

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA

FACULTAD DE ZOOTECNIA

DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE CIENCIAS PECUARIAS



**EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJA DE GUAYABA (*Psidium guajava* L.), EN
EL TRATAMIENTO DE LA MASTITIS SUB CLÍNICA, EN NARANJILLO.**

Tesis

Para optar el título de:

INGENIERO ZOOTECNISTA

TUESTA PANDURO, ROSA ILIANA

Promoción 2009 - II

Tingo María - Perú

2010

L10

T89

Tuesta Panduro, Rosa Iliana

Extracto Etanólico de Hoja de Guayaba (*Psidium guajava* L.), en el Tratamiento de la Mastitis Sub Clínica, en Naranjillo. Tingo María, 2010

52 h.; 4 cuadros; 1 fgrs.; 39 ref.; 30 cm.

Tesis (Ing. Zootecnista) Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María (Perú). Facultad de Zootecnia.

GUAYABA / EXTRACTO ETANÓLICO / MASTITIS / CÉLULAS

SOMÁTICAS / STREPTOCOCCUS AGALACTIAE / ESCHERICHIA COLI

TINGO MARÍA / RUPA RUPA / LEONCIO PRADO / HUÁNUCO / PERÚ.



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
FACULTAD DE ZOOTECNIA

Av. Universitaria Km. 2 Teléfono: (062) 561280
TINGO MARÍA

"Año de la Consolidación Económica y Social del Perú"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los que suscriben, Miembros del Jurado de Tesis, reunidos con fecha 16 de diciembre de 2010, a horas 6:00 p.m. para calificar la tesis titulada:

EXTRACTO ETANOLICO DE HOJA DE GUAYABA (*Psidium guajava* L.), EN EL TRATAMIENTO DE LA MASTITIS SUB CLINICA, EN NARANJILLO.

Presentada por la bachiller **Rosa Iliana TUESTA PANDURO**; después de haber escuchado la sustentación y las respuestas a las interrogantes formuladas por el Jurado, se declara aprobada con el calificativo de **"BUENO"**

En consecuencia, el sustentante queda apto para optar el **TÍTULO DE INGENIERO ZOOTECNISTA**, que será aprobado por el Consejo de Facultad, tramitándolo al Consejo Universitario para la otorgación del título, de conformidad con lo establecido en el Artículo 95, inciso "i" del Estatuto de la Universidad Nacional Agraria de la Selva.

Tingo María, 16 de diciembre de 2010

M.Sc. TEODOLFO VALENCIA CHAMBA
Presidente



Méd. Vet. JORGE TURPO CALCINA
Miembro

M.Sc. JUAN LAO GONZALES
Miembro

Méd. Vet. LISANDRO TAFUR ZEVALLOS
Miembro - Asesor

DEDICATORIA

A DIOS JEHOVÁ por su inmensa bondad inmerecida y darme la oportunidad de alcanzar mis metas y bendecirme siempre.

A mis queridos padres Iliana Panduro García y Alfredo Tuesta Salas, por depositar su confianza en mí, por sus grandiosos esfuerzos y sobre todo por su amor, cariño y comprensión, gracias.

A mis queridos hermanos Alfredo y Luisa, familiares y amigos que me brindaron su apoyo y comprensión durante toda mi vida estudiantil.

AGRADECIMIENTOS

A mi alma Mater Universidad Nacional Agraria de la Selva, Facultad de Zootecnia y plana docente, por la contribución en mi formación como profesional.

A mis asesores; M.V. Lisandro Tafur Zevallos e Ing. Msc. Miguel Ángel Pérez Olano, por la motivación, los consejos de orientarme y brindarme su apoyo incondicional para la realización en el transcurso del presente trabajo, así como en el proceso de mi formación profesional.

Al profesor Ing. Msc. Juan Lao Gonzales por su amistad y apoyo desmedido en la redacción de la tesis, así mismo a los miembros del jurado, M.V. Msc. Teodolfo Valencia Chamba, M.V. Jorge Turpo Calcina.

Al sr: Edinson Chaupin Aponte, Augurio Condeso Chávez, y Manuel Díaz por permitirme realizar el trabajo de investigación en sus respectivas ganaderías.

Al M.V. Daniel Paredes y al técnico laboratorista Felix Jara Ramires, por su amistad y colaboración para poder realizar el presente trabajo.

A mis amigos, en especial a Marlene Durand Chávez por su amistad brindada y su apoyo en la realización de la tesis, a mis compañeros de promoción y a todas aquellas personas que contribuyeron en mi formación personal, profesional, en el trabajo de investigación.

ÍNDICE

Página

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1.	Generalidades de la Guayaba (<i>Psidium guajava</i> L.)	3
2.1.1.	Taxonomía y descripción botánica	3
2.1.2.	Propiedades medicinales de la guayaba	4
2.1.3.	Farmacología y Farmacognosia	5
2.2.	Generalidades sobre las mastitis	7
2.3.	Agentes etiológicos de la mastitis en vacas	8
2.4.	Patogenia de la mastitis	9
2.5.	Mastitis sub clínica	9
2.6.	Diagnóstico de la mastitis sub clínica.....	10
2.6.1.	Método de california mastitis test – CMT.....	10
2.6.2.	Conteo de Células Somáticas – CCS.....	11
2.7.	Tratamiento de la mastitis	15
2.7.1.	Tratamiento no convencional	15
2.7.2.	Tratamiento convencional	17
2.8.	Causas que predisponen que falle el tratamiento de la mastitis.....	18
2.8.1.	Falta de antibiótico en el sitio de infección	18
2.8.2.	Lesiones físicas.....	19

III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
	3.1. Lugar y fecha de ejecución del trabajo.....	22
	3.2. Tipo de investigación.....	23
	3.3. Población de vacunos y muestra.....	23
	3.4. Instalaciones	23
	3.5. Metodología de estudio	24
	3.5.1. Obtención del extracto etanólico de la hoja de guayaba	24
	3.5.2. Preparación de diluciones	24
	3.6. Identificación de vacas infectadas con mastitis sub clínica	25
	3.7. Toma de muestras de leche y aplicación del extracto.....	25
	3.8. Siembra de microorganismos e identificación de las bacterias presentes en la leche con mastitis sub clínica.....	26
	3.9. Conteo de células somáticas (CCS).....	27
	3.10. Variables independientes	28
	3.11. Tratamientos	28
	3.12. Croquis de distribución de los tratamientos.....	29
	3.13. Diseño estadístico	29
	3.14. Variable dependiente	30
	3.14.1. Presencia de mastitis sub clínica.....	30
	3.14.2. Costo por dosis de Extracto Etanólico de hoja de Guayaba (EEHG) y por tratamiento	30
IV.	RESULTADOS	31
	4.1. Presencia de microorganismos en la leche.....	31
	4.2. Cantidad de células somáticas en leche infectada.....	33
	4.3. Costo total de producción del EEHG y por dosis de aplicación.....	34

4.4. Estimación del costo de aplicar extracto etanólico de hoja de guayaba, en cuartos de vacas infectadas con mastitis sub clínica	34
V. DISCUSIÓN.....	36
5.1. Presencia de microorganismos en la leche.....	36
5.2. Conteo de células somáticas.....	38
5.3. Costo total de producción del EEHG y por dosis de aplicación.....	39
VI. CONCLUSIONES	41
VII. RECOMENDACIONES.....	42
VIII. ABSTRACT.....	43
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
X. ANEXO	52
Cuadro A: Crecimiento bacteriano a la siembra de microorganismos.....	53
Cuadro B: Cantidad de células somáticas.....	54

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Crecimiento de bacterias, in vitro, a partir de muestras de leche infectadas de vacas tratadas con extracto etanólico de <i>Psidium guajava</i> L. evaluadas en tres períodos.....	31
2. Número de células somáticas en muestras de leche infectada, de vacas tratadas con extracto de <i>Psidium guajava</i> L., evaluadas en tres períodos.....	33
3. Costo de producción de 700 ml de extracto etanólico de hoja de guayaba.....	34
4. Estimación del costo de aplicar extracto etanólico de hoja de guayaba, en cuartos de vacas infectadas con mastitis sub clínica.....	34

ÍNDICE DE FIGURA

Figura	Página
1. Toma de muestras de leche y aplicación del extracto.....	26

RESUMEN

La investigación se realizó en la zona de Tingo María (Naranjillo), provincia de Leoncio Prado, departamento Huánuco – Perú, con el objetivo de evaluar el efecto de dos concentraciones de extracto etanólico de hoja de guayaba en el tratamiento de la mastitis sub clínica y determinar su costo de producción; se utilizó 15 vacunos cruzados de tres establos lecheros, seleccionando 29 cuartos infectados con mastitis sub clínica, los cuales fueron detectados con la prueba de CMT; se realizó los tratamientos con el extracto etanólico de guayaba al 25 y 50 %, se aplicó la dosis de 5 ml durante 7 días; se realizó el conteo de células somáticas y se evaluó el crecimiento e identificación de microorganismos (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*) de la leche procedente de los cuartos infectados; en tres evaluaciones durante el experimento. Para la variable crecimiento de las bacterias se utilizó la prueba de chi-cuadrado ($p \leq 0.05$), no se encontró dependencia entre el número de placas con crecimiento bacteriano y los tratamientos empleados; para la variable conteo de células somáticas, se trabajó con el diseño complemento al azar, no se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$) entre los tratamientos con relación al conteo de células somáticas en las tres evaluaciones realizadas. El trabajo de investigación tiene las siguientes conclusiones: El extracto etanólico de hoja de guayaba (*Psidium guajava L.*) en las diluciones evaluadas no mostró efectividad en el tratamiento de mastitis sub clínica de vacas en producción en Naranjillo, siendo el costo de producción de 1ml de EEHG es de S/0.47.

I. INTRODUCCIÓN

La producción láctea en el Perú es de 50 mil toneladas de leche por año equivalente al 4.7 % del producto bruto interno (MINAG, 2010). La mastitis constituye un problema grave para el productor ocasionando grandes pérdidas económicas en leche y gasto en medicamentos.

Los agentes causantes de la mastitis en la zona de Aucayacú de la Provincia de Leoncio Prado, son *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*, esta última de mayor incidencia en las vacas (MURRIETA, 2002). Existe en el mercado una serie de productos sintéticos que, se usan en el tratamiento de la mastitis, como por ejemplo las oxitetraciclinas, cloranfenicol, enrofloxacin y gentamicina, siendo la gentamicina la de mayor actividad y resultado; pero hasta la fecha, aún no se ha podido controlar la prevalencia de la mastitis, lo que apertura la posibilidad de usar ciertas plantas medicinales que se encuentran en la zona y que poseen metabolitos activos como fuente de agentes anti-microbianos.

Se ha determinado que el efecto del extracto etanólico de hojas de guayaba (*Psidium guajava* L.), tiene efectividad antibacteriana (in vitro) en el control de las unidades formadoras de colonias de *Streptococcus agalactiae* y

Staphylococcus aureus; mostrando capacidad de poder controlar estos agentes etiológicos causantes de la mastitis en vacas (DURAND, 2009). Por lo que se plantea la hipótesis: el uso de extracto etanólico de hoja de guayaba reduce la presencia de agentes etiológicos de mayor incidencia de mastitis sub clínica en vacas lecheras.

Objetivo general:

- Evaluar el extracto etanólico de hoja de guayaba en el tratamiento de la mastitis sub clínica de vacas en producción en Naranjillo.

Objetivo específico:

- Determinar el efecto de dos concentraciones de extracto etanólico de hoja de guayaba en el tratamiento de mastitis sub clínica en cuartos infectados de ubres de vacunos.
- Determinar los costos de producción del extracto etanólico de hoja de guayaba, para tratar mastitis sub clínica en vacunos.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Generalidades de la Guayaba (*Psidium guajava* L.)

2.1.1. Taxonomía y descripción botánica

La guayaba o guayabo, guayaba dulce, guayaba blanca pertenece a la familia Myrtaceae. Su descripción botánica consiste en que el *Psidium guajava* es un árbol de hasta 10 m de altura, con un tronco de 20-25 cm de diámetro; posee una corteza suave, pubescente, delgada, color rojo-café, que producen escamas que se desprenden. Sus hojas son verdes, opuestas, con pecíolo corto, elípticas u oblongas de 5-15 cm de largo, redondeadas en el ápice y en la base, y múltiples venas horizontales provistas de glándulas. Las flores son solitarias, color blanco, de 3-4 cm de ancho. Sus frutos son aromáticos, ovales o piriformes de 2-10 cm de largo con cáscara amarilla y carnaza rosada o amarilla, externamente granular y firme, al centro lleno de pulpa suave y jugosa y muchas semillas café claro, tiene como habitat a América tropical (LOPEZ, 2009) y en la selva peruana tiene amplia distribución en toda la cuenca amazónica (SALVADOR, 1997).

2.1.2. Propiedades medicinales de la guayaba

Tanto a las hojas, como a la corteza de *P. guajava* le son atribuidas propiedades antibacterianas, antieméticas, antiinflamatorias, antihelmínticas, antisépticas, antitusivas, astringentes, carminativas, espasmolíticas y tónicas. El fruto también posee propiedades desinflamantes (LOPEZ, 2009).

ECHEMENDIA y MORRON (2004), indican que los compuestos químicos aislados de la hoja de guayaba, son: un triterpenoide pentacíclico, el ácido psidiólico que tiene actividad antiprotozoárica, ácido guajanoico; así como, B-sitosterol, uvaol, ácido oleanólico y ácido ursólico. Además, taninos (hojas 9 a 10%, corteza 12 al 30%), polifenoles, carotenoides, vitamina C, compuestos volátiles y aromáticos, terpenos, glucósidos esteroidales, antraquinonas y flavonoides.

VELASQUEZ (2008), menciona que la actividad antibacteriana se establece a los flavonoides (avicularina, guayaverina y quercetina). En varias especies los flavonoides varían sustancialmente entre genotipos, cambios estacionales, edades y daños de la hoja y sitios de ubicación (kause *et al.*, 1999; keinanen *et al.*, Laitenen *et al.*, 2000, citado por VARGAS, 2006). Las diferentes fuentes de flavonoides son de origen vegetal y se encuentran principalmente en las hojas (Seshadri y Vasishta, 1965; Lozoya *et al.*, 1994; Meian y Mohamed, 2001, citado por VARGAS, 2006). Los flavonoides están

presentes también en partes anatómicas como corteza (Ross, 1999, citado por VARGAS, 2006), yemas florales (Harborne, 1984, citado por VARGAS, 2006).

2.1.3. Farmacología y Farmacognosia

En los diferentes estudios efectuados, se ha demostrado que la tintura de hojas es activa contra *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Pseudomona aeruginosa*. Se describe que la tintura inhibe en un 80% las cepas de *E. coli*, *S. thypi*, *S. dysenteriae* y *S. pyogenes*; y que el mejor disolvente es el etanol, siendo la concentración mínima inhibitoria (CIM): 5 mg/ml para *S. typhi* y *S. aureus* (Cáceres et al., 1993, citado por LOPEZ, 2009). Además, el extracto acuoso de la raíz y hojas actúan como antibacterianos. La actividad antibacteriana es atribuida a los flavonoides como la avicularina, guayaverina y quercetina (Cáceres 1996, citado por LOPEZ, 2009).

RODRIGUEZ, MARTINEZ y MORRON (1999), afirman que la tintura de hoja de *Psidium guajava* L., inhibe el 80% de las cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella thypi*. La *Escherichia coli* contra un extracto salino se ha probado que tiene actividad antimicrobiana (Napralert Illinos, USA, 1990, citado por MARTINEZ; MOLINA y BOUCOURT, 1997).

ECHEMENDIA y MORRON (2004), sostienen que las partes a utilizar son: hojas, frutos y cortezas secas. En las hojas y corteza está presente

la quercetina que tienen acción antisecretoria de acetilcolina en intestino. Es efectiva en el tratamiento de diarrea por su contenido de taninos y su actividad astringente. Los flavonoides presentes en las hojas, tienen un efecto anti diarreico. Entre sus componentes químicos se encuentra la vitamina C2 que es muy abundante en los frutos, en las hojas hay flavonoides como quercetina, avicularina y guayaverina a los que se les atribuye el efecto antimicrobiano (LUTTERODIT, 1992).

PEREZ (2005), manifiesta que la guayaba tiene flavonoides y taninos. Uno de los principales metabólicos secundarios más importantes en los flavonoides es la quercetina presente en hojas y corteza por lo que, esta es la que le da el efecto antimicrobiano contra varias bacterias.

MARTÍNEZ *et al.* (1997), reportan una investigación sobre la actividad antimicrobiana de un extracto fluido al 40 % de *Psidium guajava* L., donde encontró que presenta actividad antimicrobiana por debajo del 50 % respecto al control positivo frente a las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*. Este extracto carece de actividad antifúngica frente a la levadura *Candida albicans*.

Los flavonoides son estructuras fenólicas que contienen un solo grupo carbonilo. Estos compuestos son sintetizados por las plantas en respuesta a la infección antimicrobiana, y su actividad sobre las bacterias probablemente se deba a su capacidad de generar complejos con proteínas

extracelulares y proteínas solubles, así como una actividad sobre la pared celular muy similar a la de las quinonas las mismas que actúan generando complejos irreversibles con aminoácidos nucleofílicos de las proteínas, provocando su inactivación. Además de actuar sobre las adhesinas expuestas en la superficie de las bacterias, sobre los polipéptidos de la pared celular y sobre las enzimas unidas a membranas (Fuertes y col., 1997, y Cowan, 1999; citado por ARAUJO y SALAS, 2008).

2.2. Generalidades sobre la mastitis

La mastitis, es la respuesta inflamatoria de la glándula mamaria normalmente causada por bacterias (KERR y WELLNITZ, 2003; BANNERMAN *et al.*, 2004; HANSEN *et al.*, 2004; HILLERTON y BERRY, 2005). Es probablemente la más costosa de las enfermedades infecciosas endémicas que afecta a las vacas y otras especies lecheras. Su impacto es en la producción animal, bienestar animal y la calidad de la leche producida (HILLERTON y BERRY, 2005).

La mastitis es una inflamación de las glándulas mamarias. En un trabajo realizado por (MURRIETA, 2002) en el ámbito Tingo María-Aucayacú encontró un 22.90% de prevalencia de esta afección, siendo los agentes etiológicos *Escherichia coli* y menor presencia *Staphylococcus aureus*.

2.3. Agentes etiológicos de la mastitis en vacas

La mastitis ha sido reconocida desde que el hombre domesticó la vaca (PHILPOT, 1996). Se estima que un tercio de todas las vacas lecheras están afectadas por cualquier forma de mastitis en uno o más cuartos.

La mastitis puede ser causada por al menos 135 agentes diferentes, principalmente bacterias, las cuales pueden ser patógenas o de origen ambiental (Lammers *et al.*, 2001; Barbosa *et al.*, 2007, citado por FERNANDEZ *et al.*, 2008). Entre las bacterias que con mayor frecuencia causan esta infección se encuentran *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli* (Bradley 2002, citado por FERNANDEZ *et al.*, 2008).

Como factores ambientales determinantes se encuentran: la ubicación del ganado (estabulado o en pastura); la ausencia del control de moscas, hacinamiento, malas prácticas de ordeño, estación climática caliente y malas condiciones de mantenimiento (Oliver *et al.*, 2005, citado por FERNANDEZ *et al.*, 2008).

2.4. Patogenia de la mastitis

La mastitis se inicia con la aparición de tres fases: invasión, infección e inflamación. En la fase de invasión los microorganismos pasan del exterior de la ubre a la leche que se encuentra en el conducto glandular y ascinos de la glándula. En la etapa de infección se da cuando los gérmenes se multiplican rápidamente e invaden el tejido mamario. Después de la invasión puede formarse una población bacteriana en el conducto glandular y, utilizando esta resistencia como base, ocurrirá una serie de multiplicaciones y diseminaciones en el tejido mamario dependiendo de la infección del mismo de la susceptibilidad del animal. Esta a su vez produce inflamación, fase en la cual aparece la mastitis clínica y en que aumenta notablemente la cuenta de leucocitos en la leche ordeñada (BLOOD, 1992).

2.5. Mastitis sub clínica

La infección puede provocar inflamación de uno, o más cuartos o de toda la glándula, aumento de la temperatura en el área afectada, así como enrojecimiento de la zona y dolor, estos eventos provocan que el sistema inmune del animal actúe tratando de aliviar el problema, además de lograr la mayoría de las veces mantener la infección únicamente en el área afectada sin alterar otros órganos o sistemas del animal (PÉREZ *et al.*, 2005).

VALERA *et al.* (2001), en el trabajo de investigación sobre terapia homeopática de mastitis sub clínica bovina concluye que la terapia homeopática constituye un método terapéutico de fácil aplicación, eficaz y económico que no interfiere en la calidad de la producción de derivados lácteos por no acumularse ni excretarse en la leche y tiene mejor efectividad.

2.6. Diagnóstico de mastitis sub clínica

Existen varios métodos para diagnosticar la mastitis sub clínica en vacunos; a continuación se describe los métodos utilizados en la ejecución del presente trabajo de investigación:

2.6.1. Método de california mastitis test – CMT

Según MELLENERGER (2000), se debe realizar los siguientes pasos:

Paso 1: Tomar una muestra del segundo chorro de leche ordeñada (aproximadamente 5cc) de cada cuarto de la ubre. La leche muestreada quedará en la paleta de muestreo que es mantenida en forma casi vertical.

Paso 2: Se vierte la solución de CMT en cada espacio de la paleta, en igual cantidad a la leche muestreada.

Paso 3: Se hace movimientos circulares de la paleta por tiempo de 10 segundos, con el fin de mezclar bien los contenidos.

Paso 4: Se “lee” los resultados en forma rápida. La reacción desaparece a los 20 segundos y es calificada visualmente según la siguiente escala:

- Reacción negativa: La mezcla de leche con el líquido del test conserva su fluidez y no muestra alteraciones visibles.
- Reacción positiva (+): La muestra se vuelve estriosa.
- Reacción positiva media (++) : Mezcla bastante mucilaginosa (movimiento lento de la mezcla).
- Reacción positiva alta (+++) : La mezcla parece muy mucilaginosa y gelatinosa, no fluye ligeramente y se forman grumos.

2.6.2. Conteo de Células Somáticas – CCS

El término células somáticas o Conteo de Células Somáticas –CCS indica una concentración de leucocitos muertos (95%) y células epiteliales exfoliadas del epitelio mamario (5%) en un mililitro de leche (Monardes y Barria 1995; Boutinaud *et al.*, 2002 citado por CHACON *et al.*, 2006). Se estima que el 98% de las células somáticas que se encuentran en un momento dado en la leche, se generaron en respuesta a una invasión bacteriana (Wattiaux, 2005, citado por CHACON *et al.*, 2006).

Las glándulas mamarias que nunca se han infectado normalmente tienen un conteo entre 20,000 a 50,000 células somáticas/ml. En grandes

poblaciones de vacas, 80% de los animales no infectados tendrán un Conteo de Células Somáticas (CCS) menor de 200,000 células/ml y 50% menor de 100,000 células/ml. Una razón de las cuentas ligeramente elevadas en animales no infectados es que algunos cuartos tuvieron una infección previa de la cual no se han recuperado totalmente. Un conteo de células somáticas mayor de 200,000 células/ml indica la presencia de mastitis sub clínicas. Los conteos de células somáticas por debajo de 400,000 células/ml son típicos de los hatos que poseen buenas prácticas de manejo, pero que no hacen un particular énfasis en el control de la mastitis (REYES y CEDEÑO, 2008).

Un alto CCS en la leche inmediatamente después del ordeño es un indicador de que la vaca está infectada con mastitis, lo que conlleva a pérdidas en producción, modificaciones bioquímicas en la leche, hasta efectuar un descarte voluntario de los animales (el riesgo de descarte de la leche aumenta en un 50% a media que se mantienen CCS en alrededor de 500.000 por ml). Las ubres sanas por lo general presentan valores de CCS por debajo de las 200.000 por mililitro, valor que es a la vez el apropiado para generar productos lácteos con buen sabor, alta durabilidad y adecuado rendimiento. Cuando la leche alcanza valores superiores a las 450.000 células/ml se considera esto como suficiente criterio para el rechazo de la leche para un proceso industrial (CHACON *et al.*, 2006).

REYES y CEDEÑO (2008), indican que el conteo de células somáticas, es el número de células existentes en leche. Se utiliza como

indicador de la infección de la glándula mamaria. La infección intramamaria es el principal factor causante de cambios en el CCS en la leche. Cuando los microorganismos causantes de mastitis invaden un cuarto de la ubre y empiezan a multiplicarse o cuando el número de estos aumenta significativamente en un cuarto infectado, el organismo de la vaca tiene que reclutar leucocitos para combatir a dichos microorganismos causantes de la mastitis. Más del 98% de las células somáticas que se encuentran en la leche provienen de las células blancas que ingresan a la misma en respuesta a la invasión bacteriana de la ubre.

Si el conteo de células somáticas es alto (mayor de 500.000 por ml) cuando los microorganismos de *Escherichia coli* entran a la ubre, y si hay rápido movimiento de glóbulos blancos en la ubre como respuesta a dicha invasión, las posibilidades para que ésta se elimine son buenas. Sin embargo, la leche de bajo conteo somático puede ofrecer un ambiente propicio al crecimiento y establecimiento de *Escherichia coli*. Una de las funciones de las células somáticas es la de atacar y destruir microorganismos (RUANO, 2007).

Las células somáticas son una expresión del grado de inflamación que presenta la glándula mamaria como consecuencia de la agresión de patógenos u otros factores de índole traumático, generalmente derivados de un defectuoso manejo del ordeño, inapropiadas instalaciones y mal manejo; las células somáticas son principalmente leucocitos y células descamativas de los epitelios secretores y conductos de la glándula. La influencia de las células somáticas sobre la producción en volumen de la leche y también sobre la

composición de la secreción láctea concentra la atención de la investigación en el último tiempo (PEDRAZA *et al.*, 2000).

CUBERLO (2007), comenta que los CCS aumentan con la edad del animal y la etapa de la lactancia y la leche de cuartos no infectados exhibe aumentos en los CCS según aumenta el número de lactancias. También demostró que los CCS de leche de cuartos no infectados aumentaron de 83,000 a los 35 días post parto a 160,000 a los 285 días. En cambio, los CCS de leche en cuartos infectados con *S. aureus* aumentaron de 234,000 a 1,000,000 células/ml en el mismo período. Todos los cuartos, sin importar el estado de infección, presentaron CCS elevados inmediatamente después del parto.

La privación de alimento y agua a las vacas ocasiona disminuciones dramáticas en la producción de leche y aumentos proporcionales en los CCS. Existen variaciones del contenido de células somáticas asociadas con los meses y estaciones del año. En climas templados, los CCS son generalmente menores en el invierno y mayores durante el verano, lo cual coincide con el aumento en la incidencia de mastitis clínica durante los meses de verano (CUBERLO, 2007).

Una observación común es que el CCS se incrementa con el avance de la edad y el estadio de la lactancia. Sin embargo en estudios de estos dos grupos se separaron las vacas sanas y por estado de infección comprobándose que las vacas sanas tenían CCS por debajo de las 200.000

por ml. La privación de agua resultó en una dramática disminución de la producción y proporcional incremento en el CCS. Esto tiende a explicarse por efecto de dilución así también el efecto del estrés en vacas sanas es casi nulo, en cambio el efecto del estrés en vacas infectadas en combinación con ejercicio extremo (caminar mucho) o condiciones de estrés agrava más la inflamación de las vacas afectadas (SEVERIN, 2008).

SALINAS y RIVERA (2006), mencionan que existen varios factores que podrían afectar el número total de células somáticas en la leche, como son la edad de la vaca, los días en leche, stress, variaciones diurnas, así como variaciones de temporada, frecuencia de ordeño y por supuesto la mastitis es el factor más importante en la elevación de los conteos de células somáticas.

2.7. Tratamiento de la mastitis

2.7.1 Tratamiento no convencional

PAREDES (sa) en un estudio usando plasma marino, propóleos y chichipince (*Hamelia patens*) para el tratamiento alternativo en el control de la mastitis clínica bovina; buscando el menor costo, fácil aplicación y rápido retorno económico para las empresas ganaderas. Los resultados obtenidos indican 70% de animales curados con plasma marino; con *Hamelia patens* 100% y con propóleos 100%. Así mismo pudo determinar que estos recursos naturales son más baratos que los antibióticos, lo que se traduce en una mayor

ganancia para las ganaderías, reduciendo las pérdidas en lo que a producción se refiere y alargando la vida productiva de la glándula y de la vaca.

MORALEDA (2005) con el objetivo de determinar el porcentaje de reducción de células somáticas en muestras de leche de vacas con mastitis por efecto de la aplicación tópica de solución de miel al 30%, estableció que el uso de dipping con miel al 30% (p/p), aplicada diariamente sobre los pezones de vacas, reduce significativamente el recuento de células somáticas en leche proveniente de vacas con mastitis, al ser aplicada durante tiempo prolongado.

PEREZ et al. (2007), con el objetivo de evaluar el uso del extracto acuoso de la hoja del neem (*Azadiractha indica* A. Juss) sobre *S. aureus* y otros *Staphylococcus* causantes de mastitis sub clínica bovina, los resultados obtenidos en 30 cepas de *S. aureus*, 16 presentaron halos de inhibición entre 2 y 18 mm de diámetro de inhibición y de las 17 cepas de otros *Staphylococcus*, siete solamente presentaron halos de inhibición entre 2 y 8 mm. Estos resultados indican la importancia que tiene el extracto como sustancia inhibitoria para *S. aureus* y otros *Staphylococcus*, el cual puede ser recomendado como una alternativa junto al antibiótico en la medicina veterinaria para el control de la enfermedad.

2.7.2. Tratamiento convencional

En opinión de Ruíz *et al.* (2001), citado por MORALEDA (2005) la identificación de la bacteria que causa la mastitis en las vacas y los patrones de su susceptibilidad antibiótica son necesarios para elegir un antibiótico apropiado para el tratamiento. Es prudente además, monitorear periódicamente las bacterias aisladas de mastitis bovina en cuanto al patrón y rango de susceptibilidad a los distintos antibióticos. El mismo autor señala, que las variaciones en la susceptibilidad de las bacterias están relacionadas con las medidas terapéuticas y el uso frecuente de determinados antibióticos en zonas geográficas definidas.

Algunos autores han sugerido el uso de preparaciones con combinación de 2 o 3 antibióticos para su administración intramamaria en el tratamiento de la mastitis; se fundamenta en que su acción sinérgica podría cubrir a todos los patógenos, incluidas las bacterias gram negativas. Al respecto, este autor señala que no hay evidencias suficientes que demuestren que ello sea eficaz para tratar las mastitis por coliformes y, por otra parte, esta acción sinérgica nunca ha podido ser demostrada *in vivo* (Pyörälä 2002, citado por MORALEDA, 2005).

SCARAMELLI *et al.* (2005), el tratamiento de los casos sub clínicos está indicado sólo cuando el agente causal es *Streptococcus agalactiae* o cuando el CCS en leche de tanque es tan elevado que

compromete la comercialización de la leche. La terapia en lactancia produce una tasa de cura de 90 a 95% cuando el agente es *S. agalactiae*. La terapia en lactancia para tratar infecciones sub clínicas causadas por agentes distintos a *S. agalactiae* no se recomienda pues la tasa de cura es frecuentemente inferior a 10% y rara vez es mayor al 50%. Las pruebas experimentales sobre tratamientos alternativos al uso de antibióticos, incluyendo oxitocina, probióticos y preparados homeopáticos, revelan poca o ninguna efectividad. Se han ensayado terapias combinadas (amoxicilina intramamaria y penicilina G parenteral) y el uso combinado de antibióticos y vacunas contra *S. aureus* con resultados variables.

2.8. Causas que predisponen que falle el tratamiento de la mastitis

2.8.1 Falta de antibiótico en el sitio de infección

Esto puede suceder cuando el tratamiento se hace vía intramamaria, porque los conductos galactóforos están obstruidos por coágulos de leche, descamaciones celulares o por la presión ejercida durante el proceso inflamatorio, o cuando el antibiótico no cuenta con el vehículo apropiado para lograr una buena difusión en todo el cuarto, especialmente hacia el tejido infectado, porque alrededor del sitio de infección se forman abscesos, fibrosis o tejido cicatrizal, lo cual no permite el contacto del antibiótico con los microorganismos. Esto sucede con frecuencia en mastitis causadas por *Staphylococcus aureus*. Otra causa es que las concentraciones de antibiótico en los tejidos infectados no alcanzan el nivel mínimo efectivo para matar a los

microorganismos. Esto sucede cuando se aplican dosis insuficientes o se dan tratamientos por períodos muy cortos. Porque el antibiótico administrado por vía sistémica no pasa de la sangre a la leche debido a sus características farmacocinéticas (IÑIGUEZ, 2010).

2.8.2 Lesiones físicas

El esfínter del pezón representa la primera línea de defensa contra cualquier infección. El interior del canal del pezón está compuesto por un tejido muscular que sirve como "válvula" para mantener el canal del pezón cerrado; así se previene el flujo de la leche hacia el exterior y la entrada de bacterias hacia el interior de la ubre. Las células que componen el interior del canal del pezón producen una sustancia llamada "queratina". La queratina está compuesta por un material fibroso proteico y ácidos grasos que en conjunto poseen un fuerte poder antibacterial (LOOR *et al.*, 2000).

La queratina es una barrera efectiva contra el ingreso de bacterias en la ubre, por lo que cualquier trauma que recibiera el pezón también puede afectar su grado de susceptibilidad hacia invasiones bacterianas, colonización, y eventualmente infecciones. Los traumas físicos pueden llegar a destruir la queratina. Una vez que el trauma ha ocurrido, el esfínter del pezón puede permanecer abierto. La inserción de cánulas para el chequeo de mastitis dentro del pezón puede contribuir a causar trauma (LOOR *et al.*, 2000).

ALDERETE (2009), menciona que cuando se introduce un elemento a través del esfínter se está incrementando sensiblemente el riesgo de infección y, si además se daña la capa interna de queratina que tapiza el canal, los microorganismos encuentran una puerta de entrada más apropiada para invadir el tejido glandular mamario. Si la cánula de un inyector intramamario se introduce más de 2 cm, o si la maniobra se hace con violencia, se daña la queratina y por más que se esté colocando un antibiótico, la carga bacteriana que es capaz de ingresar al cuarto mamario es muy alta y la infección muy probable. Esto es especialmente importante a tener en cuenta cuando se realizan los tratamientos al secado, ya que la vaca no volverá a ser ordeñada y, por lo tanto, la ubre no será liberada de bacterias y toxinas.

Los procedimientos para administrar el tratamiento a vacas con mastitis son críticos para obtener resultados deseados. Lo más importante es que la punta del pezón debe desinfectarse antes de la infusión para minimizar el número de bacterias presentes en el orificio del pezón. La queratina puede ser forzada contra la pared interior del pezón por la cánula, creando una apertura mayor de la normal. La jeringa puede también empujar microorganismos colonizados en la cisterna del pezón e inducir infecciones. Cuando la cánula se inserta por el orificio "desinfectado" (proceso que no elimina el 100% de la bacterias) los microorganismos sobrevivientes pueden ser llevados junto con ésta y entrar a la cisterna. Si los microorganismos que ganan el acceso a la cisterna por estas rutas son resistentes o inaccesibles a la droga inyectada, se puede producir una nueva infección. Los estudios

diseñados para comparar la inserción completa y la parcial de sólo 2 a 3 cm de la punta de la cánula, han demostrado que la mastitis al momento del parto se reduce marcadamente al emplear la inserción parcial (RUANO, 2007).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar y fecha de ejecución del trabajo

El trabajo se realizó en dos establos lecheros ubicadas en el distrito de Padre Felipe Luyando (Naranjillo), carretera marginal a 5 km al sur de la ciudad de Tingo María, provincia de Leoncio Prado, Región de Huánuco, que geográficamente se encuentra ubicado a 75° 59' 30" longitud oeste, 09° 14' 00" latitud sur, a una altitud de 700 m.s.n.m. con una temperatura promedio anual de 23,6 °C y una humedad relativa de 83,6%; ecológicamente se encuentra ubicado en la zona de vida bosque muy húmedo – pre montano subtropical, (UNAS, 2009).

El extracto etanólico de hoja de guayaba, (EEHG) se preparó en el laboratorio de la Facultad de Industrias Alimentarias; el cultivo de micro organismos y conteo de células somáticas se efectuó en el laboratorio de Sanidad Animal de la Facultad de Zootecnia, ambos laboratorios pertenecen y se ubican en la Universidad Nacional Agraria de la Selva (UNAS).

El trabajo tuvo una duración tres meses; entre junio a agosto del 2010.

3.2. Tipo de investigación

La investigación es de tipo experimental.

3.3. Población de vacunos y muestra

Universo: Se considera todas las vacas de tres establos lecheros del distrito de Naranjillo.

Muestra: Se seleccionaron 15 vacunos de tres establos lecheros, en su mayoría de raza cruzados, con un mayor porcentaje de sangre Brown swiss, del distrito de Naranjillo se seleccionó cuartos infectadas con mastitis sub clínica, teniendo un total de cinco vacunos por establo, de las cuales se colectó un total de 29 cuartos infectados que fueron evaluados.

3.4. Instalaciones

El sistema de explotación de los establos donde se realizó el experimento, se caracteriza por ejecutar el manejo semi estabuladas; existe predominancia de pasto natural (*Paspalum conjugatum*) en todos los potreros, cuentan con bebederos, comederos. El ordeño es manual y una vez por día.

3.5. Metodología de estudio

3.5.1. Obtención del extracto etanólico de la hoja de guayaba

Se colectó 12.0 k de hojas frescas de guayaba (*Psidium guajava* L.), en la periferia de la ciudad de Tingo María en horas de la mañana. Las hojas fueron fisiológicamente maduras, seleccionadas por su ubicación en la rama las más cercanas al tallo, por su coloración verde oscura, por su sanidad fisiológica e integridad de la hoja.

Estas hojas fueron secadas en una estufa a 48 - 55°C por un período de 48 horas, luego se puso en maceración las hojas en etanol puro de 96° en proporción de 1:3 respectivamente, por un periodo de 7 días, en un envase con sello hermético, homogenizando diariamente; luego se separó las hojas del extracto usando gasa médica y la fracción líquida sobrante (extracto) fue filtrado en papel filtro tipo sábana y sometido a evaporación del etanol bajo presión reducida en un rotavapor. El producto obtenido fue guardado en envase de vidrio y almacenado a temperatura ambiente.

3.5.2. Preparación de diluciones

Se preparó el total de las diluciones al 25 y 50 % de EEHG para todo el experimento, estimando 5 ml de dosis para ser aplicado durante los 7 días de estudio en cada cuarto afectado con mastitis sub clínica. Se colocó

175 y 350 g de EEHG, cada cantidad en un matraz y se enrazó con agua destilada hasta 700 ml, luego se homogenizó y centrifugó las soluciones a 6000 rpm por un período de 2 minutos, quedando preparado las soluciones a 25 y 50% de concentración respectivamente.

3.6. Identificación de vacas infectadas con mastitis sub clínica

La identificación de las vacas con mastitis sub clínica sometidas al presente estudio fue siguiendo el método cualitativo de CMT descrito por (MELLEMBERGER, 2000); esta evaluación se realizó al momento del ordeño, a las 6.00 am, usando el segundo chorro de leche fresca de cada cuarto de la ubre. Se identificó y seleccionó vacas con mastitis sub clínica, de acuerdo al grado de infestación en: Sospechoso (+/-), afectada (+, ++, +++) a las cuales se inyectó el extracto de acuerdo al tratamiento que correspondían.

3.7. Toma de muestras de leche y aplicación del extracto

Las muestras de leche se colectó los días 0, 3 y 7 (ver Figura 1) en tubos de ensayo previamente esterilizados y rotulados, que fueron condicionados en una caja térmica para su traslado hacia el laboratorio de sanidad de la facultad de zootecnia de la UNAS en un periodo no mayor de una hora, para realizar las evaluaciones pertinentes.

La aplicación del extracto de hoja de guayaba se hizo a las 6 am. luego del ordeño, durante 7 días consecutivos, se inyectó 5 ml en cada uno de los cuartos mamarios infectados usando un catéter mamario adaptado a jeringa.

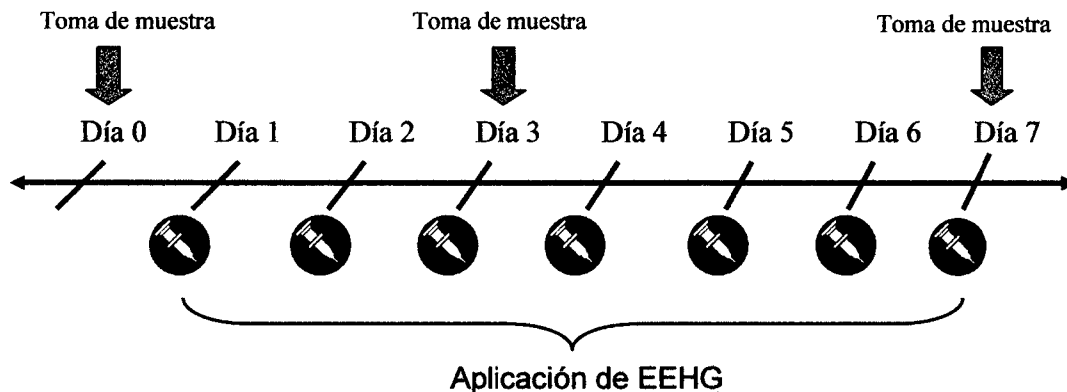


Figura 1. Toma de muestras de leche y aplicación del extracto.

3.8. Siembra de microorganismos e Identificación de las bacterias presentes en la leche con mastitis sub clínica

La siembra de leche infectada para identificar los microorganismos patógenos se realizó siguiendo el método descrito por (MENDO, 1995) que consiste en acondicionar el microorganismo a un medio de cultivo fértil, de acuerdo a sus exigencias vitales, para que en condiciones óptimas de temperatura y tiempo de incubación, pueda desarrollar y multiplicarse IN VITRO.

La identificación de las bacterias se realizó observando la presencia o ausencia de las mismas según el agar específico utilizado: agar macConkey para *Escherichia coli*; agar sangre al 5% para *Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus aureus*.

3.9. Conteo de células somáticas (CCS)

El CCS se realizó para determinar el grado de inflamación que presenta la glándula mamaria como consecuencia de la agresión de patógenos ó de un mal manejo del ordeño, inapropiadas instalaciones, etc. Se realizó siguiendo la técnica que se usa en el Laboratorio de Sanidad Animal de la UNAS y tiene los siguientes pasos:

Se coloca 10 µl de leche fresca infectada en un portaobjeto acondicionado con marcas de 1 cm², se hace un frotis y esperar que seque por un período de 10 minutos, reposar el portaobjeto que contiene la muestra, por 10 minutos en una solución de xilol-alcohol, retirar y dejar secar, adicionar una gota de azul de metileno y esperar 2 minutos; luego lavar la muestra y dejar secar, contar las células con el uso de un microscopio.

Número total de células somáticas por ml de leche (TCS/ml) = $K \times A \times B$;

Donde:

K = Constante lograda del número de campos microscópicos de 1cm^2 (1600 campos microscópicos).

A = Promedio de células contadas en 10 filamentos de leche infectada que se colocó en la lámina portaobjeto.

B = 100 para llevar a ml.

3.10. Variable independiente

- Extracto etanólico de hoja de guayaba.

3.11. Tratamientos

Consistió en la aplicación de diferentes concentraciones de extracto etanólico de hoja de guayaba (EEHG) en los cuartos con mastitis subclínica de ubres de vacunos.

Tratamiento control: Sin EEHG (T1)

Tratamiento 2: Solución al 25 % de EEHG (T2)

Tratamiento 3: Solución al 50% de EEHG (T3)

3.12. Croquis de distribución de los tratamientos

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
T ₁ =Control	C1	C2	C3	C4	C5
T ₂ =25%	T ₂ R ₁	T ₂ R ₂	T ₂ R ₃	T ₂ R ₄	T ₂ R ₅
T ₃ =50%	T ₃ R ₁	T ₃ R ₂	T ₃ R ₃	T ₃ R ₄	T ₃ R ₅

3.13. Diseño estadístico

Se utilizó estadística descriptiva para la caracterización de las variables en estudio. Para la variable mortalidad de las bacterias se utilizó la prueba de significancia bajo el modelo de distribución chi-cuadrado, al 5% de nivel de significancia. Para la variable conteo de células somáticas, se utilizó el Diseño complementado al azar (DCA), luego de transformar la variable para justificar su distribución normal. La transformación realizada fue la logarítmica base 10.

Modelo aditivo lineal:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

Donde: Y_{ij} = Conteo de célula somática de la i -ésima concentración de extracto de guayaba, en el j -ésimo cuarto evaluado

μ = Media poblacional

T_i = Efecto de la i -ésima concentración de extracto de guayaba

e_{ij} = Error experimental

3.14. Variable dependiente

3.14.1 Presencia de microorganismos en la leche

- Presencia de bacterias

Se determinó sembrando leche infectada proveniente de cuartos con mastitis sub clínica a los que se aplicó la solución de EEHG.

- Cantidad de células somáticas

Se contabilizó las células muertas en las muestras de leche infectada de cuartos que se aplicó EEHG.

3.14.2. Costo por dosis de EEHG y por tratamiento

Se tomó como referencia todos los gastos hechos para la obtención del extracto etanólico de la hoja de guayaba y la cantidad de producto que se usó por dosis aplicada en cada cuarto infectado.

IV. RESULTADOS

4.1. Presencia de microorganismos en la leche

Cuadro 1: Crecimiento de bacterias, in vitro, a partir de muestras de leche infectada de vacas tratadas con extracto etanólico de hoja de *Psidium guajava* L. evaluadas en tres períodos.

Día de evaluación		Número de placas petri con leche de cuartos infectados que muestran crecimiento bacteriano					
Día 0	N	Positivo		Negativo		Total	
		Número	%	Número	%	Número	%
Grupo 1 (T1 = control)	13	9	69	4	31	13	100
Grupo 2 (T2 = 25%)	7	3	43	4	57	7	100
Grupo 3 (T3 = 50%)	9	0	0	9	100	9	100
*p-valor= 0.0052							
Día 3							
T1 = control	13	9	69	4	31	13	100
T2 = 25%	7	3	43	4	57	7	100
T3 = 50%	9	8	89	1	11	9	100
*p-valor= 0.1424							
Día 7							
T1 = Control	13	9	69	4	31	13	100
T2 = 25%	7	4	57	3	43	7	100
T3 = 50%	9	9	100	0	0	9	100
*p-valor= 0.1046							

*Evaluación estadística utilizando tablas de contingencia con chi-cuadrado ($P \leq 0.05$)
 N= Número de muestras

El Cuadro 1 muestra los resultados de las evaluaciones del día 0, 3 y 7, para determinar la cantidad de cuartos infectados por agentes etiológicos de la mastitis como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*, mediante el método de siembra en su agar específico.

El día Cero, las muestras de leche colectada del grupo 1 y 2 se observa crecimiento bacteriano en un 69% y 43% de muestras respectivamente lográndose identificar solamente (*S. aureus*); mientras que el grupo 3 no hubo crecimiento alguno de bacterias específicas en el agar en las que se realizó el cultivo. Existe diferencia estadística (p -valor=0.0052) entre el número de casos positivos y negativos en relación a los grupos evaluados. Al tercer día de aplicación del EEHG se encontró que no existe diferencia significativa (p -valor=0.1424) entre el número de casos positivos y negativos en relación a los tratamientos; se observa que el T1 y T2 mantienen iguales valores a los encontrados en el día 0, que se observó solo (*S. aureus*); sin embargo en el T3 aumenta a un 89 % en las placas petri mostrando crecimiento bacteriano identificándose (*S. aureus*, *S. agalactiae* y *Escherichia coli*). Al séptimo día de aplicación no se encontró diferencia significativa (p -valor=0.1046) entre el número de casos positivos y negativos en relación a los tratamientos. Para el T1 tanto en el día 0, 3 y 7 se mantienen igual el % de placas petri positivas al microorganismo presente (*S. aureus*); mientras que para el T2 y T3 existe un aumento del % de placas petri positivas, estando presente en el T2 *S. aureus*, y en el T3 (*S. aureus*, *S. agalactiae* y *Escherichia coli*).

4.2. Cantidad de células somáticas en leche infectada

Cuadro 2: Número de células somáticas en muestras de leche infectada, de vacas tratadas con extracto de *Psidium guajava* L., evaluados en tres períodos.

Tratamientos	N	Número De Células Somáticas		
		Conteo Inicial (DÍA 0)	Conteo Intermedio (DÍA 3)	Conteo Final (DÍA 7)
T1 (0%)	13	1949844.6 ± 2.74 a	2630268.0 ± 2.5 a	3235936.6 ± 2.5 a
T2 (25%)	7	870963.6 ± 3.0 a	1148153.6 ± 2.9 a	1348962.9 ± 2.8 a
T3 (50%)	9	724436.0 ± 2.5 a	1348962.9 ± 2.1 a	2137962.1 ± 2.1 a
p-valor		0.0606 ns	0.1106 ns	0.133 ns
CV		7.09	6.38	6.18

Letras distintas en cada columna indican diferencia significativa, según prueba de Tukey ($p < 0.05$)
 ns= No significancia
 N = Número de muestras

En el Cuadro 2 se puede observar que no existe diferencia significativa entre tratamientos (p -valor=0.05), siendo el T1 el que muestra mayor número de células somáticas; así mismo, este cuadro muestra el incremento del número de células somáticas a medida que aumenta los días que se aplicó el EEHG.

4.3. Costo total de producción del EEHG y por dosis de aplicación

Cuadro 3: Costo de producción de 700 ml de extracto etanólico de hoja de guayaba.

Materiales	Unidad	Cantidad	Total S/.
Hoja de Guayaba	k	12	120.00
Etanol	L	24	144.00
Papel filtro	pliego	2	5.00
Agua destilada	ml	875	3.50
Uso de equipos	--	--	17.50
Mano de obra	horas	8	40.00
TOTAL			330.00

Cuadro 4: Estimación del costo de aplicar extracto etanólico de hoja de guayaba, en cuartos de vacas infectadas con mastitis sub clínica.

Tratamientos	Nº cuartos aplicados	Total de dosis utilizada	Cantidad aplicada/dosis ml	Cantidad de ml utilizados	Costo unitario S/.	S/. Total por cuartos aplicados
T2=25% de EEHG	7	49	5	245	0.24	58.80
T3=50% de EEHG	9	63	5	315	0.47	148.05

El Cuadro 3 presenta los costos de preparar las soluciones de EEHG usadas en este experimento, considerando que se preparó 700 ml; el costo por ml es S/.0.47. El Cuadro 4 se puede ver el costo por dosis (5 ml) y costo total por aplicar a cada cuarto infectado con mastitis sub clínica durante

siete días el extracto etanólico de hoja de guayaba. Se puede apreciar que el costo incrementa por el aumento de concentración del EEHG en la solución que se aplicó.

V. DISCUSIÓN

5.1. Presencia de microorganismos en la leche

En el Cuadro 1 se observa que no existe efectividad antibacteriana del EEHG en ninguno de los tratamientos; por el contrario, a medida que aumentaba los días que se aplicó el EEHG, la presencia de microorganismos en los cuartos infectados se incrementaba en relación a la evaluación del día 0, lo que se expresa en un mayor número de placas petri que dan positivo a la prueba. Estos resultados no concuerdan con lo reportado por (DURAND, 2009) quien en un estudio in vitro concluyó que el extracto etanólico de hoja de guayaba tiene efectividad antibacteriana de un 83% frente a *Streptococcus agalactiae* y de 53% para *Staphylococcus aureus*. Bajo condiciones in vivo, las vacas responden implementando mecanismos de reacción que pueden atenuar la actividad de los productos que se inyectan en la ubre. Así mismo, los resultados logrados en este experimento no concuerda con lo reportado con (MARTÍNEZ *et al.*, 1997) y (LÓPEZ, 2009) quienes atribuyen actividad antibacteriana al extracto de guayaba, por sus compuestos flavonoides, que también lo menciona (VELÁSQUEZ, 2008; LUTTERODIT, 1992; PEREZ, 2005 y ECHEMENDIA y MORRON, 2004). Es probable que el contenido de estos compuestos activos en el EEHG utilizado en este experimento no haya sido

suficiente para contrarrestar la presencia de las bacterias que generalmente producen mastitis sub clínica; así mismo puede ser que estos compuestos sean poco estables en el extracto concentrado haciéndole perder su capacidad bactericida.

No se descarta que la falta de efectividad del extracto etanólico de guayaba probablemente sea por la aplicación intramamaria, el extracto no llegó a tener contacto directo con las bacterias o la dispersión no fue suficiente como lo sostiene (IÑIGUEZ, 2010), al indicar que el tratamiento falla, porque el antibiótico no llega al sitio de infección debido a la obstrucción de los conductos galactóforos por coágulos de leche, descamaciones celulares, el antibiótico no cuenta con el vehículo apropiado para lograr una buena difusión en todo el cuarto. También porque alrededor del sitio de infección se forman abscesos, fibrosis o tejido cicatrizal, impidiendo el contacto del producto con los microorganismos. Esto sucede con frecuencia en mastitis causadas por *Staphylococcus aureus*.

Del mismo modo el uso de cánulas intramamarias para tratar mastitis puede haber causado lesiones que ayudan la proliferación de bacterias responsables de la mastitis sub clínica, tal como lo indican (ALDERETE, 2009) y (LOOR *et al.*, 2000) que al introducir la cánula más de 2 cm, sumado a una maniobra brusca daña la queratina del pezón y por más que se coloque un antibiótico, la carga bacteriana es capaz de ingresar al cuarto mamario y por ende una infección. Es probable que la desinfección realizada no fue suficiente

para contrarrestar la contaminación con estos microorganismos en los pezones que se venían aplicando el EEHG, lo que es corroborado por (RUANO, 2007) quien manifiesta que por más que se desinfecte el orificio, no elimina al 100% las bacterias, haciéndolas más resistentes y pueden ser llevados hasta la cisterna y producir infección.

5.2. Cantidad de células somáticas en leche infectada

El número de células somáticas incrementó en los cuartos de las vacas infectadas con mastitis sub clínica a medida que se iba aplicando el EEHG, inclusive el tratamiento control donde se aplicó solo agua, lo que indicaría que el manejo sumado a la acción en forma conjunta de otros factores como edad del animal, estrés, condición nutricional y ambiente favorecieron el incremento como lo sostienen (SALINAS y RIVERA, 2006) y (SEVERIN, 2008); pero, es la mastitis propiamente el principal factor que induce a un mayor número de células somáticas, sobre todo bajo condiciones de alta temperatura que coadyuva en el aumento de incidencia de mastitis sub clínica lo cual es corroborado por (CURBELO, 2007). La persistencia de la presencia de cuartos infectados con mastitis con altos número de células obedecen a la presencia de bacterias y expresa el grado de inflamación (PEDRAZA *et al.*, 2000), también a la presencia de células que actúan como mecanismos de defensa contra la invasión de bacterias como lo reportan (REYES y CEDEÑO, 2008) y (CHACON *et al.*, 2006), e indican que más del 98% de las células somáticas que se

encuentran en la leche provienen de las células blancas que ingresan a la misma en respuesta a la invasión bacteriana de la ubre.

Sin embargo, existe una ligera disminución del número de células somáticas en la leche cuando se aplica el producto sobre todo el T2 con 25 % de EEHG; pero las concentraciones encontradas en este trabajo son ampliamente altos comparado con los datos que reporta (CHACON *et al.*, 2006), por lo que la aplicación del EEHG no tuvo un impacto significativo para atenuar el número de células somáticas en los cuartos de las vacas evaluadas.

Amerita afinar aspectos relacionados a la obtención, preparado y aplicación de EEHG para determinar su impacto no solo en tratamiento de mastitis sub clínica en vacunos, sino también en otras especies y otras enfermedades, en vista que la teoría demuestra que la hoja de guayaba tiene compuestos químicos con bondades biomédicas.

5.3. Costo total de producción del EEHG y por dosis de aplicación

El costo total de obtener el Extracto Etanólico de Hoja de Guayaba es relativamente barato y consecuentemente el costo por dosis de aplicación diaria (5 ml) tiene menor costo que productos comerciales como por ejemplo el MASTIJET que a la fecha cuesta S/. 25.0 cada dosis. Los costos por dosis del EEHG que se presentan en el Cuadro 4 son diferentes entre tratamientos, obviamente, el T2 cuesta menos por que tiene menor concentración de EEHG

que el T3 (25 y 50 % respectivamente), consecuentemente el costo por los siete días de aplicación de este producto es mayor.

En vista que los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el uso de EEHG no fue positivo en contrarrestar la presencia de mastitis sub clínica, pierde importancia hacer comparaciones con resultados de productos comerciales; no obstante, sería importante seguir investigando y perfeccionar el uso de la hoja de guayaba por los compuestos biomédicos que cuenta como lo menciona (ECHEMENDIA y MORRON, 2004; VELAZQUEZ, 2008 y PEREZ, 2005) y así dar valor agregado a nuestros recursos naturales que se encuentran en la zona coincidiendo con lo indicado por PAREDES (sa).

VI. CONCLUSIONES

El valor de dilución de 0.25% y 50% del extracto etanólico de guayaba (*Psidium guajava L.*) no resultó ser efectiva para el tratamiento de la mastitis sub clínica de vacas en producción en Naranjillo.

El costo de producción de preparar 1ml de EEHG es S/. 0.47.

VII. RECOMENDACIONES

Investigar las distintas variedades de guayaba que crecen en diferentes regiones del Perú para controlador de bacterias.

Realizar trabajos similares aislando cada metabolito por separado a fin de controlar efectos adversos.

VIII.ABSTRACT

ETHANOL EXTRACT OF GUAYAVA LEAVES (*Psidium guajava* L.) IN THE TREATMENT OF SUB CLINICAL MASTITIS IN NARANJILLO.

This research work was carried out in Naranjillo, Tingo María, Leoncio Prado province, Huánuco- Perú, with the objective to evaluate the effect of two ethanol extract concentration of guayaba leaves in sub clinical mastitis treatment and to determine the production solution cost. Fifteen cross breed cows from three dairy stables were used in order to obtain 29 selected infected quarts of sub clinical mastitis, who ones were detected with CMT test. Two kind of treatment were prepared, one with 25% ethanol extract solution and other with 50% ethanol extract solution, doses of 5 ml during 7 days of each solution were applied, somatic cells count and identification and growth of microorganisms (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus agalactiae*) of milk coming from the infected quarts were evaluated for three times during the experiment. To bacteria growth variable the square-chi test ($p \leq 0.05$) was used; between plates number with bacterial growth and the treatments used did find dependence, to somatic cell count completed random design were used and no significant difference ($p > 0.05$) was found between the treatments in relation de somatic cells count in the 3 times evaluations. The

research work had the following conclusion: The ethanol extract of guayaba leaves (*Psidium guajava* L.) in the evaluated solutions did not show effectiveness in the sub clinical mastitis treatment of lactation cow in Naranjillo, being the production cost of 1 ml EEHG S/ 0.47.

Key words: Guayaba (*Psidium guajava*), ethanol extract, somatic cells, mastitis, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, CMT.

IX.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDERETE, A. 2009. Prevención de residuos de antibióticos en leche, [En línea]; (<http://www.misionrg.com.ar/antiblec.htm>,01 Nov.2010).
- BANNERMAN, D., PAAPE, J., LEE, J., ZHAO, X., HOPE, C., y RAINARD, P. 2004. *Escherichia Coli* and *Staphylococcus aureus*. Elicit Differential Innate Immune Responses Following Intramammary Infection. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*. 11 (3): 463-472.
- BLOOD, D. 1992. Medicina veterinaria aplicada 7^{ma} ed. Guadalajara, México, interamericana. S.A. 1008 p.
- CUBERLO, R. 2007. Relación entre los recuentos de células somáticas, prácticas de manejo y patógenos causantes de mastitis en hatos lecheros, Universidad de Puerto Rico recinto de Mayagüez. [En línea]; (<http://grad.uprm.edu/tesis/curbelorodriguez.pdf>, 01 Nov. 2010).
- CHACÓN, A., VARGAS C., JIMÉNEZ, M. 2006. Incidencia en el conteo de células somáticas de un sellador de barrera (yodo-povidona 0,26%) y un sellador convencional (yoduro 0,44%). Vol. 17, número 002 Universidad de Costa Rica Alajuela. [En línea]: REDALYC, (<http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/437/43717208.pdf>, 01 May. 2010).

- DURAND, G. 2009. Efecto del extracto etanólico de hojas de guayaba (*Psidium guajava* L.), en el control de los agentes etiológicos de la mastitis en el alto Huallaga. Tingo María, Perú. 46 p.
- EICHEMENDÍA, C., MORÓN, J. 2004. Tintura de hojas de *Psidium guajava* L. en pacientes con diarrea aguda simple. Rev. Cubana Plant Med. 9(3). [En línea]: SCIELO, (http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v4n2/pla_02299.pdf, journals, 29 Abr. 2010).
- FERNANDEZ, M., RAMIREZ, J., CHAVEZ, C., ARIAS, M. 2008. Disminución en la incidencia de mastitis en ganado vacuno con la aplicación de un sellador de barrera experimental. Costarricense. 32(1): 107-112.
- HANSEN, J., SOTO, P, y NATZKE, R. 2004. Mastitis and Fertility in Cattle- Possible Involvement of Inflammation or Immune Activation in.
- HILLERTON, E., y BERRY, A. 2005. A review. Treating Mastitis in The Cow-a Tradition or an Archaism. Journal of Applied Microbiology. 98: 1250-1255.
- IAÑEZ, E.1998. Resistencia bacteriana a los antibióticos. Curso de Microbiología General. [En línea]; (http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/micro-ianez/21_micro.htm#indice, Libro, 02 Nov. 2010).
- IÑIGUEZ, F. 2010. ¿Por qué fallan los tratamientos de mastitis? Bovinos de leche. Rev. N° 21, México. [En línea]; (http://www.virbac.com.mx/publicaciones/al_Día/gl-21/pdf.pdf, 02 Nov. 2010).
- KERR, E., Y WELLNITZ, O. 2003. Mammary Expression of News Genes to Combat Mastitis. J Anim. Sci. 81 (suppl.3): 38-47.

- LOPEZ, V. 2009. Evaluación del efecto antibacteriano *in vitro* de seis especies de plantas de uso medicinal sobre bacterias causantes de mastitis en vacas lecheras. Universidad de san Carlos de Guatemala facultad de medicina veterinaria y zootecnia, 30p. [En línea]: BIBLIOTECA, (http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/10/10_1178.pdf, 01 Nov. 2010).
- LOOR, J.; JONES, G.; BAILEY, T. 2000. Aspectos básicos sobre el desarrollo de mastitis. [En línea]; (http://www.aampo.com.a/espanol/bovinos/bovinos_13.htm, 03 Nov. 2010).
- LUTTERODIT, G. 1992. Inhibition of Microlax induced experimental diarrhoea with narcotic like extracts of *Psidium guajava* leaf in rats. J Ethnopharmacol 1992; 37:151-7. [En línea]: CLINIC GA, (<http://rain-tree.Com/clinic/clinicga.htm#G9>, journals, 29 Abr. 2010).
- MARTINEZ, J., MOLINA, N., BOUCOURT, E.1997. Evaluación de la actividad microbiana del *Psidium guajava* L. (guayaba). Rev Cubana de Plant Med. 2(1): 12-14. [En línea]: SCIELO, (<http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v2n1/pla03197.pdf>, journals, 28 Feb.2010).
- MELLENBERGER, R. 2000. Dept. of Animal Sciences, Michigan State University. [En línea]; (<http://www.Uwex.edu/mikqualdy/dairyfarm/cmtposter/factsheetenespañol.pdf>, 22 Mar. 2010).
- MENDO, M. 1995. Lecciones de microbiología y medios de cultivo- manual de laboratorio. 4 ed. p.53.

- MINAG, 2010. Producción de leche fresca enero 2010, Boletín técnico N°59. [En línea];(http://www.cepes.org.pe/cendoc/cultivos/lecheM/20100300_semanal/vida_lactea_nro59_20100315.pdf, 04 Nov. 2010).
- MORALEDA, P. 2005. Efectividad de la aplicación de solución de miel como coadyuvante en el control de la mastitis bovina. Universidad Austral de Chile. [En línea]; (<http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2005/fam828e/doc/fam828e.pdf>, 09 Ene.2011).
- MURRIETA, H. 2002. Incidencia e identificación del agente etiológico causante de la mastitis sub clínica en ganado lechero en la zona de Tingo María – Aucayacú. Tingo María, Perú. 62 p.
- PEDRAZA, C., MANSILLA, A., FAJARDO, P., AGÜERO, H. 2000. Cambios en la producción y composición láctea por efecto del incremento de células somáticas en leche de vacas. [En línea]: SCIELO (http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S03652807200000300005&lng=es&nrm=iso, 28 Oct. 2010).
- PÉREZ, F. 2005. Caracterización de extractos farmacéuticos de cuatro árboles de uso. Universidad de san Carlos de Guatemala facultad de ciencias químicas y farmacia, p. 1-60.
- PÉREZ, G., BEDOLLA, C., CASTAÑEDA, H. 2005. Importancia del conteo de células somáticas en la cría sustentable de vacas productoras de leche. Sustentabilidad. Vol. III, N° 1. Universidad de Guadalajara, Jalisco., México. p. 86-94.

- PÉREZ, M., CABRERA, L., PIETROSEMOLI, S., COLINA, G., OVIEDO DE VALE, M. y MÉNDEZ, Y. 2007. Uso del extracto acuoso de la hoja del neem (*Azadiractha indica* A. Juss) sobre *Staphylococcus* causantes de mastitis. Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia (LUZ). Maracaibo, Venezuela. [En línea]; ([http://www.revfacagronluz.org.ve/Compendio% 20 Digital/jornadas2010/PDF/z-1.pdf](http://www.revfacagronluz.org.ve/Compendio%20Digital/jornadas2010/PDF/z-1.pdf), 09 Ene.2011).
- PAREDES, C. sa. Tratamientos alternativos en el control de la mastitis clínica bovina; plasma marino, propóleos y chichipince (*Hamelia patens*). [En línea]; (<http://www.usam.edu.sv/SiteUmasferrer/InvetigacionInstitucional/Tratamientos%20alternativos%20Mastitis.pdf>, 02 Nov. 2010).
- PHILPOT, W. 1996. La calidad de la Leche y la Mastitis. Disertación pronunciada en la primera exposición Latinoamericana de Producción e Industria Lechera: Mundo Lácteo. Argentina: 1.
- REYES, M., CEDEÑO, L. 2008. Importancia del conteo de células somáticas en la calidad de la leche. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo- México. [En línea]: REDVET, (<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090908.html>, 1 Nov.2010).
- RODRIGUEZ, F., MARTINEZ, M y MORRON, D. 1999. Disminución del tránsito intestinal en ratones por tintura de guayaba (*Psidium guajava* L.) oral. Rev. Cubana Plant Med. 3(2):54-6. [En línea]: SCIELO, (<http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v4n2/pla02229.pdf>, journals, 28 Feb.2010).

- RUANO, E. 2007. Evaluación del efecto de extracto de *Propionibacterium granulorum* y lipopolisacárido de *Escherichia coli* en el tratamiento de mastitis clínica en vacas lecheras especializadas. Universidad de San Carlos de Guatemala facultad de medicina veterinaria y zootecnia escuela de veterinaria. [En línea]; ([http:// biblioteca.usac.edu.gt /tesis /10/10_1060 .pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/10/10_1060.pdf), 28 Set. 2010).
- SALINAS, M., RIVERA, T. 2006. Utilización del anamú en el control de la mastitis bovina en la finca San Emilio del municipio de Diriomo del Departamento de Granada. Universidad Nacional Agraria Facultad de Ciencia Animal Departamento de medicina veterinaria_ Managua Nicaragua. [En línea]; (<http://cenida.una.edu.ni/Tesis/tnl73s165.pdf>, 27 Oct. 2010).
- SCARAMELLI, A., GONZÁLES, Z. 2005. Prevención y control de la mastitis bovina. Facultad de ciencias veterinarias, Universidad Central de Venezuela. [En línea]; (http://avpa.ula.ve /docuPDFs/libros_online/ manual-ganaderia /seccion5 /articulo10-s5.pdf, 09 Ene.2011).
- SALVADOR, P. 1997. Cultivos de frutos amazónicos. Manual para el extensionista. p.135.
- SEVERIN, G. 2008. Recuento de células somáticas. Universidad Harmon de Kentucky. [En línea]; (www.produccion-animal.com.ar, 25 Oct. 2010).
- UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA. 2009. Datos meteorológicos. Estación meteorológica José Abelardo Quiñones. Datos no publicados.

- VALERA, R., LINARES, F., NOVOA, R., CABALLERO, C., CASANOVAS, E. (2001).Terapia homeopática de mastitis subclínica bovina. Universidad de Cienfuegos, Facultad de Ciencias Agrarias-Cuba. [En línea]; (<http://www.bibliociencias.cu/gsd/collect/revistas/import/Terapiabovina.pdf> , 30 May. 2010).
- VARGAS, D. 2006. Cinética de acumulación y distribución de flavonoides en guayaba (*Psidium guajava* L.). Rev. Científica de América latina y el Caribe. Vol. 40, Nº 0001. [En línea]: REDALYC, (<http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/302/30240111.pdf>, Journals, 24 Abr. 2010).
- VELASQUEZ, E. 2008. Validación farmacológica de la actividad antiinflamatoria de las infusiones acuosas de las hojas de *Buddleja americana* L. (salvia santa), hojas de *Eupatorium semialatum* (bacché), y hojas de *Psidium guajava* L. (guayaba) en ratas hembras albinas. Universidad de San Carlos de Guatemala facultad de ciencias químicas y farmacia, 62p. [En línea]; (http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2638.pdf, 04 Nov.2010).

X. ANEXO

Cuadro A: Crecimiento bacteriano a la siembra de microorganismos.

Crecimiento bacteriano en relación a los días de evaluación			
T1=CONTROL			
Identificación vaca	evaluaciones		
	Día 0	Día 3	Día 7
Sin cacho PD	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
cachuda AD	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
cachuda PD	POSITIVO *	POSITIVO *	POSITIVO *
cachuda PI	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
Holstein PI	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
Holstein AI	POSITIVO *	POSITIVO *	POSITIVO *
Holstein AD	POSITIVO *	POSITIVO *	POSITIVO *
Holstein PD	POSITIVO *	POSITIVO *	POSITIVO *
3 Tetas PI	POSITIVO *	POSITIVO *	POSITIVO *
3 Tetas PD	POSITIVO *	POSITIVO *	POSITIVO *
3 Tetas AD	POSITIVO *	POSITIVO *	POSITIVO *
Pansona PI	POSITIVO *	POSITIVO *	POSITIVO *
Pansona PD	POSITIVO *	POSITIVO *	POSITIVO *
T2=25% EEHG			
Mamita PD	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO *
Maruja PD	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
Lulu AD	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
Paola AD	POSITIVO *	POSITIVO *	POSITIVO *
Negra AD	NEGATIVO	POSITIVO *	POSITIVO *
Negra AI	POSITIVO *	NEGATIVO	NEGATIVO
Negra PI	POSITIVO *	POSITIVO *	POSITIVO *
T3=50% EEHG			
Luz amarilla AD	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO * ⁺
Ojitos AD	NEGATIVO	POSITIVO *	POSITIVO *
Ojitos PI	NEGATIVO	POSITIVO *	POSITIVO * ⁺
Ojitos AI	NEGATIVO	POSITIVO *	POSITIVO * ⁺
Ojitos PD	NEGATIVO	POSITIVO *	POSITIVO * ^x
Blanca AD	NEGATIVO	POSITIVO * ⁺	POSITIVO *
Blanca PD	NEGATIVO	POSITIVO * ^{++x}	POSITIVO *
Jova AD	NEGATIVO	POSITIVO *	POSITIVO *
N.Mulata AI	NEGATIVO	POSITIVO *	POSITIVO *

* Staphylococcus aureus ⁺ Escherichia coli ^x Streptococcus agalactiae

Cuadro B: Cantidad de células somáticas.

Cantidad de células somáticas en relación a los días de evaluación				
T1= CONTROL				
Identificación vaca	Indicador Prueba CMT	Evaluaciones		
		Día 0	Día 3	Día 7
Sin cacho PD	+	400	640	960
cachuda AD	+	704	800	800
cachuda PD	+++	6'000,000	8'000,000	8'800,000
cachuda PI	+++	8'800,000	10'400,000	11'200,000
Holstein PI	+	400	688	800
Holstein AI	++	2'000,000	4'000,000	4'800,000
Holstein AD	++	2'000,000	2'400,000	4'000,000
Holstein PD	++	4'000,000	4'800,000	4'800,000
3 Tetas PI	++	1'440,000	2'240,000	2'880,000
3 Tetas PD	++	2'240,000	2'400,000	2'560,000
3 Tetas AD	++	2'608,000	2'880,000	4'000,000
Panona PI	++	1'200,000	1'600,000	2'240,000
Panona PD	+++	6'000,000	8'000,000	12'800,000
T2=25%EEHG				
Mamita PD	+	640	800	1'008,000
Maruja PD	+	480	656	720
Lulu AD	+	496	592	672
Paola AD	+	400	640	800
Negra AD	+	560	800	1'200,000
Negra AI	++	1'200,000	1'280,000	1'424,000
Negra PI	+++	8'800,000	12'000,000	12'800,000
T3=50%EEHG				
Luz amarilla AD	+	400	480	1'200,000
Ojitos AD	+	400	640	800
Ojitos PI	+	448	736	960
Ojitos AI	+	592	800	1'040,000
Ojitos PD	++	1'440,000	1'760,000	2'400,000
Blanca AD	++	1'920,000	2'720,000	4'800,000
Blanca PD	++	2'000,000	4'320,000	4'800,000
Jova AD	++	1'200,000	1'600,000	4'000,000
N.Mulata AI	++	1'840,000	2'400,000	4'128,000