

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICO VETERINARIAS



El extracto acuoso del *Allium sativum* (ajo) en la terapia para mastitis en bovinos lecheros.

Por:

CÉSAR AQUINO GALVÁN

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Torreón, Coahuila, México
Febrero 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICO VETERINARIAS

El extracto acuoso del *Allium sativum* (ajo) en la terapia para mastitis en bovinos lecheros.

Por:

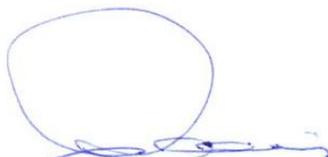
CÉSAR AQUINO GALVÁN

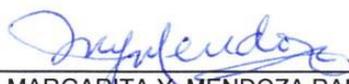
TESIS

Que se somete a la consideración del H. Jurado Examinador como requisito parcial para obtener el título de:

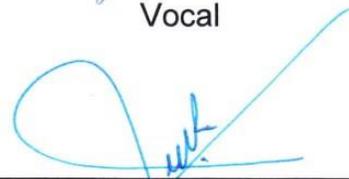
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

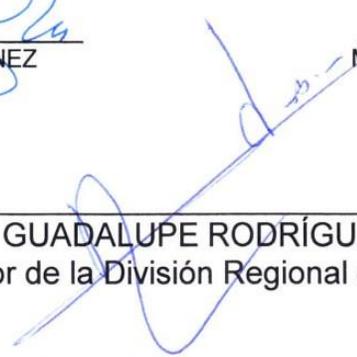
Aprobada por:


M.V.Z. EPAB. CARLOS RAMÍREZ FERNÁNDEZ
Presidente


M.C. MARGARITA Y. MENDOZA RAMOS
Vocal


DR. RAFAEL RODRÍGUEZ MARTÍNEZ
Vocal


M.C. GERARDO ARELLANO RODRÍGUEZ
Vocal Suplente


MVZ. J. GUADALUPE RODRÍGUEZ MARTÍNEZ
Coordinador de la División Regional de Ciencia Animal

Torreón, Coahuila, México
Febrero 2019


Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICO VETERINARIAS

El extracto acuoso del *Allium sativum* (ajo) en la terapia para mastitis en bovinos lecheros.

Por:

CÉSAR AQUINO GALVÁN

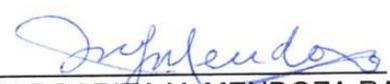
TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

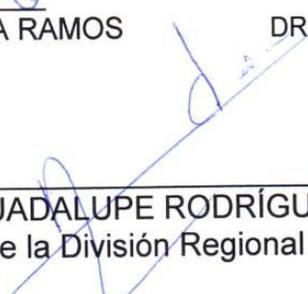
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Aprobada por el Comité de Asesoría:


M.V.Z. EPAB. CARLOS RAMÍREZ FERNÁNDEZ
Asesor Principal


M.C. MARGARITA Y. MENDOZA RAMOS
Coasesor


DR. RAFAEL RODRÍGUEZ MARTÍNEZ
Coasesor


MVZ. J. GUADALUPE RODRÍGUEZ MARTÍNEZ
Coordinador de la División Regional de Ciencia Animal


Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal

Torreón, Coahuila, México
Febrero 2019

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a mis padres **Fulgencio Aquino Pastor** y **Celia Galván Rivera**, por su apoyo incondicional a pesar de la distancia, por darme la oportunidad de estudiar esta carrera que tanto amo, por apoyarme en todas las decisiones que tome, por todos sus sabios consejos y por su amor.

A mi esposa **Luisa Díaz Antonio**, por su amor y apoyo incondicional, por acompañarme en este largo camino de mi formación profesional, por soportar mi ausencia y mi estrés en la realización de este proyecto.

A mis hermanos **Orlando Aquino Galván**, **Omar Aquino Galván** gracias por su apoyo fraterno y por haber creído en mí.

A mis abuelos **Alicia Pastor Canuto** y **Jacinto Aquino Luis** (QEPD), muchas gracias por su apoyo incondicional y sabios consejos.

A mí cuñada **Leonila Morales**, a mi niña **Brianda Itzel Aquino Morales** y a mis tíos y primos.

A mis amigos **Rafael Torres**, **Marlene Montes**, **Miguel Ornelas**, **Dolores Díaz**, por su valiosa amistad y apoyo.

A mis asesores **M.V.Z EPAB. Carlos Ramírez Fernández**, por su confianza en la realización de este proyecto de tesis, por sus consejos, enseñanzas, **M.C. Margarita Y. Mendoza Ramos** y **Dr. Rafael Rodríguez Martínez**, por ayudarme en la redacción y por dedicar su valioso tiempo en la revisión del presente trabajo.

A todo el personal del estable "Llocee 2, San Alberto", por darme la oportunidad y por brindarme las facilidades, de hacer el experimento del presente trabajo.

A todos ustedes muchas gracias.

DEDICATORIAS

Especialmente a ti mi querido viejo **Jacinto Aquino Luis** (QEPD), que desde dónde te encuentres celebras conmigo la conclusión y resultados de este trabajo. Siempre te llevo en mi mente y corazón.

A mis padres **Fulgencio Aquino Pastor** y **Celia Galván Rivera**.

A la mujer que eligió compartir su vida conmigo **Luisa Díaz Antonio**, te amo mi amor.

A mi abuela **Alicia Pastor Canuto**.

A mis hermanos **Orlando Aquino Galván** y **Omar Aquino Galván**.

ABREVIATURAS

ADN. Ácido desoxirribonucleico

ARN. Ácido ribonucleico

β. Beta

a. C. Antes de Cristo

CCS. Conteo de Células Somáticas

CMT. California Mastitis Test

cm. centímetro

g. Gramos

kg. Kilogramos

ml. Mililitro

mm³. Milímetro cúbico

mg. Miligramos

NaOH. Hidróxido de sodio

PH. Potencial de hidrogeniones

Ppm. Partes por millón

UFC. Unidades Formadoras de Colonia

μg. Microgramos

μm. Micrómetro

\$. Signo de pesos

¢. Signo centavos

RESUMEN

El objetivo de estudio fue determinar la eficacia del extracto acuoso del ajo (*Allium sativum*) en el tratamiento de vacas lecheras Holstein con mastitis. En dicho experimento se seleccionaron 50 animales lactantes con signos de mastitis: cambios organolépticos de la leche (grumos), positivas a Prueba California (CMT). Los animales se agruparon en forma aleatoria en dos lotes: el lote 1 (n=25) como Grupo testigo (GT) en el cual se realizó un tratamiento de rutina de acuerdo a un protocolo establecido en la explotación que consiste en la terapia con diversos antibióticos. En el grupo en experimentación (GA) se realizó una terapia local con un tratamiento de un extracto acuoso de ajo (*Allium sativum*) durante tres días y con una frecuencia de cada 24 horas.

Una vez finalizado el periodo de prueba a todos los animales (ambos grupos) se les realizó una Prueba California a aquellos que denotaron recuperación con respecto a los cambios organolépticos de secreción láctea. Observándose que el grupo tratado (GA) con el extracto de ajo arrojó una respuesta positiva de un 64 % y el grupo testigo (GT) de un 74 %. Los resultados fueron analizados con el análisis estadístico χ^2 y se observa una diferencia no significativa en ambos grupos ($P>0.05$).

Por lo cual se concluye que los resultados en ambos grupos son similares y que al extracto de ajo se le considera como una alternativa para los tratamientos de mastitis, ya que es un producto de bajo costo (\$ 2.43.⁰⁰), respecto al tratamiento convencional con antibióticos (\$ 41.50.⁰⁰).

Palabras clave: Extracto, Acuoso, *Allium sativum*, Terapia, Mastitis.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIAS	ii
ABREVIATURAS	iii
ÍNDICE	v
ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Hipótesis	3
1.2 Objetivo general	4
1.3 Objetivos específicos	4
II. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1 El ajo (<i>Allium sativum</i>): descripción botánica	5
2.2 El ajo en la historia	6
2.3 Composición	7
2.4 El ajo: componentes bioactivos	8
2.4.1 Fructanos	9
2.4.2 Flavonoides	9
2.4.3 Compuestos sulfurados	9
2.4.4 Aliína	10
2.4.5 Enzima alinasa	10
2.4.6 Tiosulfonatos	11
2.4.6.1 Formación	11
2.4.6.2 Estabilidad	11
2.4.7 Alicina	12
2.4.7.1 Vida media	13
2.4.7.2 Efecto antimicrobiano	13
2.4.7.3 Propiedades antifúngicas	14
2.4.7.4 Mecanismo acción de la alicina en bacterias	14
2.4.7.5 Mecanismo de acción de la alicina en hongos	15
2.4.7.6 Mecanismo de acción del ajoene en hongos	15
2.5 Uso del extracto de ajo (<i>A. sativum</i>) para mastitis bovina	15
2.6 Resistencia bacteriana a los antibióticos	16
2.7 Impacto económico de la mastitis bovina en la ganadería lechera	17
2.8 Definición de mastitis bovina	18

2.8.1 Mastitis subclínica	18
2.8.2 Mastitis clínica.....	19
2.8.3 Etiología	19
2.8.3.1 Patógenos contagiosos.....	20
2.8.3.2 Patógenos ambientales	21
2.8.4 Métodos de tratamiento.....	21
2.8.4 Métodos de detección de la mastitis bovina	22
2.8.5 Observación y palpación de la ubre	22
2.8.6 Pruebas físicas	22
2.8.6.1 Taza probadora	22
2.8.7 Pruebas químicas.....	23
2.8.7.1 Conductividad eléctrica de la leche (PCE)	23
2.8.7.2 Papel indicador de mastitis	23
2.8.7.3 Prueba Whiteside.....	23
2.8.8 Pruebas biológicas.....	24
2.8.8.1 Prueba California para Mastitis (CMT)	24
2.8.8.2 Prueba de Wisconsin para Mastitis (WMT)	24
2.8.8.3 Monitoreo del conteo de células somáticas	24
2.8.8.4 Métodos de conteo electrónico celular	25
2.8.9 Pruebas bacteriológicas.....	26
III. MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1 Materiales	28
3.2 Preparación del extracto acuoso de ajo (<i>Allium sativum</i>).	29
3.3 Metodología del experimento	30
3.4 Análisis estadístico	31
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
IV. CONCLUSIÓN.....	34
V. RECOMENDACIONES.....	34
VI. LITERATURA CITADA.....	35

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición del ajo (tomada de http://www.infojardin.com.2008).	8
Cuadro 2. Grado de afección dependiendo el número de células somáticas en leche por ml en la prueba California (tomado de Ruiz, 1996).	30
Cuadro 3. Resultados de tratamiento con extracto acuoso de ajo (<i>Allium sativum</i>) y tratamiento con antibiótico convencional después de tres días de tratamiento, en vacas Holstein positivas a prueba de California.	32
Cuadro 4. Conteo de células somáticas/ml (promedio) en vacas Holstein positivas a prueba de California antes y después del tratamiento con extracto acuoso de ajo (<i>Allium sativum</i>) y antibiótico convencional.	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Descripción botánica del ajo	6
Figura 2. Composición química de la aliína.....	10
Figura 3. Reacción química de la formación de alicina	12
Figura 4. Ubicación estable “Llocee” S.A. de C.V.	27
Figura 5. Estable “Llocee” S.A. de C.V.	28

I. INTRODUCCIÓN

El ajo (*Allium sativum*) es un bulbo perteneciente a la familia *Liliaceae* y subfamilia *Allioideae* (García y Sánchez-Muniz, 2000; Greco, 2011). Se caracteriza por tener un sistema radicular, al tener raíz bulbosa compuesta de 6-12 bulbillos conocidos comúnmente como “dientes”, reunidos en su base por medio de una película delgada para formar la “cabeza del ajo”. Cada bulbillo se encuentra envuelto por una hoja protectora blanca o rojiza, membranosa muy delgada (Bender-Bojalil y Bárcenas-Pozos, 2013).

El ajo por sus tantas virtudes (antioxidante, hipolipemante, antiaterogénica, antiagregante, fibrinolítica, antihipertensiva, antimicrobiana y antifúngica, anticarcinogénica, antitumorogénica e inmunomoduladora) ha sido muy estudiado en el ámbito farmacéutico. Sus características van desde la aplicación culinaria hasta sus más estudiados efectos en la medicina natural como: antimicrobiano y antifúngico. Además, de todas las especies de *Allium*, el ajo es el que contiene la mayor concentración de compuestos azufrados, lo que le confiere actividad antimicrobiana potente (Bender-Bojalil y Bárcenas-Pozos, 2013; López, 2011).

Este producto contiene por lo menos 33 compuestos azufrados, varias enzimas, 17 aminoácidos y algunos minerales que contribuyen a su actividad antimicrobiana (Arteaga *et al.*, 2016). Uno de estos compuestos azufrados es la alicina que inhibe a más de 300 bacterias, tanto Gram-positivas como Gram-negativas, tales como *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus polymyxa*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Streptococcus* spp,

Klebsiella spp, *Proteus* spp, *Bacillus* spp, *Clostridium* spp y *Mycobacterium tuberculosis* (Kumar y Jain 2010; Ledezma y Apitz-Castro, 1998).

Arteaga *et al.* (2016) Demostraron que la aplicación de una mayor concentración de oleo resina de ajo (6 ml) es efectivo frente a un número de UFC de *Staphylococcus aureus* en cuartos mamarios de vacas con mastitis subclínica.

Así mismo, Moscoso (2011) Señaló que la aplicación de 20 por ciento de tintura de ajo (concentración máxima en su estudio), disminuye la carga microbiana (*Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*), en la leche de una manera más eficiente.

Dentro de las estrategias para controlar esta enfermedad, la principal acción es la de establecer estrategias en el proceso del ordeño considerándose al personal y sanidad del medio ambiente. En individuos que se manifiestan de forma clínica y subclínica se utilizan terapias antibióticas, pero recientemente este tipo de medidas terapéuticas no tienen el éxito esperado, debido al uso indiscriminado e irracional así como la implementación de dosis inadecuadas o aplicaciones con una duración errónea en el tratamiento de las infecciones, así, como su uso, como promotores de crecimiento, ha favorecido el desarrollo de resistencia bacteriana, que puede ser transmitida a patógenos de animales (Bastos *et al.*, 2011; Phillips *et al.*, 2004; Saini *et al.*, 2012). En vista del presente escenario, la búsqueda de nuevas sustancias antimicrobianas que actúen sobre los principales microorganismos causantes de enfermedades, tanto en hombre como en animales, a partir de fuentes naturales, como las plantas, es creciente (Duarte, 2006).

1.1 Hipótesis

La terapia local con una solución acuosa de *Allium sativum* es una alternativa para el tratamiento de mastitis clínica.

1.2 Objetivo general

Determinar la eficacia del extracto acuoso del ajo (*Allium sativum*) en el tratamiento de vacas con mastitis.

1.3 Objetivos específicos.

1. Obtención de un producto de bajo costo, de fácil preparación y materia prima fácil de obtener.
2. Sustituir las terapias para mastitis con el uso de antibióticos convencionales de alto costo y con resistencia bacteriana progresiva.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 El ajo (*Allium sativum*): descripción botánica

El género *Allium* contiene más de 300 especies de plantas; entre ellas se encuentra el ajo, que es un bulbo perteneciente a la familia *Liliaceae* y subfamilia *Allioideae*, de nombre científico *Allium sativum*, el término *Allium* procede de la palabra *All*, que significa “ardiente o caliente” mientras que el nombre “*sativum*” procede del latín que significa cultivado (García y Sánchez-Muniz, 2000; Greco, 2011).

Es una planta vivaz, bianual y resistente al frío cuyas raíces son blancas, fasciculadas, numerosas y con escasas ramificaciones. De la parte superior del bulbo nacen las partes fibrosas, que se introducen en la tierra para alimentar y anclar a la planta. El tallo o disco, está representada por una masa cónica que es fuerte y crece desde 40 a más de 55 centímetros de largo, terminando por las flores. Las yemas vegetativas auxiliares de las hojas se hipertrofian durante la fase de bulbificación formando los “dientes” del ajo por acumulación de sustancias nutritivas, que se encuentran rodeadas de túnicas (coloreadas o no) que son restos de vainas foliares, las flores se encuentran contenidas en una espata membranosa que se abre longitudinalmente en el momento de la floración y las hojas son planas, algo acanaladas, característica que lo diferencia de la cebolla, figura 1 (Greco, 2011; González, 2004).

El ajo se caracteriza por tener un sistema radicular, al tener raíz bulbosa compuesta de 6 a 12 bulbillos conocidos comúnmente como “dientes”, reunidos en su base por medio de una película delgada para formar la “cabeza del ajo”. Cada bulbillo se

encuentra envuelto por una hoja protectora blanca o rojiza, membranosa muy delgada (Bender-Bojalil y Bárcenas-Pozos, 2013).

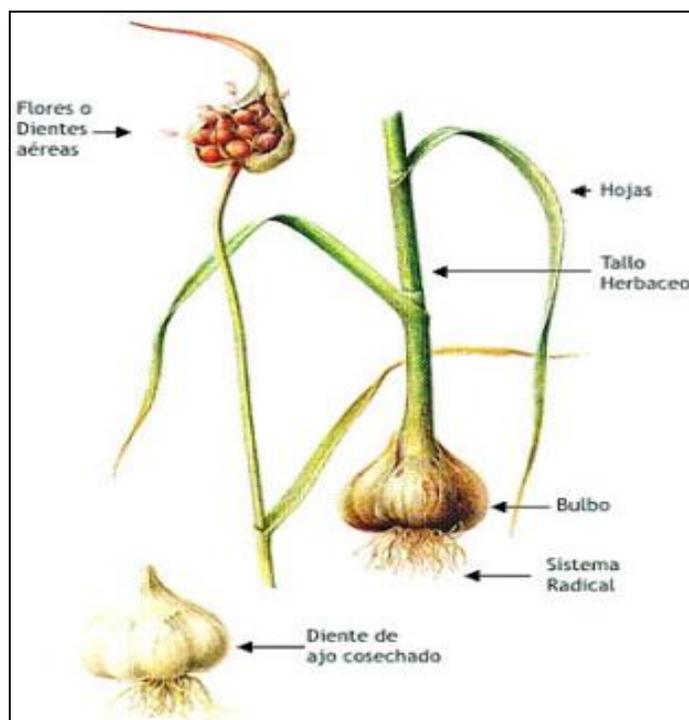


Figura 1. Descripción botánica del ajo

2.2 El ajo en la historia

Diversas especies del género *Allium*, al que pertenece el ajo, han sido cultivadas por miles de años por sus propiedades terapéuticas, profilácticas, su significancia religiosa, su sabor y aroma. Esta hortaliza es un condimento natural por excelencia y forma parte de los hábitos alimentarios y terapéuticos de muchas culturas (Moscoso, 2011).

Su origen se ubica en Asia central; asimismo, los chinos y egipcios ya lo utilizaban desde la más remota antigüedad. En china se estima que en el año 2000 a. C. ya se conocía el ajo y formaba parte de la dieta diaria como condimento picante y era

un componente medicinal importante para combatir, principalmente, enfermedades respiratorias, digestivas e infecciones (Greco, 2011).

Hipócrates, recordado como el Padre de la Medicina, lo utilizaba como remedio para enfermedades pulmonares y para dolores abdominales. Como en Grecia, los romanos reconocían al ajo como un agente energizante y, también, como potente afrodisíaco. Igualmente, lo usaban para curar enfermedades digestivas, mordeduras de animales, artritis y convulsiones. También, la escuela de Medicina de Salerno (Nápoles, Siglo X) fue un centro de difusión de las bondades del ajo como buen preservador de la salud (López, 2011).

En el renacimiento, el ajo, también, fue considerado como una planta medicinal y era cultivado en jardines de hierbas terapéuticas en diferentes ciudades de Italia. Además, los ingleses incluían al ajo en sus medinas para aliviar dolores de dientes y constipaciones (Rivlin, 2001).

Históricamente se cree que Luis Pasteur fue el primero que describió el efecto antibacteriano en jugo de ajo en 1858, para tratar infecciones (Kumar y Jain, 2010).

2.3 Composición

El ajo en fresco posee distintos componentes entre los que destacan el agua y los carbohidratos, como la fructosa, compuestos azufrados, fibra y aminoácidos libres. Tiene altos niveles de vitaminas A y C, y bajos niveles de vitaminas del complejo B. Asimismo, posee un alto contenido de compuestos fenólicos, polifenoles y fitoesteroles (Rahaman, 2003).

Cuadro 1. Composición del ajo (tomada de <http://www.infojardin.com.2008>).

Nutrientes	Valor	Nutrientes	Valor
Energía (kcal)	119	Calcio (mg)	17.8
Proteína (g)	4.3	Hierro (mg)	1.2
carbohidratos (g)	24.3	Yodo (μ g)	4.7
Fibra (g)	1.2	Magnesio (mg)	24.1
Grasa total (g)	0.23	Zinc (mg)	1.1
Colesterol (mg)	0	Selenio (μ g)	2
Alcohol (g)	0	Sodio (mg)	19
Agua (g)	70	Potasio (mg)	446
		Fósforo (mg)	134

En cuanto a los minerales, el ajo tiene niveles importantes de potasio, fósforo, magnesio, sodio, calcio y hierro. También presenta un contenido moderado de selenio y germanio, pero su concentración depende de los minerales presentes en el suelo donde crece el bulbo (Bender-Bojalil y Bárcenas-Pozos, 2013).

2.4 El ajo: componentes bioactivos

El ajo contiene diversos componentes bioactivos responsables de distintas propiedades benéficas para la salud. Entre ellos, se pueden mencionar a los *fructanos*, *flavonoides* y los *compuestos sulfurados* denominados fitoquímicos. Los

mismos que otorgan propiedades que constituyen el sustento para la fabricación de diversos productos con fines terapéuticos y permiten categorizarlo como un alimento funcional (Greco, 2011).

2.4.1 Fructanos

Son polímeros de moléculas de fructosa unidos por glucosídicos (fructosa, glucosa y sacarosa). Su función es proteger a la planta del estrés a causa del medio ambiente. Además, interviene en su metabolismo, como catalizador, en la polimerización. De los tres tipos de fructanos, el que se encuentra presente en el ajo, es la inulina (Villagómez y Mercado, 2008).

2.4.2 Flavonoides

Son compuestos que contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante (Martínez- Flórez *et al.*, 2002). Dentro de los principales flavonoides del ajo son los flavonoles, la miricetina y la apigenina (Lanzotti, 2006).

2.4.3 Compuestos sulfurados

Los principales compuestos sulfurados del ajo son las cisteínas sulfóxidos, como la aliína (7-14 mg/g), metiína (0.5-2 mg/g) e isoaliína (0.1-2 mg/g). Estas cisteínas sulfóxidos se forman del γ -glutamil- cisteína (γ -glutamil-S-trans-1-propenil cisteína, γ -glutamil-S-alilcisteína y γ -glutamil-S-metilcisteína) durante la maduración, que es cuando aumentan los niveles de la enzima γ -glutamil-transpeptidasa (Córdoba, 2010). El contenido total de sulfuros en el ajo es de aproximadamente 1.0 por ciento en peso seco y 0.35 por ciento en peso fresco (Lawson, 1993).

Entre los compuestos sulfurados del ajo, la alicina ha ocupado el lugar más destacado por considerarse la sustancia con mayor actividad biológica (Alonso, 2007).

2.4.4 Aliína

La aliína o S-alilcisteína sulfóxido es el compuesto sulfurado más abundante en el ajo fresco, es inodora y estable, del que se deriva la sustancia activa alicina. El ajo contiene 7-14 mg/g de aliína por gramo de peso fresco, y de 18-42 mg/g de peso seco (Córdoba, 2010).

La aliína es estable en soluciones acuosas y a temperaturas elevadas. Cuando las células se rompen, la aliína reacciona, y en aproximadamente diez segundos toda la aliína expuesta se convierte en tiosulfatos que emiten el aroma característico del ajo fresco (Lawson y Wang, 2005).

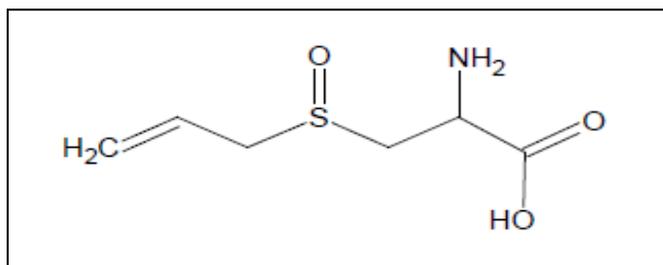


Figura 2. Composición química de la aliína

2.4.5 Enzima alinasa

La alinasa comprende del 10 al 12 por ciento del material proteico soluble en los dientes de ajo. Se encuentra en las vacuolas de la célula separada físicamente de su substrato natural (la aliína) que se encuentra en el citoplasma de las células del ajo (Kuettnner *et al.*, 2002).

Esta enzima se activa a pH de 4.5 hasta 9, pero se inactiva rápidamente y de forma irreversible a pH 1.5-3 (Córdoba, 2010).

2.4.6 Tiosulfonatos

2.4.6.1 Formación

Los tiosulfonatos se forman cuando el ajo es cortado, triturado o cuando se agrega agua al ajo deshidratado (Méndez y Castaigne, 2008).

Lawson *et al.* (1991) Realizaron un estudio sobre el contenido de alicina y otros tiosulfonatos presentes en el homogenato de ajo, concluyendo que la alicina es el tiosulfonato mayoritario, representando el 70-80 por ciento del total de tiosulfonatos formados. Seguido por los tiosulfonatos minoritarios: alil-SS(O)-metil (6-16 por ciento), metil-SS(O)-alil (3-9 por ciento), trans-1-propenil-SS(O)-alil (1-7 por ciento), alil-SS(O)-trans-1-propenil (0.2-4 por ciento), trans-1-propenil-SS(O)-metil y metil-SS(O)-trans-1-propenil (0.1-2.5 por ciento), y metil-SS(O)-metil (2 por ciento).

La formación de alicina, se completa en 0.2-0.5 minutos a temperatura ambiente, mientras que la formación de metil tiosulfonato termina en 1.5-5 minutos. Los alil tiosulfonatos representan entre el 95-98 por ciento del total de los tiosulfonatos, y los metil tiosulfonatos entre 10-30 por ciento del total (Lawson, 1993).

2.4.6.2 Estabilidad

Los tiosulfonatos son compuestos muy reactivos y experimentan un gran número de transformaciones que dependen de variables como la temperatura, el pH y las condiciones de extracción (Córdoba, 2010).

2.4.7 Alicina

La alicina es un componente oxidante producido por el ajo crudo cuando sus células se rompen por la acción de un corte o triturado, permitiendo la interacción de la enzima alinasa la cual cataliza la conversión de aliína en alicina, en contacto con el aire y pH superior a 3 (Lawson y Hughes, 1992). La reacción se completa de 0.2 a 0.5 minutos después de haber iniciado (Lawson, 1993). El poder bactericida de la alicina fue descubierto en 1944 por el Premio Nobel Doctor Arthur Stoll (González *et al.*, 2014).

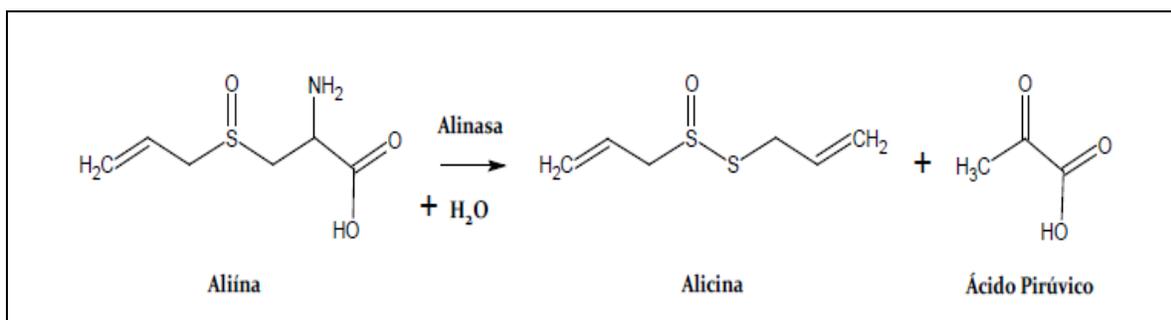


Figura 3. Reacción química de la formación de alicina

Enseguida, la alicina experimenta degradación en forma rápida, permitiendo la formación de nuevos compuestos sulfurados tales como sulfuro de dialílico, disulfuro de dialilo y trisulfuro de dialilo. Asimismo, en presencia de calor, la alicina se transforma en ajoene y vinilodtiínas (Córdoba, 2010). Hoy en día se sabe que 1 mg de aliína equivale a 0.45 mg de alicina (Granados, 2003).

Entre las propiedades nutraceuticas atribuidas a este compuesto, destacan su acción antitrombocítica, hipotensora, antimicrobiana, antifúngica, anticarcinogénica, antitumorogénica e inmunomoduladora (López, 2007).

2.4.7.1 Vida media

Se ha demostrado que alicina tiene una vida media biológica y química de 6 días en solución acuosa y de 11 días en alcohol al 20 por ciento; es inestable en aceite vegetal, con una vida media de 0,8 horas, la cantidad de alicina disminuye linealmente dependiendo del tiempo de incubación y temperatura; así la vida media de la alicina es más estable a los 4°C (Fujisawa *et al.*, 2008).

2.4.7.2 Efecto antimicrobiano

De manera natural los animales conviven en simbiosis con billones de microorganismos como bacterias, hongos y protozoarios, principalmente concentrados en el tracto gastrointestinal y la piel (Ramírez-Concepción *et al.*, 2016). Estos microorganismos juegan un papel trascendental para la salud animal, así como constituyen un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades (Stauffer *et al.*, 2000).

En diversas preparaciones, el ajo ha demostrado que la alicina exhibe un amplio espectro de actividad microbiana contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas como: *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus polymyxa*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona auroginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Streptococcus spp*, *Klebsiella spp*, *Proteus spp*, *Bacillus spp*, *Clostridium spp* y *Mycobacterium tuberculosis* (Kumar y Jain 2010; Ledezma y Apitz-Castro, 1998).

En 1989, Debouzy demostró la actividad inhibitoria del compuesto Ajoene en el crecimiento de diversos tipos de células, como *Streptococcus lactis*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* (Ledezma y Apitz-Castro, 1998).

2.4.7.3 Propiedades antifúngicas

Muchos hongos, incluidos *Cándida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *Torulopsis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Cryptococcus*, *Aspergillus niger*, *Trichosporon beigelii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula*, *Paracoccidioides brasilienses*, *Coccidioides immitis*, *Fonsecae pedrosi*, *Cladosporium carrioni*, *C. fulvum*, *Verticillium dahlie*, *Oidium lycopersicum*, *Sphaerotheca fuliginea*, *S. pannosa*, *Alternaria dauci*, *A. solani*, *A. tenuissima*, *A. triticina*, *Colletotrichum* sp, *Curvularia* sp, *Fusarium lini*, *F. oxysporum*, *F. semitectum*, *F. udum*, *Aschochyta* sp, *Botrytis cinerea*, *Phoma limgan*, *Phytophthora cinnamomi*, *Phytium ultimum*, *Ulocladium cucurbitae*, *Rhodoturula minuta*, *cryptococcus albidus* (Yoshida, 1987; San Blas, 1989, 1993; Sánchez, 1993,1995; Reimers, 1993; Singh, 1990).

2.4.7.4 Mecanismo acción de la alicina en bacterias

In vitro, se han reconocido las propiedades antimicrobianas de la alicina, pero también contribuyen los ajoenes y el trisulfuro de dialilo. Se considera que la alicina tiene actividad antimicrobiana porque modifica la biosíntesis de los lípidos y síntesis de RNA de los microorganismos y disminuye el perfil de lípidos, este compuesto activo reacciona rápidamente con grupos tiol libres, por ello se cree que el principal mecanismo antimicrobiano se produce a través de la interacción de alicina con enzimas que contienen grupos tiol, como proteasas y alcohol deshidrogenasas, es decir, la alicina actúa inhibiendo ciertas enzimas de los microorganismos que contienen el grupo tiol como es el caso del glutatión reductasa dejándola inservible para regular la carga oxidativa que se genera durante el metabolismo celular

incrementándose los radicales libres que conllevan a la muerte celular (Rahman, 2007; Tortora, 2007).

2.4.7.5 Mecanismo de acción de la alicina en hongos

Este compuesto actúa a través de la disminución del consumo de oxígeno, reduciendo el crecimiento del organismo e inhibiendo la síntesis de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos que ocasionan daños a la membrana (Corrales y Reyes, 2014).

2.4.7.6 Mecanismo de acción del ajoene en hongos

Parece estar asociado a perturbaciones que se originan en la integridad de la membrana plasmática, al inducir cambios en su composición lipídica, incrementando el contenido relativo de esteroides e induciendo fuertes cambios en la composición fosfolipídica (Ledezma y Apitz-Castro, 1998).

2.5 Uso del extracto de ajo (*A. sativum*) para mastitis bovina

Arteaga *et al.* (2016) Demostraron en un trabajo en el que se evaluaron cuatro tipos de tratamiento a base de extractos comerciales de oleo resina de ajo y oleo resina de orégano y el tratamiento que mostró mayor efectividad frente a un número de UFC de *Staphylococcus aureus* en cuartos mamarios de vacas fue la de 6 ml de oleo resina de ajo + 1 ml oleo de resina de orégano, esto demuestra que la aplicación con una mayor concentración de ajo y baja en orégano ocasiona más eficacia contra esta bacteria.

Moscoso (2011) Señaló que la aplicación de 20 por ciento de tintura de ajo (concentración máxima en su estudio), disminuye la carga microbiana (en especial *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*), en la leche de una manera más eficiente.

2.6 Resistencia bacteriana a los antibióticos

La resistencia bacteriana a los antibióticos es creciente día a día y por ende la búsqueda de nuevos principios activos que actúen en los principales microorganismos causantes de enfermedades, tanto en el hombre como en los animales, es creciente (Duarte, 2006).

La resistencia antibiótica es considerada como un fenómeno progresivo caracterizado por una defensa parcial o completa de los microorganismos al efecto antibiótico; el origen de esto se debe principalmente al uso indiscriminado e irracional de los antibióticos, así como la implementación de dosis incorrectas o aplicaciones con una duración inapropiada en las terapias (Bastos *et al.*, 2011).

Así mismo, unos de los principales inconvenientes de la terapia con antibióticos es que, además de ser utilizados por su acción terapéutica en el tratamiento de las infecciones intramamarias, también son administrados con fines profilácticos en la prevención de la enfermedad durante el secado de los animales, entre una lactancia y la siguiente. Esta práctica favorece la selección de cepas resistentes en la población microbiana e influye negativamente en el tratamiento de la enfermedad (Calvinho *et al.*, 1991).

Estudios realizados muestran que la multiresistencia bacteriana está vinculada a la existencia de menos barreras para la transferencia de genes de resistencia entre

bacterias de diferentes géneros y familias (Heisig *et al.*, 1995). Siendo los mecanismos de resistencia la modificación enzimática del antibiótico, bomba de salida, cambio en la permeabilidad de membrana externa, y alteraciones del sitio de acción (Tafur *et al.*, 2008).

Estudios realizados en la terapia de mastitis con antibióticos, notificaron los mayores porcentajes de resistencia para penicilina (40,3-47,6 por ciento), estreptomicina (20-58 por ciento), eritromicina (2-13 por ciento) y oxacilina (0-2 por ciento) (Pellegrino *et al.*, 2011; Villanueva y Morales, 2017).

2.7 Impacto económico de la mastitis bovina en la ganadería lechera

Es considerada una enfermedad altamente prevaleciente en el ganado lechero, y es una de las más importantes que afecta mundialmente la industria lechera, pues ocasiona pérdidas económicas considerables a todos los productores de leche en el mundo y los costos asociados esta enfermedad, incluyen disminución de la producción y calidad de la leche, leche descartada, aumento en los costos de tratamiento y servicios veterinarios, compra de antibióticos, trabajo extra, descarte de animales y ocurrencia de enfermedades contaminantes (Cerón-Muñoz *et al.*, 2002; Halasa *et al.*, 2007; Tomasinsig *et al.*, 2010; Wellenberg *et al.*, 2002).

Se considera que esta enfermedad representa el 70 por ciento de los gastos totales para los ganaderos lecheros (Bradley y Green, 2001; Dos Santos *et al.*, 2002). Usualmente es tratada o prevenida con antibióticos intramamarios; representando una carga económica muy alta para los productos de leche en todo el mundo. Las pérdidas mundiales, anuales debido a mastitis, se han estimado en 35 billones de dólares americanos (Wellenberg *et al.*, 2002; O'Flaherty *et al.*, 2005).

2.8 Definición de mastitis bovina

La mastitis es un proceso inflamatorio de la glándula mamaria, causada por diversidad de agentes microbiológicos los cuales invaden este órgano cuando el proceso de ordeño se realiza en forma deficiente provocando un proceso inflamatorio el cual se manifiesta en diversos grados, sobreagudo, subclínico y crónico, caracterizado por cambios en el tejido glandular y cambios físicos y químicos de la secreción láctica, además, también puede ser de origen traumático y tóxico (Contreras y Rodríguez, 2011; Seegers *et al*, 2003; Zhao y Lacasse, 2008; Ramírez *et al.*, 2001; Andresen, 2001).

Se caracteriza por la migración de células somáticas, principalmente neutrófilos polimorfonucleares (PMN), a la glándula mamaria y por un aumento en el contenido de proteasa en la leche producida (Kerr y Wellnitz, 2003).

La mastitis bovina puede clasificarse de acuerdo al grado de inflamación y las lesiones locales e implicaciones sistémicas en la vaca, pueden ser: mastitis clínica y mastitis subclínica, es decir, puede ser acompañada de signos clínicos o no (Bedolla, 2017; Fernández *et al.*, 2012).

2.8.1 Mastitis subclínica

La mastitis subclínica se caracteriza por la presencia de un microorganismo en combinación con un conteo elevado de células somáticas en leche, esta puede desarrollar fácilmente una inflamación y no tener tratamiento (Gallegos y Moncada, 2011). Este tipo de mastitis no presenta cambios visibles en la leche o ubre, se percibe una reducción en el rendimiento, composición alterada y la presencia de componentes inflamatorios y bacterias en la leche (Bedolla, 2017).

Esta presentación de la enfermedad es la más persistente en el ganado lechero; ocurre frecuentemente, y puede conducir a grandes pérdidas económicas no solo por la reducción de la producción, también por los elevados conteos de células somáticas presentes en el tanque de leche (Ariznabarreta *et al.*, 2002). En la práctica, los casos de mastitis subclínica con frecuencia no son detectados rápidamente, o pueden incluso no ser reconocidos por el ordeñador (Wellenberg *et al.*, 2002).

2.8.2 Mastitis clínica

La mastitis clínica es definida como una anormalidad en la glándula mamaria de la vaca o la leche, que puede ser fácilmente observada (Tollersrud *et al.*, 2000).

Se caracteriza por la tumefacción o dolor de la ubre, enrojecimiento de la misma, la leche puede presentar una apariencia anormal y, en algunos casos, hay un aumento de la temperatura rectal, letargo, anorexia e incluso la muerte, además, las bacterias están presentes en la leche lo que reduce el rendimiento y la calidad considerablemente (Heringstad *et al.*, 2000).

La mastitis clínica puede presentarse de forma aguda y se caracteriza por su aparición súbita. En la forma crónica, se presenta una infección de larga duración, con leche de apariencia anormal y/o cambios al realizar la palpación del tejido sobre la ubre (Schrick *et al.*, 2001).

2.8.3 Etiología

Se han identificado aproximadamente 140 especies causantes de mastitis, que se dividen en patógenos contagiosos y ambientales; dentro de los primeros, los

principales son *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* y *Mycoplasma spp*; siendo su principal vía de entrada el canal del pezón (Radostits *et al.*, 2002).

2.8.3.1 Patógenos contagiosos

Los patógenos contagiosos, tienen su hábitat en la glándula mamaria bovina y se transmiten de ubre a ubre principalmente durante el ordeño (Fernández *et al.*, 2012).

Estos microorganismos se han adaptado a las condiciones de la ubre, desarrollando estrategias para evadir el sistema inmune y permanecer en la mama (Bradley y Green, 2001).

La principal causa de infección intramamaria en los rumiantes es *Staphylococcus aureus* (Mullarky *et al.*, 2001; Zadoks, 2002). No es un patógeno obligado de la ubre, ya que se puede encontrar también en lesiones de la piel de los pezones, en las manos de los ordeñadores, en las camas en los equipos de ordeño (Calderón y Rodríguez, 2008).

Streptococcus agalactiae, *Streptococcus uberis*, y *Streptococcus dysgalactiae* son las especies frecuentemente identificadas, otra especie de estreptococos, el *Streptococcus parasanguinis*, ha sido implicado en las infecciones de la glándula mamaria (Las Heras *et al.*, 2002).

Existen varias especies de *Mycoplasma* que afectan al ganado bovino y las siguientes: *M. bovis*, *M. alkalensens*, *M. arginini*, *M. bovigentialum*, *M. californicum*, *M. canadense*, *M. capricolum*, *M. boviherinis*, *M. dispar*, grupo bovino 7 y F-38 y que pueden causar mastitis en las vacas lecheras (Radostits *et al.*, 2002).

2.8.3.2 Patógenos ambientales

Los patógenos ambientales, su reservorio principal es el ambiente donde permanecen los animales y no las glándulas mamarias infectadas, son *Streptococcus* ambientales y en menor medida coliformes (Fernández *et al.*, 2012).

A diferencia de los contagiosos son transmitidos entre las ordeñas por el ambiente que sirve como la fuente primaria de estos organismos. Los patógenos principales de este grupo son bacilos entéricos Gram-negativos y Gram-positivos como: *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, y *Enterococcus spp* (Bedolla *et al.*, 2007; Rossitto *et al.*, 2002).

Las principales levaduras causantes de mastitis son *Cryptococcus neoformans* y *Candida albicans* (Fernández *et al.*, 2012).

2.8.4 Métodos de tratamiento

El éxito de un tratamiento antibacteriano contra la mastitis, está determinado por una elección adecuada del antibiótico, teniendo en cuenta la resistencia de la bacteria y las regulaciones farmacocinéticas. Debe alcanzarse una concentración efectiva antibacterial en el tejido, de acuerdo con el patógeno que se trate y durante un periodo adecuado de tiempo. Básicamente para la terapia antibacterial de mastitis se recomiendan: β -lactámicos, aminoglicósidos, lincosamidas, macrólidos, tetraciclinas, polipéptidos, trimetoprim-sulfonamidas combinadas, quinolonas. Condiciones para la administración de sustancias antibióticas efectivas es la vía parenteral o en su caso mediante infusión intramamaria (Wolter *et al.*, 2004).

El control más efectivo para la mastitis se logra mediante medidas preventivas. El tratamiento no es un sustituto. Para controlar una infección durante la lactancia, el tratamiento debe ir acompañado de una identificación de la causa de la infección, entre las pruebas que deben realizarse están: la prueba de California y el cultivo de muestras de leche (Carrión, 2001).

2.8.4 Métodos de detección de la mastitis bovina

2.8.5 Observación y palpación de la ubre

La infección puede provocar inflamación de un cuarto o de toda la glándula, aumento de la temperatura, enrojecimiento y dolor en el área afectada, estos eventos provocan que el sistema inmune del animal actúe tratando de aliviar el problema, además de lograr mantener la infección únicamente en el área afectada sin alterar otros órganos o sistemas del animal. Cuando se encuentran todos o algunos de los signos enumerados se interpreta como un caso de mastitis clínica, además, se encuentran cambios importantes en la leche que produce el tejido afectado, estos cambios pueden ser alteración del color, aparición de grumos, coágulos sanguinolentos o con pus y leche más acuosa (Pérez *et al.*, 2005).

2.8.6 Pruebas físicas

2.8.6.1 Taza probadora

Examine los primeros chorros de leche de cada ordeño sobre un recipiente (strip cup) de fondo oscuro. Los coágulos, escamas, hilos, materia fibrosa, secreciones acuosas, o cambio de color, esto indica que la leche no es normal y que hay problemas probables (Carrión, 2001).

2.8.7 Pruebas químicas

2.8.7.1 Conductividad eléctrica de la leche (PCE)

Se basa en el aumento de conductividad eléctrica de la leche debido a su mayor contenido electrolítico especialmente iones de sodio y de cloro, se ha desarrollado como un método para monitorear el estado de la mastitis en la vaca (Medina y Montaldo, 2003; Norger *et al.*, 2004).

Esta técnica es importante porque mide la lesión, como es el caso del recuento celular. Sin embargo, sus limitaciones probablemente restringen su uso a vacas de producción elevada que se mantienen en rebaños pequeños, o en laboratorios con auto analizadores. Además, en el caso de las mastitis subclínicas, la precisión es solo del 50% en comparación con los métodos estándar (Radostits, 2002).

2.8.7.2 Papel indicador de mastitis

Este método, consiste en un papel sobre el que se hace caer directamente del pezón algunas gotas de leche, se consideran sospechosas las leches que dan una coloración correspondiente a un pH igual o superior a 7. La prueba descubre el 50 por ciento de las leches infectadas (Charles, 1984).

2.8.7.3 Prueba Whiteside

La mezcla de leche con un solución de NaOH al 4 por ciento ocasiona que la leche se gelifique formando grumos que son visibles. Los grumos serán más grandes conforme la leche contenga mayor número de células somáticas. Para hacer más visible la reacción es conveniente usar un placa de acrílico negra que pueda tener dibujada 4 cuadros de 3cm x 3cm, uno por cada cuarto (Ávila, 1984; Pérez, 1986).

2.8.8 Pruebas biológicas

2.8.8.1 Prueba California para Mastitis (CMT)

La prueba consiste en el agregado de un detergente a la leche, el alquilauril sulfonato de sodio, causando liberación del ADN de los leucocitos presentes en la ubre y este se convierte en combinación con agentes proteicos de la leche en un gelatina. A mayor presencia de células se libera una mayor concentración de ADN, por lo tanto mayor será la formación de gelatina, traduciéndose en nuestra lectura e interpretación del resultado como el grado más elevado de inflamación (Smith, 1990; Saran y Chaffer, 2000; Medina y Montaldo, 2003).

Desafortunadamente esta prueba es muy subjetiva y tiene que hacerse al lado de la vaca durante el ordeño (lo que interfiere con el manejo del ordeño). Posee una sensibilidad del 97 por ciento y una especificidad del 93 por ciento (Pérez, 1986; Bedolla *et al.*, 2007).

2.8.8.2 Prueba de Wisconsin para Mastitis (WMT)

Se utiliza una solución similar a la que se emplea con la prueba de California (CMT), pero en contraste con esta última, los resultados se miden cuantitativamente dependiendo de la viscosidad, no cualitativamente o de estimarla a ojo de buen cubero como en la CMT (Fernández, 1997; Bedolla, 2004).

2.8.8.3 Monitoreo del conteo de células somáticas

El contenido de células somáticas en la leche nos permite conocer el estado funcional y de salud de la glándula mamaria en periodo lactante; debido a su estrecha relación con la composición de la leche, es un criterio de calidad muy importante (Wolter *et al.*, 2004; Bedolla, 2004).

El conteo de células somáticas (CCS) es la medición más ampliamente utilizada para supervisar el estado inflamatorio de la glándula mamaria, y puede ser realizada en la leche de: cuartos individuales, vacas individuales, de un grupo de vacas o de todos los grupos de vacas (Philpot, 2001; Bedolla 2004).

2.8.8.4 Métodos de conteo electrónico celular

Los métodos electrónicos tienen en la actualidad una aplicación universal, sobre todo en laboratorios de control lechero o dedicados al diagnóstico o investigación de la mastitis, utilizándose aparatos de recuentos celulares como el Fossomatic (Foos Electric, Dinamarca) y el Counter Coulter (Coulter, Inglaterra) (Saran y Chaffer, 2000; Bedolla *et al.*, 2007).

El Fossomatic basa su cálculo en la tinción fluorimétrica del material nuclear, mientras que el Counter Coulter cuenta el número de impulsos electrónicos resultantes de las partículas que pasan entre dos electrodos (Djabri *et al.*, 2002). Es decir, cuenta partículas de un diámetro determinado, que para el caso serían las células, pero en el rango de recuento entrarían otras partículas, aumentando ligeramente el valor en comparación con el Fossomatic (Saran y Chaffer, 2000; Bedolla *et al.*, 2007).

El Fossomatic consiste en el filtrado de una solución de leche mezclada con detergente (Triton X-100 EDTA) a través de una membrana con poros finos. Un procedimiento colorimétrico basado en la reacción con el ADN que está relacionado directamente con el número de células presentes en la muestra inicial (Djabri *et al.*, 2002; Bedolla, 2007).

Procedimiento: se coloca una muestra, 5 ml de leche a 40° C. en el Fossomatic se tiñen las células somáticas con un colorante fluorescente para obtener una reacción solo con el ADN. Es por eso que las partículas sucias y los glóbulos de los lípidos no se suman al número de las CCS. La muestra pasa frente a una luz especial y un detector registra cada célula somática. Entre cada muestra el aparato limpia su sistema de flujo para evitar el efecto del arrastre de una muestra a otra. Todas estas funciones son automáticas (Carrión, 2001).

2.8.9 Pruebas bacteriológicas

Los cultivos de laboratorio son necesarios para identificar los organismos específicos que se encuentran comprendidos en un caso clínico de mastitis y para distinguir los animales de aquellos que presentan un caso subclínico. La fidelidad de los resultados depende de los cuidados sanitarios que se tengan durante la toma de muestras y su manipulación posterior (Pérez *et al.*, 2005).



Figura 5. Establo “Llocee” S.A. de C.V.

3.1 Materiales

Para el experimento se utilizaron:

- 2 kg de ajo
- 6 litros de agua estéril
- 250 ml de cloro al 4.5 por ciento
- 1 Mortero
- Licuadora
- 2 recipientes de vidrio
- 4 frascos ámbar de 250 ml
- Gasas estériles
- Papel filtro
- 130 cánulas
- 200 g de algodón estéril
- 1 jeringa 60 ml
- 20 jeringas 5 ml
- 10 jeringas 10 ml
- 500 ml de alcohol

Para el experimento se utilizaron un total de 50 vacas Holstein, las cuales se asignaron a 2 grupos de manera aleatoria: Grupo Ajo (GA) el tratamiento consistió en extracto acuoso de ajo y Grupo Testigo (GT) tratamiento a base de antibióticos convencionales establecidos en el protocolo de la explotación.

3.2 Preparación del extracto acuoso de ajo (*Allium sativum*).

Para obtener el extracto acuoso se pelaron los bulbos de ajo, con un posterior lavado general con agua destilada, seguido con una desinfección utilizando hipoclorito de sodio a una concentración de 200 ppm durante 5 minutos. Acto seguido se realizó otro enjuague de los bulbos con suficiente agua estéril, esto para retirar el hipoclorito residual. Posteriormente se procedió a la trituración de 10 dientes de ajo, utilizando para ellos una licuadora, con recipientes de vidrio estériles, en presencia de una mínima cantidad de agua destilada estéril (5ml), el resultado de este proceso fue una masa de consistencia pastosa, inmediatamente se procedió a moler con un mortero para lograr la ruptura de mayor cantidad de células de ajo con el propósito de que la alicina se libere de la vacuola y entre en contacto con la enzima alicinasa que se encuentra en el citosol, esto para que estas dos sustancias pudieran reaccionar y formar el compuesto activo con propiedades biológicas que es la alicina. Luego de obtenido el triturado, éste fue filtrado en dos etapas: una a través de una gasa plegada varias veces, para retirar los residuos más groseros, y la siguiente, empleando papel filtro (25 μ mm), realizando la filtración tres veces. Para su empleo fue disuelto en 50 ml de agua destilada. El extracto final estéril fue transferido a un envase, previamente esterilizado, para su conservación a 4°C (máximo 6 días) hasta su empleo (Chalar y col., 2014; García y Herrera, 2007). Considerando los materiales utilizados el costo por tratamiento es a razón de ¢ 0.81 por día. En el presente experimento se utilizaron dosis de 5 ml cada 24 horas por tres días el costo total del tratamiento es de \$ 2.43.

3.3 Metodología del experimento

El estudio se llevó a cabo en vacas de dos a tres lactancias, de cero a 90 días en leche y con mastitis clínica (Grado 2 o moderada), vacas que presentaron cambios organolépticos en leche como: grumos en la leche, leche aguachenta, color amarillo, con inflamación leve y dieron positivo a la Prueba California (CMT) y un conteo promedio de 1, 339,694 células somáticas/mililitro.

Cuadro 2. Grado de afección dependiendo el número de células somáticas en leche por ml en la prueba California (tomado de Ruiz, 1996).

Reacción	Células somáticas/ml de leche
Negativo	0-200,000
Traza	150,000-500,000
Grado 1	400,000-1,500,000
Grado 2	3,000,000-5,000,000
Grado 3	>5,000,000

Después, se procedió a asignar los animales a los grupos anteriormente mencionados. Todas las vacas se ordeñaron al final como protocolo de todas las explotaciones con las vacas positivas a mastitis clínica. Se cuidó que se ordeñaran de manera adecuada, y al término de la ordeña se exprimía los pezones de forma manual.

Posteriormente, se realizó el empleo de los tratamientos, vacas del Grupo ajo (GA), se procedió a hacer asepsia del pezón con un algodón impregnado de alcohol al 70 por ciento. Con la ayuda de una cánula intramamaria y una jeringa de 5 ml, se aplicó

el extracto acuoso de ajo en cada cuarto afectado, cada 24 horas por un lapso de tres días. Grupo testigo (GT), se usaron antibióticos de forma parenteral β -lactámicos, quinolonas, y aminoglicósidos en infusión intramamaria

De acuerdo a protocolos de la explotación, las vacas que no respondieron al tratamiento con el extracto de ajo al tercer día, se sometieron a tratamientos con antibióticos antes ya mencionados.

Así mismo, al cuarto día se evaluaron los resultados del tratamiento, para esto se recurrió a la Prueba California (CMT) y Conteo de Células Somáticas (CCS).

3.4 Análisis estadístico

Los datos sobre la efectividad de los tratamientos, fueron analizados por medio de X^2 (Prueba de Chi Cuadrado) para identificar diferencias ($P < 0.05$) entre las proporciones de sanas de cada uno de ellos, después de tres días de administración de los tratamientos.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuadro 3. Resultados de tratamiento con extracto acuoso de ajo (*Allium sativum*) y tratamiento con antibiótico convencional después de tres días de tratamiento, en vacas Holstein positivas a prueba de California.

Tratamiento	Total de vacas tratadas	Vacas que sanaron	P	Vacas enfermas	% de enfermas
Grupo ajo	25	16 (64 %)	> 0.05	9	36 %
Grupo Testigo	25	19 (76 %)		6	24 %

Los resultados que se obtuvieron corresponden a 16 vacas sanas en el grupo ajo (GA) que representa un 64 por ciento de efectividad del extracto acuoso de ajo y 9 (36 por ciento) vacas que siguieron enfermas que no mostraron reacción alguna al tratamiento. Por otro lado, el resultado del tratamiento convencional (GT) es de 19 (76 por ciento) vacas sanas y 6 (24 por ciento) vacas enfermas.

Una vez obtenidos todos los resultados de los tratamientos 1 y 2, estos fueron analizados con X^2 donde se observó que estadísticamente no hay diferencias en ambos tratamientos ($P > 0.05$).

El promedio de células somáticas/ml en los dos tratamientos, cuadro 4, cabe mencionar que la diferencia en el promedio de células somáticas en las vacas sanas del tratamiento 1 y 2 hay una diferencia de 33,939 CCS/ml respectivamente, se observa que en el tratamiento 1 la reducción es mucho más que en el tratamiento 2, en cambio las vacas que siguieron enfermas después de los tratamientos (3 días), el promedio de células somáticas es mucho más alta en el tratamiento 1, esto puede

ser por alguna reacción adversa al extracto acuoso de ajo (*Allium sativum*), que aún se desconoce.

Cuadro 4. Conteo de células somáticas/ml (promedio) en vacas Holstein positivas a prueba de California antes y después del tratamiento con extracto acuoso de ajo (*Allium sativum*) y antibiótico convencional.

Tratamiento	CCS Antes de tratamiento	CCS después de tratamiento	CCS sanas	CCS enfermas
Grupo ajo	1,258,542	576,200	63,438	1, 487,778
Grupo testigo	1,417,600	145,680	97,377	297,500

Estos resultados coinciden parcialmente con los reportados por Arteaga *et al.*, (2016); Moscoso (2011) en tratamiento y prevención de mastitis bovina, pero estos autores utilizaron compuestos del ajo mezclados con otros productos.

Los animales que no respondieron al tratamiento (GA) mostraron un alto conteo celular somático con modificación organoléptica de la secreción láctea, se consideran como negativos al tratamiento.

IV. CONCLUSIÓN

En la presente investigación se logró demostrar la hipótesis. El uso del extracto acuoso del ajo (*Allium sativum*) usado como infusión intramamaria, demostró tener una efectividad de 64 por ciento. Además, se de ser un producto de bajo costo (\$2.43.⁰⁰), de fácil preparación y materia prima fácil de obtener.

V. RECOMENDACIONES

El uso del extracto acuoso del ajo (*Allium sativum*), es una alternativa que puede usarse, en las explotaciones lecheras en las cuales la resistencia bacteriana a los antibióticos es creciente, por lo que se tiene que prolongar los tratamientos y el tiempo de retiro de la leche resulta en más días y ocasiona pérdidas económicas significativas a la explotación.

En las vacas que no mostraron reacción alguna al extracto en los 3 días de tratamiento y que incrementaron el recuento de células somáticas se recomienda prolongar el tratamiento por 5 días y acortar los rangos de aplicación del extracto a 12 horas.

En aquellas vacas que no hubo respuesta favorable se sugiere realizar pruebas de aislamiento bacteriano en muestras de leche y determinar la posible resistencia.

Determinar la estabilidad del ingrediente activo (alicina) del ajo en la leche para ver si existen residuos del antibiótico, que puedan repercutir en la salud pública.

VI. LITERATURA CITADA

1. Alonso, J. 2007. Tratado de fitofármacos y nutraceuticos. Editorial CORPUS. Argentina.
2. Andresen, S. H. 2001. Mastitis: prevención y control. Rev Inv Vet Perú. 12: 55-64.
3. Ariznabarreta, C., Gonzalo, C. and San Primitivo, F. 2002. Microbiological quality and somatic cell count of ewe milk with special reference to Staphylococci. J. Dairy Sci. 85: 1370-1375. En línea: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030202742033> consultado 22/06/18.
4. Arroyo-Lara, A., Landín-Grandvallet, L. A., Alonso-Bustamante, A., Sánchez-Aguilar, M. A. y Suárez-Franco, G. 2015. Actividad inhibitoria de *Allium cepa* y *Allium sativum* sobre cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella enteritidis*. Revista Científica Biológico Agropecuaria Texpan. 3: 1045-1052.
5. Arteaga, F., Hurtado, E. y Dueñas H. 2016. Extractos de *Allium sativum* y *Origanum vulgare* como reductores de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, causales de mastitis subclínica. Rev. Unell. Cienc. Tec. 34: 20-24.
6. Ávila, T. S. 1984. Producción intensiva de ganado lechero. Anatomía y Fisiología de la glándula mamaria. Editorial Continental. México: 139-157.
7. Bastos, O. M., Damé, L. F., de Souza, L., Almeida, D. B., Alves, M. R. y Braga, J. R. 2011. Actividad antimicrobiana de aceite esencial de *Origanum vulgare* L. ante bacterias aisladas en leche de bovino. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 16: 260-266.

8. Bedolla, C. C., Castañeda, V. H. y Wolter, W. 2007. Métodos de detección de la mastitis bovina. REDVET. 8: 1-17.
9. Bedolla, C. C. 2004. Métodos de detección de la mastitis bovina. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Mimeo. 8.
10. Bedolla, C. C. 2017. Etiología de la mastitis bovina. Entorno ganadero BM editores. 80: 1-7.
11. Bender-Bojail, D. y Bárcenas-Pozos, M. E. 2013. El ajo y sus aplicaciones en la conservación de alimentos. Temas selectos de ingeniería de alimentos. 7: 25-36.
12. Bradley, A. J. and Green, M. J. 2001. Adaptation of *Escherichia coli* to the bovine mammary gland. J. Clin. Microbiol. 39: 1845-1849.
13. Calderón, A. y Rodríguez, V. C. 2008. Prevalencia de mastitis bovina y su etiología infecciosa en sistemas especializados en producción de leche en el altiplano cundiboyacense (Colombia). Rev Colomb Cienc Pecu. 21: 582-589.
14. Calvino, L. F., Delgado, A. R., Vitulich, C. A., Occhi, H. L., Canavesio, V. R., Zurbriggen, M. A. y Tarabla, H. D. 1991. Susceptibilidad *in vivo* a los antimicrobianos de microorganismos aislados a partir de mastitis clínicas en tambos de la cuenca lechera santafesina. Vet. Arg. 8: 677-680.
15. Carrión, G. M. 2001. Principios básicos para el control de la mastitis en granjas y el mejoramiento de la calidad de leche. Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional-Michoacán, Departamento de Recursos Naturales Programa de Apoyo a la Ganadería Regional: 28-30.

16. Cerón-Muñoz, M., Tonhati, H., Duarte, J., Olivera, J., Muñoz-Berrocal, M. and Jurado-Gómez H. 2002. Factors affecting somatic cell counts and their relations with milk and milk constituent yield in buffaloes. *J. Dairy Sci.* 85: 2885-2889.
17. Chalar, V. L., Moya, M. J., Vargas, A. E., Sejas, R. M. y Romero, B. 2014. Función antimicrobiana de la alicina de ajo en cultivos de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. *Revista Científica Ciencia Médica.* 17: 26-28.
18. Charles, A. 1984. *Ciencia de la leche. Principios de técnica lechera.* Editorial CECSA, México: 310.
19. Contreras, G. A. and Rodríguez J. M. 2011. Mastitis: comparative etiology and epidemiology. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 16: 339-356.
20. Córdoba, L. L. 2010. Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.): Implicaciones analíticas. Tesis de grado. Universidad Politécnica Nacional. Santa Cruz Xococotlán, Oaxaca.
21. Corrales, R. I. y Reyes, P. J. 2004. Actividad antimicrobiana y antifúngica de *Allium sativum* en estomatología. *Revista* 16 de abril. 254: 59-68.
22. Djabri, B., Barrielle, N., Beaudeau, F. and Seegers, H. 2002. Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: a meta-analysis. *Vet. Res.* 33: 335-357.
23. Dos Santos, N. J., Netto, K. R., Gentilini, E., Sordelli, D. and Fraire, B. M. 2002. Phenotypic and genetic characterization of bacteriocin-producing strains of *Staphylococcus aureus* involved in bovine mastitis. *Veterinary Microbiology.* 85: 133-144.

24. Duarte, T. M. 2006. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. MultiCiencia. 7: 1-16.
25. Fernández del Río, J. A. 1997. Mastitis: calidad y eficiencia en la producción de leche. Manual de procedimientos para la ordeña. Virbac. Departamento técnico: 13-18.
26. Fernández, B. O., Trujillo, G. J., Peña, C. J., Cerquera, G. J. y Granja, S. Y. 2012. Mastitis bovina: generalidades y métodos de diagnóstico. REDVET. 13: 1-20.
27. Fujisawa, H., Suma, K., Origuchi, K., Kumagai, H., Seki, T. and Ariga, T. 2008. Biological and chemical stability of garlic-derived allicin. J. Agric. Food. Chem. 56: 4229-4235.
28. Gallegos, A. y Moncada, J. N. 2011. Uso de extractos de semillas de cítricos para el control de la mastitis bovina. Universidad Michoacana San Nicolás de Hidalgo.
29. García, R. R. y Herrera, A. F. 2007. Evaluación de la inhibición del crecimiento de cinco cepas bacterianas patógenas por extractos acuosos de *Allium sativum*, *Allium fistulosum*, *Allium cepa*: estudio preliminar in vitro. Revista de la Facultad de Ciencias Básicas. 5: 68-79.
30. García, G. L. y Sánchez-Muniz, F. J. 2000. Revisión: efectos cardiovasculares del ajo (*Allium sativum*). Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 50: 219-229.
31. González, R. 2004. Evolución del contenido de Alicina durante la conservación poscosecha, para el empleo de *Allium sativum* L. en la elaboración de alimentos funcionales. Tesis de Grado. Universidad Nacional de Cuyo. Facultad de Ciencias Agrarias.

32. González, M. M., Guerra, I. G., Maza, H. J. y Cruz, D. A. 2014. Revisión bibliográfica sobre el uso terapéutico del ajo. *Revista Cubana de Medicina Física y Rehabilitación*. 6: 61-71.
33. Granados, P. 2003. *Microbiología*. 1ª edición. Editorial Paraninfo. España.
34. Greco, F. M. 2011. Estudio de procesos de deshidratación industrial de ajo con la finalidad de preservar alicina como principio bioactivo. Tesis de Grado. Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza, Argentina.
35. Gurley, B. J., Gardner, S. F., Hubbard, M. A., Williams, D. K., Gentry, W. B., Cui, Y. and Ang. C. Y. 2005. Clinical assessment of botanical supplementation on cytochrome P450 phenotypes in the elderly: St. John's wort, garlic oil, *Panax ginseng* and *Ginkgo biloba*. *Drugs Aging*. 22: 525-539.
36. Halasa, T., Huijps, K., Østerås, O. and Hogeveen, H. 2007. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. *Veterinary Quarterly*. 29: 18-31.
37. Heringstad, B., Klemetsdal, G. and Ruane, J. 2000. Selection for mastitis resistance in dairy cattle: a review with focus on the situation in the Nordic countries. *Livestock Production Science*. 64: 95-106.
38. Heisig, P., Kratz, B., Halle, E., Gräser, Y., Altwegg, M., Rabsch, W. and Faber, J. P. 1995. Identification of DNA gyrase a mutation in ciprofloxacin-resistant isolates of *Salmonella typhimurium* from men and cattle in Germany. *Microbial Drug Resistance*. 1: 211-218.
39. Kerr, D. E. and Wellnitz, O. 2003. Mammary expression of new genes to combat mastitis. *J Anim Sci*. 3: 38-47. En línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15000405> consultado 22/06/18.

40. Kuettner, E. B., Hilgenfeld, R. and Weiss, M. 2002. The active principle of garlic at atomic resolution. *J. Biol. Chem.* 277: 46402-46407.
41. Kumar, P. R. and Pranay, J. 2010. Antimicrobial activity of *Allium sativum* ethanolic extract against food associated bacteria and fungi. *Drug invention today.* 2: 229-232.
42. Lanzotti, V. 2006. The analysis of onion and garlic. *J. Chromatogr.* 1112: 3-22.
43. Las Heras, A., Vela, A., Fernández, E., Legaz, E., Domínguez, L. and Fernández-Garayzábal, J. F. 2002. Unusual outbreak of clinical mastitis in dairy sheep caused by *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. *J. Clin. Microbiol.* 40: 1106-1108.
44. Lawson, L. D. 1993. Bioactive organosulfur compounds of garlic and garlic products: role in reducing blood lipids. *American Chemical Society*, 21: 306-330.
45. Lawson, L. D. and Hughes, B. G. 1992. Characterization of the formation of allicin and other thiosulfinates from garlic. *Planta Medica.* 58: 345-350.
46. Lawson, L., Wang, Z. and Hughes, B. 1991. Identification and HPLC quantitation of sulfides and dialk(en)yl thiosulfinates in commercial garlic products. *Planta Médica.* 57: 363-370.
47. Lawson, L. D. and Wang, Z. J. 2005. Allicin and allicin –derived garlic compounds increase breath acetone through allyl methyl sulfide: use in measuring allicin bioavailability. *J. Agric. Food Chem.* 53: 1974-1983.
48. Ledezma, E. y Apitz-Castro, R. 1998. Del folklora al mecanismo molecular: el ejemplo del ajoene. *Interciencia.* 23: 227-231.

49. López, P. J. 2011. Observación de la actividad antimicrobiana del ajo (*Allium sativum*) en el laboratorio de educación secundaria. Rev. Eureka. 8: 491-494.
50. López, L. T. 2007. El ajo. *Ámbito farmacéutico*. Fitoterapia. 26: 77-81.
51. Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, M. J. y Tuñón, M. J. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.* 12: 271-278.
52. Medina, C. M. y Montaldo, V. H. 2003. El uso de la prueba de conductividad eléctrica y su relación con la prueba de California para mastitis. CNM. V Congreso Nacional de Control de Mastitis. Aguascalientes, México. 29-31 de mayo.
53. Mendez, L. L. and Castaigne, F. 2008. Effect of temperature cycling on allinase activity in garlic. *J. Food Chem.* 111: 56-60.
54. Moscoso, B. F. 2011. Evaluación de diferentes concentraciones de tintura de ajo como sellador de ubres post ordeño para mejorar la calidad de la leche en cuatro fincas de la parroquia Ingapirca de la provincia del Cañar. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Tesis de grado. Riobamba, Ecuador.
55. Mullarky, I. K., Su, C., Frieze, N., Park, Y. H. and Sordillo, L. M. 2001. *Staphylococcus aureus agr* Genotypes with enterotoxin production capabilities can resist neutrophil bacterial activity. *Infect. Immun.* 69: 45-51.
56. Norberg, E., Hogeveen, H., Korsgaard, I. R., Friggens, N. C., Sloth, KHMN. And Løvendal, P. 2004. Electrical Conductivity of Milk: Ability to Predict Mastitis Status. *J. Dairy Sci.* 87: 1099-1107.
57. O'Flaherty, S., Ross, R. P., Flynn, J., Meaney, W., Fitzgerald, G. F. and Coffey, A. 2005. Isolation and characterization of two anti-staphylococcal

- bacteriophages specific for pathogenic *Staphylococcus aureus* associated with bovine infections. Letters in Applied Microbiology. 41: 482-486.
58. Pellegrino, M. S., Frola, I. D., Odierno, L. M. and Bogni, C. I. 2011. Mastitis bovina: resistencia a antibióticos de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de leche. REDVET. 12: 1-14.
 59. Pérez, D. M. 1986. Manual sobre ganado productor de leche. Editorial Villicaña S. A., México: 710-744.
 60. Pérez, C. G., Bedolla, C. C. y Castañeda, V. H. 2005. Importancia del conteo de células somáticas en la cría sustentable de vacas productoras de leche. Sustentabilidad. Universidad de Guadalajara, Jalisco., México. 3: 86-94.
 61. Phillips, I., Casewell, M., Cox, T., De Groot, B., Friis, C., Jones, R., Nightingale, C., Preston, R. and Waddell, J. 2004. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 53: 28-52.
 62. Philpot, W. N. 2001. Importancia de la cuenta de células somáticas y los factores que la afectan. III Congreso Nacional de Control de Mastitis y Calidad de la Leche. Junio de 2001. León, Guanajuato, México: 26.
 63. Radostits, O. M., Gay, C. C., Blood, D. C. y Hinchcliff, K. W. 2002. Medicina Veterinaria. Mastitis bovina. 9a edición. McGraw-Hill. Madrid, España.
 64. Rahaman, K. 2003. Garlic and aging: new insights into an old remedy. Ageing Research Reviews. 2: 39-56.
 65. Ramírez-Concepción, H., Castro-Velazco, L. y Martínez-Santiago, E. 2016. Efectos terapéuticos del ajo (*Allium sativum*). Salud y Administración. 3: 39-47.

66. Ramírez, N., Gaviria, G., Arroyave, O., Sierra, B. y Benjumea, J. 2001. Prevalencia de mastitis en vacas lecheras lactantes en el municipio de San Pedro de los Milagros, Antioquia. *Rev Col Cienc Pec.* 14: 76-87.
67. Reimers, F., Smolka, E. S., Werres, S., Schumacher-Plank, K. and Wagner, G. 1993. Effect of Ajoene, a compound derived from *Allium sativum*, on phytopathogenic and epiphytic micro-organisms. *J. Plant Dis. Protec.* 100: 622-633.
68. Rivlin, R. 2001. Historical perspective on the use of garlic. *American Society for Nutritional.* 951S-954S.
69. Rossitto, P. V., Ruiz, L., Kikuchi, Y., Gleen, K., Luiz, K., Watts, J. L. and Cullor, S. 2002. Antibiotic susceptibility patterns for environmental streptococci isolated from bovine mastitis in central California Dairies. *J Dairy Sci.* 85: 132-138.
70. Ruiz, S. A. 1996. Presencia de mastitis subclínica en ocho hatos de la periferia de Uruapan, Michoacán en bovinos productores de leche. Tesis profesional. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. Pp. 35-38.
71. Saini, V., McClure, J. T., Léger, D., Keefe, G. P., Scholl, D. T., Morck, D. W. and Barkema, H. W. 2012. Antimicrobial resistance profiles of common mastitis pathogens on Canadian dairy farms. *J. Dairy Sci.* 45: 4319-4332.
72. San Blas, G., San Blas, F., Gil, F., Mariño, L. and Apitz-Castro, R. 1989. Inhibition of growth of the Dimorphic Fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by Ajoene. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 33: 1641-1644.

73. San Blas, G., Mariño, L., San Blas, F. and Apitz-Castro, R. 1993. Effect of ajoene on dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Med. Vet. Mycol.* 31: 133-141.
74. Sánchez, M., Gil, F. y Apitz-Castro, R. 1993. Efectos inhibitorios y alteraciones ultra estructurales producidas por Ajoene sobre el crecimiento in vitro de los hongos dematiáceos: *Cladosporium carrionii* y *Fonsecaea pedrosoi*. *Rev. Iberoamericana de Micología.* 10: 74-78.
75. Sara, A. y Chaffer, M. 2000. Mastitis y calidad de leche. Editorial Inter-Médica. Buenos Aires, Argentina: 194.
76. Schrick, F. N., Hockett, M. E., Saxton, A. M., Lewis, M. J., Dowlen, H. H. and Oliver, S. P. 2001. Influence of subclinical mastitis during early lactation on reproduce parameters. *J. Dairy Sci.* 84: 1407-1412. En línea: [https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(01\)70172-5/pdf](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(01)70172-5/pdf) consultado 22/06/18.
77. Seegers, H., Fourichon, C. and Beaudeau, F. 2003. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet. Res.* 34: 475-491.
78. Singh, U. P., Pandey, N. V., Wagner, G. K. and Singh, K. P. 1990. Antifungal activity of Ajoene, a constituent of garlic (*Allium sativum*) *Can. J. Bot.* 68: 1354-1356.
79. Smith, B. P. 1990. Large Animal Internal Medicine. St Luis, Missouri: The C. V. Mosby Co.
80. Stauffer, A., Orrego, A. y Aquino, A. 2000. Selección de extractos vegetales con efecto fungicida y/o bactericida. *Rev. Cienc. Technol.* 1: 29-33.

81. Tafur, D., Torres, J. y Villegas, M. 2008. Mecanismo de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Infect Colombia*. 12: 217-226.
82. Tollersrud, T., Kenny, K., Reitz, A. J. and Lee, J. C. 2000. Genetic and serologic evaluation of capsule production by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus* and other *Staphylococcus spp.* from Europe and the United States. *J. Clin. Microbiol.* 38: 2998-3002.
83. Tomasinsig, L., De Conti, G., Skerlavaj, B., Piccinini, R., Mazzilli, M., D'Este, F., Tossi, A. and Zanetti, M. 2010. Broad-spectrum activity against bacterial mastitis pathogens and activation of mammary epithelial cells support a protective role of neutrophil cathelicidins in bovine mastitis. *Infect. Immun.* 78: 1781-1778.
84. Tortora, J. G., Funke, B. R., Case, C. L. 2007. Introducción a la microbiología. 9ª edición. Editorial Panamericana. Madrid, España.
85. Villagómez, A. A. y Mercado, S. E. 2008. Cuantificación de fructanos en bulbo de ajo pardillo.
86. Villanueva, T. G. y Morales, C. S. 2017. Resistencia antibiótica de patógenos bacterianos aislados de mastitis clínica en bovinos de crianza extensiva. *REDVET*. 18: 1-12.
87. Wellenberg, G. J., Van der Poel, W.H.M. and Van Oirschot, J. T. 2002. Viral infections and bovine mastitis: a review. *Elsevier Veterinary Microbiology*. 88: 27-45.
88. Wolter, W., Castañeda, H., Kloppert, B. y Zschock, M. 2004. Mastitis bovina. Prevención, diagnóstico y tratamiento. Editorial Universitaria. Universidad de Guadalajara, Jalisco. 16: 62-72.

89. Yoshida, S., Kasuga, S., Hayashi, N., Ushiroguchi, T., Matsuura, H. and Nakagawa, S. 1987. Antifungal activity of ajoene derived from garlic. *Appl Environ Microbiol.* 53: 615-616.
90. Zadoks, R. N. 2002. Molecular and mathematical epidemiology of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis* mastitis in dairy herds. Dissertation Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine: 2-3, 239.
91. Zhao, X. and Lacasse, P. 2008. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. *J. Anim. Sci.* 86: 57-65.