



UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE CUENCA

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

**PROPÓLEO COMO ALTERNATIVA PARA EL TRATAMIENTO
DE MASTITIS SUBCLÍNICA BOVINA EN LA PARROQUIA
CUMBE**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE MEDICO VETERINARIO**

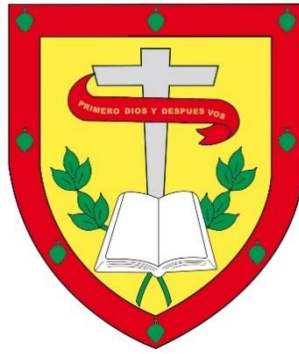
AUTORA: JOHANNA PATRICIA LANDI SANTANDER

DIRECTORA: Dra. MERCY DEL CISNE CUENCA CONDOY M.Sc.

CUENCA -ECUADOR

2024

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

**PROPÓLEO COMO ALTERNATIVA PARA EL TRATAMIENTO
DE MASTITIS SUBCLÍNICA BOVINA EN LA PARROQUIA
CUMBE**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
MEDICO VETERINARIO**

AUTORA: JOHANNA PATRICIA LANDI SANTANDER

DIRECTORA: Dra. MERCY DEL CISNE CUENCA CONDOY M.Sc.

CUENCA – ECUADOR

2024

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO

Eficacia del Propóleo en el tratamiento de la mastitis subclínica bovina: una alternativa natural

Efficacy of Propolis in the treatment of subclinical bovine mastitis: A natural alternative

Titulo corto: Propóleo para Tratamiento de la Mastitis Subclínica Bovina

Mercy Cuenca-Condoy^{1*}, Johanna Landi-Santander¹, Nathalie Campos-Murillo¹, Wilson Quinteros-Rodas¹

¹ Universidad Católica de Cuenca, Escuela de Medicina Veterinaria. Cuenca –Ecuador

*Autor correspondencia: mccuencac@ucacue.edu.ec

Mercy Cuenca-Condoy; <https://orcid.org/0000-0003-2854-2971>

mccuencac@ucacue.edu.ec

Johanna Landi-Santander; <https://orcid.org/0009-0005-9917-0740>

johanna.landi.97@est.ucacue.edu.ec

Nathalie Campos-Murillo; <https://orcid.org/0000-0003-2707-3376>

ncampos@ucacue.edu.ec

Wilson Quinteros-Rodas; <https://orcid.org/0000-0002-2936-9018>

wquinterosr@ucacue.edu.ec

RESUMEN

Con el objeto de evaluar el efecto del extracto hidroalcohólico del propóleo frente a las bacterias causantes de mastitis subclínica bovina, se llevó a cabo un experimento cuya ejecución se realizó en dos fases. En la primera fase se obtuvo el extracto de propóleo a través del método de maceración, utilizando como solvente alcohol de 70°. En la segunda fase, se aislaron e identificaron bacterias de muestras de leche cruda de la parroquia Cumbe mediante la técnica MALDI-TOF. Se utilizaron discos de antibiograma impregnados con diferentes concentraciones de propóleo para determinar la susceptibilidad bacteriana. El análisis estadístico utilizó la prueba de Kruskal-Wallis debido a la no normalidad de los datos. Ocho bacterias fueron identificadas, entre ellas *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* como microorganismos contagiosos, y de tipo ambiental se reporta a *Pantoea agglomerans*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Arthrobacter gandavensis* y *Kluyvera cryocrescens*. Los resultados mostraron una resistencia generalizada a los antibióticos penicilina y doxiciclina. Sin embargo, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus warneri* y *Arthrobacter gandavensis* mostraron susceptibilidad al propóleo, con halos de inhibición significativos a partir de 0,25 mL. La concentración mínima inhibitoria (CMI) del propóleo frente a *S. aureus* y *S. agalactiae* se determinó en dosis de 0,1 mL y 0,05 mL, respectivamente. Los hallazgos sugieren que el propóleo podría ser una alternativa terapéutica efectiva para el tratamiento de la mastitis subclínica bovina, especialmente frente a ciertos patógenos resistentes a los antibióticos convencionales, resaltando la necesidad urgente de investigar nuevas opciones terapéuticas para esta enfermedad.

Palabras clave: Mastitis bovina; etiología; propóleo

ABSTRACT

The objective of the study was to evaluate the effect of the hydroalcoholic extract of propolis against the bacteria that cause subclinical bovine mastitis. The experiment was run in two phases. In the first phase, the propolis extract was obtained through the maceration method, using 90° alcohol as a solvent. In the second phase, bacteria were isolated and identified from raw milk samples from the Cumbe parish using the MALDI-TOF technique. Antibiogram disks impregnated with different concentrations of propolis were used to determine bacterial susceptibility. Statistical analysis used the Kruskal-Wallis test due to non-normality of the data. Eight bacteria were identified, including *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* as contagious microorganisms, and environmental type *Pantoea agglomerans*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Arthrobacter gandavensis* and *Kluyvera cryocrescens* were reported. The results showed widespread resistance to the antibiotics penicillin and doxycycline. However, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus warneri* and *Arthrobacter gandavensis* showed susceptibility to propolis, with significant inhibition zones starting at 0.25 mL. The minimum inhibitory concentration (MIC) of propolis against *S. aureus* and *S. agalactiae* was determined at doses of 0.1 mL and 0.05 mL, respectively. The findings suggest that propolis could be an effective therapeutic alternative for the treatment of subclinical bovine mastitis, especially against certain pathogens resistant to conventional antibiotics, highlighting the urgent need to investigate new therapeutic options for this disease.

Key words: Bovine mastitis; etiology; propolis

INTRODUCCIÓN

La inflamación de la glándula mamaria (mastitis), es común entre las vacas lecheras lactantes y es una de las enfermedades más costosas para la industria láctea [1]. Esta enfermedad acarrea importantes pérdidas económicas debido a la reducción en la calidad y cantidad de leche, con pérdidas que oscilan entre 1 y 2,5 kg de leche/ vaca/ día durante las dos primeras semanas de lactancia [2]. Además, genera costos terapéuticos elevados y el descarte de animales jóvenes [3], compromete el bienestar animal y representa un peligro potencial para la seguridad alimentaria y la salud pública [4]. En particular, *Staphylococcus aureus*, un patógeno zoonótico, es el microorganismo más prevalente en los casos de mastitis bovina [5].

Actualmente, el diagnóstico más utilizado para la mastitis subclínica es el recuento de células somáticas (CCE); sin embargo, este método no identifica el factor etiológico causante de la infección, lo que imposibilita la introducción de una terapia antimicrobiana específica [6]. A pesar de esto, los antibióticos han sido la terapia más comúnmente utilizada para tratar la mastitis bovina. Sin embargo, el uso inadecuado de estos productos ha llevado a la resistencia bacteriana, afectando la salud pública [7, 8], lo que ha incrementado la preferencia de los consumidores por leche y productos de origen orgánico [9].

En este contexto, a nivel global se buscan nuevas alternativas terapéuticas que cumplan funciones similares a las de los antibióticos sin dejar residuos dañinos en la leche que perjudiquen la salud del consumidor [10]. Entre las estrategias más utilizadas destacan los compuestos bioactivos con actividad antimicrobiana presentes en extractos vegetales, extractos de propóleos y veneno de serpientes [11, 12, 13]. Así, Przybyłek y Karpinski [14] señalan que el propóleo afecta la permeabilidad de las membranas celulares de los microorganismos, interrumpe el potencial de membrana, reduce la producción de adenosina trifosfato (ATP) y disminuye la movilidad bacteriana. Este mecanismo de acción se atribuye a los polifenoles, terpenoides, esteroides y aminoácidos presentes en el propóleo [15]. No obstante, no todos los propóleos presentan esta propiedad debido a la variabilidad en la composición de estos compuestos.

Considerando estos aspectos, es necesario maximizar los estudios que permitan verificar si el propóleo puede considerarse una alternativa terapéutica viable para la mastitis bovina, dadas sus propiedades antibacterianas, antiinflamatorias y antioxidantes. Por lo tanto, el objetivo de este estudio es evaluar el efecto antimicrobiano del propóleo frente a bacterias causantes de mastitis subclínica bovina (MSB), con el fin de proporcionar información científica útil para el desarrollo de nuevos fármacos.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en dos fases. La primera fase involucró la obtención del extracto de propóleo en el Centro de Investigación, Innovación y Transferencia de Tecnología (CIITT) de la Universidad Católica de Cuenca, Ecuador, ubicado a una altitud de 2,560 msnm [16].

La segunda fase consistió en el aislamiento e identificación de las bacterias causantes de mastitis subclínica bovina a partir de muestras de leche cruda provenientes de hatos lecheros de la parroquia Cumbe, en el cantón Cuenca, provincia del Azuay, a una altitud de 2,680 msnm. Esta región presenta una temperatura media de 18°C y una precipitación anual promedio de entre 650 y 1000 mm, con los meses de marzo y abril registrando las lluvias más intensas, y julio a septiembre siendo la época de menor precipitación [17].

Obtención del extracto de propóleo

Se utilizó una relación 1:3, colocando en frascos ámbar 500 g de Propóleo como soluto y 1500 mL de alcohol potable al 70% como solvente, la mezcla se colocó a temperatura de 37°C, se agitó suavemente cada 72 horas y se dejó reposar por un lapso de 21 días en un espacio oscuro. Posteriormente, se filtró la muestra utilizando papel filtro grado 1. Whatman®, quedando un valor de 1175 mL seguido a esto se procedió a separar los componentes activos del solvente, utilizando una estufa de aire forzado (Memmert, UF110, Alemán), a 37°C, ventilación de 30% y trampilla de 60% por 48 horas (h), pasado este tiempo el valor final del extracto propóleo fue de 854 mL, el cual se envaso en botellas de vidrio ámbar para evitar la desintegración de sus principios activos, obteniendo una concentración del propóleo de (58, 55% m/v), lo que equivale a 585, 48 µg/mL.

Identificación de bacterias causantes de MSB

Se llevó a cabo una investigación observacional y descriptiva con un diseño transversal y un muestreo no probabilístico por conveniencia. Se examinaron 1000 cuartos mamarios de 250 vacas Holstein Friesian y sus cruces, manejadas bajo un sistema semi-intensivo con dos ordeños diarios.

Para detectar la MSB, se utilizó la prueba de campo conocida como California Mastitis Test (CMT). Primero se limpió la ubre con agua destilada tipo I, se desinfectaron los pezones con alcohol etílico al 70% y se secaron con toallas de papel. Posteriormente, siguiendo la metodología propuesta por Mellenberg y Roth [18], se descartaron los dos primeros chorros de leche y se mezclaron 2 mL de reactivo CMT con 2 mL de leche extraída de cada cuarto mamario en una raqueta de prueba, realizando movimientos circulares durante 10 segundos.

Los resultados cualitativos se interpretaron según el método descrito por Bedolla y Castañeda [19], observando la reacción generada entre el alquil-aril sulfonato de sodio y la cantidad de células somáticas (CS) en la leche, a partir de la presencia del fenómeno de gelificación y se confirmaron cuantitativamente mediante el conteo de células somáticas usando el analizador Ekomilk Scan (Ekomilk, modelo Ultra Pro, Bulgaria), siguiendo la

norma NTE INEN 1529-5 de Ecuador [20]. Las muestras positivas a MSB, se trasladaron al laboratorio para microbiología se sembraron en cajas de Petri por duplicado sobre agar nutritivo y posteriormente se incubaron, a 37°C durante 24 h, verificando el crecimiento de colonias bacteriana. Posteriormente, las colonias se aislaron por diferencia morfológica y las colonias se purificaron en tres rondas para asegurar la pureza. Luego, las colonias se sembraron por última vez en agar sangre y se incubaron durante 18 h a 37 °C para el proceso de identificación utilizando la técnica de espectrometría de masas de tiempo de vuelo de ionización/desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF), utilizando VITEK®MS, de origen español. Esta técnica se ha convertido en un recurso de referencia para la identificación de microorganismos en los servicios de microbiología clínica porque es rápida, sencilla y más fiable que la técnica de identificación bioquímica convencional [21].

Realización del antibiograma

Para determinar la susceptibilidad o resistencia de las bacterias, se utilizó la técnica de difusión en agar (Kirby-Bauer), siguiendo la metodología descrita por Cercenado y Saavedra [22], se impregnaron discos de antibiograma con 585,48 µg/mL de propóleo en volúmenes de 0,1; 0,15; 0,20; 0,25; 0,30 y 0,50 mL, y discos para antibiograma con penicilina y doxiciclina, Thermo Scientific™. Estos discos, se colocaron por triplicado sobre agar Mueller-Hinton previamente inoculado con la cepa bacteriana y se incubaron a 37°C por 18 h. Los halos de inhibición se interpretaron según los criterios del FDA y el NCCLS, clasificando los microorganismos como sensibles o resistentes [23].

Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un estudio observacional descriptivo de corte transversal, utilizando un muestreo no probabilístico de conveniencia. Para evaluar la normalidad de los datos, se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov, mientras que, la homogeneidad de varianzas se examinó con la prueba de Levene. Debido a que los datos no mostraron una distribución normal, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para el análisis estadístico.

RESULTADOS Y DISCUSION

Etiología de la MSB

En la provincia del Azuay-Ecuador, la etiología de mastitis bovina es muy poco estudiada; en este estudio, ocho bacterias fueron identificadas como causantes de MSB en la parroquia Cumbe, siendo *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*, las bacterias de tipo contagioso; mientras que *Pantoea agglomerans*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Arthrobacter gandavensis* y *Kluyvera cryocrescens*, se integran dentro de la etiología bacteriana de tipo ambiental. datos similares reporta Bermeo [16], quien identificó a *S. aureus* como microorganismo responsable de mastitis subclínica en el sector soldados, parroquia San Joaquín, cantón Cuenca-Ecuador.

Existen estudios que reportan la etiología en diversos cantones del Ecuador; así Cuenca y col [24], también reportan a *S. aureus* y *S. agalactiae*, dentro de la etiología contagiosa de

MSB en el cantón Biblián, provincia Del Cañar; Bonifaz y Conlago [25] y Bonifaz y col [26], igualmente encontraron a *S. aureus* en hatos bovinos lecheros de las parroquias Paquiestancia cantón Cayambe y Pedro Moncayo, provincia del Pichincha respectivamente. De igual forma, Maldonado y col [27], señalan a *S. aureus* como agente etiológico de la mastitis en vacas lecheras del cantón Licto, provincia de Chimborazo. Así mismo Ormaza y col [28], reconocen a este microorganismo como agente etiológico de mastitis Bovina en la Provincia de Carchi, Antón Montufar.

Efecto del propóleo sobre bacterias causantes de MSB

Los resultados revelaron una resistencia generalizada de todas las bacterias estudiadas a los antibióticos penicilina y doxiciclina, lo que resalta la necesidad urgente de investigar nuevas opciones terapéuticas. Además, se observó que *Streptococcus agalactiae*, *Pantoea agglomerans*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* y *Kluyvera cryocrescens* mostraron resistencia a las dosis de propóleo investigadas.

Por otro lado, se encontró que *Staphylococcus aureus* mostró susceptibilidad al propóleo a partir de una dosis de 0,25 mL, con halos de inhibición de 22,67 cm, y alcanzó los halos más amplios de 24,3 cm con la dosis más alta (0,50 mL).

Además, se observó que *Staphylococcus warneri* alcanzó halos de inhibición de 25,67 cm con una dosis de 0,50 mL de propóleo, mientras que *Arthrobacter gandavensis* mostró halos de 26 cm con dosis iguales o superiores a 0,20 mL, TABLA I y FIG. 1

Resultados similares reportan Dos Santos, y CI [29], quienes señalan que el extracto de propóleo en alcohol etílico, acetato de etilo y hexano en dosis de 6250, 3125 y 1562,5µg/mL, poseen actividad contra *S. aureus* aislado de casos de mastitis caprina. Los datos son apoyados por Amarante y Col [30], quienes comprobaron que el extracto etanólico de propóleo a una concentración de 68,7 µg/mL tiene actividad antimicrobiana contra *S. aureus*. Landero y Col [3], también demostraron que el Propóleo tiene efecto contra diversas especies de *Staphylococcus*. No obstante, los datos difieren de los reportados por Aamer y Abdul [11], quienes reportaron que las cepas de *S. aureus* y *S. intermedius*, son susceptibles al propóleo en combinación con la miel, observando que el propóleo solo no fue efectivo.

Quizá la diferencia de resultados reportados del efecto antimicrobiano del propóleo frente a bacterias causantes de mastitis subclínica bovina se deba a que varios factores influyen en la efectividad antimicrobiana del propóleo como: La composición química (cantidad y tipo de flavonoides, ácidos fenólicos, y terpenoides) [31, 32, 33, 34], el método de extracción (solventes utilizados, temperatura y tiempo de extracción), concentración del propóleo (dosis y formulación), pH del medio, condiciones de almacenamiento (luz, temperatura y humedad), tipo de microorganismo (susceptibilidad o resistencia), sinergia con otros productos naturales [35].

TABLA I

Efecto del extracto de propóleo (585, 48 µg/mL) sobre bacterias causantes de MSB

DIAMETRO DEL HALO (mm)									
Dosis (mL)	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Artrobacter gandavesis</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	<i>Staphylococcus warner</i>	<i>Kluyvera cryocrescens</i>	p. valor
0.10	13,33 ^{cd}	7,67 ^{abc}	16,33 ^d	7,00 ^{ab}	10,33 ^{bcd}	13,00 ^{bcd}	6,00 ^a	7,00 ^{ab}	0,0023
0.15	17,67 ^c	10,33 ^{ab}	19,00 ^c	11,00 ^{ab}	12,33 ^{abc}	13,33 ^{abc}	15,00 ^{bc}	6,33 ^a	0,0052
0.20	20,00 ^{bc}	12,33 ^a	26,67 ^c	15,67 ^{ab}	15,00 ^a	17,33 ^{abc}	17,00 ^{abc}	13,00 ^a	0,0059
0.25	22,67 ^c	16,33 ^{abc}	26,67 ^c	16,33 ^a	17,67 ^{bc}	14,33 ^{ab}	15,00 ^{ab}	16,33 ^{abc}	0,0045
0.30	24,67 ^b	18,33 ^a	26,63 ^b	17,00 ^a	21,33 ^b	11,00 ^a	18,00 ^a	19,33 ^{ab}	0,0042
0.50	24,33 ^a	19,67 ^a	26,67 ^a	19,00 ^a	21,36 ^a	19,33 ^a	25,67 ^a	14,33 ^a	0,4014
Penicilina	14,00 ^{cd}	13,33 ^{bcd}	13,67 ^{bcd}	11,67 ^{abc}	15,00 ^d	1,33 ^a	14,33 ^{cd}	5,00 ^{ab}	0,0118
Doxicilina	1,67 ^a	12,67 ^{bcd}	14,00 ^{cd}	13,00 ^{cd}	11,33 ^{abcd}	3,33 ^{ab}	15,33 ^d	10 ^{abc}	0,047

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

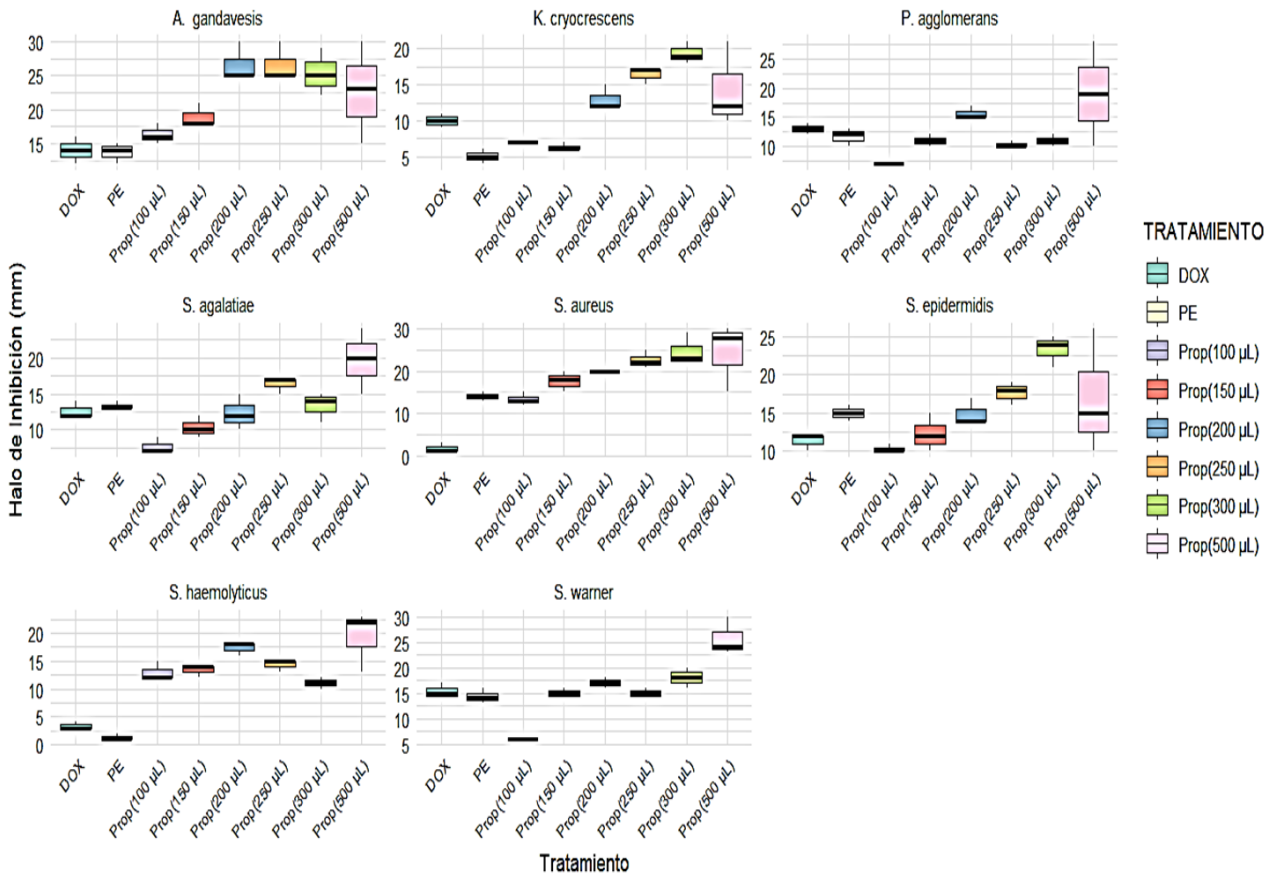


FIGURA1. Representación gráfica del efecto del extracto hidroalcohólico del propóleo

La concentración mínima inhibitoria (CMI) del propóleo frente a las bacterias contagiosas *S. aureus* y *S. agalactiae* se determinó con dosis de 0,1 mL y 0,05 mL, respectivamente, en concentración de (58,55% m/v), equivalente a 585, 48 µg/mL. Klahr y col [13] alcanzaron la (CMI) del extracto etanólico de propóleo para cepas de *Citrobacter sp.*, *Bacillus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Klebsiella sp.*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus aureus* 25923, *Staphylococcus lugdunensis* y *Corynebacterium spp.*, con dosis igual o inferior a 50, 000 µg/mL. Bacic y col [12], registraron concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) de propóleo en el rango de 16 a 64 mg/L para *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus coagulasa-negativos*. La diferencia de CMI reportada, también difiere dependiendo principalmente de la composición y concentración del propóleo, dosis, solvente utilizado en la extracción de los componentes activos del propóleo y microorganismo evaluado.

CONCLUSIÓN

Considerando los hallazgos encontrados en el estudio, resalta la necesidad urgente de investigar nuevas opciones terapéuticas en reemplazo de la terapia convencional; pudiendo ser el propóleo una alternativa terapéutica prometedora para el tratamiento de la mastitis subclínica bovina, particularmente cuando el agente etiológico involucrado sea *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus warneri* y *Arthrobacter gandavensis*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Centro de Investigación, Innovación y Transferencia de Tecnología, de la Universidad Católica de Cuenca, por permitir el desarrollo de parte de la investigación.

Conflicto de Interés

Los autores declaran la no existencia de conflictos en el presente trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1]Wang M, Yang N, Laterrière M, Gagné D, Omonijo F, Ibeagha E. Multi-omics integration identifies regulatory factors underlying bovine subclinical mastitis. *J. Anim. Sci. Biotech.* [Internet]. 2024; 15(46):1-21. Doi:10.1186/s40104-024-00996-8.
- [2]Kour S, Sharma N, Balaji P, Singh J, Veiga M, Son Y. Advances in diagnostic approaches and therapeutic management in bovine mastitis. *Vet. Sci.* [Internet]. 2023; 10(7):1-33. <https://doi.org/10.3390/vetsci10070449>
- [3]Landeró J, Castillo D, Altamirano P. Efectividad de dos tratamientos alternativos (*própolis et allium sativum*) en el control de mastitis subclínica bovina, en el departamento de Estelí Nicaragua, febrero 2020. *Teknos Revista Científica.* [Internet]. 2021; 21(1):28-33. <https://doi.org/10.25044/25392190.1029>
- [4]Wang M, Bissonnette N, Laterrière M, Dudemaine P, Gagné D, Roy J, Sirad M, Ibeagha E. DNA methylation haplotype block signatures responding to *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis and association with production and health traits. *BMC Biology.* [Internet]. 2024; 22(65):1-25. <https://doi.org/10.1186/s12915-024-01843-y>
- [5]Chakrawarti A, Casey C, Burk A, Mugabi R, Ochoa A, Barlow J. An observational study demonstrates human-adapted *Staphylococcus aureus* strains have a higher frequency of antibiotic resistance compared to cattle-adapted strains isolated from dairy farms making farmstead cheese. *BMC Veterinary Research.* [Internet]. 2024; 20(75):1-14. <https://doi.org/10.1186/s12917-024-03910-6>
- [6]Dobrut A, Skibiński J, Bekier A, Drożdż K, Rudnicka K, Płociński P, Siemińska I, Brzywczy M. Development of a prototypic, field-usable diagnostic tool for the detection of gram-positive cocci-induced mastitis in cattle. *BMC Veterinary Research.* [Internet]. 2024; 20(169):1-16. <https://doi.org/10.1186/s12917-024-04028-5>
- [7]Pinheiro G, Veleirinho M, Mazzarino L, Pinheiro, L, Maraschin M, Aoki R, Kuhnen S. Development of propolis nanoparticles for the treatment of bovine mastitis: in vitro studies on antimicrobial and cytotoxic act. *Can. J. Anim. Sci.* [Internet]. 2019; 99(4):713–723. Doi: 10.1139/cjas-2018-0173
- [8]Ashraf A, Imran M. Causes, types, etiological agents, prevalence, diagnosis, treatment, prevention, effects on human health and future aspects of bovine mastitis. *Anim. Health Res. Rev.* [Internet]. 2020; 21: 36–49. Doi: 10.1017/S1466252319000094

- [9]Sattat A, Rahman S, Hossain D, Begum F, Islam S, Rahman M, Rahman T, Hassan J. Virulence Determinants and Antimicrobial Resistance of E. Coli Isolated from Bovine Clinical Mastitis in Some Selected Dairy Farms of Bangladesh. Saudi J Biol Sci. [Internet].2021; 28(11): 6317-6323. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.06.099>
- [10]Morales A, Rivero N, Valladares B, Velázquez V , Delgadillo L, Zaragoza A. Bovine mastitis, a worldwide impact disease: Prevalence, antimicrobial resistance, and viable alternative approaches. Vet Anim Sci. [Internet]. 2023; 21:1-14. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2023.100306>
- [11]Aamer A, Abdul M. Minimum Inhibitory and Bactericidal Concentrations (MIC and MBC) of Honey and Bee Propolis against Multi-Drug Resistant (MDR) Staphylococcus sp. Isolated from Bovine Clinical Mastitis. Altern Integ Med. [Internet]. 2014; 3(4):1-5. doi:10.4172/2327-5162.1000171
- [12]Bacic G, Macesic N, Radin L, Aladrovi J, Matanovic K, Masek T, Brozic D, Benic M, Radic B, Bacic I, Suran J. Intramammary propolis formulation for subclinical mastitis prevention and treatment in dairy cows. J. Dairy Vet. Anim. Res. [Internet]. 2016; 3(5): 159. <https://doi.org/10.15406/jdvar.2016.03.00091>
- [13]Klahr G, Isola J, GiehL D, Rosa C, Martins A, Bartmer M, Segabinazzi L. Antimicrobial activity of the ethanolic extract of propolis against bacteria that cause mastitis in cattle. Biotemas. [Internet]. 2019; 32(1):1-10. <http://dx.doi.org/10.5007/2175-7925.2019v32n1p1>
- [14]Przybyłek I, Karpiński T. Antibacterial Properties of Propolis. Molecules. [Internet]. 2019; 24(11): 1-17. doi:10.3390/molecules24112047
- [15]Tomanic D, Samardžija M, Kovacevic Z. Alternatives to Antimicrobial Treatment in Bovine Mastitis Therapy: A Review. Antibiotics (Basel). [Internet]. 2023; 12(4): 1-16. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12040683>
- [16]Bermeo M. Incidencia de La mastitis subclinica Bovina, en el sector Soldados de la Parroquia San Joaquin [Tesis de Grado en Internet]. Cuenca. Ecuador Universidad del Azuay. Facultad de Ciencia y Tecnología. Escuela de Ingeniería Agropecuaria. 2014; [citada 11 Mayo 2024]. 54p. Disponible en: <https://dspace.uazuay.edu.ec/bitstream/datos/3588/1/10272.pdf>.
- [17]Plan De Desarrollo y Ordenamiento Territorial - Cumbe. Cumbe, Gobierno Del Ecuador. 2020 [citada 08 Marzo 2024]; 86p. Disponible en: https://emac.gob.ec/wp-content/uploads/2024/05/PDOT_.pdf

- [18]Mellenberg R, Roth C. Hoja de Información de la Prueba de Mastitis California (CMT). [Internet]. Topmilk.msu.edu: Rivera H; 2004 [consultado 08 Marzo 2024]. Disponible en: <https://topmilk.msu.edu/-/media/assets/topmilk/docs/cmt-californiamastitis/cmt-factsheet-sp.pdf>
- [19]Bedolla C, Castañeda V, Wolter W. Métodos de detección de mastitis bovina. REDVET. [Internet]. 2007 [citado 08 Marzo 2024]; 8(9): 1-17. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/273449619_Metodos_de_deteccion_de_la_mastitis
- [20]Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN). Requisitos microbiológicos de la leche cruda tomada en hato Quito-Ecuador. 2012; p 1-7.
- [21]Maldonado N, Robledo C, Robledo J. La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica. Infectio. [Internet]. 2018; 22(1): 35-45. doi: 10.22354/in.v0i0.703
- [22]Cercenado E, Saavedra J. El antibiograma. Interpretación del antibiograma: conceptos generales (I). An Pediatr Contin. [Internet]. 2009 [citado 08 Marzo 2024]; 7(4): 214-217. Disponible en: https://www.academia.edu/40114807/El_antibiograma_Interpretaci%C3%B3n_del_antibiograma_conceptos_generales_I
- [23]Cavaliere S, Harbeck R, McCarter Y, Ortez J, Rankin I, Sautter R, Sharp S, Spiegel C. Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana. Primera. Seattle, Washington: Departments of Laboratory Medicine and Microbiology; 2005.
- [24]Cuenca, M.; Reinoso, L.; González, J.; García, D. Etiología de la mastitis bovina subclínica en Biblián-Ecuador. J. Anim. Health Prod. [Internet]. 2024; 12(1): 100-107. doi: <http://dx.doi.org/10.17582/journal.jahp/2024/12.1.100.107>
- [25]Bonifaz N, Conlago F. Prevalencia e Incidencia de Mastitis Bovina mediante la prueba de California Mastitis Test con identificación del agente etiológico, en Paquiestancia, Ecuador. La Granja. [Internet]. 2016; 24(2): 43-52. doi: <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.17163/lgr.n24.2016.04>
- [26]Bonifaz N, Galarza X, Fuertes B, Beltrán J. Determinación molecular del agente etiológico de la Mastitis Bovina de muestras provenientes de unidades productoras Andinas. La Granja. [Internet]. 2024; 39(1): 137-149. doi: <https://doi.org/10.17163/lgr.n39.2024.08>
- [27]Maldonado D, Quilapanta A, Santos C, Mena L. Diagnóstico de Mastitis Subclínica Mediante Tres Métodos para el Control y Tratamiento en Bovinos de Leche Holstein.

- Dominio de las Ciencias. [Internet]. 2022; 8(1): 773-790. doi: <https://doi.org/10.23857/dc.v8i1.2603>
- [28]Ormaza D, Rueda R, Huera D, Ibarra E. Mastitis bovina en el cantón Montúfar – Carchi. Prevalencia, agente causal y factores de riesgo. AXIOMA. [Internet].2022; 26: 5-10. doi:<https://doi.org/10.26621/ra.v1i26.735>
- [29]Dos Santos H, Vieira D, Yamamoto S, Costa M, Sá M, Silva E, Silva T. Antimicrobial activity of propolis extract fractions against Staphylococcus spp. isolated from goat mastitis. Pesq. Vet. Bras. [Internet]. 2019; 39(12): 954-960. doi: 10.1590/1678-5150-PVB-5940
- [30]Amarante J, Ribeiro M, Costa M, Menezes F, Silva T, Amarante T, Grandola A, Moura L. Chemical composition and antimicrobial activity of two extract of propolis against isolates of Staphylococcus spp. and multiresistant bacterials. Pesq. Vet. Bras. [Internet]. 2019; 39(9): 734-743. doi: <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-6128>
- [31]Burdock G. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). Food Chem Toxicol. [Internet]. 1998; 36(4): 347-363. doi: [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(97\)00145-2](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(97)00145-2)
- [32]Bankova V, De Castro S.; Marcucci, M. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. Apidologie. [Internet]. 2000; 31: 3-15. doi: <https://doi.org/10.1051/apido:2000102>
- [33]Sforcin J, Bankova V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? Journal of Ethnopharmacol. [Internet]. 2011; 133(2): 253-260. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.10.032>
- [34]Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. Journal of Ethnopharmacol. [Internet]. 1999; 64(3): 235-240. doi: [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00131-7](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00131-7)
- [35]Viuda M, Ruiz Y, Fernández J, Pérez J. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. J Food Sci. [Internet]. 2008; 73(9): 117-24. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00966.x>