

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA Y ZOOTECNIA**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA**



**TESIS**

**DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA BACTERIANA DE LOS AGENTES  
CAUSALES DE MASTITIS SUBCLÍNICA EN VACAS EN EL DISTRITO DE LANGUI,  
PROVINCIA CANAS, CUSCO**

**PRESENTADO POR:**

Br. FRANK QUISPE HUAMAN

**PARA OPTAR AL TITULO PROFESIONAL DE  
MEDICO VETERINARIO**

**ASESOR:**

Dra. DIANA SANCHEZ HERENCIA

**CUSCO - PERU**

**2024**

## INFORME DE ORIGINALIDAD

(Aprobado por Resolución Nro.CU-303-2020-UNSAAC)

El que suscribe, asesor del proyecto de investigación/tesis titulado DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA BACTERIANA DE LOS AGENTES CAUSALES DE MASTITIS SUBCLÍNICA EN VACAS EN EL DISTRITO DE LANGUI, PROVINCIA CANAS, CUSCO

presentado por: Bach. FRANK QUISPE HUAMAN, con código de estudiante 134825 para optar el título profesional/grado académico de Médico Veterinario.

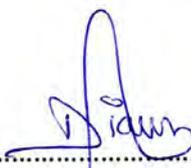
Informo que el trabajo de investigación ha sido sometido a revisión por 01 veces, mediante el Software Antiplagio Turnitin, conforme al Art. 6° del *Reglamento para Uso de Sistema Antiplagio de la UNSAAC* y de la evaluación de originalidad se tiene un porcentaje de 10%

### Evaluación y acciones del reporte de coincidencia para trabajos de investigación conducentes a grado académico o título profesional, tesis

Porcentaje	Evaluación y Acciones	Marque con una (X)
Del 1 al 10%	No se considera plagio.	X
Del 11 al 30 %	Devolver al usuario para las correcciones.	
Mayor a 31%	El responsable de la revisión del documento emite un informe al inmediato jerárquico, quien a su vez eleva el informe a la autoridad académica para que tome las acciones correspondientes. Sin perjuicio de las sanciones administrativas que correspondan de acuerdo a Ley.	

Por tanto, en mi condición de asesor, firmo el presente informe en señal de conformidad y **adjunto** la primera hoja del reporte del Sistema Antiplagio.

Cusco, 9 de Agosto del 2025.

  
.....  
Firma

Post firma DIANA SÁNCHEZ HERENCIA

Nro. de DNI 40854420

ORCID del asesor 0000 - 0001 - 6203 - 5354

### Se adjunta:

1. Reporte generado por el Sistema Antiplagio.
2. Enlace del Reporte Generado por el Sistema Antiplagio: oid: 27259.480349696

# FRANK QUISPE HUAMAN

## DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA BACTERIANA DE LOS AGENTES CAUSALES DE MASTITIS SUBCLÍNICA EN VACAS E

 Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco

### Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid::27259:480349696

97 Páginas

Fecha de entrega

9 ago 2025, 7:38 p.m. GMT-5

21.507 Palabras

Fecha de descarga

9 ago 2025, 7:42 p.m. GMT-5

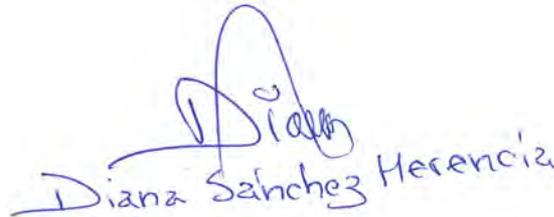
126.788 Caracteres

Nombre de archivo

Tesis Frank 4.pdf

Tamaño de archivo

3.1 MB



Diana Sánchez Herencia

# 10% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

## Filtrado desde el informe

- ▶ Bibliografía
- ▶ Texto citado
- ▶ Texto mencionado
- ▶ Coincidencias menores (menos de 10 palabras)
- ▶ Trabajos entregados

## Exclusiones

- ▶ N.º de fuentes excluidas

## Fuentes principales

- 10%  Fuentes de Internet
- 2%  Publicaciones
- 0%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

## Marcas de integridad

### N.º de alerta de integridad para revisión

-  **Caracteres reemplazados**  
70 caracteres sospechosos en N.º de páginas  
Las letras son intercambiadas por caracteres similares de otro alfabeto.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

## INDICE:

I INTRODUCCIÓN.....	12
II PROBLEMA OBJETO DE LA INVESTIGACIÓN.....	14
III OBJETIVOS .....	14
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	15
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS .....	15
IV JUSTIFICACION .....	16
V HIPOTESIS.....	17
HIPÓTESIS GENERAL.....	17
HIPÓTESIS ESPECÍFICAS.....	17
VI REVISION BIBLIOGRÁFICA.....	18
6.1 ANTECEDENTES.....	18
6.1.1 Agentes causales de la mastitis subclínica .....	18
6.1.2 Resistencia a fármacos de los agentes etiológicos de la mastitis subclínica. ....	19
VII MARCO TEÓRICO.....	23
7.1 Producción de leche.....	23
7.2 Anatomía y fisiología de la glándula mamaria .....	23
7.3 La mastitis bovina .....	25
7.4 Clasificación de la mastitis bovina.....	27
7.4.1 Mastitis subclínica. ....	28
7.5 Agentes etiológicos de la mastitis bovina .....	29
7.5.1 Agentes contagiosos. ....	29
7.5.2 Agentes ambientales. ....	31
7.6 Tinción Gram:.....	33
7.7 Diagnóstico de la mastitis bovina.....	34
7.7.1 Prueba de California Mastitis Test (CMT).....	35

7.7.2 Análisis microbiológico de la leche. ....	35
7.7.3 Medios de cultivo. ....	35
7.8 Sensibilidad y resistencia bacteriana. ....	37
7.8.1 Método de Kirby–Bauer (Método de difusión). ....	37
7.9 Tipos de resistencia antimicrobiana. ....	38
7.10 Mecanismo de acción de los antibióticos. ....	39
7.11 Actividad anti infecciosa de los antibióticos. ....	39
7.12 Política de antibióticos. ....	40
VIII MATERIALES Y METODOS .....	41
8.1 Ámbito de estudio .....	41
8.2 Método de investigación. ....	41
8.3 Diseño de estudio. ....	41
8.4 Diseño de investigación. ....	42
8.5 Población y muestra .....	42
8.5.1 Población .....	42
8.5.2 Muestra .....	42
8.6 Criterios de selección de vacunos. ....	43
8.6.1 Criterios de inclusión .....	43
8.6.2 Criterios de exclusión. ....	43
8.7 Materiales y equipos .....	43
8.7.1 Materiales para recolección de muestras de mastitis. ....	43
8.7.2 Materiales para identificar el agente causal. ....	44
8.7.3 Medios de cultivo .....	44
8.7.4 Reactivos .....	45
8.7.5 Equipos .....	45
8.7.6 Materiales para identificar la resistencia. ....	45

8.8 Metodología .....	45
8.8.1 Diagnóstico de vacas con mastitis subclínica .....	46
8.8.1.1 Prueba de California Mastitis Test (CMT).....	46
8.8.2 Identificación del agente etiológico.....	46
8.8.2.1 Preparación de medios de cultivo bacteriano. ....	47
8.8.3 Identificación de las características macroscópicas de las colonias bacterianas. 48	
8.8.4 Identificación de las características microscópicas de las colonias bacterianas. ..	48
8.8.5 Tinción Gram. ....	48
8.8.6 Identificación de características de las pruebas bioquímicas. ....	49
8.8.6.1 Prueba de la catalasa.....	49
8.8.6.2 Agar eosina y azul de metileno (EMB).....	49
8.8.6.3 Manitol salado.....	50
8.8.6.4 Citrato de Simmons.....	50
8.8.7 Determinación del grado de resistencia antimicrobiana.....	50
8.8.7.1 Antibiograma para agentes etiológicos de la mastitis subclínica.....	51
8.8.8 Análisis de datos. ....	51
IX RESULTADOS Y DISCUSION: .....	53
9.1 Mastitis subclínica en vacas productoras de leche del distrito de Langui. ....	53
9.2 Identificación de las características macroscópicas, microscópicas y bioquímicas de los agentes causales de mastitis subclínica en las comunidades de Chancarani, Radio Urbano y Conde Kjecra del distrito de Langui.....	54
9.2.1 Características macroscópicas de los agentes etiológicos.....	54
9.2.2 Características microscópicas de los agentes etiológicos.....	57
9.2.3 Características bioquímicas de los agentes etiológicos. ....	58
9.3 Identificación de agentes etiológicos de la mastitis subclínica. ....	60

9.4 Resistencia de los agentes etiológicos causantes de la mastitis subclinica.....	61
9.4.1 Resistencia del <i>Staphylococcus aureus</i> .....	61
9.4.2 Resistencia del <i>Streptococcus spp.</i> .....	64
9.4.3 Resistencia de la <i>E. coli</i> .....	66
X CONCLUSIONES: .....	67
XI RECOMENDACIONES: .....	69
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	70
ANEXOS .....	80

## ÍNDICE DE TABLAS:

<b>Tabla 1.</b> Cuadro de procedimientos para cultivo bacteriano .....	47
<b>Tabla 2.</b> Identificación de los agentes etiológicos, según sus características macroscópicas. ....	56
<b>Tabla 3.</b> Identificación de los agentes etiológicos, según sus características microscópicas.....	57
<b>Tabla 4.</b> Identificación de los agentes etiológicos, según sus características bioquímicas. ....	59
<b>Tabla 5.</b> Agentes etiológicos identificados.....	61
<b>Tabla 6.</b> Prueba de sensibilidad para el <i>Staphylococcus aureus</i> .....	63
<b>Tabla 7.</b> Prueba de sensibilidad para <i>Streptococcus spp.</i> ....	65
<b>Tabla 8.</b> Prueba de sensibilidad para la <i>E. coli</i> .....	67

## ANEXOS:

<b>Anexo 1</b> Tabla complementaria 9. Características macroscópicas del <i>Streptococcus</i> spp. ....	87
<b>Anexo 2</b> Tabla complementaria 10. Características microscópicas del <i>Streptococcus</i> ... 88	
<b>Anexo 3</b> Tabla complementaria 11. Características macroscópicas del <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	89
<b>Anexo 4</b> Tabla complementaria 12. Características microscópicas del <i>Staphylococcus aureus</i> .....	90
<b>Anexo 5</b> Tabla complementaria 13. Características macroscópicas de la <i>E. coli</i> .....	91
<b>Anexo 6</b> Tabla complementaria 14. Características microscópicas de la <i>E. coli</i> .....	91
<b>Anexo 7</b> Tabla complementaria 15. Prueba de Resistencia del <i>Streptococcus spp.</i> frente a antibióticos de uso frecuente. ....	92
<b>Anexo 8</b> Tabla complementaria 16. Prueba de resistencia del <i>Staphylococcus aureus</i> frente a antibióticos de uso frecuente. ....	93
<b>Anexo 9</b> Tabla complementaria 17. Prueba de resistencia de la <i>E. coli</i> frente a antibióticos de uso frecuente. ....	94

## ÍNDICE DE FIGURAS:

<b>Figura 1.</b> Sistema de soporte de la ubre de la vaca. ....	24
<b>Figura 2.</b> Los alvéolos y conductos que forman el sistema secretor de leche. ....	25
<b>Figura 3.</b> Progresión de la infección y daño tisular del parénquima mamario en la mastitis. ....	28
<b>Figura 4:</b> Selección aleatoria de vacas en producción del distrito de Langui. ....	80
<b>Figura 5:</b> Identificación de casos de mastitis subclínica mediante la prueba de CMT. ....	80
<b>Figura 6:</b> Recolección de muestras de leche para el cultivo bacteriano. ....	80
<b>Figura 7: A:</b> Pesando el tipo de agar de acuerdo al número de muestras. <b>B:</b> Homogenización del agar y esterilización de las placas petri en autoclave. ....	81
<b>Figura 8:</b> Preparación de medios de cultivo. ....	81
<b>Figura 9: A:</b> Colección de sangre <b>B:</b> Enriquecimiento con sangre de cordero para nutrir el agar sangre a 45° chorro lento. ....	81
<b>Figura 10:</b> Vertiendo el agar ya homogenizado sobre la placa petri. ....	82
<b>Figura 11:</b> Siembra de las muestras de leche sobre placas de agar sangre y agar MacConkey. ....	82
<b>Figura 12:</b> Identificación macroscópica de las colonias de agar sangre y agar MacConkey ....	83
<b>Figura 13:</b> Tinción Gram de las muestras sembradas en las placas petri. ....	83
<b>Figura 14:</b> Tinción Gram, foto microscópica a 100X bacterias Gram positivos <i>Streptococcus spp.</i> ....	83
<b>Figura 15:</b> Tinción Gram, foto microscópica a 100X bacterias Gram positivos <i>Staphylococcus spp.</i> ....	84
<b>Figura 16:</b> Tinción Gram, foto microscópica a 100X, se aprecia bacilos Gram negativos. ....	84
<b>Figura 17:</b> Preparación de medios selectivos. ....	84
<b>Figura 18:</b> Crecimiento de colonias en agar manitol salado. ....	85
<b>Figura 19:</b> Crecimiento de colonias en agar EMB. ....	85
<b>Figura 20:</b> Crecimiento de agar citrato de Simmons. ....	85
<b>Figura 21:</b> Identificación del crecimiento bacteriano en presencia de los discos de sensibilidad. ....	86

## **ACRONIMOS:**

**CMT:** California mastitis test

**WBC:** Recuento de glóbulos blancos

**EMB:** Eosina y azul de metileno

**DS:** Desviación estándar

**NTP:** Norma técnica peruana

**MRSA:** Mastitis por *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina

**FnBPA:** Proteína de unión a fibronectina

**CN:** Gentamicina

**P:** Penicilina

**S:** Estreptomicina

**AUG:** Amoxicilina + ácido clavulánico

**E:** Eritromicina

**ENR:** Enrofloxacin

**SMX:** Sulfametoxazole

**AML:** Amoxicilina

**CTX:** Cefotaxima

**CLSI:** Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico.

## DEDICATORIA

*A Dios y a mis padres, por haberme sostenido en los momentos más difíciles, por darme la fuerza, la sabiduría y el propósito para culminar este camino. Con mucho amor para mis padres; mi madre Sofía, que es mi fortaleza a seguir adelante, y mi padre Pablo, que desde el cielo me guía, acompaña y me inspira a honrar su memoria con cada logro. Este logro también es de ustedes.*

*A mis hermanos y tíos; Guillermo y Eduviges, por ser siempre un ejemplo de fortaleza y responsabilidad, gracias por cada palabra de aliento, por estar cuando más los necesitaba y por creer en mí incluso cuando yo dudaba. Carmen, Vero, Edith y Anali, a ustedes porque son parte de mi historia, mi fuerza y mi raíz. Mis tíos; Dionicio y Barbara, gracias por el apoyo incondicional, su aliento constante, sus palabras y la confianza en mí han sido fundamentales para llegar hasta aquí. Esta meta es también suya.*

## AGRADECIMIENTO

*Agradezco, en primer lugar, a Dios, por darme la vida, la salud y la hermosa experiencia dentro de la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco en especial a la escuela profesional de Medicina Veterinaria sede- Sicuani, por haberme brindado la oportunidad de formarme académicamente.*

*A todos mis docentes, gracias por compartir no solo sus conocimientos, sino también su vocación, paciencia y compromiso con nuestra formación.*

*A mi asesora de tesis: Dra. Diana Sánchez Herencia, le expreso mi más sincero agradecimiento por su guía, paciencia y compromiso a lo largo de este proceso. Gracias por acompañarme con dedicación, por compartir su experiencia, valoro profundamente cada orientación que me ayudó a crecer como profesional y como persona.*

*A mis amigos (as), que me acompañaron durante la elaboración de esta tesis, gracias por su ayuda desinteresada, por sus ideas, sus revisiones, sus consejos y, sobre todo, por su paciencia. Su apoyo no solo fue académico, sino también emocional, y eso marcó una gran diferencia. Esta meta también lleva parte de ustedes.*

*¡Muchas Gracias!*

## RESUMEN

La mastitis subclínica es una de las principales enfermedades en las vacas productoras de leche y que genera considerables pérdidas económicas. El objetivo del presente estudio fue determinar la resistencia bacteriana de los agentes causales de mastitis subclínica en vacas, en el distrito de Langui provincia de Canas – Cusco. Para lo cual, se utilizaron muestras de 220 vacas en producción de las cuales 49 dieron positivo a mastitis subclínica (17,38%), mediante la prueba de California mastitis test (CMT), los agentes etiológicos se identificaron según características macroscópicas, microscópicas y bioquímicas, se hizo la prueba de sensibilidad en la que se utilizaron diferentes antibióticos de uso frecuente en la zona como, ENR5 Enrofloxacina, P10 Penicilina G, S10 Estreptomicina, E5 Eritromicina, CN10 gentamicina, SMX50 sulfametoxazol, AUG30 amoxicilina+ ácido clavulánico, CTX30 cefotaxima y AML30 amoxicilina. En los resultados los agentes etiológicos identificados fueron *Staphylococcus aureus* (46.94%), *Streptococcus spp* (42.86%) y *Escherichia coli* (10.20%). Así mismo, el *Staphylococcus aureus* demostró una resistencia significativa frente a la penicilina G, cefotaxima y amoxicilina, el *Streptococcus spp* demostró también resistencia a cefotaxima y amoxicilina, a diferencia de la *E. coli* que presentó sensibilidad a todos los antibióticos utilizados. Por lo tanto, se concluye que los agentes bacterianos causante de mastitis subclínica son tres y en mayor porcentaje al *Staphylococcus aureus*, seguido del *Streptococcus spp* y *Escherichia coli*, los cuales son resistentes a diferentes antibióticos de uso frecuente en la zona.

*Palabras clave: Agentes etiológicos, mastitis subclínica, resistencia bacteriana, vacas*

## ABSTRACT

Subclinical mastitis is one of the main diseases in dairy cows, causing considerable economic losses. The objective of this study was to determine the bacterial resistance of the causative agents of subclinical mastitis in cows in the Langui district of Canas province, Cusco. For which, samples from 220 cows in production were used, of which 49 tested positive for subclinical mastitis (17,38%), using the California mastitis test (CMT), the etiological agents were identified according to macroscopic, microscopic and biochemical characteristics, the sensitivity test was performed in which different antibiotics frequently used in the area were used, such as ENR5 Enrofloxacin, P10 Penicillin G, S10 Streptomycin, E5 Erythromycin, CN10 gentamicin, SMX50 sulfamethoxazole, AUG30 amoxicillin + clavulanic acid, CTX30 cefotaxime and AML30 amoxicillin. In the results, the etiological agents identified were *Staphylococcus aureus* (46.94%), *Streptococcus spp* (42.86%) and *Escherichia coli* (10.20%). Likewise, *Staphylococcus aureus* demonstrated significant resistance to penicillin G, cefotaxime, and amoxicillin, while *Streptococcus spp.* also demonstrated resistance to cefotaxime and amoxicillin, unlike *E. coli*, which was sensitive to all the antibiotics used. Therefore, it is concluded that there are three bacterial agents causing subclinical mastitis, with the highest percentage being *Staphylococcus aureus*, followed by *Streptococcus spp.* and *Escherichia coli*, which are resistant to various antibiotics commonly used in the area.

*Key words: Etiological agents, subclinical mastitis, bacterial resistance, cows*

## I INTRODUCCIÓN

La crianza de vacunos tiene por finalidad la producción de carne y principalmente la leche, siendo la leche uno de los alimentos necesarios sobre todo para niños y jóvenes por sus altos contenidos de grasa, proteínas, vitaminas y minerales, así mismo, es la materia prima principal para la elaboración de derivados lácteos como la mantequilla, el queso y el yogurt, sin embargo, la calidad nutritiva de la leche depende mucho de las buenas prácticas de manejo y ordeño de las vacas productoras de leche (Ortiz y Olivera, 2014). Los productos lácteos en los últimos años, son ampliamente consumidos formando parte del estilo de vida diaria de las personas (Ortiz et al., 2017). Para tener calidad nutritiva de la leche es importante cuidar y promover la buena salud del sistema mamario de las vacas productoras de leche (Brousett-Minaya et al., 2015).

Contrariamente a lo que exige la (Norma técnica peruana 2016), las alteraciones patológicas e inflamatorias a nivel de la glándula mamaria tienden a afectar la calidad sanitaria y nutritiva de la leche, y estos a su vez son de presentación frecuente en los hatos lecheros a nivel mundial (Bedolla et al., 2020). Por lo que, la mastitis hace referencia a la inflamación de la glándula mamaria que puede ser producido por patógenos contagiosos y ambientales, en menor frecuencia es iniciado por un proceso traumático que sufren las vacas a nivel de las glándulas mamaria (Bolaños et al., 2012) y llega a determinar que la mastitis subclínica es producida por un manejo del vacuno y control sanitario deficiente (Bolaños et al., 2012).

Por lo tanto, la mastitis subclínica tiene un impacto significativo sobre las propiedades fisicoquímicas de la leche, disminuyendo su densidad (1.0258 g/mL), sólidos no grasos (8.14%), lactosa (4.48%), sales (0.68%) y proteína (2.97%), y aumentando el punto de congelación (-0.532°), pH (7.36) y grasas (5.98%) (Vargas, G. 2024).

Sabiendo que la mastitis subclínica es de presentación constante se tiene pruebas diagnósticas como la prueba de california para mastitis test (CMT) que es una prueba de diagnóstico de mastitis en bovinos, es una prueba rápida y sencilla que se realiza en el campo, permitiendo identificar la presencia de mastitis subclínica en cada cuarto de la ubre de una vaca, funciona agregando un reactivo a la leche, que causa la liberación del ADN de los leucocitos presentes en la ubre y a la mezcla se presenta como un compuesto gelatinoso el cual indica el grado de mastitis presente en el cuarto de la ubre (Escobedo et al., 2021).

Para el tratamiento de la mastitis se utilizan con frecuencia antibióticos  $\beta$ -lactámicos, aminoglicósidos y fluoroquinolonas, en la cual la investigación reporta resistencia de antibióticos de vacas con mastitis causada por *Staphylococcus aureus* las cuales presentan resistencia al tratamiento con penicilina G en mayor porcentaje (Quispe et al., 2020). Esta resistencia podría deberse al ingreso incompleto del antibiótico a través de la glándula mamaria y a la sobrevivencia de las bacterias en el interior de las células, así mismo, se reportaron mayor resistencia a penicilina, cefalosporinas y tetraciclinas (Villanueva y Siever, 2017), también se reportaron casos de mastitis por *Staphylococcus aureus* resistentes a eritromicina y gentamicina (Quispe et al., 2020).

El presente trabajo de tesis se realizó viendo la necesidad de identificar a los microorganismos causantes de mastitis subclínica en el distrito de Langui – Canas - Cusco, así como determinar la susceptibilidad que poseen frente a varios antibióticos de uso frecuente en la zona. Estos datos serán de gran utilidad como base científica para implementar programas de control y prevención de mastitis subclínica y así evitar contribuir con el incremento de la resistencia antimicrobiana y sobre todo evitar pérdidas económicas a todos productores de leche de toda la zona local.

## II. PROBLEMA OBJETO DE LA INVESTIGACIÓN

La mastitis bovina y principalmente la mastitis subclínica es una de las enfermedades de presentación muy frecuente y muchas veces no es diagnosticada correctamente debido a su desarrollo imperceptible, causando así considerables pérdidas económicas en la producción de leche. La variada etiología bacteriana genera la necesidad de realizar pruebas diagnósticas de laboratorio para su identificación de manera previa al tratamiento (Ashraf y Imran, 2018). Adicionalmente, en los últimos años se viene teniendo varios reportes sobre la resistencia bacteriana a los fármacos antimicrobianos de uso frecuente, esto debido al uso indiscriminado de estos fármacos y muchas veces a dosis por debajo de su concentración inhibitoria mínima (Quispe et al., 2020), esto genera la necesidad de realizar pruebas de resistencia hacia los antibióticos de uso común con la finalidad de elegir de manera más eficiente el antibiótico a utilizar para el tratamiento de la mastitis subclínica.

Se reportaron alrededor de 135 patógenos que tienen el potencial de causar la mastitis, sin embargo, solamente un limitado grupo de microorganismos contagiosos y ambientales llegan a causar el 85 % de todas las mastitis y el restante 15 % de casos es producido por hongos, algas, etc. (Celis, 2017).

Uno de los problemas para el diagnóstico y tratamiento de las vacas es la identificación del tipo de mastitis, ya que Esta enfermedad tiene un origen infeccioso y no infeccioso, destacándose su etiología bacteriana, presenta un curso clínico y subclínico, la mala calidad del agua, las lactancias por periodos largos y el estrés constituyen factores de riesgo para su presentación (Valdivia et al., 2023).

En otro reporte se destaca la importancia de la elevada coinfección de *Mycoplasma spp* y *S. aureus* por su repercusión potencial en el comportamiento clínico-epidemiológico de la mastitis bovina (Ramírez et al.,2023). Por lo tanto, es necesario realizar estudios epidemiológicos y paralelamente

generar nuevas alternativas de tratamiento e implementar programas de control y prevención previo estudio de susceptibilidad del o los microorganismos causantes de mastitis en vacas lecheras; así mismo, se debería hacer estudios epidemiológicos paralelos.

### **III. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GENERAL**

Determinar la resistencia bacteriana de los agentes causales de mastitis subclínica en vacas, en el distrito de Langui, provincia de Canas – Cusco.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

Identificar los agentes causales de mastitis subclínica en vacas del distrito de Langui.

Analizar la resistencia de los agentes causales de mastitis subclínica en vacas del distrito de Langui.

#### **IV. JUSTIFICACION**

Teniendo en cuenta que la mastitis subclínica es una enfermedad que puede ocasionar una serie de problemas graves tales como la disminución de la producción y la baja calidad de leche, y que esto genera el aumento de los costos de tratamiento, ya que esta presentación de mastitis subclínica es la más persistente en el ganado lechero por que no se da de manera visible, y el mal diagnóstico, así como el uso incorrecto de los antibióticos viene a promover la resistencia bacteriana hacia los fármacos utilizados para el tratamiento de la mastitis subclínica (Ashraf y Imran, 2018).

La determinación de resistencia bacteriana en mastitis subclínica nos facilitara, brindar un buen tratamiento ya que la mastitis es una enfermedad bacteriana común en las explotaciones lecheras, si bien se dispone de conocimientos sobre la mastitis y su manejo y tratamiento óptimos, algunos productores lecheros aún utilizan antibióticos de forma inapropiada, el uso de antibióticos por parte de los productores puede verse influenciado por restricciones y motivaciones personales, pero cabe suponer que también influyen factores externos (Poizat et al., 2017).

La cuenca lechera del distrito de Languí – Canas – Cusco posee un total de 1054 vacunos según la encuesta municipal 2020, entre ellas vacas productoras de leche que por lo general son ordeñadas manualmente y en donde además no se tiene implementado ningún programa de control y prevención de enfermedades, es necesario poder identificar los agentes etiológicos causante de las enfermedades más preponderantes y en este caso específico de la mastitis subclínica, para luego analizar su grado de resistencia frente a diversos fármacos de uso habitual en la zona. Los resultados del presente trabajo de tesis podrán ser utilizados como un estudio base para conocer los agentes etiológicos de presentación frecuente y el estado actual de la resistencia hacia fármacos de uso frecuente, conociendo estos datos se podrá dar la debida importancia a la mastitis subclínica bovina y así dar sustento a la implementación de programas de control y prevención de esta enfermedad en el distrito de Languí, con la finalidad de evitar pérdidas económicas en los criadores de vacas

productoras de leche y así también poder fomentar el uso y dosificación correcta de los antibióticos y evitar el uso indiscriminado de estos mismos, para así poder frenar los problemas graves de resistencia a antibióticos utilizados para mastitis subclínica. Los cuales tienen repercusión en la salud animal y salud humana, de esta manera también asegurar la calidad sanitaria de la leche para el consumidor.

## **V. HIPOTESIS**

### **HIPÓTESIS GENERAL**

Existen agentes causantes de mastitis subclínica y que estos logren tener resistencia a fármacos de uso frecuente en vacas productoras de leche del distrito de Langui.

### **HIPÓTESIS ESPECÍFICAS**

Podría existir agentes bacterianos que causen mastitis subclínica en vacas productoras de leche del distrito de Langui.

Podría haber algún desarrollo de resistencia de los agentes bacterianos a fármacos de uso frecuente en vacas productoras de leche del distrito de Langui.

## VI. REVISION BIBLIOGRÁFICA

### 6.1 ANTECEDENTES

#### 6.1.1 Agentes causales de la mastitis subclínica

Un estudio realizado en Trujillo, utilizando 35 vacas productoras de leche demuestra que *E. coli*, *Klebsiella sp.* y *Staphylococcus aureus* fueron los agentes etiológicos más frecuentes (Rodríguez y Muñoz, 2017).

El estudio realizado en el departamento de Chiquimula – Guatemala, en el cual se diagnosticó 965 vacas mediante la prueba de california mastitis test (CMT). Se identificó con mayor frecuencia los agentes etiológicos como *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Enterobacterias* (Celis, 2017).

Se realizó un estudio, en la cual se diagnosticó mastitis subclínica en 220 vacas productoras en 42 fincas ganaderas de leche mediante la prueba de california mastitis test (CMT) en la comunidad de Paquiestancia cantón de Cayambe – Ecuador, se reportó como agentes etiológicos más frecuentes al *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Staphylococcus epidermis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus* y *Corynebacterium* (Bonifaz y Colango, 2016).

Otro estudio realizado en Lurín – Lima, Se evaluaron 586 vacas Holstein sin cuadros de mastitis clínica durante la estación de verano, Este estudio reportó la presencia de *Streptococcus agalactiae* (9.1%), *Staphylococcus aureus* (7.8%) y *Escherichia coli* (6.2%) en muestras de leche de vacas diagnosticadas con mastitis subclínica mediante CMT (Miranda y Morales-Cauti 2022).

El estudio realizado en 386 vacas en producción en el cantón Montúfar, provincia del Carchi, en Ecuador; con el objetivo de determinar la prevalencia, agentes causales y factores de riesgo

asociados a la mastitis bovina se utilizó la prueba de California Mastitis Test (CMT). En el cual se identificó patógenos como el *Staphylococcus aureus*, *Enterobacterias* y *E. coli*; sin embargo, no se logró determinar la presencia de *Mohos* y *Levaduras* (Ormaza y Rueda, 2021).

#### 6.1.2 Resistencia a fármacos de los agentes etiológicos de la mastitis subclínica.

Se hizo un estudio que tuvo como objetivo evaluar la incidencia de mastitis bovina subclínica mediante la prueba de California Mastitis Test (CMT) en la hacienda Tasinteo-Pillaro. Para lo cual se realizó identificación de agentes etiológicos y antibiograma, realizado en 34 vacas en producción en el cual se determinó una mayor frecuencia de presentación de la *E.Coli* y el *Staphylococcus spp*, los cuales fueron sensibles a la cefalexina, medianamente sensible al cefadroxil y completamente resistente al rifampin (Velez, 2022).

La investigación realizada en 36 vacas en Popayan – Colombia, el cual tuvo como objetivo caracterizar los patógenos causantes de mastitis bovina, clínica y subclínica por medio de pruebas especializadas en dos fincas de distintas condiciones climáticas se tuvo como resultado que los patógenos predominantes fueron, *Staphylococcus aureus* y con menor presentación: *E. coli*, *Citrobacter diversus* y *Klebsiella oxytoca*. Y que los microorganismos de la finca 1 presentan mayor resistencia a la cefalexina, amikacina, penicilina, ampicilina y amoxicilina + ácido clavulánico, mientras que los animales de la finca 2 presentan mayor resistencia a la amikacina y en menor medida a la ampicilina y amoxicilina + ácido clavulánico (Realpe, 2022).

Un estudio realizado en Lurín – Lima, evaluando unas 586 vacas en producción se logró identificar a la *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, y *Streptococcus agalactiae* como patógenos frecuentes causantes de la mastitis subclínica, adicionalmente, se reporta que la *Klebsiella oxytoca* es resistente a Penicilina, Cefalotina, Amikacina, Estreptomina, Tetraciclina, Gentamicina, Cefalexina y Enrofloxacin, el *Enterobacter cloacae* fue resistente a Penicilina, Amikacina, Estreptomina,

Tetraciclina, Gentamicina, Cefalexina y Enrofloxacin, y para el *Streptococcus agalactiae* se reportó resistencia a la Penicilina, Cefalotina, Estreptomina, Gentamicina, Cefalexina y Enrofloxacin (Miranda y Morales 2022).

El *Staphylococcus spp*, es uno de los patógenos más importantes causantes de mastitis subclínica bovina. Un estudio tuvo como objetivo identificar fenotípicamente aislamientos de *Staphylococcus spp*, obtenidos de leche bovina y ver la resistencia a antibióticos por la técnica Kirby Bauer, Para la cual se clasificaron en 101 cepas mediante pruebas fenotípicas. En la cual se determinó que un total 65 cepas son de *Staphylococcus aureus* y que estas presentan resistencias a la eritromicina, tetraciclina, clindamicina, una resistencia intermedia a kanamicina, una baja resistencia a la cefotaxima y una muy baja resistencia sulfametoxazol y trimetoprima (Jiménez et al., 2020).

Otro estudio realizado en Huamanga – Ayacucho en 94 vacas en producción, Con el objetivo de evaluar la resistencia antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* causantes de la mastitis bovina. Se realizó el aislamiento, identificación y el antibiograma de las bacterias en estudio para determinar la resistencia frente a cinco antibióticos. Las muestras fueron recolectadas en el fundo Allpachaca de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga utilizando la prueba de California Mastitis Test (CMT), demostraron que el *Staphylococcus agalactiae* presenta resistencia frente a Penicilina, Cefalexina y Sulfatrimetoprima, contrariamente fueron sensibles a la Tetraciclina y amoxicilina + ácido clavulánico, por otro lado, el *Staphylococcus aureus* resulto ser resistente a la penicilina, amoxicilina + ácido clavulánico y contrariamente fueron sensibles a Cefalexina, Tetraciclina y Sulfatrimetoprima (Quispe et al., 2020).

Se hizo un estudio en dos lecherías en el municipio de Caluco, Sonsonate, El Salvador, en 120 vacas productoras. Con el objetivo de determinar la eficacia de tres marcas de selladores de pezón sobre la incidencia de mastitis subclínica bovina mediante la prueba de California para el diagnóstico de mastitis (CMT). Se identificó al *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* y *E. coli* como los

patógenos de presentación frecuente; así mismo, estas bacterias demostraron ser fuertemente resistente a la Penicilina G, a la Ampicilina y a fármacos de la familia de los aminoglucósidos, betalactámicos y quinolonas (Inestroza et al., 2020).

Otro estudio realizado en 586 vacas productoras de leche de 4 establos lecheros de Lurín se logró determinar que el *Streptococcus agalactiae* presenta resistencia a la penicilina, a la cefalotina, a la estreptomina y a la tetraciclina, así mismo, la *Klebsiella oxytoca* presenta resistencia a la penicilina, a la cefalotina, a la amikacina, a la estreptomina, a la tetraciclina, a la gentamicina a la cefalexina y a la enrofloxacin, finalmente, el *Enterobacter cloacae* presenta resistencia total a la Penicilina, resistencias parciales a la cefalotina, a la tetraciclina, a la gentamicina, a la cefalexina y a la enrofloxacin (Miranda, 2018).

Se determinó la frecuencia y susceptibilidad antimicrobiana de bacterias causantes de mastitis en bovinos de un establo del distrito de Conache, Trujillo, Perú; de 35 vacas en producción, el estudio menciona que *E. coli* presentó una susceptibilidad intermedia a Oxaciclina y Rifampicina y el *Staphylococcus aureus* presentó resistencia a Ampicilina y susceptibilidad intermedia a Clindamicina y Eritromicina (Rodríguez y Muñoz, 2017).

El proyecto de estudio realizado en 139 vacas en producción en Lurín, el cual tuvo como objetivo determinar la resistencia a antibióticos que desarrollan los agentes bacterianos. se logró identificar como agentes etiológicos más frecuentes al *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Bacillus sp*, *Bacillus subtilis* y *Criobacter freundii*, adicionalmente se reportó que el *Staphylococcus aureus* presentaba resistencia frente a la Penicilina y el *Streptococcus agalactiae* presentó resistencia frente a Cefalexina, Penicilina y Cefalotina (Villanueva y Siever, 2017).

El estudio realizado menciona que los agentes etiológicos como *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Staphylococcus epidermis*, *Escherichia coli* cepa 1, *Micrococcus* y *Corynebacterium* vienen desarrollando resistencia a estreptomicina, amoxicilina, cefalexina, tetraciclina y gentamicina (Bonifaz y Colango, 2016).

Se realizó un estudio en 670 vacas en producción en la que se determinó los agentes bacterianos y el perfil de resistencia en la mastitis subclínica de vacas que abastecen los 8 centros de acopio del municipio del Sauce y Tecuaname La Paz centro (León). Y se diagnosticó mediante la prueba de mastitis de california (CMT). En la cual identificó al *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella sp*, *Staphylococcus coagulasa negativo*, *E. coli* y *Streptococcus spp* como los principales agentes patógenos causantes de la mastitis subclínica, adicionalmente, se observó que los antibióticos más efectivos para este grupo de bacterias fue la enrofloxacina, seguido de la Ciprofloxacina y la gentamicina (Chavarría y Meléndez, 2012).

## **VII MARCO TEÓRICO**

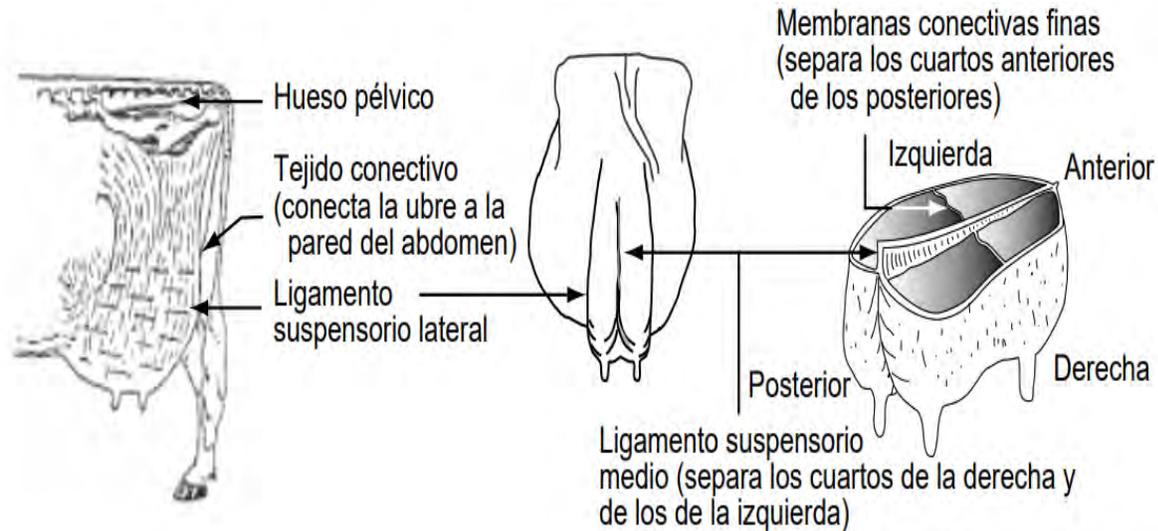
### **7.1 Producción de leche**

La leche, es un alimento imprescindible para el desarrollo y el crecimiento de los terneros, la primera etapa de vida es fundamental, para el bienestar, el rendimiento y la productividad a lo largo de la vida (Costa et al., 2016). La leche es una emulsión de grasa en agua que contiene aproximadamente 87% de agua, 4% de lactosa, 3.5% de proteínas y 4% de grasa y está compuesta de glóbulos grasos suspendidos en una fase acuosa que también contiene lactosa, sales minerales, proteínas y vitaminas, por tanto, las principales proteínas son las caseínas que forman micelas coloidales en la leche (Gamboa, 2023). Las características físico – químicas y composición de la leche de vaca varían debido a varios factores como la raza, estado de salud, época de lactación y la alimentación (Alvarado, 2012).

### **7.2 Anatomía y fisiología de la glándula mamaria**

Anatómicamente la glándula mamaria, se divide en dos secciones internas muy evidentes (derecha e izquierda), separadas por el ligamento suspensorio medio, que provee el soporte primario de la ubre. Dicho ligamento es elástico y está adherido a la pared abdominal, estas dos secciones están divididas por una fina membrana, convirtiéndola en cuarto delantero y cuarto trasero, además, la glándula mamaria posee también otras estructuras de soporte como la piel, que la protege del ambiente exterior y evita que se balancee excesivamente de lado a lado; los ligamentos suspensorios laterales, que se adhieren a la pelvis y no son elásticos, y finalmente la lamellae septa, que son bandas de tejido conectivo, que van entre el ligamento suspensorio medio y los laterales (Experiencia veterinaria, 2020). Los cuartos delanteros se encuentran separados de los cuartos traseros por un septo de tejido conectivo poco aparente y contrariamente los cuartos derechos e izquierdos se encuentran separados de forma clara por el ligamento suspensorio medio (Boeris et al., 2016). Según

la capacidad de producción de leche, los cuartos traseros se encuentran más desarrollados y producen el 60 % de total de la leche y los cuartos delanteros relativamente poco desarrollados llegan a producir el 40 % de la leche total (Wattiaux, 1998).

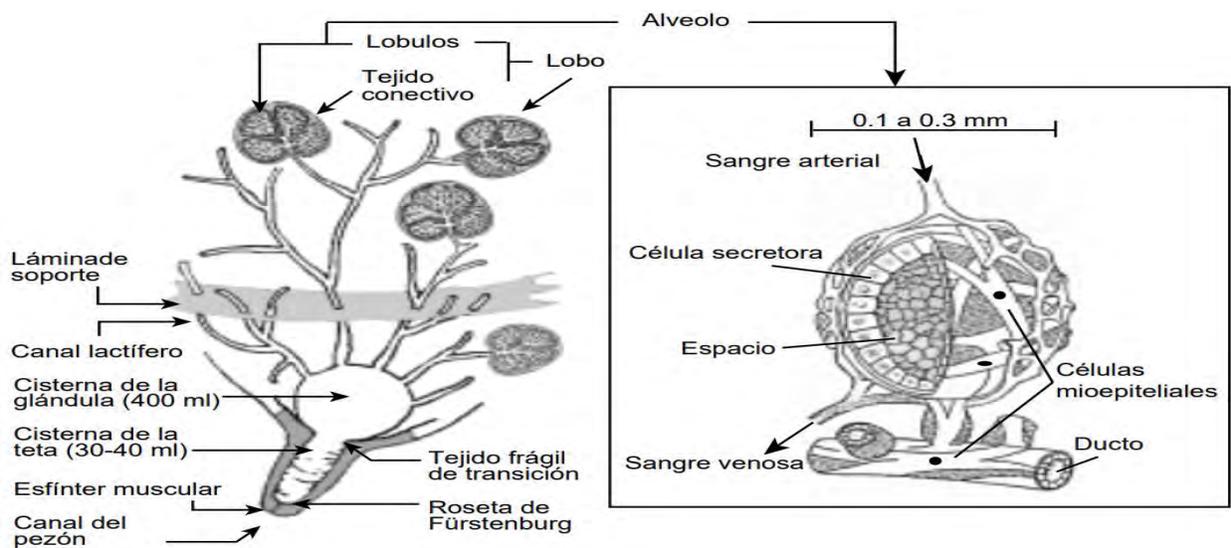


**Figura 1.** Sistema de soporte de la ubre de la vaca.

Adaptado de Wattiaux, M. (1998) Instituto Babcock para la investigación y desarrollo internacional de la industria lechera. Universidad de Wisconsin-Madison, USA.

Cada uno de los cuartos mamarios finalizan en un pezón que tiene una longitud entre 7 y 8 cm, compuestas por un plexo venoso y ramas nerviosas que facilitan su función, la pared de los pezones posee cuatro capas que son la epidermis constituida de una capa de células muertas queratinizadas, seguido de la dermis que posee vasos sanguíneos y estructuras nerviosas, se continúa con fibras musculares dispuestas longitudinal, oblicua y transversalmente, y el endotelio que recubre los vasos sanguíneos (Boeris et al., 2016).

El pezón posee una cisterna que tiene continuidad con la cisterna de la glándula mamaria, esta cisterna glandular posee capacidad entre 40 a 100 gramos, cada una de las cisterna se continúa con 10 a 12 conductos mayores que se ramifican hasta alcanzar de manera progresiva los lóbulos secretores que contienen lobulillos y estos a su vez se encuentran conformados por 150 a 220 alvéolos, que vienen a ser las unidades funcionales ya que se encuentran tapizados por células epiteliales con función secretora de leche (Boeris et al., 2016).



**Figura 2.** Los alvéolos y conductos que forman el sistema secretor de leche.

Adaptado de Wattix, M. (1998) Instituto Babcock para la investigación y desarrollo internacional de la industria lechera. Universidad de Wisconsin-Madison, USA.

La glándula mamaria está formada por una red ramificada de conductos que terminan en los alvéolos, Una mayor ramificación de estos conductos constituye los lóbulos que están formados por los alvéolos, la capa más interna de los alvéolos está formada por células epiteliales que se diferencian y secretan leche después del nacimiento (Macias y Hinck, 2012). La glándula mamaria está formada por dos estructuras principales: el parénquima o tejido glandular (secretor) y el estroma, y el tejido

secretor está formado por los alvéolos, cuya pared está recubierta por un epitelio secretor simple de células cúbicas llamadas lactocitos, situados sobre una membrana basal y rodeados por un sistema capilar arteriovenoso y células mioepiteliales, formando la capa externa de la glándula, y una pequeña población de células madre (Olmos-Hernandez et al., 2020).

### 7.3 La mastitis bovina

La mastitis produce inflamación de los cuartos mamarios, algunas vacas presentan dolor al tacto y la leche se encuentra visiblemente alterada por coágulos, descamaciones y a veces sangre. Con lo que se concluye, que las alteraciones que sufre la leche cuando la vaca presenta mastitis, existe descenso del contenido nutricional, de proteína (3,12%) materia grasa (3.77%) contenido de lactosa (4.14%), inclusive puede perderse la producción cuando se entrega a empresas que tienen mayores exigencias de calidad (Valle-Sánchez et al., 2022). Así mismo, la leche producida por vacas con mastitis subclínica tiene una menor cantidad de caseína, sólidos totales, proteína y grasas en comparación a la leche de las vacas sin mastitis subclínica, esto también puede llegar a afectar negativamente en la alimentación de los terneros, a la alimentación de los humanos que pueden llegar a consumirlo y a la elaboración de productos lácteos (Boeris et al., 2016).

El daño tisular a nivel de la glándula mamaria por causas físicas genera una respuesta inflamatoria, este cuadro inflamatorio viene a denominarse mastitis (Valle-Sánchez et al., 2022). Sin embargo, los agentes infecciosos son los de mayor importancia, siendo los de hallazgo frecuente en las vacas bacterias como el *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Pasteurella sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Nocardia asteroides*, *Mycoplasma bovis*, *Corynebacterium pyogenes*, *Pseudomonas sp.*, *Leptospira sp.*, *Serratia sp.*, *Klebsiella sp.*, *Fusobacterium sp.*; algas, como *Prototheca sp.*; hongos, como *Aspergillus fumigatus*, *Trichosporon sp.* y *Candida sp.*; además de levaduras, como *Cryptococcus neoformans*, etc. (Gasque, 2015). La inflamación de la glándula mamaria generalmente es causada por infecciones

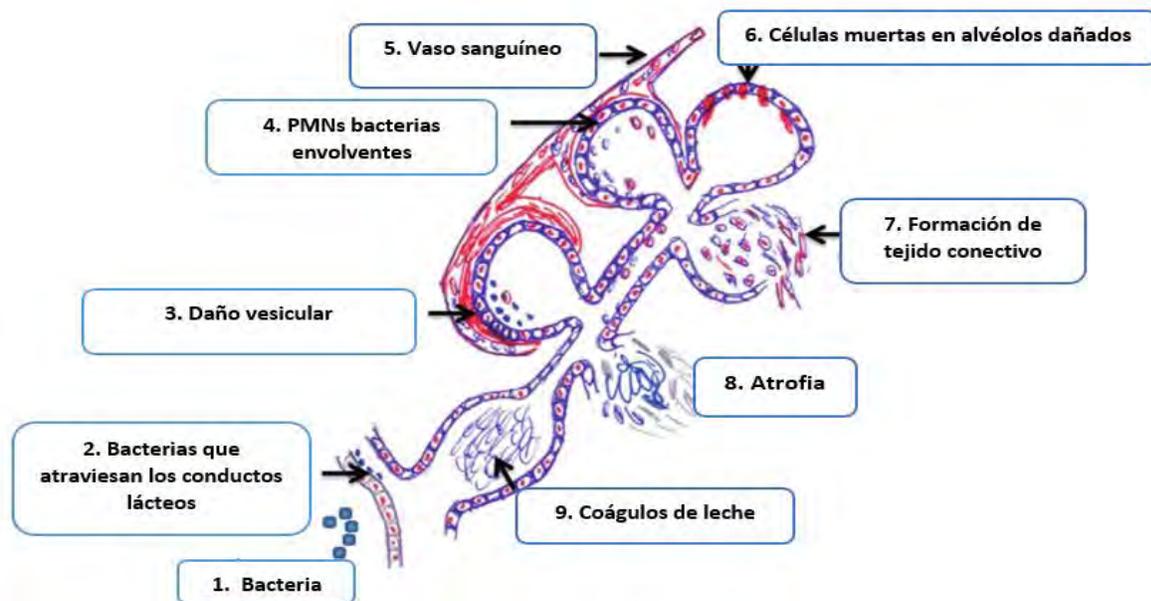
microbianas, Tanto factores bacterianos como reacciones inmunes del huésped contribuyen a este proceso, durante la infección de la glándula mamaria el daño tisular puede ser causado por bacterias y/o sus productos. Ciertas bacterias producen toxinas que destruyen las membranas celulares y dañan las células epiteliales mamarias bovinas, mientras que otras son capaces de invadir y multiplicarse dentro de ellas antes de causar la muerte celular. Simultáneamente se produce la ruptura de la barrera sangre-leche y un influjo en la glándula de células somáticas y neutrófilos polimorfo nucleares entre otras. Cuantas más células inmunes migran, mayor es el daño del epitelio mamario (De Luca et al., 2020). La leche en casos de mastitis tendrá por tanto células somáticas por encima de las 750,000 células somáticas/mL de leche y normalmente según lo recomendado por la (Norma Técnica Peruana 2016), este recuento no debe ser mayor a 500,000 células/ml de leche.

Esta enfermedad es una de las causas más importante de descarte de vacas productoras de leche, alrededor de 21,5 % vacas con problemas a nivel de la ubre son descartadas anualmente (Velásquez y Vega, 2012). Así mismo, la mastitis afecta la eficiencia reproductiva de las vacas, disminuyendo las tasas de concepción, incremento de los días abiertos, aumento del número de servicios por concepción (Espinoza et al., 2023).

#### **7.4 Clasificación de la mastitis bovina.**

Esta enfermedad infectocontagiosa que según criterios clínicos posee dos formas clásicas de presentación: la mastitis clínica que presenta signos clínicos evidentes que hace que pueda ser fácilmente identificable y contrariamente la mastitis subclínica que no presenta signos clínicos evidentes y por ende se requiere el uso de pruebas diagnósticas que faciliten su identificación y tratamiento oportuno (Espinoza et al., 2023). La mastitis se considera la enfermedad de mayor importancia económica y productiva en la cadena de producción de leche bovina (Alfonso et al., 2020). Esta afectación causa pérdidas asociadas a la disminución del rendimiento y la calidad lechera, el aumento del número de tratamientos clínicos a los animales y el desecho temprano de las vacas

(Bedolla et al., 2020). Otra forma de clasificación según criterios de tiempo de duración de la enfermedad lo divide en mastitis aguda, subaguda y crónica (Valle, 2022).



**Figura 3.** Progresión de la infección y daño tisular del parénquima mamario en la mastitis.

Adaptado de Sharma, N., Devi, S., y Bacic, G. (2022). Potential of Stem Cell Therapy to Combat Mastitis in Dairy Animals. In *Stem Cells in Veterinary Science* (pp. 63-76). Singapore: Springer Nature Singapore (Sharma y Bacic, 2022).

#### 7.4.1 Mastitis subclínica.

Viene a ser uno de los mayores problemas silenciosos que producen altos niveles de pérdidas económicas para los criadores de vacas productoras de leche, cambiando el aspecto y la composición fisicoquímica de la leche (Brousett-Minaya et al., 2015). La leche producida se ve afectada por la disminución en el volumen de leche, deterioro de su composición y la presencia de trazas de antibióticos (Shoib et al., 2021). Los principales factores de riesgo relacionado a los vacunos vienen a ser la raza, la edad, el parto, la lactancia, el periodo seco, lesiones previas en los pezones y la resistencia genética; los factores relacionados a los patógenos son los factores de virulencia y el

número de microorganismos en la infección; finalmente, los factores relacionados al manejo se tiene en la higiene de los pezones, el estado de los cobertizos, la higiene ambiental, el tamaño del rebaño, técnicas de ordeño, uso de instrumentos y/o equipos de ordeño de forma poco higiénica e inadecuada (Brousett-Minaya et al., 2015).

## **7.5 Agentes etiológicos de la mastitis bovina.**

Los agentes patógenos de la mastitis se pueden clasificar en dos grupos definidos: los patógenos contagiosos que se transmiten de vacas con mastitis a vacas sanas mediante malas prácticas de higiene al momento del ordeño (García, 2016), en este grupo de patógenos se encuentran el *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma spp* (Shoaib et al., 2021). Contrariamente, los patógenos ambientales provienen principalmente del medio ambiente que rodea a la vaca como el establo, el suelo, el estiercol, etc. Por lo que es sumamente importante la higiene de las vacas y del medio ambiente donde viven (García, 2016), en este grupo de patógenos se encuentran la *Escherichia coli*, *Klebsiella spp*, *Enterobacter spp*, *Citrobacter spp* (Shoaib et al., 2021), *Streptococcus uberis* y *Streptococcus dysgalactiae* (García, 2016).

### 7.5.1 Agentes contagiosos.

#### A) *Staphylococcus aureus*

Es una de las principales bacterias que llegan a causar mastitis subclínica en vacas productoras de leche en todo el mundo (Campos et al., 2022), representando una prevalencia del 43 % al 74 %, es una bacteria tipo coco, gran positiva, catalasa y coagulasa positiva, no formadora de esporas, oxidasa negativa, inmóvil y anaerobia facultativa (Shoaib et al., 2021). Los *Staphylococcus* se agrupan en forma de racimos, producen carotenoides amarillos, el pigmento dorado estafiloxantina es un importante factor de virulencia (Ayala et al., 2022). De todos los genotipos de *S. aureus* identificados a nivel mundial, la CC97 es la que con frecuencia se encuentra en los casos de mastitis subclínica,

otros genotipos se relacionan más a infecciones humanas o son poco frecuentes en vacunos (Campos et al., 2022). Los numerosos factores de virulencia se pueden clasificar en factores no secretores y secretores (Shoib et al., 2021). Las adhesinas, que comprenden una familia de proteínas de superficie ancladas a la pared celular, son las que facilitan el proceso de adhesión y es un paso importante para la invasión microbiana de la glándula mamaria, así mismo se dispone de las proteínas de unión a fibronectina (FnBPA y FnBPB), que promueven de igual manera la adhesión e invasión; la formación de biopelículas es otro factor característico del *S. aureus* y finalmente, la producción de toxinas como los superantígenos (SAg) capaces de evadir la función inmuno normal, así mismo, las enterotoxinas M y H promueven la inflamación, necrosis y apoptosis de las células epiteliales de la glándula mamaria, la  $\alpha$ -hemolisina que promueve la liberación del contenido celular y conduce a la apoptosis celular, la  $\beta$ -hemolisina que hidrolisa la esfingomiélinina aumenta la permeabilidad de las células huésped, la  $\delta$ -hemolisina perturba la membrana celular y la  $\gamma$ -hemolisina solo se presenta en bajas concentraciones (Campos et al., 2022). La mastitis es un problema poblacional multifactorial, por lo que es importante realizar un correcto manejo y tener una óptima técnica de ordeño, por lo que, su control depende de la aplicación de un sistema integral de medidas como reducir la tasa de nuevas infecciones y reducir el tiempo de infección en cada caso de mastitis (Toscano y Burgos, 2025).

#### B) *Streptococcus agalactiae*.

El *Streptococcus agalactiae* es un microorganismo coco gran positivo que infecta la glándula mamaria, Aislando cepas de *S. agalactiae* de leche cruda de vacas con mastitis subclínica, la prevalencia varía por rebaño, la tasa total de infección es 11,1%, a 16,5% (Sztachañska et al., 2016 ). Las pérdidas económicas asociadas a la MSC incluyen la reducción en la producción y calidad de la leche, así como el aumento en el recuento de células somáticas (RCS), estos factores afectan directamente la rentabilidad de las explotaciones lecheras (Medrano-Galarza et al., 2021). Una vez que *Strep. agalactiae* coloniza la glándula mamaria bovina, obtiene fuentes de nutrientes de la leche

para su proliferación y causa efectos dañinos a largo plazo. Por lo tanto, la capacidad metabólica y la capacidad de adhesión, invasión y evasión inmunitaria de *Strep. agalactiae* podrían desempeñar un papel crucial en la mastitis bovina (Liu et al., 2024).

#### 7.5.2 Agentes ambientales.

##### A) *Escherichia coli*

*Escherichia coli* es una de las bacterias ambientales que frecuentemente se ha visto implicada en infecciones de la glándula mamaria bovina, se ha observado que son bacterias formadoras de biopelículas ya que se asocian con infecciones persistentes, son bacterias móviles que causan patogenicidad, estas son muy diversas y pertenecen principalmente al grupo filogenético A (Cruz-Soto et al., 2020).

La *E. coli* presenta cepas hemolíticas y las colonias en agar MacConkey son de color rosado, indicando fermentación de lactosa (Dash et al., 2024).

##### B) *Streptococcus dysgalactiae*

El *S. dysgalactiae* posee resistencia a múltiples antimicrobianos y factores de virulencia, lo que complica su control en el ambiente (Zhang, X., et al 2021). Puede aislarse de sitios como amígdalas, boca y tracto genital de bovinos, sugiriendo su rol en la transmisión ambiental de la mastitis (European Food Safety Authority EFSA 2021).

Los *estreptococos* forman colonias muy pequeñas de bordes regulares, convexas, transparentes u opacas, de 0,5-2 mm de diámetro. Son inmóviles, no formadores de esporas, grampositivos, capsulares en algunas especies y hemolíticos en muchas especies. Están agrupados en pares o cadenas y presentan catalasa negativa (Stanchi, 2007).

### *Streptococcus dysgalactiae* subespecie *Equisimilis*:

El *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *Equisimilis* es una bacteria del genero *Streptococcus*, de la familia *Streptococcaceae*, es grampositiva, b-hemolítica, catalasa negativa, anaerobio facultativo, caracterizada por expresar en su pared el grupo C y G de antígenos de lancefield y forma colonias grandes > 0,5 mm de diámetro (Vieira et al., 1998). Este microorganismo es un patógeno común de animales domésticos, principalmente de bovinos y equinos, en los que causa mastitis, poliartitis e infección a nivel del tracto respiratorio, esta bacteria es un constituyente de la microbiota de las mucosas oral, intestinal y vaginal y en ocasiones es capaz de evitar los mecanismos de defensa del hospedador e invadir los tejidos causando infecciones de la piel, respiratorias y tejidos blandos. La transmisión de este microorganismo se produce a través de la exposición o contacto directo con animales infectados (Riffon et al., 2001).

### C) *Staphylococcus coagulasa negativos*

Pueden vivir tanto al aire libre como sobre ubres infectadas, se les llama oportunistas de la flora cutánea del pezón, pelaje y fosas nasales. En este grupo de bacterias se incluye más de 50 especies y también subespecies. Las bacterias más comunes aisladas de mastitis bovina son: *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus epidermitis*, *Staphylococcus hyicus* y *Staphylococcus simulans* (Bonetto, 2014).

### D) *Streptococcus uberis*

El *Streptococcus uberis* (*S. uberis*), se considera uno de los principales patógenos causantes de mastitis en muchos países del mundo, lo que ocasiona importantes pérdidas económicas a los ganaderos. Si bien la implementación de estrategias de control de la mastitis ha sido eficaz para reducir la prevalencia de patógenos contagiosos en hatos lecheros bien gestionados, *S. uberis* sigue siendo responsable de una proporción significativa de mastitis clínicas, y principalmente subclínicas,

aunque la patogénesis y los factores de virulencia requeridos para el desarrollo de la infección intramamaria aún no están bien establecidos, se han descrito varios genes putativos asociados a la virulencia (Vezina et al., 2021).

Utilizando medios selectivos y pruebas bioquímicas para *S. uberis* en casos clínicos de mastitis bovina, la cual se caracterizaron como cocos Gram positivos que formaban cadenas (Barker, J. C., et al. 2019).

El *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* y *Streptococcus uberis*, son los microorganismos más comunes responsable de la mastitis bovina que dan con una secuencia global variable entre *Streptococcus Spp* (Kabelitz et al., 2021). El *S. agalactiae* se considera como alto patógeno de casos de mastitis; sin embargo, debido a su naturaleza contagiosa, la incidencia de *S. agalactiae*, mediante un buen plan de higiene, se ve una baja considerable de tasa de contagio (Benić et al., 2018). Y como resultado, la prevalencia de patógenos de mastitis ambiental como *S. uberis* han aumentado notablemente (Kabelitz et al., 2021). Sin embargo, la prevalencia de estos microorganismos fue variable esto según su ubicación geográfica (Kabelitz et al., 2021). En Bangladesh, la información sobre *Streptococcus spp* y su susceptibilidad a los antibióticos en la mastitis es mínima (Hassan et al., 2023).

## **7.6 Tinción Gram:**

La tinción de Gram es una de las técnicas más importantes y utilizadas en microbiología para clasificar y diferenciar especies bacterianas. Mediante la tinción de Gram, los científicos pueden clasificar de forma rápida y eficiente las bacterias en dos grandes grupos: grampositivas y gramnegativas, según la composición de su pared celular. Esta clasificación no solo facilita la identificación bacteriana, sino que también influye en la determinación del tratamiento adecuado para

las infecciones bacterianas. La tinción de Gram se basa en las diferencias estructurales entre las paredes celulares de las bacterias. La pared celular es una parte esencial de la célula bacteriana, ya que proporciona integridad estructural y protección. Sin embargo, el grosor y la composición de la pared celular varían significativamente entre las diferentes especies bacterianas. Las bacterias grampositivas tienen una gruesa capa de peptidoglicano, mientras que las gramnegativas poseen una delgada capa de peptidoglicano rodeada por una membrana externa. La tinción de Gram implica una serie de pasos que diferencian a las bacterias según cómo retienen el colorante violeta cristal tras ser sometidas a diferentes productos químicos (Gao 2024).

### **7.7 Diagnóstico de la mastitis bovina.**

Es preciso realizar un buen procedimiento diagnóstico con la finalidad de tener un tratamiento óptimo de la enfermedad, se requiere la realización de una técnica de diagnóstico rápida, confiable y económica que tenga un mayor alcance y acceso hacia los criadores de vacas productoras de leche. Un aspecto importante a tener en cuenta es detectar la presencia de mastitis de forma oportuna para poder revertirlo de manera adecuada, esto se puede lograr realizando la estimación de las células somáticas en la leche, identificación de procesos inflamatorios a nivel de la ubre de las vacas, identificación de los microorganismos patógenos y el uso de pruebas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la secuenciación (Ashraf y Imran, 2018).

Se puede disponer de técnicas de campo como la prueba de mastitis de California (CMT), la P. Whiteside.mas. titest y Wisconsin m .test; otras que requieren conocimientos previos como el recuento de células somáticas y finalmente se tiene técnicas de identificación del agente microbiano mediante procedimientos laboratoriales como los cultivos bacterianos, la PCR, detección de biomarcadores por proteómica y la secuenciación de gen 16S bacteriano (Duarte et al., 2015).

### 7.7.1 Prueba de California Mastitis Test (CMT).

La prueba de California Mastitis Test (CMT) es un método de diagnóstico y de descarte de mastitis subclínica que se utiliza ampliamente a nivel mundial por su facilidad de manejo, bajo costo, rapidez y especificidad (Ferronato et al., 2018). La prueba de CMT estipula la cantidad de células somáticas en las muestras de leche, a mayor cantidad existe inflamación de la glándula mamaria (Duarte et al., 2015).

### 7.7.2 Análisis microbiológico de la leche.

Consiste en la obtención aséptica de muestras de leche que pueden ser utilizados para realizar el cultivo bacteriano e identificar las cepas bacterianas causantes de mastitis subclínica mediante pruebas de laboratorio complementarias como la prueba de hemólisis, la tinción Gram y la prueba de la catalasa (Bedolla et al., 2020).

### 7.7.3 Medios de Cultivo.

#### A) Agar sangre

Es un medio de cultivo que se utiliza para promover el crecimiento de varios microorganismos de importancia clínica tanto Gram positivos, Gram negativos, hongos y levaduras; así mismo, en este medio de cultivo se pueden identificar las características de hemólisis que algunos microorganismos pueden generar, la sangre a utilizarse puede ser de carnero, sangre humana y de caballo (Chávez et al., 2019).

#### B) Agar MacConkey

El agar MacConkey en la microbiología, enfatiza su importancia en la identificación de bacterias Gram negativas basándose en la fermentación de lactosa y la observación de cambios en el pH, en

condiciones ácidas se tornan de color fucsia, además, Se destaca su capacidad para aislar bacterias Gram negativas y diferenciar entre fermentadores y no fermentadores de lactosa (Tmmedia 2024).

### C) Agar EMB

El agar eosina-azul de metileno (EMB) es un medio selectivo para el crecimiento de bacterias gramnegativas, Como *E. coli* y *A. baumannii*. bacterias gramnegativas cultivadas en agar EMB, utilizado además, para diferenciar rápidamente microorganismos fermentadores y no fermentadores de lactosa y sacarosa, en comparación a otros medios de cultivo que identifican solo fermentadores o no fermentadores de lactosa (Yakupoğullar et al., 2019).

### D) Citrato de Simmons

El agar citrato de Simmons se utiliza para distinguir entre coliformes como *Klebsiella aerogenes* (anteriormente *Enterobacter aerogenes*) (+ve) que se encuentran naturalmente en el suelo, y ambientes acuáticos de coliformes fecales como *Escherichia coli* (-ve), cuya presencia sería indicativa de contaminación fecal, lo cual el citrato positivo, indica que el crecimiento será visible en la superficie inclinada y el medio adquirirá un intenso color azul. Los carbonatos y bicarbonatos alcalinos producidos como subproductos del catabolismo del citrato elevan el pH del medio por encima de 7,6, lo que provoca que el azul de bromotimol cambie de su color verde original a azul, Solo las bacterias que utilizan el citrato como única fuente de carbono y energía podrán crecer en el medio de citrato Simmons. Por lo tanto, un cultivo de prueba citrato negativo será prácticamente indistinguible de un cultivo inclinado sin inocular, la *E. coli* es citrato negativo (Manual de Procedimientos de Microbiología Clínica, 2016).

## E) Manitol salado

El Agar de sal de manitol es un medio selectivo y diferencial para el aislamiento de *Staphylococcus aureus*, tiene la acción del rojo fenol como indicador de pH y su capacidad para diferenciar entre *estafilococos* fermentadores y no fermentadores de manitol (Marjolein, 2020).

### 7.8 Sensibilidad y Resistencia bacteriana.

La determinación de la resistencia antimicrobiana está indicada en los casos en que el microorganismo causal de la infección pertenezca a una especie incapaz de exhibir resistencia a los antibióticos de uso clínico (Galas y Pastean, 2006). Esta resistencia puede ser natural o intrínseca, mutacional o adquirida. Así mismo, los mecanismos de resistencia a los agentes antimicrobianos abarcan: producción de enzimas inactivantes, alteraciones en el sitio de acción y modificaciones en el ingreso o el flujo del antibiótico (Stanchi, 2007).

#### 7.8.1 Método de Kirby–Bauer (Método de difusión).

Inicialmente se debe realizar el cultivo bacteriano en placas de agar Müller-Hinton, para luego colocar encima los discos de papel filtro impregnados con diversos antibióticos de interés y luego de una incubación a 37 °C por 24 – 48 horas se podrá verificar los halos alrededor de cada disco de papel y según el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento bacteriano se podrá determinar el grado de resistencia bacteriana frente a los antibióticos de prueba (Galas y Pastean, 2006). Dado que no se puede predecir la susceptibilidad de los agentes, es necesario estudiar la sensibilidad de cada microorganismo a diferentes fármacos, pudiendo elegir así el fármaco más apropiado contra el patógeno, el menos tóxico para el huésped (López, 2009).

El fundamento para la interpretación de los resultados obtenidos se basa en caracterizar al microorganismo como:

**Sensibles:** esto significa que un microorganismo se considera sensible a un antibiótico cuando el mismo responde al tratamiento con dicho fármaco a la dosis recomendada (López, 2009).

**Resistentes:** este significado nos indica que no es probable que la infección causada por el microorganismo responda al antibiótico en cuestión, así sea a mayor dosis y la localización de la infección (López, 2009).

**Medianamente sensibles o de sensibilidad intermedia:** Se aplica a dos situaciones. Por un lado, se incluyen en ella las cepas con sensibilidad disminuida a un antibiótico que puede utilizarse con éxito, para el tratamiento en dosis más altas, por ser poco tóxico o porque se concentra en el foco de infección (López, 2009).

### **7.9 Tipos de resistencia antimicrobiana.**

**Resistencia natural:** se indica cuando actúan las cepas de una misma especie bacteriana. también la resistencia natural permite proveer la inactividad de la molécula frente a bacterias identificadas (Colango, 2013).

**Resistencia adquirida:** se da cuando las características propias de ciertas cepas dentro de una especie bacteriana naturalmente sensible, el cual genéticamente ha sido modificado por mutación o adquisición de genes, son evolutivas, y su frecuencia depende a menudo de la utilización de los antibióticos (Colango, 2013).

**Resistencia cruzada:** se indica cuando se debe a un mismo mecanismo de resistencia. En general, afecta a varios antibióticos dentro de una misma familia. En ciertos casos, puede afectar a antibióticos de familias diferentes (Colango, 2013).

Resistencia asociada: afecta a varios antibióticos de familias diferentes. En general, se debe a la asociación de varios mecanismos de resistencia (Colango, 2013).

### **7.10 Mecanismo de acción de los antibióticos.**

Se indica la actividad de un agente anti infeccioso que está definida por su espectro antibacteriano, es decir, el conjunto de microorganismos patógenos que se ven afectados por las concentraciones del antibiótico sin causarle toxicidad. Por lo que la sustancia química producida por un microorganismo, que desarrolla una actividad antimicrobiana. Estas pueden ser: Natural o biológico. Se obtiene de cultivos de microorganismos que pueden ser hongos o bacterias, semisintético. A partir de un núcleo básico de un agente obtenido de forma natural, se modifican algunas de sus características químicas, para mejorar sus propiedades, por ejemplo, aumentar su actividad, ampliar su espectro de acción, facilitar su administración o disminuir los efectos indeseables (Paredes y Roca, 2004).

### **7.11 Actividad anti infecciosa de los antibióticos.**

Bactericidas: Producen la muerte de los microorganismos responsables del proceso infeccioso. Pertenecen a este grupo los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos, rifampicina, vancomicina, polimixinas, fosfomicina, quinolonas y nitrofurantoínas (Paredes y Roca, 2004).

Bacteriostáticos: Inhiben el crecimiento bacteriano, aunque el microorganismo permanece viable, de forma que, cuando se suspende el tratamiento, puede volver a recuperarse y multiplicarse. Pertenecen a este grupo los macrolidos, tetraciclinas, clindamicina y sulfonamidas (Paredes y Roca, 2004).

## **7.12 Política de antibióticos.**

Las infecciones causadas por bacterias resistentes se asocian a una mayor morbilidad, mortalidad y coste del tratamiento que las causadas por bacterias sensibles de la misma especie. El creciente abuso y/o mal uso de antibióticos se encuentra entre los principales factores responsables del aumento de cepas multirresistentes. Por lo que el mecanismo de acción de los antibióticos es primordial para el desarrollo de estrategias que permitan establecer mecanismos de defensa bacteriana de forma eficaz y segura (Tang et al., 2023).

## **VIII MATERIALES Y METODOS**

### **8.1 Ámbito de estudio**

La obtención de muestras de leche y el diagnóstico de vacas con mastitis subclínica se realizó en las comunidades de Chancarani, Radio Urbano y Conde Kjecra del distrito de Langui – Canas – Cusco, entre los meses de abril a julio del 2023. El distrito de Langui se encuentra a una altura de 3 969 m.s.n.m, Latitud Sur: 14° 25`57" y Longitud W: 71° 16` 22", posee una superficie total de unos 187.1 km<sup>2</sup> (SENAMHI, 2012).

La identificación del agente etiológico, así como la determinación del grado de resistencia antimicrobiana, se realizaron en el Laboratorio de Microbiología de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria – Filial Sicuani de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. La ciudad de Sicuani se encuentra situado a una altura de 3,548 metros sobre el nivel del mar y con respecto a sus coordenadas geográficas se encuentra entre los 14°16,23" de latitud sur y los 71°13'37" de longitud oeste, llegando a presentar climas entre templado y seco frío, con una temperatura que varía desde 1.9 °C y 20.5 °C. Así mismo, posee una humedad relativa del 60 % y una precipitación pluvial media de 650 mm (Gore Cusco, 2020).

### **8.2 Método de investigación.**

El trabajo realizado es de carácter inferencial, prospectivo e analítico, iniciándose con el descarte de vacas sanas mediante la prueba de california mastitis test (CMT).

### **8.3 Diseño de estudio.**

El presente trabajo de tesis es de tipo observacional descriptivo de Corte Transversal.

## 8.4 Diseño de investigación.

La presente tesis es no experimental (no se utilizaron grupos experimentales para ver el efecto de variables independientes sobre las variables dependientes) puesto que se enmarcó en la identificación de vacas con mastitis subclínica, seguidamente se identificó los agentes etiológicos causantes de mastitis subclínica y finalmente se determinó el grado de resistencia frente a diferentes antimicrobianos causantes de mastitis subclínica.

## 8.5 Población y muestra.

### 8.5.1 Población

La población está conformada por todas las vacas productoras de leche del distrito de Langui de las comunidades de Chancarani, Radio urbano y Conde Kjecra con una población total de 1054 vacunos.

### 8.5.2 Muestra

La investigación seguirá un muestreo de tipo probabilístico aleatorio pues este proporciona la misma oportunidad de selección a cada uno de los elementos de estudio que conforman la población.

Se determinó el tamaño de la muestra a considerar, utilizando la fórmula de cálculo de tamaño muestra para poblaciones finitas de la siguiente manera:

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

N = Tamaño de la población: 1,054

$Z_{\alpha}^2 = 1,96$  (nivel de confianza del 95%): 1,96

p = Probabilidad de éxito (50%): 0,50

q = Probabilidad de fracaso (50%): 0,50

d = Nivel de precisión (5%): 0,05

$$n = \frac{(1054)(1,96)^2(0,50)(0,50)}{(0,05)^2(1054 - 1) + (1,96)^2(0,50)(0,50)}$$

$$n = 281.71 \cong 282$$

## **8.6 Criterios de selección de vacunos.**

### **8.6.1 Criterios de inclusión**

- ✓ Vacas en etapa de lactación (producción de leche).
- ✓ Sin tratamiento algunos al menos 7 días previos a la toma de muestras de leche.
- ✓ Vacas sin mastitis clínica (aparentemente sanas).

### **8.6.2 Criterios de exclusión.**

- ✓ Vacas que no estén en lactación.
- ✓ Vacas que estén con tratamiento.
- ✓ Vacas que presenten mastitis clínica.

## **8.7. Materiales y equipos**

### **8.7.1 Materiales para recolección de muestras de mastitis.**

- ✓ Papel toalla.
- ✓ Guantes.
- ✓ Bolsas estériles.
- ✓ Frascos de colección estériles.
- ✓ Equipo de C.M.T.

- ✓ Lapicero.
- ✓ Ficha de registro.
- ✓ Ficha de recolección de datos.

### **8.7.2 Materiales para identificar el agente causal.**

- ✓ Bata.
- ✓ Guantes.
- ✓ Mechero bunsen.
- ✓ Laminas porta y cubre objetos.
- ✓ Chispero.
- ✓ Microscopio.
- ✓ Asa de kolle.
- ✓ Bandeja.
- ✓ Hisopos estériles.
- ✓ Agar sangre.
- ✓ Agar McConkey.
- ✓ Agar Mueller-Hinton.
- ✓ Reactivos para coloración Gram.
- ✓ Discos de sensibilidad antibiótica.
- ✓ Tubo de ensayo.
- ✓ Probeta graduada 100 mL.
- ✓ Gradilla y canastillas.
- ✓ Matraz de Erlenmeyer.
- ✓ Mortero

### **8.7.3 Medios de Cultivo**

- ✓ Agar sangre.
- ✓ Agar McConkey.
- ✓ Agar Mueller-Hinton.
- ✓ Agar EMB.
- ✓ Agar manitol salado.
- ✓ Agar citrato de Simmons.

#### **8.7.4 Reactivos**

- ✓ Cristal violeta (1 g de cristal violeta en 100 mL de agua destilada).
- ✓ Lugol (1 g de yodo en 2 gramos de yoduro potásico en 100 mL de agua destilada).
- ✓ Safranina (1 g de safranina en 100 mL de agua destilada).
- ✓ Aceite de inmersión.

#### **8.7.5 Equipos**

- ✓ Autoclave.
- ✓ Estufa.

#### **8.7.6 Materiales para identificar la resistencia.**

- ✓ Agua destilada estéril.
- ✓ Tubos de ensayo.
- ✓ Asa de Kolle.
- ✓ Pipetas.
- ✓ Mechero bunsen.
- ✓ Estufa.
- ✓ Placas petri con medio Mueller-Hinton.
- ✓ Discos de sensibilidad antibiótica.

## **8.8 Metodología**

Se tomó muestra a 282 vacas en producción de las comunidades de Radio urbano, Conde Kjecra y Chancarani; luego, se procedió a determinar la presencia de mastitis subclínica mediante la prueba de California mastitis test (CMT).

### **8.8.1 Diagnóstico de vacas con mastitis subclínica**

#### **8.8.1.1 Prueba de California Mastitis Test (CMT)**

El diagnóstico de la mastitis subclínica se realizó en horas de la mañana (primer ordeño del día), para lo cual se utilizó la prueba de california mastitis test (CMT) e interpretando los resultados conforme a las recomendaciones descritas anteriormente (Ferronato et al., 2018).

Para realizar la prueba de CMT, inicialmente se eliminaron los 3 primeros chorros de leche de cada cuarto mamario, posteriormente se procedió a tomar una muestra de 2mL de leche por cada cuarto mamario de forma directa a cada compartimento de la paleta del CMT, luego se agregó 2 mL de reactivo de CMT a cada compartimento y se procedió a agitarlo de forma circular para homogenizarlo. Para la lectura de los resultados se siguieron las recomendaciones descritas con anterioridad (Ferronato et al., 2018), se consideraron como muestras negativas cuando la mezcla de leche y reactivo de CMT no formó geles, muestras consideradas como positivas fueron las que presentaron formación de geles en el homogenizado de leche y reactivo CMT.

### **8.8.2 Identificación del agente etiológico**

Para la identificación del agente etiológico, primero, se recolectaron 5 mL de muestra de leche de cada cuarto mamario de vacas que resultados positivos a mastitis subclínica por CMT. Estas muestras de leche fueron mantenidas y transportados en una terma cooler de forma inmediata hasta el Laboratorio de Microbiología de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria – Filial Sicuani de la

8.8.2.1 Preparación de medios de cultivo bacteriano.

**Tabla 1:** Cuadro de procedimiento para preparación de agar y diferenciación de bacterias.

	Agar		Suspension (g)	Agua esteril (mL)	Bacterias a identificar
	Medio de cultivo	Uso			
1	Agar Sangre	No selectivo	40 g	1000 mL	<i>Gram positivos</i> <i>Gram negativos</i>
2	Agar MacConkey	Selectivo diferencial	50 g	1000 mL	<i>Gram Negativo</i>
3	Agar EMB	Selectivo Diferencial	37.46 g	1000 mL	<i>Enterobacterias</i>
4	Agar Manitol salado	Selectivo Diferencial	111.02g	1000 mL	<i>Gram positivos</i>
5	Agar Citrato de simmons	Selectivo Diferencial	24.20 g	1000 mL	<i>Enterobacterias</i>
6	Agar Mueller-Hinton	Sensibilidad	38 g	1000 mL	- -

8.8.2.1.1 Agar sangre.

Según las indicaciones del laboratorio, se tomó como proporción de mezcla la cantidad de 40 gramos de agar sangre en 1000 mL de agua destilada. Por lo que para cada muestra se pesó unos 1 gramo de agar sangre base en polvo y se mezcló con 25 mL de agua destilada, la mezcla fue sometida a 121 °C en autoclave durante 15 minutos aproximadamente o hasta que en agar quede disuelto completamente, seguidamente se agregó 5% de sangre de cordero para enriquecer el agar cuando esta enfrié a 45 – 50 °C, luego se vierte a la placa Petri y se deja enfriar en reposo por unos 10 minutos (hasta que el agar se gelifique), para luego proceder a realizar la siembra de la muestra de leche.

#### 8.8.2.1.2 Agar MacConkey.

Según las indicaciones del laboratorio, se tomó como proporción de mezcla la cantidad de 50 gramos de agar MacConkey en 1000 mL de agua destilada. Por lo que para cada muestra se pesaron unos 0.5 gramos de agar MacConkey en polvo y se mezcló con 10 mL de agua destilada, la mezcla fue sometida a 121 °C en autoclave durante 30 minutos aproximadamente o hasta que en agar quede disuelto completamente, luego se vierte a la placa Petri y se dejó enfriar en reposo por unos 10 minutos (hasta que el agar se gelifique), para luego proceder a realizar la siembra de la muestra de leche.

#### 8.8.3 Identificación de las características macroscópicas de las colonias bacterianas.

Una vez que se obtuvo las colonias bacterianas en las placas de agar, se determinaron características macroscópicas como el tamaño, la forma, los bordes, la elevación la textura y el color de las colonias bacterianas, así mismo, se observó también la hemólisis producida por las colonias bacterianas.

#### 8.8.4 Identificación de las características microscópicas de las colonias bacterianas.

Se determinaron características de la forma individual (cocos y bacilos) y de la forma agrupada (cadena, racimo) de las bacterias.

#### 8.8.5 Tinción Gram.

Una vez obtenido el crecimiento de las colonias bacterianas en los distintos medios de cultivo utilizados, se extrajo una muestra de las colonias para realizar la tinción Gram. Inicialmente se realizó un extendido de la muestra bacteriana en láminas portaobjetos y luego se dejó secar al ambiente y por flameo (3 veces), luego se agregó cristal violeta, de manera que esto cubrió todo el extendido bacteriano y se dejó reposar por 1 minuto, luego se procedió a enjuagar las láminas con agua destilada, posteriormente se agregó lugol cubriendo todo el extendido bacteriano y se dejó reposar

por unos 30 segundos, y de igual manera se volvió a enjuagar con agua y seguidamente se agregó alcohol acetona al extendido bacteriano y se dejó reposar por unos 15 segundos, luego se enjuago nuevamente con agua y finalmente se agregó safranina al extendido bacteriano y se dejó reposar por 1 minuto y se realizó un lavado final con agua. Como resultado de la coloración Gram se obtuvieron bacteria con una coloración rosada que corresponderán a bacterias gram negativas, mientras que las bacterias gram positivas obtuvieron una coloración morada (Gonzales et al., 2020).

#### 8.8.6 Identificación de características de las pruebas bioquímicas.

##### 8.8.6.1 Prueba de la catalasa.

Para realizar esta prueba se colocó una gota de peróxido de hidrógeno encima de un portaobjetos y luego se agregó la muestra bacteriana y como resultado se dio la formación de burbujas. La catalasa viene a ser una enzima que poseen la mayoría de las bacterias aerobias, esta enzima descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. La presencia de burbujas de aire indica la presencia de una bacteria aerobia y por tanto resulta ser catalasa positiva, caso contrario (no formación de burbujas) resulta ser una bacteria catalasa negativa.

##### 8.8.6.2 Agar eosina y azul de metileno (EMB).

Según las indicaciones del laboratorio, se tomó como proporción de mezcla la cantidad de 37.46 gramos de agar eosina y azul de metileno (EMB) en 1000 mL de agua destilada. Por lo que para cada muestra se pesaron unos 0.94 gramos de agar EMB en polvo y se mezcló con 25 ml de agua destilada, la mezcla fue sometida a 121 °C en autoclave durante 15 minutos hasta que el agar quedo disuelto completamente, luego se vertió a la placa Petri y se dejó enfriar en reposo por unos 10 minutos (hasta que el agar se gelifique), y luego se procedió a realizar la siembra de la muestra de leche.

#### 8.8.6.3 Manitol salado.

Según las indicaciones del laboratorio, se tomó como proporción de mezcla la cantidad de 111.02 gramos de agar manitol salado en 1000 mL de agua destilada, por lo que para muestra se pesaron unos 2.77 gramos de agar manitol salado en polvo y se mezcló con 25 mL de agua destilada, la mezcla fue sometida a 121 °C en autoclave durante 15 minutos hasta que se disolvió el agar completamente, luego se vertió a la placa Petri y se dejó enfriar en reposo por unos 10 minutos (hasta que el agar se gelifique), y se procedió a realizar la siembra de la muestra de leche.

#### 8.8.6.4 Citrato de Simmons

Según las indicaciones del laboratorio, se tomó como proporción de mezcla la cantidad de 24.20 gramos de Agar citrato de Simmons en 1000 mL de agua destilada. Por lo que para cada muestra se pesaron unos 0.17 gramos de agar citrato de Simmons en polvo y se mezcló con 7 mL de agua destilada, la mezcla fue sometida a 121 °C en autoclave durante 15 minutos, esto hasta que el agar quedo disuelto de forma completa, luego se vertió a Los tubos de ensayo y se dejó enfriar en reposo por unos 10 minutos (hasta que el agar se gelifique), y se procedió a realizar la siembra de la muestra de leche.

#### 8.8.7 Determinación del grado de resistencia antimicrobiana.

Para poder determinar el grado de resistencia bacteriana de los diferentes agentes etiológicos de la mastitis subclínica, en este trabajo de tesis se utilizó agar Mueller-Hinton. Los Antibióticos se seleccionó a base de la utilización de estos antibióticos por los productores de la zona para mastitis y otras enfermedades, por tanto, se utilizó los diferentes discos de sensibilidad como la amoxicilina (AML), Amoxicilina + ácido clavulánico (AUG), penicilina G (P), gentamicina (CN), cefotaxima (CTX), eritromicina (E), enrofloxacin (ENR), sulfametoxazol (SMX) y S10 Estreptomina.

#### 8.8.7.1 Antibiograma para agentes etiológicos de la mastitis subclínica.

Se preparó el agar Mueller–Hinton, para lo cual, se pesaron unos 0.25 gramos de agar Mueller–Hinton en polvo y se mezcló con 10 mL de agua destilada, la mezcla se calentó hasta su punto de ebullición hasta que el agar quedo disuelto completamente, luego se vertió a la placa Petri y se dejó enfriar en reposo por unos 10 minutos (hasta que el agar se gelifique), y se procedió a realizar la siembra de la muestra de leche.

Ya listas las placas de agar Mueller – Hinton, se procedió a disolver la muestra bacteriana aislada en un 1 mL de agua destilada, y con un hisopo estéril se procedió a sembrar la mezcla en toda la placa de agar Mueller – Hinton de tal forma que quedo completamente cubierto de la suspensión bacteriana, se dejó secar por unos minutos y luego, se colocaron los discos de sensibilidad inmersos con amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulánico, penicilina G, gentamicina, cefotaxima, eritromicina, enrofloxacina, sulfametoxazol y espiramicina, a una distancia de 2 a 3 cm de disco a disco y luego se dejó incubar a 35 °C por 24 horas.

Luego, se procedió a medir los halos de inhibición alrededor de los discos de sensibilidad con una regla milimétrica sobre una base oscura, esto para poder determinar si los agentes bacterianos resultaron ser sensibles, medianamente resistentes o resistentes a un antibiótico en particular.

#### 8.8.8 Análisis de datos.

Para determinar el efecto de la variable independiente (tipo de antibiótico) sobre la variable dependiente (crecimiento o inhibición bacteriana), se determinó el promedio y la desviación estándar del tamaño del halo alrededor de los discos de sensibilidad para luego conocer la diferencia entre medias a través de un análisis de varianza ( $\alpha = 0.05$ ), utilizando el software estadístico SPSS.

En la presente investigación se aplicó la prueba paramétrica ANOVA, la cual nos permite determinar la significancia en cuanto a los promedios a comparar, y la prueba de Tukey que es un método que tiene como fin comparar las medias individuales provenientes de un análisis de varianza de las muestras (Hernandez, 2016).

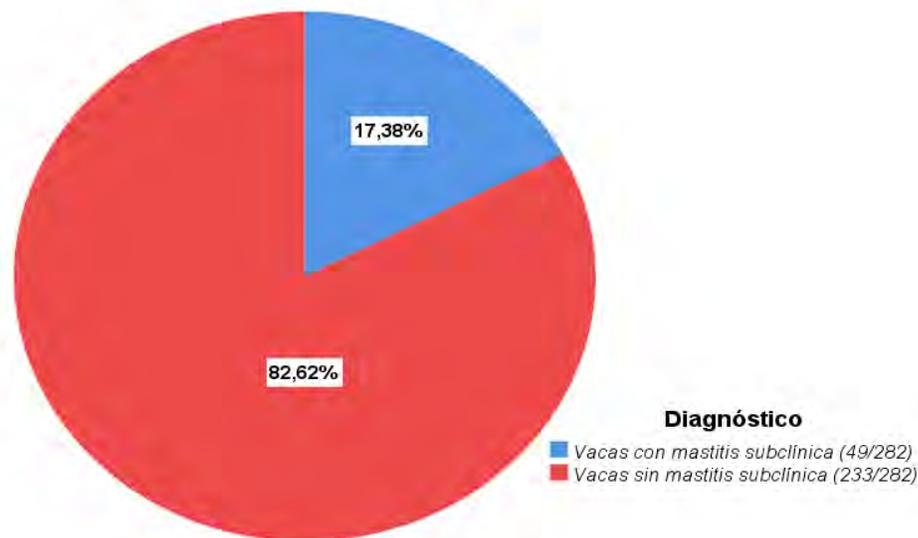
Para determinar la resistencia bacteriana a los antibióticos, se valoró el diámetro del halo y se comparó con las referencias publicadas por el comité nacional de estándares de laboratorio (CLSI), la cual determina las referencias en la cual se indica si los antimicrobianos son sensible, intermedio o resistentes (S, I, R).

## IX RESULTADOS Y DISCUSION:

### 9.1 Mastitis subclínica en vacas productoras de leche del distrito de Langui.

Los casos positivos a mastitis subclínica fueron (49/282) en vacas del distrito de Langui, el cual representa el 17.38 %. **Fig. 4**

**Figura N° 4.** Porcentaje de casos de mastitis subclínica en el distrito de Langui.



Otros estudios similares en zonas cercanas demuestran relativamente niveles de prevalencia más elevados, un estudio en el distrito de Chamaca provincia de Chumbivilcas, demostró una prevalencia del 19.85 % (Colque, 2015), así mismo, otro estudio de (Sánchez y Mamani, 2022) en Santa Rosa – Melgar, demuestra un 47 % de prevalencia de mastitis subclínica. Estas diferencias en los niveles de prevalencia se deben a la variación en el grado de repercusión que pueden tener los diferentes factores de riesgo relacionados a la mastitis bovina, entre ellos tenemos el tipo de ordeño, la cantidad de ordeños por día. (Colque, 2015) indica que conforme aumenta el número de partos, se dan más casos de mastitis. Como también se debe tener en cuenta el fomento de la higiene en general en todo el proceso de ordeño y en los ambientes de crianza de vacunos (Condori, 2017), considerando

que es importante el manejo de registros con fines de control de sanidad y producción (Mamani, 2014). Para el diagnóstico de mastitis subclínica, la prueba de elección a utilizar es CMT siendo esta la más confiable (Escobedo, 2021). Por lo que el relativo bajo porcentaje de nivel de prevalencia en el presente estudio se podría deber a que las vacas podrían haber tenido recién uno o dos partos, siendo vacunos de crianza familiar, también se debe considerar que al pertenecer a diferentes productores en todo el distrito, es posible que la difusión de estos agentes etiológicos puede verse dificultada, contrariamente a lo que sucede en establos de crianza intensiva en donde la diseminación y contagio de enfermedades es más preponderante.

## **9.2 Identificación de las características macroscópicas, microscópicas y bioquímicas de los agentes causales de mastitis subclínica en las comunidades de Chancarani, Radio Urbano y Conde Kjecra del distrito de Langui.**

### 9.2.1 Características macroscópicas de los agentes etiológicos.

Se identificó la bacteria *Streptococcus spp*, cocos Gram positivos con forma agrupada en cadena y catalasas negativos, todas crecieron en agar sangre, con tamaños de 1 a 2 mm, puntiformes, de borde regular y entero, todas con elevación convexa y lisas, de colores blanco humo y blanco lechoso, y con hemólisis parcial y total, como se observa en la **Tabla 2**. Según, Stanchi (2007), las diferentes especies de género *Streptococcus* crecen más en medios enriquecidos con sangre y a diferencia de los demás medios estas no se ven pigmentadas, se caracterizan por formar colonias grandes y colonias pequeñas (puntiformes con diámetros desde 0,5 mm) y algunos *estreptococos* en agar sangre tienden a desarrollar halo de hemólisis completa alrededor de la colonia (betahemólisis); otros inducen una zona de coloración verdosa (alfahemólisis), y otros *estreptococos* no inducen ningún cambio (colonias no hemolíticas o gammahemolíticas). Para estudiar la hemólisis producida por los *estreptococos*, algunos factores como las condiciones de incubación y el origen de la sangre empleada en la fabricación de las placas, son determinantes y pueden hacer que varíen los patrones hemolíticos.

En el presente trabajo se identificó la bacteria *Staphylococcus aureus*, cocos Gram positivos con forma agrupada en racimo y catalasa positivo, crecieron en agar sangre y manitol salado, con tamaños de 1.5 a 2.5 mm, circulares, de borde regular y entero, convexos, de textura lisa, color amarillo cremoso y blanco lechoso esto debido a la producción de carotenoides, y todas con hemólisis parcial, se identificó a estas bacterias de acuerdo a estudios realizados por (Shoaib et al., 2021).

También se identificó a la bacteria *E. coli*, bacilos con forma cilíndrica, Gram negativos y catalasa positivos, todas crecieron en agar sangre, agar MacConkey y agar EMB, con tamaños de 2 a 2.5 mm, circulares de borde regular y entero, con elevación convexa, textura lisa, de color blanco lechoso para agar sangre y rosado-rojizo para agar MacConkey, con hemólisis parcial. En la que según, (Cruz-Soto et al., 2020), las bacterias *E. coli* se aíslan e identifican a partir de muestras, si se siembran en medios selectivos bajo condiciones de esterilidad aerobias los medios selectivos de elección son el agar MacConkey donde se forman colonias rosas con forma circular, de 2 a 4 mm de diámetro, convexas de bordes enteros y suaves.

**Tabla 2.** Identificación de los agentes etiológicos, según sus características macroscópicas.

<b>Bacterias</b>	<b>Cultivo</b>	<b>Tamaño</b>	<b>Forma</b>	<b>Borde</b>	<b>Elevación</b>	<b>Textura</b>	<b>Color</b>	<b>Hemólisis</b>
<b><i>Streptococcus spp</i></b>	Agar sangre	1 – 2 mm	Puntiforme	Regular y entero	Convexa	Lisa	Blanco humo y lechoso	Parcial y total
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>	Agar sangre y Manitol salado	1.5 – 2.5 mm	Circular	Regular y entero	Convexa	Lisa	Amarillento cremoso y blanco lechoso	Parcial
<b><i>E. coli</i></b>	Agar sangre, Mac Conkey, EMB	2 – 2.5 mm	Circular	Regular y entero	Convexa	Lisa	Rosa-rojizas	Parcial

### 9.2.2 Características microscópicas de los agentes etiológicos.

Se identificó mediante la prueba de tinción Gram, bacterias Gram positivas de morfología en forma de cocos con agrupación en forma de racimo y cadena, también bacterias Gram negativas en forma de bacilo agrupados cilíndricamente, como se observa en la **Tabla 3**. Según, Stanchi (2007), mediante la prueba de tinción Gram se puede observar cocos Gram positivos con tendencia a formar cadena o diplococos lanceolados que orienta hacia el género *Streptococcus spp*. También Shoaib et al., (2021), indica que el *Staphylococcus* está formado por cocos gram positivos, agrupados como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas. Matthew et al., (2013) y Cruz-Soto et al., (2020), indican que *la Escherichia coli* es una bacteria de la familia *enterobacteriae*, en la que en frotis teñido por la técnica Gram, la *E coli* se presenta como bacilos Gram negativos y aerobio facultativo catalasa positivo.

**Tabla 3.** Identificación de los agentes etiológicos, según sus características microscópicas.

<b>Bacterias</b>	<b>Morfología individual</b>	<b>Morfología agrupada</b>	<b>Prueba de tinción Gram</b>
<b><i>Streptococcus spp</i></b>	Coco	Cadena	Gram positivo
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>	Coco	Racimo	Gram positivo
<b><i>E. coli</i></b>	Bacilo	Cilíndrica	Gram negativo

### 9.2.3 Características bioquímicas de los agentes etiológicos.

Para la identificación del *Staphylococcus aureus* se utilizó manitol salado el cual es un medio de cultivo selectivo y diferencial en el que se observó un notable cambio de las colonias, de color rosa a un color amarillento, y los halos de la misma manera se vieron de color amarillo, esto ocasionado por el cambio de pH originado por los *S. aureus*. Así mismo se utilizó agar EMB, esto sabiendo que en este agar crecen diferentes *enterobacterias* y además que es un agar selectivo de bacilos *Gram negativos*. Por lo que se identificó *E. coli* por la coloración teniendo un cambio de color de las colonias, de negruzcas azuladas con brillo metálico. Se utilizó Citrato de Simmons para poder diferenciar e identificar *enterobacterias*, en el cual se vio ausencia de crecimiento de las bacterias aisladas ya que también se sabe que *la E. coli* no crece en ese medio de cultivo, como se muestra en la **Tabla 4**.

Según, Stanchi (2007), los *estreptococos* son bacterias que forman células ovoides o esféricas, *grampositivas*, catalasa negativas y anaerobias facultativas. Shoaib et al., (2021), indican que la mayoría de los *estafilococos* producen catalasa (enzima capaz de desdoblar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre); característica que se utiliza para diferenciar el género *Staphylococcus* de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* que son catalasa negativos. Así mismo, Stanchi (2007), indica que la enzima catalasa se encuentra en la mayoría de las bacterias que contiene citocromo excepto *Streptococcus*; ya que generalmente las bacterias que carecen de citocromo también carecen de catalasa lo que le impide a poder descomponer el peróxido de hidrogeno. También, Shoaib et al., (2021), indican que la identificación de *S. aureus*, se realiza con el empleo de la tinción de Gram, pruebas bioquímicas como prueba de la catalasa, fermentación de glucosa y que permite diferenciar al género *Staphylococcus*, que vienen hacer catalasa positiva, así mismo otras pruebas son específicas de especie como la fermentación del manitol. Según, Yakupoğullar et al., (2019), el agar EMB es un medio selectivo y diferencial, y es usado para aislar bacilos Gram negativos de rápido desarrollo, y por lo general permite el desarrollo de *enterobacterias* tales como la *Escherichia coli* con

buen crecimiento y esta viene a tener colonias con brillo metálico y centro negro azulado, también crecen otras bacterias tales como la *klebsiella pneumonia* de buen crecimiento, estas bacterias vienen a tener colonia rosada purpura confluyente *Salmonella typhimurium* de buen crecimiento pero son colonias incoloras. Gao (2024), indica que el agar Citrato de simmons es un medio diferencial, el cual es utilizado para el estudio de bacilos Gram negativos, en la cual se puede confirmar bacterias tales como *Klebsiella pneumonia*, *Salmonella typhimurium* y *Pseudomonas aeruginosa*. Marjolein, (2020), indica que la fermentación del manitol salado permite la diferenciación y la selectividad se da por la tolerancia a altas concentraciones de sal, por lo que ambas características son propias de *Staphylococcus aureus*, también reporta que el *Staphylococcus* tiene tolerancia a altas concentraciones de sal, también indica que la concentración de cloruro de sodio al 7.5% inhibe el desarrollo de muchas bacterias, permitiendo el desarrollo selectivo de *Staphylococcus*, los que se puede identificar presuntamente según sea la fermentación del manitol. Por lo que cuando ocurra esta fermentación se viene a observar un viraje del indicador rojo de fenol hacia amarillo, esto debido a la caída del pH en el medio de cultivo, en el que el agar manitol salado permite un aislamiento selectivo de *Staphylococcus aureus*. Las colonias de *S. aureus* presentan buen desarrollo, rodeadas de zonas amarillas.

**Tabla 4.** Identificación de los agentes etiológicos, según sus características bioquímicas.

Bacteria	Prueba de la catalasa	Agar EMB	Citrato de Simmons	Manitol salado
<i>Streptococcus spp</i>	Catalasa negativa	--	--	--
<i>Staphylococcus aureus</i>	Catalasa positiva	--	--	Si crece
<i>E. coli</i>	Catalasa positiva	Si crece	No crece	--

\***Streptococcus spp** no fue aislado en agar EMB, Citrato de Simmons, y manitol salado.

\***Staphylococcus** no fue aislado en agar EMB y Citrato de Simmons.

\***E. Coli** no fue aislado en Manitol salado.

9.3 Identificación de agentes etiológicos de la mastitis subclínica en las comunidades de Chancarani, Radio Urbano y Conde Kjecra del distrito de Langui.

Los agentes etiológicos más frecuentes causantes de la mastitis subclínica en el distrito de Langui fueron el *Streptococcus spp.*, el *Staphylococcus aureus* y la *E. coli*, representando el 46.94%, 42.86% y 10.20% del total de casos respectivamente, como se observa en la **Tabla 5**. Los cuales son similares a estudios hechos, en las que se reportó a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp* y *E. coli* como principales agentes causales de mastitis subclínica en vacas en producción por (Quispe et al., 2020), (Vélez, 2022), (Celis, 2017) y (Inestroza et al., 2020). Adicionalmente a esos 3 agentes etiológicos, se tienen reportes sobre otros patógenos como *Klebsiella sp* (Rodríguez y Muñoz, 2017), *Micrococcus* y *Corynebacterium* (Bonifaz y Colango, 2016), *Klebsiella oxytoca* (Miranda, 2018), *Klebsiella pneumoniae* (Kruze, 2015), *Enterobacter* (Ormaza y Rueda, 2021), *Critobacter diversus* (Realque, 2022), *Bacillus subtilis* y *Citrobacter freundii* (Villanueva y Morales, 2017), estos últimos siendo de menor frecuencia de presentación.

Según, Miranda y Morales-Cauti (2022), estas diferencias o similitudes se dan de acuerdo con la base etiológica infecciosa de la zona, estas pueden ser contagiosas y ambientales, la mastitis contagiosa está causada por microorganismos tales como el *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, los contagios de estas se dan principalmente en el momento del ordeño, también por malas prácticas como el uso compartido de medidas de higiene o por medio de las manos contaminadas de los ordeñadores, y de acuerdo al tipo de ambiente en la que se encuentran los diferentes microorganismos. Según, Shoaib et al., (2021), estos microorganismos se han aislado de las lesiones de la piel de los pezones de las vacas. Así mismo, Cruz-Soto et al., (2020), indican que las bacterias

*coliforme* como la *Escherichia coli*, el cual causa mastitis ambientales, ya que se encuentran mayormente en el medio ambiente. La infección de estas bacterias también puede ser por la mala utilización de cánulas y el descuido en las medidas profilácticas como deficiente higiene de los pezones y no sellado de las mismas. En el presente estudio, se identificó agentes bacterianos como *Streptococcus spp*, *Staphylococcus aureus* y *E. coli* mediante la observación de sus características macroscópicas, microscópicas y bioquímicas.

**Tabla 5.** Agentes etiológicos identificados.

	Muestras		Porcentaje
	Positivas	Negativas	
<i>Streptococcus spp</i>	23	26	46.94 %
<i>Staphylococcus aureus</i>	21	28	42.86 %
<i>Escherichia coli</i>	5	44	10.20 %
Total	49		100 %

#### **9.4 Resistencia de los agentes etiológicos causantes de la mastitis subclínica en las comunidades de Chancarani, Radio Urbano y Conde Kjecra del distrito de Langui.**

Para determinar la resistencia del *Streptococcus spp*, *Staphylococcus aureus* y *E. coli* frente a antibióticos de uso frecuente en la zona, se realizó pruebas de antibiogramas utilizando discos de sensibilidad, logrando determinar el tamaño del halo de inhibición del crecimiento bacteriano.

##### **9.4.1 Resistencia del *Staphylococcus aureus*.**

Se muestran los promedios y desviación estándar del tamaño de halo de inhibición del

crecimiento del *Staphylococcus aureus* alrededor de los discos de sensibilidad para varios antibióticos de uso frecuente. Para lo cual se explica que los halos de menor diámetro corresponden a cefalexina con 14.5 mm y amoxicilina con 12.9 mm, por tanto, nos indican que son los antibióticos que menor efecto tienen sobre la bacteria ( $p < 0.05$ ).

En la **Tabla 6**, se presenta los resultados de los antibióticos utilizados según la interpretación hecha por el comité nacional de estándares de laboratorio (CLSI), para *Staphylococcus áureos*, la cual demuestra una resistencia significativa frente a la penicilina G, cefotaxima y amoxicilina, sin embargo, también se muestra niveles de sensibilidad frente a la enrofloxacin, gentamicina, Sulfametoxazol y amoxicilina + ácido clavulánico. Estudios anteriores realizados por (Inestroza et al., 2020; Quispe et al., 2020 y Villanueva y Morales, 2017), nos dan a conocer que las cepas de *Staphylococcus aureus* presentan resistencia significativa frente a la penicilina G, en nuestros resultados se logra observar que también existe resistencia significativa frente a la penicilina G, así mismo, otro estudio de Rodríguez y Muñoz, (2017), indica que existe resistencia frente a la amoxicilina, tal como también se indica en nuestro estudio realizado. Otro estudio hecho por (Inestroza et al., 2020), indica que existe también resistencia significativa frente a la cefotaxima, de forma similar que el presente trabajo. Otro estudio presentado por Bonifaz y Colango, (2016), menciona que esta bacteria presentaría una marcada resistencia frente a la amoxicilina y una resistencia intermedia frente a gentamicina, de forma similar a nuestros resultados. También, otro estudio reciente menciona que este agente bacteriano presenta sensibilidad a la enrofloxacin, al igual que en nuestros resultados, que vendría a ser recomendable para casos de mastitis subclínica por *Staphylococcus aureus* (Chavarría y Meléndez, 2012). El grado de resistencia alta, intermedia o baja del *Staphylococcus aureus* frente a los antibióticos de uso frecuente viene a variar ligeramente por cuestiones geográficas, hábitos de uso de antibióticos y su frecuencia de uso, adicionalmente, las administraciones de éstos antibióticos a dosis inferiores a las recomendadas vendrían en los últimos años a generar diferentes grados de resistencia antimicrobiana.

**Tabla 6. Prueba de sensibilidad para *Staphylococcus aureus*.**

<b>Antimicrobiano</b>	<b>Puntos de interpretación del diámetro del halo mm (CLSI).</b>	<b>Tamaño de halo, mm <math>\bar{x} \pm DS</math></b>	<b>Interpretación</b>
ENR5 Enrofloxacina	S >23; I 20 a 22; R <19	26.7 <sup>a</sup> ± 0.46	Sensible
P10 Penicilina G	S >29; I -- ; R <28	25.7 <sup>a</sup> ± 1.05	Resistente
S10 Estreptomicina	S >15; I 12 a 14; R <11	23.8 <sup>a,b</sup> ± 0.32	Sensible
E15 Eritromicina	S >23; I 14 a 23; R <13	21.6 <sup>a,b</sup> ± 0.19	Intermedio
CN10 Gentamicina	S >15; I 13 a 15; R <12	19.7 <sup>a,b</sup> ± 0.32	Sensible
SMX50 Sulfametoxazol	S >16; I 11 a 15; R <10	19.6 <sup>a,b</sup> ± 0.17	Sensible
AUG30 Amoxicilina + ácido Clavulanico	S >17; I 14 a 17; R <14	18.5 <sup>a,b</sup> ± 1.05	Sensible
CTX15 Cefotaxima	S >26; I 23 a 25; R <22	14.5 <sup>b</sup> ± 0.72	Resistente
AML30 Amoxicilina	S >25; I 19 a 25; R <16	12.9 <sup>b</sup> ± 1.40	Resistente

Probabilidad

0.001

$\bar{x}$  = Promedio; DS = Desviación estándar.

Medias con letras diferentes en la misma columna difieren significativamente (P < 0.05).

Fuente: CLSI-VET01S (2024).

#### 9.4.2 Resistencia del *Streptococcus spp.*

Se muestran los promedios y desviación estándar del tamaño de halo de inhibición del crecimiento del *Streptococcus spp.* alrededor de los discos de sensibilidad para varios antibióticos de uso frecuente. Para lo cual se explica que el halo de menor diámetro corresponde a la amoxicilina con 4.2 mm, nos indican que son los antibióticos que menor efecto tienen sobre la bacteria ( $p < 0.05$ ). En la **Tabla 7**, se presenta los resultados de los antibióticos utilizados según la interpretación hecha por el comité nacional de estándares de laboratorio (CLSI), para *Streptococcus spp.*, la cual demuestra una resistencia significativa frente a cefotaxima y amoxicilina, sin embargo, también se muestra niveles de sensibilidad frente a la enrofloxacin, eritromicina y estreptomina así mismo se muestra resistencia intermedia frente a penicilina G, gentamicina. Estudios anteriores mencionan también que el *Streptococcus spp.* vendría desarrollando resistencia frente a la amoxicilina y gentamicina, según (Bonifaz y Colango, 2016; Miranda, 2018), de forma similar con nuestros resultados, también, en nuestros resultados se observó que hay una resistencia intermedia frente a la penicilina G, a diferencia de lo reportado por (Villanueva y Morales, 2017; Inestroza et al., 2020; Miranda y Morales, 2022), donde se menciona una marcada resistencia frente a la penicilina G, de esa manera también nuestros resultados demuestran que el *Streptococcus spp.* es altamente sensible frente a la enrofloxacin, de forma similar a un reporte anterior hecho por, Chavarría y Meléndez, (2012) y contrariamente otro estudio reportó que el *Streptococcus spp.* vendría a ser resistente a la enrofloxacin (Miranda y Morales, 2022). Igualmente, nuestros reportes indican una marcada sensibilidad frente a la eritromicina al igual que lo reportado (Báez et al., 2019). Esto demuestra que existe un cambio constante a lo largo del tiempo en lo que respecta al desarrollo de mecanismos de resistencia de las bacterias frente a los antibióticos de uso cotidiano. Adicionalmente, anteriores estudios reportan que el *Streptococcus spp.* podría tener cierto grado de resistencia frente a la cefalexina, cefalotina (Villanueva y Morales, 2017; Miranda y Morales, 2022), ampicilina (Inestroza et al., 2020), tetraciclina (Miranda, 2018; Stempler et al., 2022).

**Tabla 7. Prueba de sensibilidad para *Streptococcus spp.***

<b>Antimicrobiano</b>	<b>Puntos de interpretación del diámetro del halo mm (CLSI).</b>	<b>Tamaño de halo, mm <math>\bar{x} \pm DS</math></b>	<b>Interpretación</b>
ENR5 Enrofloxacina	S >21; I 17 a 20; R <16	25 <sup>a</sup> ± 0.49	Sensible
E15 Eritromicina	S >22; I 14 a 22; R <14	24.2 <sup>a</sup> ± 0.27	Sensible
P10 Penicilina G	S >24; I 18 a 23; R <17	22 <sup>a,b</sup> ± 0.99	Intermedio
S10 Estreptomina	S >15; I 12 a 14; R <11	21.1 <sup>a,b</sup> ± 0.22	Sensible
CTX15 Cefotaxima	S >24; I 21 a 23; R <20	18.8 <sup>a,b</sup> ± 0.65	Resistente
CN10 Gentamicina	S >18; I 14 a 17; R <13	15.9 <sup>b</sup> ± 0.29	Intermedio
AML30 Amoxicilina	S >22; I 19 a 21; R <18	4.2 <sup>c</sup> ± 0.93	Resistente

Probabilidad

0.001

$\bar{x}$  = Promedio; DS = Desviación estándar.

Medias con letras diferentes en la misma columna difieren significativamente (P < 0.05).

Fuente: CLSI-VET01S (2024).

#### 9.4.3 Resistencia de la *E. coli*

Se muestran los promedios y desviación estándar del tamaño de halo de inhibición del crecimiento de la *E. coli* alrededor de los discos de sensibilidad para varios antibióticos de uso frecuente. Para lo cual se explica que los halos de menor diámetro corresponden a gentamicina con 22 mm y sulfametoxazol con 21.2 mm, nos indican que son los antibióticos que menor efecto tienen sobre la bacteria ( $p < 0.05$ ).

En la **Tabla 8**, se presenta los resultados de los antibióticos utilizados, según la interpretación hecha por el comité nacional de estándares de laboratorio (CLSI), en la que la *E. coli*, demuestra sensibilidad significativa frente a todos los antimicrobianos utilizados como penicilina G, amoxicilina + ácido clavulánico, enrofloxacin, estreptomycin, gentamicina y sulfametoxazol. En la cual, un estudio anterior reporta que la *E. coli* podría mostrar sensibilidad a la enrofloxacin y gentamicina (Chavarría y Meléndez, 2012), tal como se muestra también en nuestros resultados. Contrariamente, también se reporta que la *E. coli* podría ser resistente a la penicilina G (Inestroza et al., 2020). También se reportan estudios de diferentes antibióticos utilizados para mastitis subclínica, en donde también se demuestra la presencia de resistencia de la *E. coli* frente a la ampicilina (Inestroza et al., 2020), al Rifampin (Vélez, 2022), Cefalexina y Tetraciclina (Bonifaz y Colango, 2016). también se identificaron algunos reportes que recomiendan además el uso de cefalexina, cefadroxil (Vélez, 2022), enrofloxacin y ciprofloxacina, puesto que la *E. coli* podría ser potencialmente sensible frente a estos antibióticos (Chavarría y Meléndez, 2012).

**Tabla 8. Prueba de sensibilidad para la *E. coli*.**

<b>Antimicrobiano</b>	<b>Puntos de interpretación del diámetro del halo mm (CLSI).</b>	<b>Tamaño de halo, mm <math>\bar{x} \pm DS</math></b>	<b>Interpretación</b>
P10 Penicilina G	S >18; I 14 a 16; R <13	35 <sup>a</sup> ± 0.52	Sensible
AUG30 Amoxicilina+ácido Clavulanico	S >18; I 14 a 17; R <13	32.8 <sup>a</sup> ± 0.73	Sensible
ENR5 Enrofloxacina	S >20; I 16 a 19; R <15	30.4 <sup>a,b</sup> ± 0.11	Sensible
S10 Estreptomina	S >15; I 12 a 14; R <11	24.4 <sup>b,c</sup> ± 0.25	Sensible
CN10 Gentamicina	S >15; I 13 a 14; R <12	22.0 <sup>c</sup> ± 0.12	Sensible
SMX50 Sulfametoxazol	S >16; I 11 a 15; R <10	21.2 <sup>c</sup> ± 0.65	Sensible

Probabilidad

0.001

$\bar{x}$  = Promedio; DS = Desviación estándar.

Medias con letras diferentes en la misma columna difieren significativamente (P < 0.05).

Fuente: CLSI-VET01S (2024).

## **X CONCLUSIONES:**

Los agentes etiológicos causantes de mastitis subclínica en las vacas en producción de las comunidades de Chancarani, Radio Urbano y Conde Kjecra del distrito de Langui, son el *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp*, y la *E. coli*.

Existe variabilidad en cuanto a la sensibilidad y resistencia de los antibióticos utilizados, por tanto, el *Staphylococcus aureus* demostró resistencia significativa frente a la penicilina G, cefotaxima y amoxicilina, el *Streptococcus spp* demostró resistencia significativa frente a la cefotaxima y amoxicilina, a diferencia de la *E. coli* que presento sensibilidad a todos los antibióticos utilizados, por lo que en el distrito de Langui las bacterias que ocasionan mastitis subclínica son resistentes a antibióticos de uso frecuente en la zona.

## **XI RECOMENDACIONES:**

Se recomienda implementar medidas de control y prevención específicas para la mastitis subclínica ya que esto puede incluir mejoras en las prácticas de manejo y también plantear protocolos de higiene para poder controlar la enfermedad.

Se recomienda el uso de la prueba CMT, para detectar mastitis subclínica por ser una prueba de campo rápida, sencilla, altamente sensible y específica.

Existe resistencia antimicrobiana, por lo que se sugiere realizar una selección más específica de antimicrobianos con un previo diagnóstico de la enfermedad. Esto nos ayudará a adaptar los tratamientos según la susceptibilidad específica de los agentes etiológicos, reduciendo así la resistencia antimicrobiana, resulta necesario que los ganaderos tengan registros manuales acerca de sus animales permitiendo así tener datos exactos acerca de la edad, edad de las crías, cuartos afectados, manteniendo así una información ordenada por animal.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Acosta, A., Mira, J., & Posada, S. (2017). Tópicos en mastitis bovina: desde la etiología hasta algunas terapias alternativas. *Journal of Agriculture and Animal Sciences*, 6(1), 42–58. <https://doi.org/10.22507/jals.v6n1a4>
- Alfonso, D., León, N., Pérez, C., Ruiz, A.K., & Álvarez, I. (2020). Comportamiento de la mastitis bovina en hatos lecheros del sector campesino de la provincia Villa Clara, Cuba. *Revista de Salud Animal*, 42(3).<http://scielo.sld.cu/pdf/ras/v42n3/2224-4700-rsa-42-03-e10.pdf>.
- Alvarado, T. (2012). Evaluación de los análisis físicos-químicos de la leche de los diferentes hatos bovinos del cantón Daule. Tesis de pre grado. Universidad de Guayaquil 80 pag.
- Ashraf, A., & Imran, M. (2018). Diagnóstico de mastitis bovina: del laboratorio a la explotación. *Sanidad y Producción Animal Tropical*, 50(6), 1193–1202. <https://doi.org/10.1007/s11250-018-1629-0>.
- Ayala OD, Wakeman CA, Pence IJ, Gaddy JA, Slaughter JC, (2022) *Identificación de estafiloxantina y derivados en Staphylococcus capitis subsp. capitis* de pigmentación amarilla *frontiers in Microbiology* . doi: 10.3389/fmicb.2023.1272734.
- Báez, M., Ortega, O., Lara, M., & Arce, A. (2019). Determinación de la sensibilidad de los antimicrobianos de *Streptococcus spp* en vacas lactantes positivas a la prueba de mastitis de California en el departamento de la cordillera-Paraguay. *Ciencia Veterinaria*, 21(2), 13–28. <https://doi.org/10.19137/cienvet-201921201>.
- Barker, J. C., et al. (2019). "Associations between *Streptococcus uberis* strains from the animal environment and clinical bovine mastitis cases." *Journal of Dairy Science*, 102(11), 10125–10135. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16285>.
- Benić, M., Maćesić, N., Cvetnić, L., Habrun, B., Cvetnić, Z., & Turk, R. (2018). Mastitis bovina: un problema persistente y en evolucion que requiere enfoques novedosos para su control. *Veterinario Arh*, 88:535-57. doi:10.24099/vet.arhiv.0116.
- Boeris, A., Genero, A., & Meglia, E. (2016). *Glándula mamaria y lactación*, Universidad Nacional de la Pampa. Santa rosa. 1ª edición. Argentina. ISBN. Santa rosa. 1ª edición. Argentina. ISBN: 978-950-863-262-3.-Estructura de la glándula mamaria. (s.f.).agrobit. [agrobit/Documentos/E\\_3\\_Producci/483\\_ga000019pr\[1\].htm](http://agrobit/Documentos/E_3_Producci/483_ga000019pr[1].htm).

- Bedolla, C., Domínguez, R.L., Cruz, A. R., Castañeda, H., Valladares, B., Velázquez, V., Huerta & R., Cordova, A. (2020). Agentes patógenos causantes de mastitis aislados de leche de vacas lecheras. *Revista Veterinaria Argentina*, XXXVII(338). <https://www.veterinariargentina.com/revista/2020/08/agentes-patogenos-causantes-de-mastitis-aislados-de-leche-de-vacas-lecheras/>
- Bolaños, F., Fernando, O., Graffe, T., Eduardo, J., Cabrera, P., Javier, J., Gallego, C., Salcedo, G., & Tatiana, Y. (2012). Mastitis bovina: Generalidades y métodos de diagnóstico. *Revista Veterinaria REDVET*, 13(11). [www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar).
- Bonetto, C. (2014). *Mastitis bovina causada por Staphylococcus coagulasa negativos*. [Tesis de doctorado, Universidad Nacional de la Plata]. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/40427>.
- Bonifaz, N., & Colango, F. (2016). Prevalencia e incidencia de mastitis bovina mediante la prueba de california mastitis test con identificación del agente etiológico, en Paquiestancia en el cantón de Ecuador. *Revista Científica La Granja Ecuador*, 24(2). <https://doi.org/10.17163/lgr.n24.2016.04>
- Brousett-Minaya, M., Torres, A., Chambi, A., Mamani, B., & Gutiérrez, H. (2015). Calidad fisicoquímica, microbiológica y toxicológica de la leche cruda en cuencas ganaderas de la región Puno-Perú. *Scientia Agropecuaria*, 165–176. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2015.03.03>
- Campos, B., Pickering, A. C., Rocha, L. S., Aguilar, A. P., Fabres-Klein, M. H., de Oliveira, T. A., Fitzgerald, J. R., & de Oliveira, A. (2022). Diversidad y patogenia de *Staphylococcus aureus* en la mastitis bovina: conocimientos actuales y perspectivas futuras. En *BMC Veterinary Research* (Vol. 18, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03197-5>.
- Cabrera, C., Gomez, R., & Zuñiga, A. (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Medica*, (2):149-158.
- Castañeda, H., Padilla, F., Castañeda, M., Camacho, J., & Salas, E. (2020). Variación genética de *Staphylococcus aureus* causante de mastitis en vacas lecheras en Jalisco. *Abanico Veterinario*, 10, 1–15. <https://doi.org/10.21929/abavet2020.21>
- Celis, E. (2017). Epidemiología de la mastitis subclínica de la vaca lechera en el departamento de Chiquimula. *Revista Ciencia Multidisciplinaria CUNORI*. (2) 4-5. DOI: <https://doi.org/10.36314/cunori.v2i1.32>.

- Chavarría, S. & Meléndez, L. (2012). *Identificación de agentes bacterianos implicados en mastitis subclínica y perfil de resistencia en vacas que abastecen los centros de acopio Tecuana me y El Sauce en el departamento de León*. [Tesis licenciado en Medicina Veterinaria. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua]. <http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/handle/123456789/5929>.
- Chávez, C. M., Córdova, G. L., Muñoz, E., & Otiniano, M. (2019). *Evaluación comparativa de Agar Sangre de Carnero y Agar Sangre Humana en el aislamiento de Streptococcus beta hemolíticos de pacientes con faringitis del Hospital Almanzor Aguinaga Asenjo de Chiclayo, Perú*. *Revista Médica Vallejana*, 4(2), 148–154.
- Cruz-Soto, A. S., Toro, V., Munguía, C. O., Torres, J. E., Flores, L. E., Loeza, P. D., & Jiménez, R. (2020). Relación genética, formación de biopelículas, movilidad y virulencia de *Escherichia coli* aislada de mastitis bovina. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 11(1), 167–182. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i1.4998>.
- CLSI-VET01S. (2024). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals, 7th Edition. Clinical & Laboratory Standards Institute. <https://clsi.org/standards/products/veterinarymedicine/documents/vet01s>.
- Colque, P. (2015). *Determinación de la prevalencia e incidencia de mastitis subclínica en vacunos Brown Swiss del distrito de Chamaca - Chumbivilcas - Cusco*. [Tesis para optar el título profesional de Médico Veterinario zootecnista. Universidad Nacional del Altiplano]. Obtenido de <http://repositorio.unap.edu.pe/handle/20.500.14082/1851>.
- Colango, V. (2013). *Pruebas biológicas california mastitis test (CMT)*. Obtenido de <https://1library.co/article/pruebas-biol%C3%B3gicas-california-mastitis-test>.
- Condori, A. (2017). *Prevalencia y factores de riesgo de mastitis subclínica en vacunos Brown Swiss del distrito de Umachiri - Melgar*. [Tesis para optar el título profesional de Médico Veterinario Zootecnista. Universidad Nacional del Altiplano Puno]. <http://repositorio.unap.edu.pe/handle/20.500.14082/6867>
- Costa, J , Von, KM, Weary, DM (2016). Revisión por invitación: Efectos del alojamiento en grupo de terneros lecheros sobre el comportamiento, la cognición, el rendimiento y la salud. *J. Dairy Sci.* 2016; 99 :2453-2467 <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10144> 26874423.
- Dash, M., Padhi, S., Mohanty, I., Panda, P., & Parida, B. (2024). Prevalence and antimicrobial resistance patterns of diarrheagenic and uropathogenic *Escherichia coli* in Odisha, India. *One Health Bulletin*, 2(2), 85–92. [https://doi.org/10.4103/ohbl.ohbl\\_42\\_23](https://doi.org/10.4103/ohbl.ohbl_42_23).

- De Luca, L. J., Caggiano, N., & Castrillon, M. (2020). Daño en el tejido mamario durante la mastitis bovina (parte I). *Actualidad ganadera*. Facultad de ciencias agrarias – UNLZ [https://actualidadganadera.com/dano-en-el-tejido-mamario-durante-la-mastitis-bovina-parte-i/?utm\\_source=chatgpt.com](https://actualidadganadera.com/dano-en-el-tejido-mamario-durante-la-mastitis-bovina-parte-i/?utm_source=chatgpt.com).
- Duarte, C. M., Freitas, P. P., & Bexiga, R. (2015). Avances tecnológicos en el diagnóstico de mastitis bovina: una visión general. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* (Vol. 27, Issue 6, pp. 665–672). SAGE Publications Inc. <https://doi.org/10.1177/1040638715603087>.
- European Food Safety Authority (EFSA) (2021). *Assessment of animal diseases caused by bacteria resistant to antimicrobials: cattle*. *EFSA Journal*. 19(6):45-66.
- Espinoza, G., Velásquez, C., & Vásquez, A. (2023). Mastitis clínica y eficiencia reproductiva en vacas Holstein en el valle de Huaura, Perú. *Revista Peruvian Agricultural Research*, 5(1), 69–75.
- Escobedo, C. U., Trigo, M. J., & Murga, N. L. (2021). *Comparación de dos pruebas de campo para determinar la mastitis subclínica en bovinos en la localidad de Florida - Pomacochas, 2019*. *Revista de Investigación Agropecuaria Science and Biotechnology*, 1(4)26-47.
- Experiencia veterinaria (2020). Anatomía y fisiología de la glándula mamaria. 27 de mayo de 2020. <https://www.experiencia.vet/blog/rumiantes/anatomia-y-fisiologia-de-la-glandula-mamaria/>.
- Ferronato, J. A., Ferronato, T. C., Schneider, M., Pessoa, L. F., Blagitz, M. G., Heinemann, M. B., Della Libera, A. M. M. P., & Souza, F. N. (2018). Diagnóstico de mastitis en lactación temprana: uso de Somaticell®, prueba de mastitis de California y recuento de células somáticas. *Revista Italiana de Ciencia Animal*, 17(3), 723–729. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2018.1426394>.
- Gao, X. (2024). The Role of Gram Staining in Bacterial Identification and Clinical Diagnostics. *Virology & Mycology*, 13(4), 310. <https://doi.org/10.35248/2161-0517.24.13.310>.
- Galas, M., & Pastean, F. (2006). Sensibilidad a los antimicrobianos. *Revista argentina DNF* (4) 7-8.
- García, A. (2016). Mastitis contagiosa vs ambiental. *Sitio Argentino de Producción Animal*, 1–4. [www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar).
- Gamboa, P., (2023) Propiedades, estructura y composición de la leche. Tecnológico Nacional de México – Instituto Tecnológico de Tuxtepec. "Tecnología y Aprovechamiento Integral de Alimentos II" 03 de marzo 2023. [https://es.scribd.com/document/629335004/PROPIEDADES-ESTRUCTURA-Y-COMPOSICION-DE-LA-LECHE?utm\\_source=chatgpt.com](https://es.scribd.com/document/629335004/PROPIEDADES-ESTRUCTURA-Y-COMPOSICION-DE-LA-LECHE?utm_source=chatgpt.com).

- Gasque, R. (2015). Capítulo 11: Glándula mamaria y secreción láctea. In *Enciclopedia bovina* (UNAM).
- Gore Cusco, (2020). "Análisis de la situación de salud de la provincia de Canchis". Red de Salud canas Canchis Espinar.  
[https://www.redsaludcce.gob.pe/Modernidad/archivos/epidemiologia/ASIS/ASIS\\_Canchis\\_2020.pdf](https://www.redsaludcce.gob.pe/Modernidad/archivos/epidemiologia/ASIS/ASIS_Canchis_2020.pdf).
- Gonzales, R., Melendez, C., Elizalde, B., Cortez, M., & Orduña, M. (2020). Las tinciones básicas en el Laboratorio de Microbiología: Un enfoque gráfico. *UNAM, FES Zaragoza*.
- Grossman, J., & Sisson, S. (2000). Anatomía de los animales domésticos. Ed. Elsevier Masson. 5ta edición. tomo 2. (2) 442-442.
- Hassan, J., Bag, M., Ali, M., Kabir, A., Hoque, M., Hossain, M., Khan, M. (2023). Diversidad de *Streptococcus spp* y características genómicas de *Streptococcus uberis* aislado de mastitis clínica del ganado en Bangladesh. *Front. Vet. Sci.* doi:10.1198393. doi: 10.3389/fvets.2023.1198393.
- Hernandez, R. (2016). Metodología de la investigación. *McGrw-Hill Education*.6 edicion:2(6)33-45
- Inestroza, F., Zepeda, T., Galindo, L., Salazar, C., Morán, A., & Corea, E. (2020). Efecto de tres selladores de barrera sobre la incidencia de mastitis subclínica y la evaluación de resistencia a antibióticos de tres bacterias patógenas en dos lecherías en el municipio de Caluco, Sonsonate, El Salvador. *AGROCIENCIA - Revista Científica de La Facultad de Ciencias Agronómicas de La Universidad de El Salvador*, 114–130. <https://revistaagrociencia.wordpress.com/>.
- Jiménez V, S., Torres, L. D., Parra, J. L., Rodríguez B, J. L., García C, F. E., & Patiño B, R. E. (2020). Perfil de resistencia antimicrobiana en aislamientos de *Staphylococcus spp.* obtenidos de leche bovina en Colombia. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(2), 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.05.004>.
- Kabelitz, T., Aubry, E., Van Vorst, K., Amon, T., Fulde, M., & Fulde, T. (2021). El papel de *Streptococcus spp* en la mastitis bovina.12(4)164-94 doi:10.3390/MICROORGANISMSMS9071497.
- Kruze, J. (2015). Etiología de mastitis bovina: características de los patógenos más relevantes. In *Simp sio Nacional da Vaca Leiteira* (pp. 3–33).
- Liu, K., Liu, X., Yang, J., Gu, X., Zhang, L., & Qu, W. (2024). *Streptococcus agalactiae* aislado de casos de mastitis clínica en grandes granjas lecheras del norte de China: fenotipo, genotipo de resistencia a los antimicrobianos y genes de virulencia. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 14, 1417299. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1417299>.

- López, V. (2009). *Evaluación del efecto antibacteriano in vitro de seis especies de plantas de uso medicinal sobre bacterias causantes de mastitis en vacas lecheras*. [Tesis para optar el grado de Medicina Veterinaria. Universidad de San Carlos de Guatemala]. <http://www.repositorio.usac.edu.gt/id/eprint/3345>.
- Macias, H.; Hinck, L. (2012). Desarrollo de la glándula mamaria. *WIREs Dev. Biol.* 2012 , 1 , 533–557.
- Mamani, R. (2014). *Prevalencia y factores de riesgo de mastitis subclínica en vacunos Brown Swiss del distrito de Cupi - Melgar*. [Tesis para optar el título profesional de Médico Veterinario Zootecnista. Universidad Nacional del Altiplano - Puno]. <http://repositorio.unap.edu.pe/handle/20.500.14082/2173>.
- Matthew, A., Croxen, Robyn, J. L., Roland, S., Kristie, M., Keeney, . . . Brett, F. (2013). *Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic Escherichia coli» [Avances recientes en el entendimiento de la E. coli enteropetogenica*. *clinical Microbiology Reviews*. doi:ISSN 1660-4601doi:10.1128/CMR.00022-13.
- Manual de Procedimientos de Microbiología Clínica, Cuarta Edición. (2016). En *Manual de Procedimientos de Microbiología Clínica, Cuarta Edición*. Sociedad Americana de Microbiología. <https://doi.org/10.1128/9781555818814>.
- Marjolein, T. (2020) "El Agar de sal de manitol para el aislamiento de *Staphylococcus aureus*". Marjolein Teepen. Publicado el 7 de octubre de 2020.
- Medrano-Galarza, C., Romero Z, J. A., & Pineda, P. (2021). Prevalencia, incidencia y factores de riesgo de la mastitis subclínica en lecherías especializadas de Colombia. *Agronomía Mesoamericana*, 32(2), 149–169. <https://doi.org/10.15517/am.v32i2.43794>
- Mekonnen , S., Koop, G., Melkie, S., Getahun, C., Hogeveen, H., & Lam, T. (2017). Prevalence of subclinical mastitis and associated risk factors at cow and herd level in dairy farms in North-West Ethiopia. *Prev vet Med*. doi:10.1016/J.PREVETMED.2017.06.009.
- Miranda, M. (2018). *Determinación de patógenos frecuentes con su perfil de sensibilidad de la mastitis sub clínica presentada en 4 establos lecheros de Lurín*. [Tesis para optar el título de Médico Veterinario.Universidad Científica del Sur]. <https://hdl.handle.net/20.500.12805/572>

- Miranda Q, M., & Morales-Cauti, S. (2022). Evaluación de la resistencia antibiótica de bacterias aisladas de mastitis subclínica en bovinos de establos lecheros de Lurín, Lima. *Salud y Tecnología Veterinaria*, 10(1), 8–15. <https://doi.org/10.20453/stv.v10i1.4235>
- Municipalidad Distrital de Langui. Encuesta ganadera municipal (2021).
- NORMA TÉCNICA PERUANA NTP 202.001 (2016) LECHE Y PRODUCTOS LACTEOS. Leche. Cruda. Requisitos 145 Lima, Perú 2016-22-12 6ª Edición.
- Ormaza, D & Rueda, R. (2021). *Identificación del agente etiológico y evaluación de nosodes en el tratamiento de mastitis bovina en el Cantón de Montufar. Universidad Politécnica Estatal de Carchi*. [Tesis para optar el grado de Médico Veterinario] <http://repositorio.epec.edu.ec/handle/123456789/1032>.
- Ortiz, T., Rodríguez, H., & Olivera, M. (2014). Manual de buenas prácticas de ordeño. *Biogenes. Inv Vet*, 14 (1) 68 - 73.
- Ortiz, Y., García-Amézquita, E., Acosta, CH y Sepúlveda, DR (2017) Productos Lácteos Funcionales. En: Barbosa-Cánovas, GV, et al., Eds., Seguridad Alimentaria Global y Bienestar, Springer Science + Business Media, Nueva York, 67-103.
- Olmos-Hernández, SA; Ghezzi, MD; Napolitano, F.; Cuibus, A.; Álvarez-Macías, A.; Braghieri, A.; Mota-Rojas, D. (2020). Anatomofisiología de La Glándula Mamaria: Neuroendocrinología de La Eyección Láctea En La Búfala de Agua. En *El búfalo de Agua en Latinoamérica, Hallazgos Recientes*; Napolitano, F., Mota-Rojas, D., Guerrero-Legarreta, I., Orihuela, A., Eds.; BM Editores: Ciudad de México, México, 2020; págs. 720–771.
- Paredes, F., & Roca, J. (marzo de 2004). Acción de los antibióticos: perspectiva de la medicina antimicrobiana. *Offarm*, vol 23(3) 5-8.
- Poizat, U., Bonnet-Beaugrand, F., Rault, U., Fourichon, C., Bareille, N. (2017). Uso de antibióticos por parte de los ganaderos para controlar la mastitis según los consejos sanitarios y los sistemas de producción lechera. *Medicina veterinaria anterior*.1 de octubre de 2017:146:61-72. doi: 10.1016/j.prevetmed.2017.07.016. Epub 25 de julio de 2017.
- Quispe, R., Peña, G., & Andía, V. (2020). Resistencia antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* aislados de leche de vacas con mastitis. *Revista Veterinaria*, 32(3), 79–83.

- Ramírez, N., Rodrigo, L., Lobo, E., (2023) Etiología de la Mastitis bovina en Zamora-Chinchipe, Ecuador. *Salud Animal*, Recepción: 05 Julio 2023 Aprobación: 10 agosto 2023. [https://www.redalyc.org/journal/7624/762478457002/?utm\\_source=chatgpt.com](https://www.redalyc.org/journal/7624/762478457002/?utm_source=chatgpt.com).
- Realpe, D. (2022). *Caracterización de patógenos causantes de mastitis clínica y subclínica y perfil de sensibilidad "In vitro" en dos fincas con diferentes condiciones climáticas*. [Tesis para optar el título de Médico Veterinario. Universidad Antonio Nariño Colombia]. <https://repositorio.uan.edu.co/items/1f5aab3a-01a8-45a5-a4b2-45b6a4501c81>.
- Riffon, R., Sayasith, K., Khalil, H., Dubreuil, P., Drolet, M., & Lagace, J. (2001). *Desarrollo de una prueba rápida y sensible para la identificación de los principales patógenos en la mastitis bovina mediante PCR*. *J Clin Microbiol*.12(6),121-145.
- Rodríguez, R., & Muñoz, E. (2017). Frecuencia y susceptibilidad antimicrobiana de bacterias causantes de mastitis en una explotación lechera de Trujillo, Perú. In *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* (Vol. 28, Issue 4, pp. 994–1001). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. <https://doi.org/10.15381/rivep.v28i4.13874>.
- Sánchez, D. S., & Mamani, M, G. D. (2022). Mastitis bovina subclínica y factores de riesgo ambientales en pequeños productores de ganado lechero criados en la altura. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 33(1). <https://doi.org/10.15381/rivep.v33i1.20466>.
- Santivañez B, C., Gomez , O., Cardenas V, L., Escobedo E, M., Bustinza C, R., & Peña S, J. (2013). Prevalencia y factores asociados a la mastitis subclínica bovina en los Andes peruanos. *Veterinaria y Zootecnia ISSN 2011-5415*.
- SENAMHI. (2012). Caracterización climática de las regiones Apurímac y Cusco - Informe final de investigación del estudio bi-regional disciplinario realizado. <https://repositorio.senamhi.gob.pe/handle/20.500.12542/1912?show=full>.
- Sharma, D., & Bacic, G. (2022). El potencial de la terapia con células madre para combatir la mastitis en los animales lecheros. *Stem Cells in Veterinary Science*, 1(2) 63–76.
- Shoab, M., Aquib, A., Naseer, M., Bhutta, Z., Wanxia, P., Tanveer, Q., & Hammad, M. (2021). Etiología de la mastitis bovina en bovinos lecheros con mastitis. *Ovinos y caprinos*, 6(4), 67–70.
- Stanchi, N. (2007). *Microbiología Veterinaria*. Edi. Mcgraw-Hill Interamericana, Buenos Aires, AR. *InterMedica* 163, 179-198.

- Stempler, A., Muñoz, A. J., & Lucas, M. F. (2022). *Streptococcus uberis* y su importancia como agente causal de mastitis bovina. *Revista Veterinaria*, 33(2), 192–201. <https://doi.org/10.30972/vet.3326181>.
- Sumon, SMMR, Parvin, MS, Ehsan, MA e Islam, MT (2020). *Relación entre el recuento de células somáticas y la mastitis subclínica en vacas lecheras lactantes*. *Veterinary World*, 13(8), 1709-1713.
- Sztachańska, M. · Barański, W. · Janowski, T. (2016). Prevalencia y agentes etiológicos de la mastitis subclínica al final de la lactancia en nueve rebaños lecheros del noreste de Polonia. *Pol. J. Veterinario. Ciencia*. 2016; 19 :119-124 <https://doi.org/10.1515/pjvs-2016-0015> 27096795.
- Tang KWK, Millar BC, Moore JE. Antimicrobial resistance (AMR). *Br J Biomed Sci [Internet]*. 2023 [revisado 28 junio 2023, consultado 5 noviembre 2024]; 80:11387 Disponible en: 3389/bjbs.2023.11387.
- Tmmedia, C (2024). MacConkey Agar: Isolation and Differentiation of Gram-negative Bacteria. *Medium*. Recuperado de <https://medium.com/@tmmediapharma/macconkey-agar-isolation-and-differentiation-of-gram-negative-bacteria-d1e82839ca61>.
- Toscano, J. D., & Burgos, A. R. (2025). *Factores de riesgo durante el ordeño asociados a mastitis subclínica bovina por Staphylococcus aureus meticilino resistente (MRSA)*. *Revista de Medicina Veterinaria*, 12(2).
- Vargas, G. (2024) "*Efecto de la mastitis subclínica sobre las propiedades fisicoquímicas de la leche en vacas del distrito de Santa Rosa-Puno*." [Tesis para optar el grado de Médico Veterinario. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco]. <http://hdl.handle.net/20.500.12918/8975>.
- Valdivia, A.L., Rubio, Y., & Camacho, C. (2023). Mastitis bovina un reto para la producción lechera. *Revista de Producción Animal*, vol. 35, núm. 2, pp. 109-121, 2023. Ediciones Universidad de Camagüey Recepción: 02 Julio 2023.
- Valle, K. (2022). Mastitis y calidad de la leche en vacas lecheras. *Revista Científica Agropecuaria*, (IICA/CATIE, Vol. 1). <http://orton.catie.ac.cr/reprodoc/A6379E/A6379E.PDF> 1, 55–60.
- Velásquez, C., & Vega, J. (2012). Calidad de la leche y mastitis subclínica en establos de la provincia de Huaura - Lima. In *Rev Inv Vet Perú* (Vol. 23,(1) 34-67

- Vélez, J. (2022). *Incidencia de mastitis bovina subclínica mediante la prueba de california mastitis test (CMT) con identificación del agente etiológico*. [Tesis para optar el grado de Ingeniero Zootecnista. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/17844>.
- Vezina B, Al-Harbi H, Ramay HR, Soust M, Moore RJ, Olchoway TWJ, Alawneh JI. Caracterización de secuencias y nuevos conocimientos sobre *Streptococcus uberis* asociado a mastitis bovina en hatos lecheros. *Sci Rep*. 4 de febrero de 2021;11(1):3046.
- Vieira, V. V., Texeira, L. M., Zahner, V., Momen, H., Facklam, R. R., Steigerwalt, A. G., Castro, A. (1998). *Relaciones genéticas entre los diferentes fenotipos de cepas de Streptococcus dysgalactiae*. *Int J Bacteriol*.24(8),154-187
- Villanueva. (2016). Determinación de resistencia antibiótica de patógenos bacterianos aislados de mastitis clínica bovina de crianza intensiva en Lurín, Perú. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, vol. 18, núm. 12, diciembre, 2017, pp. 1-12.
- Villanueva, G., & Siever, M. (2017). Resistencia antibiótica de patógenos bacterianos aislados de mastitis clínica en bovinos de crianza intensiva. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 18(12), 1695–7504.
- Wattiaux,A.(1998).Secreción de leche por la ubre de una vaca lechera. InstitutoBabcock para la investigación y desarrollo internacional para la industria lechera (Universidad de Wisconsin –madison– USA., Ed,) primera edición vol. 1(2)94-110.
- Yakupoğulları Y, Otlu B, Çelik B, Gözükara Bağ HG. (2019) "Rendimiento de la espectrometría de masas MALDI-TOF para la identificación de bacterias gramnegativas cultivadas en agar eosina azul de metileno (EMB): Un método sencillo para mejorar la eficacia de la identificación". *Mikrobiyol Bul*. Enero de 2019;53(1):1-11. doi: 10.5578/mb.67523.
- Zadoks, R., Allore, G., Barkema, W., Sampimon, C., Wellenberg, J., Gron, T., & Schukken, Y. (2001). Factores de riesgo a nivel de vacas y cuartos para el *Streptococcus uberis* y el *Staphylococcus aureus*. *Journal of Dairy Science*, 84(12), 2649–2663.
- Zhang, X., et al. (2021). *Antimicrobial Resistance and Virulence Factor of Streptococcus dysgalactiae Isolated from Clinical Bovine Mastitis Cases in Northwest China*. *Frontiers in Veterinary Science*. 31 de agosto de 2021;14:3519–3530. doi: [10.2147/IDR.S327924](https://doi.org/10.2147/IDR.S327924)

**ANEXOS:**



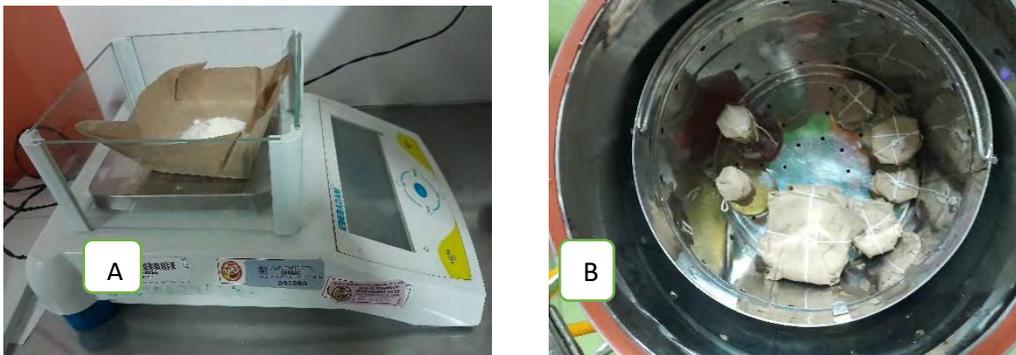
**Figura 4:** identificación aleatoria de vacas en producción del distrito de Langui.



**Figura 5:** Identificación de casos de mastitis subclínica mediante la prueba de CMT.



**Figura 6:** Muestras de leche positivas con mastitis subclínica, colectadas en cooler refrigerante, para cultivo bacteriano.



**Figura 7:** *A: Pesado del agar en polvo en bascula . B: homogenización de los agares (sangre, MacConkey y Mueller-Hinton) y esterilización de las placas petri en autoclave.*

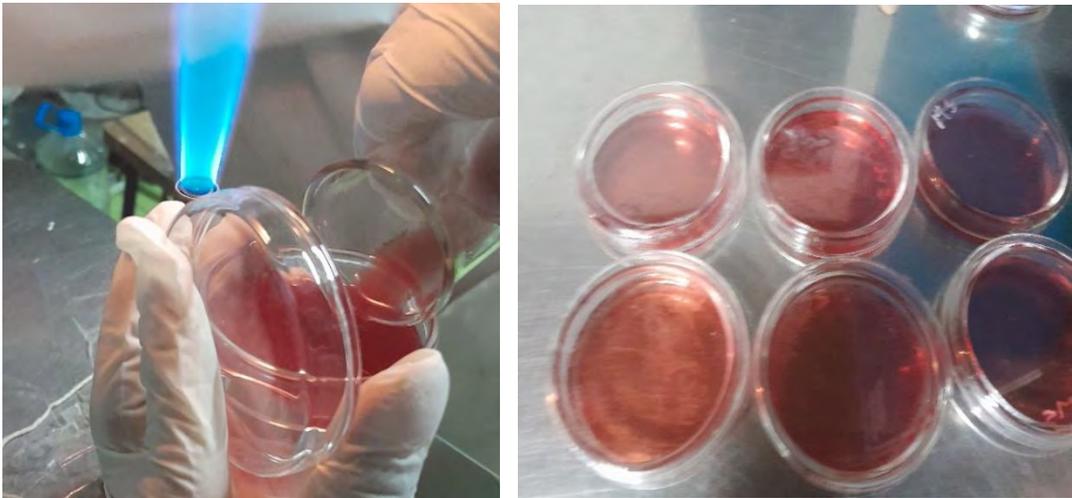


**Figura 8:** *Preparación de medios de cultivo.*

*A: Agar Sangre B: Agar MacConkey C: Agar Mueller-Hinton.*



**Figura 9:** *A: Sangre de ovino colectado un tubos de heparina con anticoagulante B: Enriquecimiento con sangre de cordero para nutrir el agar sangre a 45° chorro lento.*

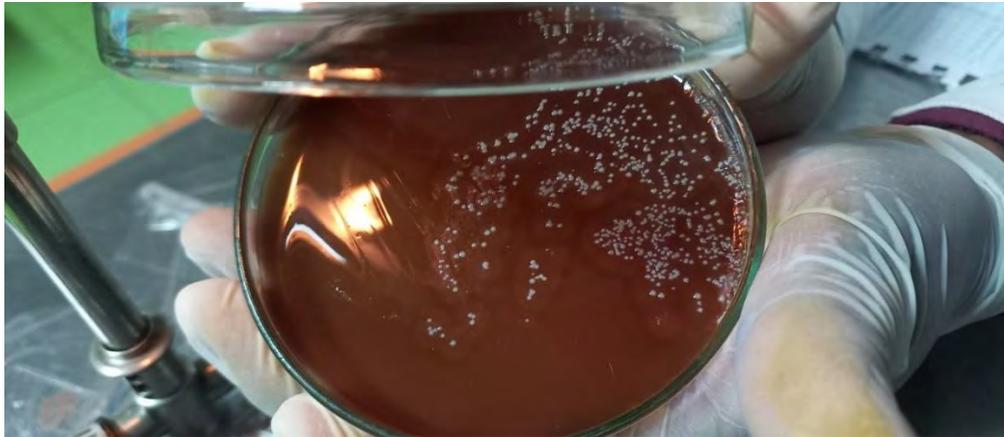


**Figura 10:** Vertiendo el agar ya homogenizado sobre la placa petri.



**Figura 11:** Siembra de las muestras de leche sobre placas de agar sangre y agar MacConkey.

**PRUEBA MACROSCOPICA:**

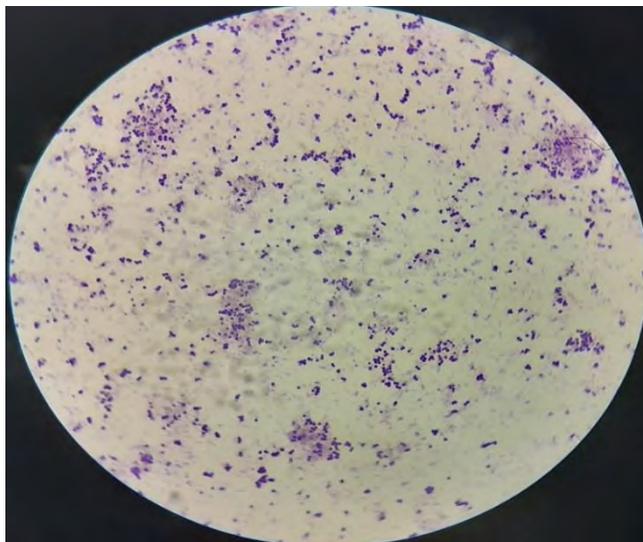


**Figura 12:** *Identificación macroscópica de las colonias de agar sangre y agar MacConkey*

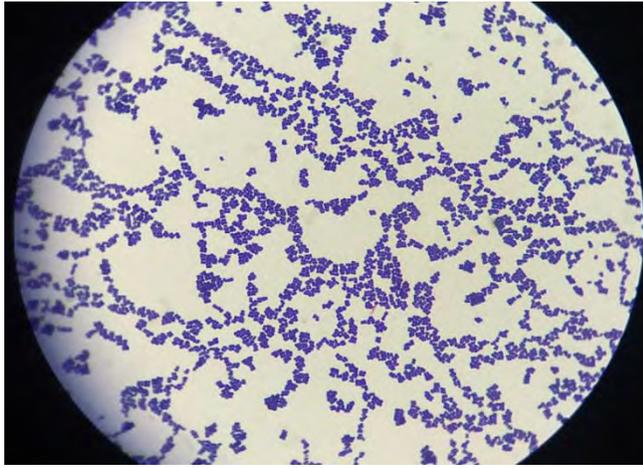
**PRUEBAS MICROSCÓPICAS.**



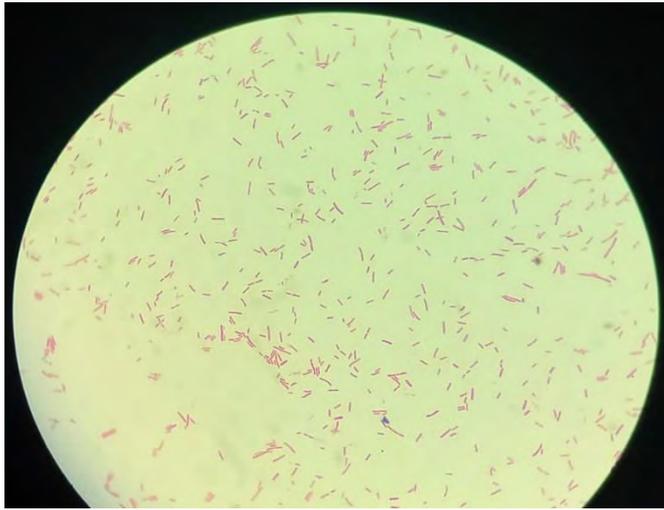
**Figura 13:** *Fijación bacteriana en lamina porta objeto, mediante la prueba Tinción Gram.*



**Figura 14:** *Tinción Gram, foto microscópica a 100X bacterias Gram positivos Streptococcus spp.*



**Figura 15:** Tinción Gram, foto microscópica a 100X bacterias Gram positivos *Staphylococcus spp.*



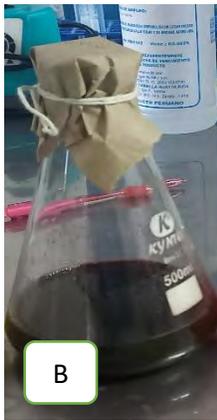
**Figura 16:** Tinción Gram, foto microscópica a 100X, se aprecia bacilos Gram negativos.

**PRUEBAS BIOQUIMICAS:**

**Figura 17:** Preparación de medios selectivos.



**A:** Agar manitol salado



**B:** Agar EMB



**C:** Agar citrato de simmons



**Figura 18:** *Crecimiento y cambio de coloración de las colonias (amarillento) en agar manitol salado.*



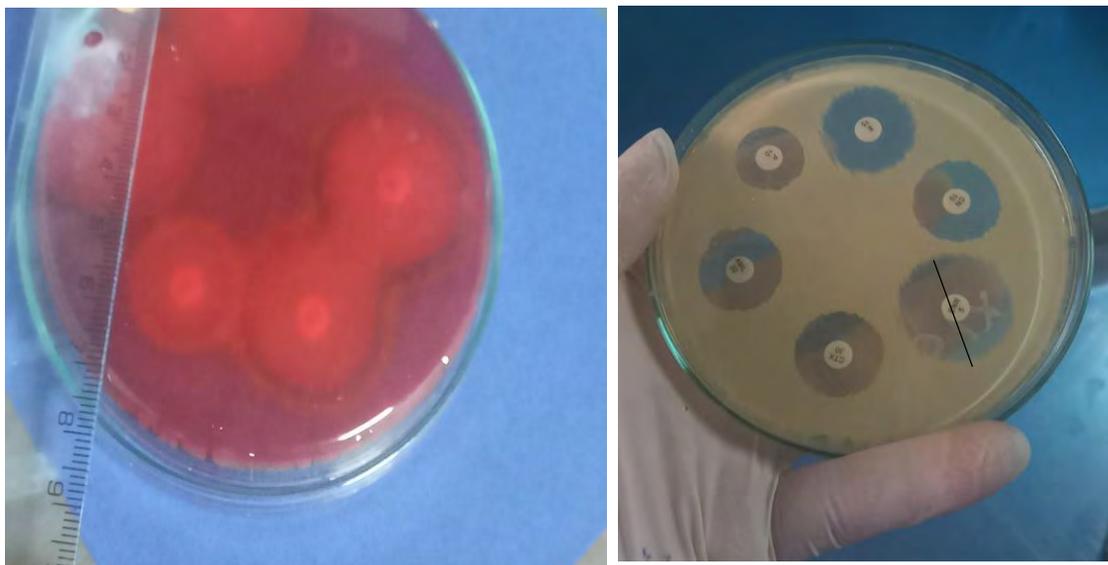
**Figura 19:** *Crecimiento y cambio de coloración de las colonias (negro azulado) en agar EMB.*



**Figura 20:** *Ausencia de crecimiento y coloración (azul), en Agar citrato de simmons.*



**Figura 21:** *Identificación del crecimiento bacteriano en presencia de los discos de sensibilidad.*



**Figura 22:** *Determinación del tamaño del halo de inhibición alrededor de los discos de sensibilidad en mm.*

Tabla complementaria 7. Características macroscópicas del *Streptococcus spp.*

N°	Bacteria	Medio de cultivo	Tamaño mm	Forma	Borde	Elevación	Textura	Color	Hemólisis
1	<i>Streptococcus spp</i>	Sangre	1.5	Puntiforme	Entero	Convexo	Lisa	Blanco lechoso	Parcial
2	<i>Streptococcus spp</i>	Sangre	1	Puntiforme	Entero	Convexo	Lisa	Blanco humo	Parcial
3	<i>Streptococcus spp</i>	Sangre	1	Puntiforme	Entero	Convexo	Lisa	Blanco lechoso	Parcial
4	<i>Streptococcus spp</i>	Sangre	2	Puntiforme	Regular	Convexo	Lisa	Blanco humo	Total
5	<i>Streptococcus spp</i>	Sangre	1	Puntiforme	Regular	Convexo	Lisa	Blanco humo	Total
6	<i>Streptococcus spp</i>	Sangre	1.5	Puntiforme	Entero	Convexo	Lisa	Blanco lechoso	Parcial
7	<i>Streptococcus spp</i>	Sangre	1	Puntiforme	Entero	Convexo	Lisa	Blanco humo	Parcial
8	<i>Streptococcus spp</i>	Sangre	1	Puntiforme	Entero	Convexo	Lisa	Blanco lechoso	Parcial
9	<i>Streptococcus spp</i>	Sangre	1	Puntiforme	Entero	Convexo	Lisa	Blanco lechoso	Parcial
10	<i>Streptococcus spp</i>	Sangre	1.5	Puntiforme	Entero	Convexo	Lisa	Blanco lechoso	Parcial
11	<i>Streptococcus spp</i>	Sangre	1	Puntiforme	Entero	Convexo	Lisa	Blanco humo	Parcial
12	<i>Streptococcus spp</i>	Sangre	2	Puntiforme	Regular	Convexo	Lisa	Blanco lechoso	Parcial
13	<i>Streptococcus spp</i>	Sangre	1.5	Puntiforme	Entero	Convexo	Lisa	Blanco humo	Parcial
14	<i>Streptococcus spp</i>	Sangre	1	Puntiforme	Regular	Convexo	Lisa	Blanco humo	Parcial
16	<i>Streptococcus spp</i>	Sangre	2	Puntiforme	Entero	Convexo	Lisa	Blanco humo	Total
19	<i>Streptococcus spp</i>	Sangre	1	Puntiforme	Entero	Convexo	Lisa	Blanco humo	Parcial
20	<i>Streptococcus spp</i>	Sangre	1.5	Puntiforme	Entero	Convexo	Lisa	Blanco lechoso	Total
21	<i>Streptococcus spp</i>	Sangre	2	Puntiforme	Entero	Convexo	Lisa	Blanco lechoso	Parcial
23	<i>Streptococcus spp</i>	Sangre	1	Puntiforme	Regular	Convexo	Lisa	Blanco lechoso	Total
28	<i>Streptococcus spp</i>	Sangre	1.5	Puntiforme	Entero	Convexo	Lisa	Blanco humo	Total
32	<i>Streptococcus spp</i>	Sangre	1	Puntiforme	Regular	Convexo	Lisa	Blanco lechoso	Parcial
45	<i>Streptococcus spp</i>	Sangre	1.5	Puntiforme	Entero	Convexo	Lisa	Blanco humo	Parcial
47	<i>Streptococcus spp</i>	Sangre	1	Puntiforme	Entero	Convexo	Lisa	Blanco humo	Total

Tabla complementaria 8. Características microscópicas del *Streptococcus spp.*

N°	Bacteria	Forma		Tinción gram	Prueba de la catalasa
		Individual	Agrupada		
1	<i>Streptococcus spp</i>	Coco	Cadena	Gram positivo	Catalasa Negativo
2	<i>Streptococcus spp</i>	Coco	Cadena	Gram positivo	Catalasa Negativo
3	<i>Streptococcus spp</i>	Coco	Cadena	Gram positivo	Catalasa Negativo
4	<i>Streptococcus spp</i>	Coco	Cadena	Gram positivo	Catalasa Negativo
5	<i>Streptococcus spp</i>	Coco	Cadena	Gram positivo	Catalasa Negativo
6	<i>Streptococcus spp</i>	Coco	Cadena	Gram positivo	Catalasa Negativo
7	<i>Streptococcus spp</i>	Coco	Cadena	Gram positivo	Catalasa Negativo
8	<i>Streptococcus spp</i>	Coco	Cadena	Gram positivo	Catalasa Negativo
9	<i>Streptococcus spp</i>	Coco	Cadena	Gram positivo	Catalasa Negativo
10	<i>Streptococcus spp</i>	Coco	Cadena	Gram positivo	Catalasa Negativo
11	<i>Streptococcus spp</i>	Coco	Cadena	Gram positivo	Catalasa Negativo
12	<i>Streptococcus spp</i>	Coco	Cadena	Gram positivo	Catalasa Negativo
13	<i>Streptococcus spp</i>	Coco	Cadena	Gram positivo	Catalasa Negativo
14	<i>Streptococcus spp</i>	Coco	Cadena	Gram positivo	Catalasa Negativo
16	<i>Streptococcus spp</i>	Coco	Cadena	Gram positivo	Catalasa Negativo
19	<i>Streptococcus spp</i>	Coco	Cadena	Gram positivo	Catalasa Negativo
20	<i>Streptococcus spp</i>	Coco	Cadena	Gram positivo	Catalasa Negativo
21	<i>Streptococcus spp</i>	Coco	Cadena	Gram positivo	Catalasa Negativo
23	<i>Streptococcus spp</i>	Coco	Cadena	Gram positivo	Catalasa Negativo
28	<i>Streptococcus spp</i>	Coco	Cadena	Gram positivo	Catalasa Negativo
32	<i>Streptococcus spp</i>	Coco	Cadena	Gram positivo	Catalasa Negativo
45	<i>Streptococcus spp</i>	Coco	Cadena	Gram positivo	Catalasa Negativo
47	<i>Streptococcus spp</i>	Coco	Cadena	Gram positivo	Catalasa Negativo

Tabla complementaria 9. Características macroscópicas del *Staphylococcus aureus*.

N°	Bacteria	Medio de cultivo	Tamaño mm	Forma	Borde	Elevación	Textura	Color	Hemólisis
15	<i>S. aureus</i>	Sangre, Manitol Salado	1.5	Circular	Entero	Convexo	Lisa	Amarillento cremoso	Parcial
17	<i>S. aureus</i>	Sangre, Manitol Salado	2	Circular	Entero	Convexo	Lisa	Amarillento cremoso	Parcial
18	<i>S. aureus</i>	Sangre, Manitol Salado	2	Circular	Regular	Convexo	Lisa	Amarillento cremoso	Parcial
22	<i>S. aureus</i>	Sangre, Manitol Salado	2	Circular	Entero	Convexo	Lisa	Blanco lechoso	Parcial
24	<i>S. aureus</i>	Sangre, Manitol Salado	2.5	Circular	Entero	Convexo	Lisa	Blanco lechoso	Parcial
25	<i>S. aureus</i>	Sangre, Manitol Salado	2	Circular	Entero	Convexo	Lisa	Amarillento cremoso	Parcial
26	<i>S. aureus</i>	Sangre, Manitol Salado	2	Circular	Regular	Convexo	Lisa	Amarillento cremoso	Parcial
27	<i>S. aureus</i>	Sangre, Manitol Salado	2	Circular	Entero	Convexo	Lisa	Amarillento cremoso	Parcial
29	<i>S. aureus</i>	Sangre, Manitol Salado	1.5	Circular	Entero	Convexo	Lisa	Amarillento cremoso	Parcial
30	<i>S. aureus</i>	Sangre, Manitol Salado	2	Circular	Entero	Convexo	Lisa	Amarillento cremoso	Parcial
31	<i>S. aureus</i>	Sangre, Manitol Salado	2	Circular	Entero	Convexo	Lisa	Amarillento cremoso	Parcial
36	<i>S. aureus</i>	Sangre, Manitol Salado	2	Circular	Entero	Convexo	Lisa	Amarillento cremoso	Parcial
37	<i>S. aureus</i>	Sangre, Manitol Salado	2	Circular	Entero	Convexo	Lisa	Amarillento cremoso	Parcial
38	<i>S. aureus</i>	Sangre, Manitol Salado	2	Circular	Entero	Convexo	Lisa	Amarillento cremoso	Parcial
39	<i>S. aureus</i>	Sangre, Manitol Salado	2	Circular	Entero	Convexo	Lisa	Amarillento cremoso	Parcial
41	<i>S. aureus</i>	Sangre, Manitol Salado	2	Circular	Entero	Convexo	Lisa	Amarillento cremoso	Parcial
43	<i>S. aureus</i>	Sangre, Manitol Salado	2	Circular	Entero	Convexo	Lisa	Blanco lechoso	Parcial
44	<i>S. aureus</i>	Sangre, Manitol Salado	1.5	Circular	Entero	Convexo	Lisa	Amarillento cremoso	Parcial
46	<i>S. aureus</i>	Sangre, Manitol Salado	2	Circular	Entero	Convexo	Lisa	Blanco lechoso	Parcial
48	<i>S. aureus</i>	Sangre, Manitol Salado	2	Circular	Entero	Convexo	Lisa	Amarillento cremoso	Parcial
49	<i>S. aureus</i>	Sangre, Manitol Salado	2	Circular	Entero	Convexo	Lisa	Blanco lechoso	Parcial

Tabla complementaria 10. Características microscópicas del *Staphylococcus aureus*.

N°	Bacteria	Forma		Tinción gram	Prueba de la catalasa
		Individual	Agrupada		
15	<i>S. aureus</i>	Coco	Racimo	Gram positivo	Catalasa Positivo
17	<i>S. aureus</i>	Coco	Racimo	Gram positivo	Catalasa Positivo
18	<i>S. aureus</i>	Coco	Racimo	Gram positivo	Catalasa Positivo
22	<i>S. aureus</i>	Coco	Racimo	Gram positivo	Catalasa Positivo
24	<i>S. aureus</i>	Coco	Racimo	Gram positivo	Catalasa Positivo
25	<i>S. aureus</i>	Coco	Racimo	Gram positivo	Catalasa Positivo
26	<i>S. aureus</i>	Coco	Racimo	Gram positivo	Catalasa Positivo
27	<i>S. aureus</i>	Coco	Racimo	Gram positivo	Catalasa Positivo
29	<i>S. aureus</i>	Coco	Racimo	Gram positivo	Catalasa Positivo
30	<i>S. aureus</i>	Coco	Racimo	Gram positivo	Catalasa Positivo
31	<i>S. aureus</i>	Coco	Racimo	Gram positivo	Catalasa Negativo
36	<i>S. aureus</i>	Coco	Racimo	Gram positivo	Catalasa Positivo
37	<i>S. aureus</i>	Coco	Racimo	Gram positivo	Catalasa Positivo
38	<i>S. aureus</i>	Coco	Racimo	Gram positivo	Catalasa Positivo
39	<i>S. aureus</i>	Coco	Racimo	Gram positivo	Catalasa Positivo
41	<i>S. aureus</i>	Coco	Racimo	Gram positivo	Catalasa Positivo
43	<i>S. aureus</i>	Coco	Racimo	Gram positivo	Catalasa Positivo
44	<i>S. aureus</i>	Coco	Racimo	Gram positivo	Catalasa Positivo
46	<i>S. aureus</i>	Coco	Racimo	Gram positivo	Catalasa Positivo
48	<i>S. aureus</i>	Coco	Racimo	Gram positivo	Catalasa Positivo
49	<i>S. aureus</i>	Coco	Racimo	Gram positivo	Catalasa Positivo

Tabla complementaria 11. Características macroscópicas de la *E. coli*.

N°	Bacteria	Medio de cultivo	Tamaño mm	Forma	Borde	Elevación	Textura	Color	Hemólisis
33	<i>E. coli</i>	Sangre, Mc Conkey , EMB	2	Circular	Regular	Convexo	Lisa	Rosa-rojiza	Parcial
34	<i>E. coli</i>	Sangre, Mc Conkey , EMB	2.5	Circular	Regular	Convexo	Lisa	Rosa-rojiza	Parcial
35	<i>E. coli</i>	Sangre, Mc Conkey, EMB	2	Circular	Regular	Convexo	Lisa	Rosa-rojiza	Parcial
40	<i>E. coli</i>	Sangre, Mc Conkey , EMB	2.5	Circular	Entero	Convexo	Lisa	Rosa-rojiza	Parcial
42	<i>E. coli</i>	Sangre, Mc Conkey , EMB	2.5	Circular	Entero	Convexo	Lisa	Rosa-rojiza	Parcial

Tabla complementaria 12. Características microscópicas de la *E. coli*

N°	Bacteria	Forma	Tinción gram	Prueba de la catalasa
33	<i>E. coli</i>	Bacilo	Gram negativo	Catalasa Positivo
34	<i>E. coli</i>	Bacilo	Gram negativo	Catalasa Positivo
35	<i>E. coli</i>	Bacilo	Gram negativo	Catalasa Positivo
40	<i>E. coli</i>	Bacilo	Gram negativo	Catalasa Positivo
42	<i>E. coli</i>	Bacilo	Gram negativo	Catalasa Positivo

Tabla complementaria 13. Prueba de resistencia del *Streptococcus spp.* frente a antibióticos de uso frecuente.

Bacteria	Tamaño del halo alrededor de los discos de sensibilidad en milímetros						
	AML10_Amoxicilina	CN10_Gentamicina	CTX_Cefotaxima2	E15_Eritromicina	ENR5_Enrofloxacina	P10_Penicilina G	S10_Estreptomicina
<i>Streptococcus spp</i>	0	1,7	2,5	2,7	3	0	
<i>Streptococcus spp</i>	0	1,6	2,1	2,8	2	2,8	
<i>Streptococcus spp</i>	0	1,9	2,6	2,6	3,2	3	
<i>Streptococcus spp</i>	0	1,5	2,3	2,5	2,9	3	
<i>Streptococcus spp</i>	0	1,7	2,5	2,7	3	0	
<i>Streptococcus spp</i>	0	1,6	2,1	2,8	2	2,8	
<i>Streptococcus spp</i>	0	1,9	2,6	2,6	3,2	3	
<i>Streptococcus spp</i>	0	1,5	2	2	2,5	2,5	
<i>Streptococcus spp</i>	0	1,2	2	2,4	2,4	2,2	
<i>Streptococcus spp</i>	0	1,3	1,5	2,2	2,2	2,2	
<i>Streptococcus spp</i>	1	1,2	1,4	2	2,5	2	
<i>Streptococcus spp</i>	1	1,4	2	2,6	2,5	2,8	
<i>Streptococcus spp</i>	0	1,3	1,3	2,2	2,3	2,6	
<i>Streptococcus spp</i>	0		2,2	2,2	2,4	2	2,3
<i>Streptococcus spp</i>	0,4		2,1	2,6	2,1	2,1	1,8
<i>Streptococcus spp</i>	0,3		1,9	2	2,1	2,4	2
<i>Streptococcus spp</i>	0,6		2	2,2	2	2,7	2,4
<i>Streptococcus spp</i>	0		0		1,7		2,4
<i>Streptococcus spp</i>	0		0,8		1,7	2,4	2
<i>Streptococcus spp</i>	3,4	2,1	1,2		3,2	3	2
<i>Streptococcus spp</i>	3	2,2	1,2		3,2	3,3	2

Tabla complementaria 14. Prueba de resistencia del *Staphylococcus aureus* frente a antibióticos de uso frecuente.

Bacteria	Tamaño del halo alrededor de los discos de sensibilidad en milímetros								
	AML30_Amoxicilina	AUG30_Amoxicilina + Acido Clavulánico	CN10_Gentamicina	CTX30_Cefotaxima	E15_Eritromicina	ENR5_Enrofloxacina	P10_Penicilina G	S10_Estreptomicina	SMX50_Sulfametoxazol
<i>S. aureus</i>	1,6		1,5	1,5	2	2,8	2,5		
<i>S. aureus</i>	0		1,4	1,5	2,1	2,5	2,7		
<i>S. aureus</i>	0		1,5	2	2,5	2,4	2,3		
<i>S. aureus</i>	0			2,4	2,1	2,2	2,6	2	
<i>S. aureus</i>	0			2,1	2,1	2,4	2,5	2,8	
<i>S. aureus</i>	0	1,6		1,2		2,5	1,1	2,3	
<i>S. aureus</i>	0	0		1		1,6	0	2,2	
<i>S. aureus</i>	0,5	1,5		0		3,5	3,5	3	
<i>S. aureus</i>	1,6	3,4		2,9		2,8	3,7	2,1	
<i>S. aureus</i>	1,4	2,1		2		2,2	2,5	2	
<i>S. aureus</i>	0	0		0,6		1,8	0	2,4	
<i>S. aureus</i>		2,6	2,3			3	3,4	2,8	2,2
<i>S. aureus</i>		2,4	2,1			3,1	3,2	2,5	2
<i>S. aureus</i>		2,2	2,3			2,9	3,4	2,8	1,8
<i>S. aureus</i>		2	2			2,8	3,2	2,5	2
<i>S. aureus</i>		2,5	2			3,2	3,5	2,6	1,8
<i>S. aureus</i>	3,2		2	1,4		3	2,6	2,2	
<i>S. aureus</i>	3		2,2	1,5		2,5	2,8	2	
<i>S. aureus</i>	3,2		2,4	1		3	3,2	2,5	
<i>S. aureus</i>	3,2		2	0,9		3	3	2,2	
<i>S. aureus</i>	3		1,9	1,2		2,8	2,8	2	

Tabla complementaria 15. Prueba de Resistencia de la *E. coli* frente a antibióticos de uso frecuente.

Bacteria	Tamaño del halo alrededor de los discos de sensibilidad en milímetros					
	AUG30_Amoxicilina + Acido Clavulánico	CN10_Gentamicina	ENR5_Enrofloxacin	P10_Penicilina G	S10_Estreptomicina	SMX50_Sulfametoxazol
<i>E. coli</i>	3,8	2	3,2	4	2,3	2
<i>E. coli</i>	2,5	2,3	3,1	2,8	2,8	2,2
<i>E. coli</i>	4	2,2	3	4	2,6	2,2
<i>E. coli</i>	2,5	2,2	3	3,5	2,2	2,4
<i>E. coli</i>	3,6	2,3	2,9	3,2	2,3	1,8

Tabla complementaria 18. Descripción de la sensibilidad antimicrobiana de los agentes etiológicos para Gram positivo, publicadas por el Comité Nacional de Estándares de Laboratorio (CLSI).

Pruebas de sensibilidad(mm) para Gram positivo							
Antimicrobial	Interpretación	Puntos de interrupción del diámetro de la zona	<i>Staphylococcus spp.</i>		Puntos de interrupción del diámetro de la zona	<i>Streptococcus sp.</i>	
			N	%		n	%
ERR5_Enrofloxacina	S	>22	0	0%	>22	4	100%
	I	17 a 22	9	50%	17 a 22	0	0%
	R	<17	9	50%	<17	0	0%
S10_Estreptomicina	S	>9	15	83%	>9	3	75%
	I	7 a 9	3	17%	7 a 9	1	25%
	R	<7	0	0%	<7	0	0%
CN10_Gentamicina	S	>16	7	39%	>16	3	75%
	I	13 a 15	6	33%	13 a 15	1	25%
	R	<12	5	28%	<12	0	0%
TE30_tetraciclina	S	>18	11	61%	>18	2	50%
	I	15 a 18	3	17%	15 a 18	0	0%
	R	<15	4	22%	<15	2	50%
AML30_Amoxicilina	S	>25	3	17%	>25	1	25%
	I	19 a 25	15	83%	19 a 25	3	75%
	R	<19	0	0%	<19	0	0%
AUG30_Amoxi_Acido_Clavul	S	>17	18	100%	>17	4	100%
	I	14 a 17	0	0%	14 a 17	0	0%
	R	<14	0	0%	<14	0	0%
P10_Penicilina	S	>17	18	100%	>17	4	100%
	I	14 a 17	0	0%	14 a 17	0	0%
	R	<14	0	0%	<14	0	0%
E15_Cefotaxin	S	>17	18	100%	>22	4	100%
	I	15-17	0	0%	14-22	0	0%
	R	<15	0	0%	<14	0	0%
E15_Eritromicina	S	>23	6	33%	>22	1	25%
	I	14 a 22	11	61%	14-22	3	75%
	R	<13	1	6%	<14	0	0%
BA10_bacitracina	S	>22	2	11%	>22	0	0%
	I	14-22	13	72%	14-22	2	50%
	R	<14	3	17%	<14	2	50%

S= sensible, I= intermedio; R= resistente

Tabla complementaria 19. Descripción de la sensibilidad antimicrobiana de los agentes etiológicos para Gram negativo, publicadas por el Comité Nacional de Estándares de Laboratorio (CLSI).

Pruebas de sensibilidad(mm) para gram negativo				
Antimicrobial	Interpretación	Puntos de interrupción del diámetro de la zona	<i>Escherichia coli</i>	
			n	%
FFC30_florfenicol	S	>29	0	0%
	I	28 a 29	0	0%
	R	<28	7	100%
SXT25_trimetropim_sulfamethoxazole	S	>16	7	100%
	I	11 a 15	0	0%
	R	<10	0	0%
E15_Eritromicina	S	>23	0	0%
	I	14 a 22	0	0%
	R	<13	7	100%
TE30_tetraciclina	S	>19	7	100%
	I	15 a 18	0	0%
	R	<14	0	0%
CN10_Gentamicina	S	>15	7	100%
	I	13 a 14	0	0%
	R	<12	0	0%
S10_Streptomina	S	>9	7	100%
	I	7 a 9	0	0%
	R	<7	0	0%
ENR5_Enrofloxacin	S	>22	6	86%
	I	17 a 22	1	14%
	R	<17	0	0%
MTZ5_Metronidazol	S	>32	0	0%
	I	17 a 31	0	0%
	R	<16	7	100%
AML30_Amoxicilina	S	>18	2	29%
	I	14 a 17	1	14%
	R	<13	4	57%

S= sensible, I= intermedio; R= resistente