94)77262-3
- Caballero, M., Acero, V. y Martin, H. (2017). El ácido hipocloroso como tratamiento alternativo en papilomatosis bovina: Reporte de caso. *Revista Colombiana de ciencias Pecuarias*, 30, 103-105. <https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:EqhYdK47vZsJ:https://revistas.udea.edu.co/index.php/rccp/article/download/330565/20786892/+&cd=1&hl=es&ct=clnk&gl=ec>
- Cevallos, R. (2014). *Investigación y Desarrollo de bioasepsia a base de ácido hipocloroso en los procesos de desinfección*. [Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia]. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/49681>
- Concha, C. (2008). *Mastitis bovina: nuevos aspectos de diagnóstico, tratamiento y control*. https://www.uchile.cl/documentos/mastitis-bovina-nuevos-aspectos-de-diagnostico-tratamiento-y-control_58311_8_5339.pdf
- Chen, B. y Wang, C. (2022). Electrolyzed Water and Its Pharmacological Activities: A Mini-Review. *Molecules*, (27), 1-15. DOI: 10.3390/molecules27041222
- Coronado, D., Henao, D., Londoño, A. y Herruzo, R. (2011). Efecto micobactericida del ácido hipocloroso en tres especies ambientales potencialmente patógenas y en *Mycobacterium tuberculosis*. *Infectio*, 15(4), 243-252. <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v15n4/v15n4a06.pdf>
- Fernández, O., Trujillo, J., Peña, J., Cerquera, J. y Granja, Y. (2012). Mastitis bovina: Generalidades y métodos de diagnóstico. *Revista Electrónica Veterinaria*, 13(11), 1-11. https://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_leche/78-mastitis.pdf
- Fuentes, A. (2018). *Efecto del ácido hipocloroso como alternativa terapéutica sobre la endometritis bovina posparto*. [Tesis de Grado. Universidad Técnica de Ambato] <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/28396/1/Tesis%20137%20Medicina%20Veterinaria%20y%20Zootecnia%20-CD%20583.pdf>
- Gard, J., Taylor, D., Maloney, R., Schnuelle, M., Duran, S., Moore, P., Justus, W., Walz, P., Stockle, R., Rodining, S., DeGraves, F., Santen, E., Edmondson, M. y O'conner, A. (2016). Preliminary evaluation of hypochlorous acid spray for treatment of experimentally induced infectious bovine keratoconjunctivitis.

The Bovine Practitioner 50(2), 180-189. DOI:
<https://doi.org/10.21423/bovine-vol50no2p180-189>

Gobierno Autónomo Descentralizado Parroquial de San Andrés, (2020). *Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial del Gobierno Autónomo Descentralizado Parroquial Rural San Andrés 2019-2023*.
<http://sanandres.gob.ec/wp-content/uploads/2021/04/PDOT-SAN-ANDRES-2019-2023.pdf>

Fu, X., Sean, Y., Kassim, Y. William, C. (2003). Hypochlorous acid generated by myeloperoxidase modifies adjacent tryptophan and glycine residues in the catalytic domain of Matrix metalloproteinase-7 (Matrilysin). *The Journal of Biological Chemistry*, 278(31), 28403-24809. DOI: 10.1074/jbc.M304739200

Hakim H., Alam MS., Sangsriratanakul N., Nakajima K., Kitazawa M., Ota M., Toyofuku C., Yamada M., Thammakarn C., Shoham D. y Takehara K. 2016. Inactivation of bacteria on surfaces by sprayed slightly acidic hypochlorous acid water: in vitro experiments. *Journal of Veterinary Science* 78(7): 1123-8. DOI: 10.1292/jvms.16-0075.

Harmon, R. J. (1994). Physiology of mastitis and factors affecting somatic cells counts. *Journal of Dairy Science*, 77, 2103-2112. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(94)77153-8

Henao, S., Sierra, C. y Gaitán, J. (2003). Actividad bactericida del ácido hipocloroso. *Revista Facultad de Medicina*, 51(3), 136-142.
<https://www.scielo.cl/pdf/ijodontos/v9n3/art19.pdf>

Hernández, J. y Bedolla, J. L. (2008). Importancia del conteo de células somáticas en la calidad de la leche. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 9(9), 1-34.
<https://www.redalyc.org/pdf/636/63617329004.pdf>

Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología. (2015). *Anuario Meteorológico, 2015*.

Kawai, K., Shinozuka, Y., Uchida, I., Hirose, K., Mitamura, T., Watanabe, A., Kuruhara, K., Yuasa, R., Sato, R., Onda, K. y Nagahata, H. (2017). Control of Pseudomonas mastitis on a large dairy farm by using slightly acidic electrolyzed water. *Animal Science Journal*, 88(10), 1601-1605. DOI: 10.1111/asj.12815.

Lafaurie, G., Calderón, J., Zaror, C., Millán, L. y Castillo, D. (2015). Ácido hipocloroso: una nueva alternativa como agente antimicrobiano y para la

- proliferación celular para uso en odontología. *International Journal of Odontostomatology*, 9(3), 475-481.
<https://www.scielo.cl/pdf/ijodontos/v9n3/art19.pdf>
- Lafaurie, G., Del Rosario A., Arboleda, S., Escalante, A., Castillo, D., Millán, L., Calderón, J. y Nieves, B. (2009). Eficacia desinfectante del ácido hipocloroso sobre cepas con poder patogénico de cavidad oral. *Revista Colombiana de Investigación en Odontología*, 1(1), 3-11.
https://issuu.com/munevarjuan/docs/articulo_acfo
- López, J. M. (28 de mayo de 2014). *Mamitis bovina: definición, etiología y epidemiología de la enfermedad*. Ciencia Veterinaria.
<https://cienciaveterinaria.com/mamitis-definicion-etilogia-y-epidemiologia/>
- Martínez, D., Cruz, A., Millán, A. y Moreno, G. (2016). Evaluación del estado de resistencia de agentes etiológicos de mastitis clínica y subclínica frente a algunos antimicrobianos utilizados en hembras bovinas del Municipio de Sotaquirá (Boyacá-Colombia). *Revista Científica*, 25(3), 223- 231.
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=95939206006>
- Martínez, P. (2015). *Evaluación de dos dosis de ozono en el tratamiento de mastitis bovina*. [Tesis de Grado. Universidad Central del Ecuador].
<http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/6968/1/T-UCE-0014-036.pdf>
- Mellenberger, R. y Roth, C. (2000). *Hoja de Información de la Prueba de Mastitis California (CMT)*. <https://www.flipsnack.com/F956E5DBDC9/hoja-de-informacion-de-la-prueba-de-mastitis.html>
- Mera, R., Muñoz, M., Artieda, J., Ortíz, P., González, R. y Vega, V. (2017). Mastitis bovina y su repercusión en la calidad de la leche. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 18(11), 1-16. <https://www.redalyc.org/pdf/636/63653574004.pdf>
- Moreno, A. C. (2006). *Efectividad farmacológica del ácido hipocloroso frente al Helicobacter pylori en un modelo experimental en caninos*. [Tesis de Grado, Universidad de La Salle]
https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1136&context=medicina_veterinaria#:~:text=El%20grupo%20experimental%20mostr%C3%B3%20como,%25%2C%20reflujo%20del%2012%25.
- Moreno, F., Rodríguez, G., Méndez, V., Osuna, L., Vargas, M. (2007). Análisis microbiológico y su relación con la calidad higiénica y sanitario de la leche

- producida en la región del Alto de Chicamocha Departamento de Boyacá. *Revista de Medicina Veterinaria*, (14), 61-83.
- Mungube, E., Tenhagen, B., Regassa, F., Kyule, M., Shiferaw, Y., Kassa, T. y Baumann, M. (2005). Reduced milk production in udder quarters with subclinical mastitis and associated economic losses in crossbred dairy cows in Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production*, (37), 503-512. DOI: 10.1007/s11250-005-7049-y
- Nan, S., Wang, C., Cao, W., Li, B., Ma, Q. y Wang, S. (2010). Disinfection effect and application of slightly acidic electrolyzed water in a dairy cattle farm. *ASABE*, 1-13. DOI: 10.13031/2013.29761
- Naranjo, J., Acevedo, C. y Calderón, J. (2006). Usos del ácido hipocloroso en úlceras de miembros inferiores. *Informador Médico*, 1(1), 8-11. <http://receloviix.com/Docs/2006%20-%20Uso%20Del%20Acido%20Hipocloroso%20En%20Ulceras%20de%20Miembros%20Inferiores.pdf>
- Otzen, T. y Manterola, C. (2017). Técnicas de muestreo sobre una población a estudio. *International Journal of Morphology*, 35(1), 22}-232. <https://scielo.conicyt.cl/pdf/ijmorphol/v35n1/art37.pdf>
- Ormanza, D., Rueda, R., Huera, D. y Ibarra, E. (2021). Mastitis bovina en el cantón Montúfar – Carchi. Prevalencia, agente causal y factores de riesgo. *Revista Científica de Investigación, Docencia y Proyección Social*, (26), 5-10. DOI: <https://doi.org/10.26621/ra.v1i26.735>
- Paredes, E. M. (2018). *Estudio comparativo del efecto antibacteriano del peróxido de hidrógeno al 3.18%, hipoclorito de sodio al 1.85% y ácido hipocloroso en concentraciones de 125 ppm y 500 ppm contra cepas de Staphylococcus aureus y Streptococcus mutans, estudio in-vitro*. [Tesis de Grado. Universidad Central del Ecuador, Ecuador]. <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/16618/1/T-UCE-0015-ODO-041.pdf>
- Pinzón, A., Moreno, F. y Rodríguez, G. (2009). Efectos de la mastitis subclínica en algunos hatos de la cuenca lechera del Alto Chicamocha (departamento de Boyacá). *Revista de Medicina Veterinaria*, (17), 23-35. <http://www.scielo.org.co/pdf/rmv/n17/n17a03.pdf>

- Qetin, H., Erdogan, G., Yilmaz, O., Uqar, E., Peker, C. Sakarya, S. (2018). *Investigation of intramammary hypochlorous administration in cattles with subclinical mastitis*. Mediterranean Veterinary Congress 7h REEV-Med General Assembly. http://www.nhp.com.tr/referanslar/referans_58.pdf
- Quevedo, W. (2018). Recuento de células somáticas (rsc), como indicador en la resistencia de la mastitis bovina. *Revista Ciencia, Tecnología e Innovación*, 16(17): 1001-1012. http://www.scielo.org.bo/pdf/rcti/v16n17/v16n17_a05.pdf
- Ramey, D. y Kinde, H. (2015). Commercial and homemade extremely dilute hypochlorous acid solutions are bactericidal against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in vitro. *Journal of Equine Veterinary Science*, 35, 161-164. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2014.12.004>
- Riffon, R., Sayasith, K., Khalil, H., Dubreuil, P., Drolet, M. y Lagacé, J. (2001). Development of a Rapid and Sensitive Test for Identification of Major Pathogens in Bovine Mastitis by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 2584-2589. DOI: 10.1128/JCM.39.7.2584-2589.2001
- Rossito, P. V., Ruiz, L., Kikuchi, Y., Glenn, K., Luiz, K., Watts, J. L. Cullor, J. S. (2002). Antibiotic Susceptibility Patterns for Environmental Streptococci Isolated from Bovine Mastitis in Central California Dairies. *American Dairy Science Association*, 85, 132-138. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(02)74061-7
- Sakarya, S., Gunay, N., Karakulak, M., Ozturk, B. y Ertugrul, B. (2014). Hypochlorous acid: an ideal wound care agent with powerful microbicidal, antibiofilm, and wound healing potency. *Wounds*, 26(12), 342-350. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25785777/>
- Soto, L. y González, L. (2016). *Efecto del ácido hipocloroso como presellador en un grupo de vacas lecheras en la Finca Logroño en Soacha, Cundimarca*. [Tesis de Grado. Universidad de La Salle, Colombia]. https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1175&context=medicina_veterinaria#:~:text=Los%20resultados%20de%20este%20estudio,como%20desinfectante%2Dpresellador%20en%20vacas.
- Shittu, A., Abdullahi, J., Jibril, A., Mohammed, A., Fasina, F. (2012). Sub-clinical mastitis and associated risk factors on lactating cows in the Savannah Region of Nigeria. *BMC Veterinary Research*, (8), 134-141. DOI: <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-134>

- Tollersrud, T., Kenny, K., Reitz, A., Lee, J. (2000). Genetic and Serologic Evaluation of Capsule Production by Bovine Mammary Isolates of *Staphylococcus aureus* and Other *Staphylococcus* spp. from Europe and the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(2000), 2998-3003. DOI: 10.1128/jcm.38.8.2998-3003.2000
- Weichao, Z., Li, N., Xue, H., Baoming, L. y Jiafa, Z. (2016). Optimization of slightly acidic electrolyzed water spray for airborne culturable bacteria reduction in animal housing. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 9(4), 185-191. <https://ijabe.org/index.php/ijabe/article/view/2366/pdf>
- Zurita, L. (1982). Mastitis bovina con especial énfasis en la realidad nacional. *Monografías de Medicina Veterinaria*, 4(2). https://web.uchile.cl/vignette/monografiasveterinaria/monografiasveterinaria.uchile.cl/CDA/mon_vet_seccion/0,1419,SCID%253D7798%2526ISID%253D414,00.html

ANEXOS

Anexo 1 Predios e instalaciones de la granja “Santa Clara”



Hato lechero empleado en la investigación



Sala de ordeño mecánico



Zona de espera previo al primer ordeño



Zona de espera previo al segundo ordeño

Anexo 2 Realización del California Mastitis Test (CMT)



Mezcla de leche y reactivo para el CMT



Resultado de CMT: mastitis subclínica grado I



Resultado de CMT: mastitis subclínica grado II



Resultado de CMT: mastitis subclínica grado III

Anexo 3 Toma de muestras para conteo de células somáticas y cultivo bacteriológico



Limpieza del pezón previo a la toma de muestra



Toma de muestra de leche (4ml)



Muestras rotuladas para análisis de laboratorio

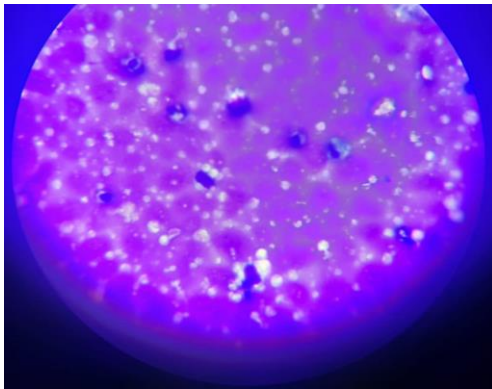
Anexo 4 Pruebas de laboratorio



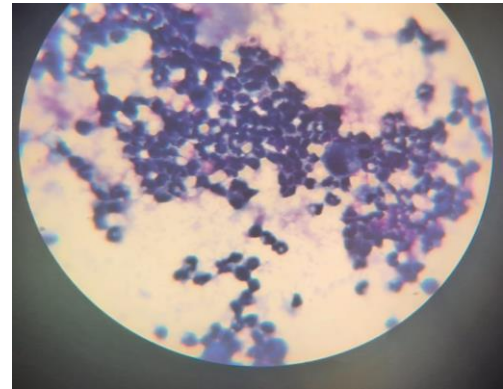
Crecimiento de colonias en cultivos de leche de vacas con mastitis subclínica



Desarrollo de colonias de *Escherichia coli* en agar MacConkey

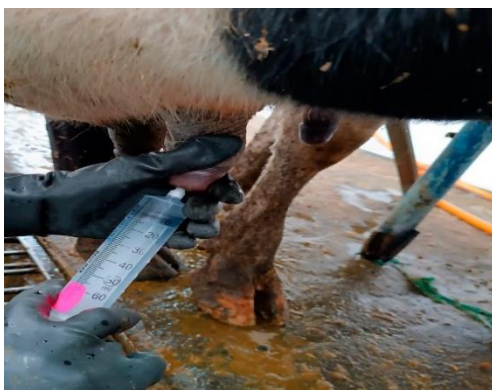


Frotis teñido para conteo de células somáticas



Conteo de células somáticas por microscopía directa

Anexo 5 Administración del ácido hipocloroso (HClO)



Administración de 10 ml de HClO vía intramamaria



Administración de 20 ml de HClO vía intramamaria



Administración de 30 ml de HClO vía intramamaria

Anexo 6 Resultados del California Mastitis Test

N°	Nombre	Cuarto mamario			
		AI	AD	PI	PD
1	Abigail*	III	III	III	III
2	Acasia*	III	III	III	III
3	Agustina	I	I	I	Negativo
4	Aitana	I	I	I	I
5	Aldana	Negativo	I	Negativo	Negativo
6	Aleja*	II	II	II	II
7	Alina	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
8	Alisson	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
9	Amalia*	I	I	I	I
10	Anahí	Negativo	Negativo	I	I
11	Analía P	I	I	I	I
12	Belén*	II	II	II	II
13	Bella	I	I	I	I
14	Benita	Negativo	Negativo	I	I
15	Beret	Negativo	I	I	I
16	Beyonce*	I	I	I	I
17	Bota	II	II	Negativo	I
18	Camila	II	I	I	Negativo
19	Candela*	II	II	II	II
20	Carioca	I	I	I	I
21	Carlota*	II	II	II	II
22	Carmelina	I	I	I	I
23	Carmina	I	I	I	I
24	Carolina	I	I	I	I

25	Carson	Negativo	Negativo	I	II
26	Cayetana	I	I	I	I
27	Celestina	Negativo	Negativo	I	I
28	Chula*	III	III	III	III
29	Clementina	I	I	I	I
30	Colory	III	III	III	III
31	Consuelo	I	I	Negativo	Negativo
32	Cristy*	I	I	I	I
33	Cubana	I	I	I	I
34	Dala*	III	III	III	III
35	Dalila	III	III	III	III
36	Daniela	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
37	Debora	III	Negativo	Negativo	Negativo
38	Doris	I	I	Negativo	I
39	Doroty*	II	II	II	II
40	Duana*	I	I	I	I
41	Emi	I	I	I	II
42	Ercilla	II	Negativo	Negativo	II
43	Evani	Negativo	Negativo	I	I
44	Eve	I	I	I	I
45	Farina*	III	III	III	III
46	Farruca (496)*	III	III	III	III
47	Fausta	I	I	I	I
48	Federica*	III	III	III	I
49	Fedora*	I	I	I	I
50	Fedora P.	II	II	I	I
51	Fiorella*	III	III	III	III
52	Florinda	I	I	I	I
53	Gabriela	I	I	I	I
54	Gaby	III	Negativo	Negativo	Negativo
55	Gadiela*	II	II	II	II
56	Gayle (349)*	III	III	III	III
57	Gema*	III	III	III	III
58	Gines	I	I	I	I
59	Israela*	II	II	II	II
60	Jade*	III	III	III	III
61	Janeth	II	II	II	II
62	Jara	I	I	I	I
63	Jasmín	Negativo	III	Negativo	Negativo
64	Jemmy	I	I	Negativo	Negativo
65	Jeny	I	I	I	I

66	Jordana	I	I	Negativo	Negativo
67	Josefa	Negativo	Negativo	I	I
68	Joss	Negativo	I	Negativo	I
69	Juana	Negativo	Negativo	I	I
70	Juliana	I	Negativo	Negativo	Negativo
71	Kate	Negativo	Negativo	Negativo	II
72	Kiara	II	Negativo	Negativo	III
73	Lady*	III	III	III	III
74	Lila	II	II	II	II
75	Lilia	II	II	II	II
76	Lino	I	I	Negativo	Negativo
77	Lira*	II	II	II	II
78	Lloro	Negativo	I	II	II
79	Lola	I	I	I	I
80	Lolita	I	I	I	I
81	Loreta	I	I	I	I
82	Luana	I	I	I	Negativo
83	Lucha	II	II	I	I
84	Luci	III	III	III	III
85	Lucia	I	I	I	III
86	Lucinda	I	I	I	I
87	Lunita	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
88	Lusmila	II	II	II	II
89	Macey	I	Negativo	Negativo	Negativo
90	Mailen	II	II	II	I
91	Malina	I	I	I	Negativo
92	Mara	I	I	I	I
93	Mari	II	II	II	II
94	Marimar*	II	II	II	II
95	Mariuxi	I	I	I	I
96	Marka*	II	II	II	II
97	Matilde*	I	I	I	I
98	Mayra	II	I	Negativo	Negativo
99	Meli	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
100	Mercedes*	III	III	III	III
101	Mia (129)	II	I	I	II
102	Mina	I	I	Negativo	I
103	Miranda	I	I	Negativo	Negativo
104	Mishel	III	III	I	I
105	Mole	I	I	I	I
106	Mora	I	I	I	I

107	Natusha	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
108	Nelda	III	III	III	III
109	Pamela	Negativo	II	I	I
110	Patricia	I	II	Negativo	Negativo
111	Peggy	I	Negativo	Negativo	I
112	Pepa	I	I	I	I
113	Pepina	I	I	I	I
114	Pepina P	I	I	I	I
115	Perica	I	I	III	III
116	Petrona	III	I	I	III
117	Pinara	Negativo	Negativo	Negativo	I
118	Popeya	Negativo	Negativo	I	I
119	Popis*	III	III	III	III
120	Pricila	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
121	Primor	II	Negativo	II	III
122	Pruna	I	Negativo	Negativo	Negativo
123	Raquel	II	II	II	II
124	Renata	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
125	Renesme	III	III	III	I
126	Rosa	I	I	I	I
127	Sahar	I	I	Negativo	Negativo
128	Salma	I	I	I	I
129	Samara	I	I	I	I
130	Sarina	I	I	I	I
131	Shelly	I	II	II	II
132	Silvita	I	III	I	III
133	Sofia	II	II	Negativo	III
134	Soledad	I	I	I	I
135	Suca	I	I	I	I
136	Taisana	I	II	II	II
137	Talia	I	I	I	I
138	Tamara	I	II	II	II
139	Tefa*	II	II	II	II
140	Teodora	II	II	II	III
141	Teolina	I	I	I	I
142	Teolinda	I	I	I	I
143	Teresa	I	I	I	I
144	Thadea*	II	II	II	II
145	Tirsa	I	I	II	I
146	Tuna P	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
147	Valentina	I	I	I	I

148	Xiomi	I	I	I	I
149	Yadira	III	III	II	Negativo
150	Zair*	I	I	I	I

Nota: (*) corresponde a las vacas que ingresaron en el estudio

Anexo 7 Cuadro de resumen del conteo de células somáticas (Ccs/ml) y análisis microbiológico (UFC/ml) de las vacas utilizadas en el estudio

Grado de mastitis	Nombre	Tratamiento	Conteo UFC/ml pretratamiento				Conteo UFC/ml postratamiento			
			CcS/ml pretratamiento	CcS/ml postratamiento	<i>S. aureus</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>E. coli</i>
I	Cristy	T0	274822	57624	13000	7000	0	0	0	0
	Duana		296985	62056	0	15000	10000	0	0	0
	Thadea		302711	63175	10000	4000	3000	0	0	0
	Acasia	T1	380176	315212	0	4000	8000	0	0	0
	Lady		389538	214716	0	4000	0	0	0	0
	Zair		351941	246182	7000	0	5000	0	0	0
	Gadiela	T2	381205	199821	0	15000	0	0	3000	0
	Gema		345744	167989	0	15000	5000	0	0	0
	Beyonce		379452	132049	10000	4000	0	3000	0	0
	Amalia	T3	252659	22163	15000	0	0	0	0	0
Fedora	241843		21205	0	8000	0	0	0	0	
Matilde	249361		36920	10000	3000	0	0	0	0	
II	Doroty	T0	988474	265852	15000	0	3000	5000	0	0
	Israela		1054960	239847	35000	0	0	3000	0	0
	Marimar		897624	210253	20000	0	4000	0	0	0
	Colory	T1	1174644	918652	8000	0	5000	0	0	0
	Janeth		1194325	849928	10000	3000	0	7000	0	0
	Lusmila		1112498	705157	15000	4000	0	9000	0	0

	Marka		593971	115248	0	17000	0	0	0	0
	Tefa	T2	443262	131515	15000	0	0	0	0	0
	Carlota		470281	110798	10000	5000	3000	0	0	0
	Aleja		616134	45388	0	15000	5000	0	0	0
	Lira	T3	775708	63864	10000	0	0	0	0	0
	Candela		682047	51837	15000	0	3000	0	0	0
	Farruca		2921096	615767	40000	0	5000	7000	0	0
	Gayle	T0	1817374	376772	30000	10000	5000	10000	0	0
	Farina		2408631	503885	25000	10000	5000	5000	0	0
	Chula		1303190	934268	20000	0	0	10000	0	0
	Popis	T1	2114359	1183509	15000	0	0	10000	0	0
	Fiorella		2477613	1082647	10000	5000	0	5000	0	0
Grado III	Dala		2282799	265467	15000	10000	0	3000	0	0
	Mercedes	T2	2885635	314310	30000	10000	5000	10000	0	0
	Jade		1975281	283194	20000	5000	0	7000	0	0
	Belén		2078898	103321	22000	0	0	0	0	0
	Federica	T3	4339534	128545	40000	0	0	3000	0	0
	Abigail		2816340	112764	25000	7000	5000	3000	0	0

Anexo 8 Análisis de varianza del conteo de células somáticas (Ccs/ml) postratamiento de las vacas con mastitis subclínica grado I

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Ccs/ml	12	0,93	0,90	24,28

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	99957142938,00	3	33319047646,00	34,36	0,0001
Tratamientos	9957142938,00	3	33319047646,00	34,36	0,0001
Error	7756685434,67	8	969585679,33		
Total	107713828372,67	11			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=81417,26980

Error: 969585679,3333 gl: 8

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
T3	26762,67	3	17977,63	A
T0	60951,67	3	17977,63	A
T2	166619,67	3	17977,63	B
T1	258703,33	3	17977,63	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 9 Análisis de varianza del conteo de células somáticas (Ccs/ml) postratamiento de las vacas con mastitis subclínica grado II

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Ccs/ml	12	0,98	0,97	18,35

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1115939003794,92	3	371979667931,64	115,72	<0,0001
Tratamientos	1115939003794,92	3	371979667931,64	115,72	<0,0001
Error	25715424029,33	8	3214428003,67		
Total	1141654427824,25	11			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=148243,37375

Error: 3214428003,6667 gl: 8

Tratamientos	Medias	n	E.E.		
T3	53696,33	3	32733,41	A	
T2	119187,00	3	32733,41	A	B
T0	238650,67	3	32733,41		B
T1	824579,00	3	32733,41		C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 10 Análisis de varianza del conteo de células somáticas (Ccs/ml) postratamiento de las vacas con mastitis subclínica grado III

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Ccs/ml	12	0,96	0,95	17,83

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1543285950964,25	3	514428650321,42	66,83	<0,0001
Tratamientos	1543285950964,25	3	514428650321,42	66,83	<0,0001
Error	61582334834,67	8	7697791854,33		
Total	1604868285798,92	11			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=229406,92341

Error: 7697791854,3333 gl: 8

Tratamientos	Medias	n	E.E.		
T3	114876,67	3	50655,02	A	
T2	287657,00	3	50655,02	A	B
T0	498808,00	3	50655,02		B
T1	1066808,00	3	50655,02		C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)