

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



TESIS

**ETIOLOGIA Y SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE
PATÓGENOS EN MASTITIS SUBCLINICA EN VACAS LECHERAS
DEL DISTRITO ANTA, PROVINCIA ANTA, DEPARTAMENTO DE
CUSCO**

PRESENTADA POR:

Br. VICTOR ANDRES TARACAYA ROSADA

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

ASESORES:

MSc. EDGAR ALBERTO VALDEZ GUTIERREZ

MSc. SANTOS WILTON CALDERÓN RUIZ

MSc. DIANA SÁNCHEZ HERENCIA

MSc. GUIULFO DURIEL MAMANI MANGO

CUSCO – PERÚ

2024

INFORME DE ORIGINALIDAD

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

El que suscribe, **Asesor** del trabajo de investigación/tesis titulada: ETIOLOGIA Y SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE PATÓGENOS EN MASTITIS SUBCLINICA EN VACAS LECHERAS DEL DISTRITO ANTA, PROVINCIA ANTA, DEPARTAMENTO DE CUSCO

Presentado por: Victor Andres Taracaya Rosada DNI N° 113211580
presentado por: DNI N°:
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, 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 1 %.

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** las primeras páginas del reporte del Sistema Antiplagio.

Cusco, 12 de Abril de 2025



Firma

Post firma M.Sc. Santos Wilton Calderón Ruiz

Nro. de DNI 26960866

ORCID del Asesor 0000-0001-8091-5814
ORCID del 2do Asesor: 0000-0002-2466-7605 DNI: 01285940
ORCID del 3er Asesor: 0000-0001-6203-5354 DNI: 40854420
ORCID del 4to Asesor: 0000-0001-8109-7702 DNI: 41061125

Se adjunta:

1. Reporte generado por el Sistema Antiplagio.
2. Enlace del Reporte Generado por el Sistema Antiplagio: **oid:** 27259:448530096

Víctor Andrés Taracaya Rosada

ETIOLOGIA Y SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE PATÓGENOS EN MASTITIS SUBCLINICA EN VACAS LECHERA...

 Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid:::27259:448530096

Fecha de entrega

12 abr 2025, 8:48 p.m. GMT-5

Fecha de descarga

12 abr 2025, 9:11 p.m. GMT-5

Nombre de archivo

CORRECCIÓN FINAL 9 ABRIL TESISSES.docx

Tamaño de archivo

2.1 MB

118 Páginas

26.135 Palabras

151.341 Caracteres

1% Overall Similarity

The combined total of all matches, including overlapping sources, for each database.

Filtered from the Report

- ▶ Bibliography
- ▶ Quoted Text
- ▶ Cited Text
- ▶ Small Matches (less than 15 words)

Exclusions

- ▶ 93 Excluded Matches

Top Sources

- 0%  Internet sources
- 0%  Publications
- 0%  Submitted works (Student Papers)

Integrity Flags

1 Integrity Flag for Review

-  **Replaced Characters**
84 suspect characters on 12 pages
Letters are swapped with similar characters from another alphabet.

Our system's algorithms look deeply at a document for any inconsistencies that would set it apart from a normal submission. If we notice something strange, we flag it for you to review.

A Flag is not necessarily an indicator of a problem. However, we'd recommend you focus your attention there for further review.

INDICE

| | |
|---------------------------------------------------------------|------|
| INDICE..... | ii |
| ABREVIATURAS | vi |
| DEDICATORIA | viii |
| AGRADECIMIENTO | viii |
| RESUMEN | x |
| SUMMARY | xi |
| I. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| II. PROBLEMA OBJETO DE INVESTIGACION | 5 |
| 2.1. Identificación de problema objeto de investigación | 5 |
| 2.2. Planteamiento del problema | 6 |
| 2.2.1. Problema general..... | 6 |
| 2.2.2. Problemas específicos | 6 |
| III. OBJETIVOS Y JUSTIFICACION | 7 |
| 3.1. Objetivos..... | 7 |
| 3.1.1. Objetivo General | 7 |
| 3.1.2. Objetivos específicos | 7 |
| 3.2. Justificación | 7 |
| IV. HIPÓTESIS | 9 |
| 4.1. Hipótesis general | 9 |
| 4.2. Hipótesis específicas | 9 |
| V. MARCO TEÓRICO | 10 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.1. Antecedentes de la investigación o marco referencial..... | 10 |
| 5.2. Bases teóricas..... | 19 |
| 5.2.1. Anatomía y fisiología de la glándula mamaria | 19 |
| 5.2.2. Estructura del pezón | 20 |
| 5.2.3. Clasificación de la mastitis bovina | 20 |
| 5.2.4. Mastitis subclínica | 23 |
| 5.2.5. Etiología | 23 |
| 5.2.6. Mecanismos de defensa de la glándula mamaria..... | 24 |
| 5.2.6.1. La inmunología de la glándula mamaria de la vaca..... | 24 |
| 5.2.6.2. El sistema de defensa inmune MG y sus componentes relacionados | 25 |
| 5.2.7. Fisiopatología de la mastitis | 26 |
| 5.2.7.1. Fase de invasión de pezón | 26 |
| 5.2.7.2. Fase de infección | 27 |
| 5.2.7.3. Fase de inflamación | 28 |
| 5.2.7.4. Fase de destrucción de tejido alveolar | 28 |
| 5.2.7.5. Control de la mastitis subclínica | 29 |
| 5.2.7.6. Medidas de control en el futuro | 29 |
| 5.2.7.7. Prueba de California Mastitis Test (CMT)..... | 30 |
| 5.2.7.8. Células somáticas | 30 |
| 5.3. Marco conceptual..... | 31 |
| 5.4. Terminología..... | 32 |
| Procedimiento para la identificación de bacterias | 33 |
| 5.4.4. Técnicas e instrumentos de recopilación de información..... | 38 |
| 5.4.5. Técnicas para el procesamiento y análisis de la información | 38 |
| VI. DISEÑO DE LA INVESTIGACION | 42 |
| 6.1. Tipo de investigación: | 42 |
| 6.2. Ubicación espacial:..... | 42 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------|-----|
| 6.2.1. Ubicación política | 42 |
| 6.2.2. Ubicación geográfica..... | 42 |
| 6.2.3. Ubicación hidrográfica..... | 42 |
| 6.3. Método de la investigación..... | 42 |
| 6.3.1. Población y muestra:..... | 42 |
| 6.4. Prueba de California Mastitis Test (CMT)..... | 43 |
| 6.5. Materiales y equipos | 46 |
| Técnicas e instrumentos de recopilación de información | 48 |
| Técnicas para el procesamiento y análisis de la información | 53 |
| 6.6. Variables/categorías | 53 |
| VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 54 |
| 7.1. Análisis, interpretación y discusión de resultados | 54 |
| VIII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 70 |
| 8.1. Conclusiones | 70 |
| 8.2. Recomendaciones | 71 |
| IX. REFERENCIAS..... | 72 |
| X. ANEXOS..... | 93 |
| Anexo 1. Prueba de CMT y realizar la encuesta | 98 |
| Anexo 2. Desinfección de la paleta..... | 98 |
| Anexo 3. Recolección leche en paleta | 99 |
| Anexo 4. Adición del reactivo de CMT | 99 |
| Anexo 5. Recolección de muestra que salió positivo al CMT | 100 |
| Anexo 6. Medios de cultivo y placas esterilizados en autoclave..... | 100 |
| Anexo 7. Adición de medio de cultivo a las placas..... | 101 |
| Anexo 8. Placas con medio de cultivo previa identificación..... | 101 |
| Anexo 9. Siembra de muestra con hisopo en medio de cultivo | 102 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------|-----|
| Anexo 10. Crecimiento de colonias..... | 102 |
| Anexo 11. Tinción Gram | 103 |
| Anexo 12. Aplicación de reactivo en la tinción Gram | 103 |
| Anexo 13. Reactivo para realizar la prueba de catalasa | 104 |
| Anexo 14. Aislamiento a medios más selectivos..... | 104 |
| Anexo 15. Crecimiento de colonias en medio selectivo..... | 105 |
| Anexo 16. Preparación en tubo de ensayo las colonias | 105 |
| Anexo 17. Extracción de colonias para su dilución en tubo de ensayo | 106 |
| Anexo 18. Halo inhibición | 106 |
| Anexo 20. Medición de los halos | 107 |

ABREVIATURAS

| | |
|--------|-----------------------------------------------------------------------|
| AG | Acido grasos |
| AML30 | Amoxicilina |
| C3b | Complemento |
| CMI | Concentración mínimo inhibitorio |
| CMT | California Mastitis Test |
| E15 | Eritromicina |
| EMB | Eosin Methylene Blue Agar |
| EUA | Estados Unidos |
| EUCAST | Comité Europeo sobre pruebas de Susceptibilidad a los antimicrobianos |
| FFC30 | Florfenicol |
| GM | Glándula mamaria |
| LPS | Lipopolisacáridos |
| µg | Microgramos |
| MC | Mastitis clínica. |
| MSC | Mastitis subclínica |
| NCCLS | Comité nacional de estándares de laboratorio |
| PMN | Polimorfonucleares |
| RI | Respuesta Inmunitario |
| SIA | Sistema inmunológico adaptativo |
| SNC | <i>Staphylococcus</i> coagulasa negativa |
| SXT25 | Trimetropim + sulfamethoxazole |
| OPS | Organización Panamericana de la Salud |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| pH | Indicador del potencial de hidrógeno de una disolución |
| RAM | Resistencia a los antimicrobianos. |

RTL

Receptores tipo Toll

DEDICATORIA

A Dios y mis Padres:

A Dios todo poderoso por haberme otorgado una familia maravillosa, Con amor a mis padres; Juana y Ubaldo dedico este trabajo de tesis pues sin ellos no lo había logrado. muchísimas gracias viejitos por permitirme iniciar y finalizar este logro.

A mi pareja e hija:

Con mucho cariño para mi esposa Delia quien se encuentra en su gloria de nuestro gran Creador. A mi hija Luana, quien ha estado a mi lado todo este tiempo en que he trabajado este trabajo de tesis.

A mis hermanos:

Oswaldo, Ulises, Anibal y Yaneth quienes contribuyeron con su apoyo moral, para la culminación de mi anhelado objetivo, así mismo por el inmenso aprecio que tuve de ellos.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios nuestro creador por permitirme tener tan buena experiencia dentro de la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco especialmente a la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria sede- Sicuani.

A mis docentes por permitirme convertirme en ser un profesional en lo que tanto me apasiona, gracias maestros que hicieron parte de este proceso integral de mi formación que deja como producto terminado.

Al equipo de trabajo de: Laboratorio de microbiología “MVZ. MSc Diana Sánchez Herencia” y todos los que forman parte del laboratorio de la Escuela Profesional de Medicina veterinaria, quienes fueron partícipes de este trabajo de investigación.

A mis asesores de tesis: Dr. Edgar Valdez Gutierrez, MVZ.MSc Guiulfo Duriel Mamani Mango, MVZ MSc Diana Sánchez Herencia, MV MSc Santos Wilton Calderón Ruiz, por la cátedra, apoyo y orientación incondicional en la realización de este trabajo.

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo identificar los principales agentes etiológicos responsables de la mastitis subclínica y evaluar su sensibilidad a los antimicrobianos en vacas lecheras del distrito de Anta, región Cusco. Se llevó a cabo una investigación observacional, descriptiva y transversal para los cuales realizó el estudio con 29 vacas positivas a mastitis subclínica mediante la prueba de California Mastitis Test (CMT). A partir de estas muestras, se realizaron cultivos microbiológicos y pruebas de antibiograma para identificar los agentes patógenos y analizar su resistencia a diferentes antimicrobianos. Los resultados mostraron que los principales microorganismos aislados fueron *Staphylococcus spp.* (62%), *Escherichia coli* (24%) y *Streptococcus sp.* (14%), lo que confirma su alta prevalencia en la zona de estudio. En términos de resistencia antimicrobiana, se evidenció que *Staphylococcus spp.* presentó resistencia a penicilina, amoxicilina, tetraciclina y eritromicina, mientras que *Escherichia coli* mostró resistencia generalizada a múltiples antibióticos, con una sensibilidad intermedia solo a trimetoprima-sulfametoxazol. En conclusión, el estudio resalta la importancia de la vigilancia epidemiológica y el uso prudente de antimicrobianos en la ganadería lechera. La identificación de los agentes etiológicos y su perfil de resistencia permite proponer estrategias más eficientes para el control de la mastitis subclínica, reduciendo así las pérdidas económicas y mejorando la calidad de la leche.

Palabras clave: Mastitis subclínica, agentes etiológicos, resistencia antimicrobiana, vacas lecheras, antibiograma.

SUMMARY

The objective of this study was to identify the main etiological agents responsible for subclinical mastitis and to evaluate their sensitivity to antimicrobials in dairy cows in the district of Anta, Cusco region. An observational, descriptive and cross-sectional study was carried out with 29 cows positive for subclinical mastitis using the California Mastitis Test (CMT). From these samples, microbiological cultures and antibiogram tests were performed to identify the pathogens and analyze their resistance to different antimicrobials. The results showed that the main microorganisms isolated were *Staphylococcus* spp. (62%), *Escherichia coli* (24%) and *Streptococcus* sp. (14%), confirming their high prevalence in the study area. In terms of antimicrobial resistance, it was found that *Staphylococcus* spp. *Escherichia coli* showed resistance to penicillin, amoxicillin, tetracycline and erythromycin, while *Escherichia coli* showed widespread resistance to multiple antibiotics, with intermediate sensitivity only to trimethoprim-sulfamethoxazole. In conclusion, the study highlights the importance of epidemiological surveillance and prudent use of antimicrobials in dairy farming. The identification of etiological agents and their resistance profile allows proposing more efficient strategies for the control of subclinical mastitis, thus reducing economic losses and improving milk quality.

Key words: Subclinical mastitis, etiological agents, antimicrobial resistance, dairy cows, antibiogram

I. INTRODUCCIÓN

Petrovski et al., (2006) señalan que la mastitis bovina es la principal enfermedad infecciosa endémica del ganado lechero a nivel mundial, así como en nuestro país. La mastitis es responsable de importantes pérdidas económicas para los productores de leche y la industria de procesamiento de leche, lo que resulta en una reducción de la producción de leche, alteración en la composición de la leche, ocasiona que la leche sea desechada, existen mayores costos de reemplazo, implica mayores costos de tratamiento y servicios veterinarios. Aparte de las pérdidas económicas sustanciales asociadas con la enfermedad, la mastitis tiene un potencial zoonótico grave y se ha asociado con el creciente desarrollo y la rápida aparición de cepas multirresistentes en todo el mundo (Beyene et al., 2017; Nielsen, 2009; Oliver et al., 2011; Pol & Ruegg, 2007).

Ruegg, (2017) y Taponen et al, (2017) mencionan que la mastitis, es la inflamación de la glándula mamaria, generalmente como consecuencia de la adhesión, invasión y colonización por patógenos de mastitis. Existe en tres formas: mastitis clínica, subclínica y crónica. Entre estas formas, la mastitis subclínica es más común y da como resultado una reducción de la producción de leche sin signos clínicos observables ni anomalías en la leche, por esta razón, es difícil de diagnosticar y persiste más tiempo en el rebaño (Ndahetuye et al., 2020; Zeryehun & Abera, 2017). La mastitis subclínica (MSC), es la forma principal de esta enfermedad en los rebaños lecheros de todo el mundo y da como resultado un mayor número de células somáticas en la leche producida y cambios en sus cualidades físicas y químicas . La etiología de la mastitis incluye microorganismos patógenos que sobreviven y proliferan en la piel y las heridas del pezón, así como microorganismos ambientales que no se retienen en el pezón, se han informado más de 140 especies patógenas diferentes (Ruegg, 2017; Taponen et al., 2017; Zeryehun & Abera, 2017a).

Existen muchos estudios documentados de los principales patógenos de la mastitis, como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y coliformes. Los estudios actuales han informado de un cambio en los patógenos principales a patógenos menores, como el estafilococo coagulasa negativo y otros bacilos. Estos estudios han demostrado que estos patógenos menores pueden desempeñar un

papel importante en la patogenia de la mastitis y varían de un rebaño a otro (Amer et al., 2018a; Paduch & Krömker, 2011).

Bhosale et al., (2014) señalan que el tratamiento principal de la mastitis se administra comúnmente mediante infusión intramamaria o administración parenteral de antibióticos, como estreptomicina, ampicilina, cloxacilina, penicilina y tetraciclina. El tratamiento efectivo de la mastitis bovina depende de la susceptibilidad antimicrobiana de los patógenos, el tipo de mastitis, la raza del ganado y el régimen de tratamiento. La aparición de resistencia a los medicamentos es un serio desafío para el control de la mastitis, ya que los perfiles de resistencia a menudo son específicos del rebaño (Silveira-Filho et al., 2014). La combinación de más de un agente antimicrobiano sinérgico puede ser más eficaz que el uso de un solo fármaco y puede lograr una alta tasa de curación.

Laven et al., (2014) ; Oliver et al., (2011) ; Vakkamäki et al., (2017), señalan que la pronta identificación y comprensión de la diversidad de los patógenos asociados con la mastitis es esencial para una prevención y un control efectivo. Sin embargo, se prevé que el tratamiento se vuelva problemático en un futuro próximo debido al rápido aumento de patógenos resistentes a los antibióticos. La transmisión de patógenos de mastitis resistentes a los antimicrobianos y patógenos transmitidos por los alimentos a los humanos podría ocurrir si se consume leche sin pasteurizar (Abrahmsén et al., 2014; Beyene et al., 2017; Oliver et al., 2011).

(Ruegg, 2009; Stevens et al., 2016), mencionan que el uso generalizado de antibióticos en el control de la mastitis aumenta considerablemente el riesgo de instalar y transmitir resistencia a los antibióticos a los consumidores. Tal posibilidad está constantemente en la atención de las autoridades de salud pública y de salud animal, lo que requiere una redefinición científicamente fundamentada de las terapias con antibióticos que tenga en cuenta la intersección del bienestar animal con las preocupaciones sociales.

Perales Palacios, (2016) indica que los patógenos causantes de mastitis pueden ser clasificados, desde el punto de vista epidemiológico, en tres grandes grupos, de acuerdo a su origen y forma de difundir en el rebaño lechero. Patógenos contagiosos: La fuente de infección son los cuartos de ubre infectados; su transmisión ocurre durante el ordeño a través de las manos del ordeñador, paños de secado o pezoneras. En este grupo se ubican: *Streptococcus agalactiae*,

Staphylococcus aureus, *Corynebacterium bovis*, *Mycoplasma spp.*, y en ocasiones, *Streptococcus dysgalactiae*, aunque este último puede tener origen ambiental. B. Patógenos ambientales: La fuente de infección es el ambiente como la cama de paja o aserrín, agua estancada, tierra, también pueden encontrarse en la piel (pezón y abdomen) y en los órganos reproductores del animal. La infección ocurre en cualquier momento, pero es frecuente en el período que sigue al ordeño, durante el periodo seco o descanso y durante los días posteriores al parto. En este grupo se incluyen: *Streptococcus uberis* y otros estreptococos (a excepción de *Streptococcus agalactiae*), *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, coliformes, *Pseudomonas aeruginosa*, *Nocardia asteroides*, levaduras, *Prototheca zooffi*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Bacillus spp.*, y otros microorganismos que viven en el ambiente de la vaca. El grado de infección de estas bacterias tiende a incrementarse cuando las condiciones favorecen su crecimiento especialmente en época de lluvia. C. Patógenos oportunistas: La fuente más importante de estos microorganismos es la piel sana de la ubre y los pezones y manos del ordeñador. La frecuencia de infección por estos agentes es mayor durante el periodo de reposo o seco, durante el cual la piel del pezón no está expuesta a los germicidas usados en la desinfección de pezones post-ordeño. La frecuencia de infecciones causadas por estos microorganismos es elevada para el momento del parto, pero disminuye drásticamente durante la lactación.

Raramente generan casos clínicos, y si surgen suelen ser moderados. Pueden infectar a novillas en su primer parto. La mayoría de las infecciones se curan espontáneamente. En este grupo se incluyen: *Staphylococcus hyicus*, *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. intermedius*, *S. xilosus*, *S. simulans* y otras especies de *Staphylococcus* distintas a *Staphylococcus aureus*; probablemente, algunos estreptococos, podrían ubicarse en esta categoría.

Gomes et al., (2016), manifiestan que la mastitis bovina es una de las enfermedades que ocasiona más gastos a la ganadería en el Perú y del mundo, causa grandes pérdidas limitan la productividad de los rebaños lecheros, determinadas por subproductividad de los cuartos infectados, reducción de la producción de leche, leche mastítica que debe descartarse, gastos por concepto de medicina y aumento de los costos por utilización de mano de obra especializada en el tratamiento de la infección.

Restrepo-Botero et al., (2012), indican que en Estados Unidos de América se estima que el costo por año causado por la enfermedad es de 1,2 a 1,7 billones de dólares, con pérdida anual por vaca de 184 dólares. En Colombia se calculan 41.580 pesos diarios, por la presencia de mastitis subclínica.

Larsson & Flach, (2022) mencionan que el uso indiscriminado de antibióticos en algunos países ha conllevado a un aumento en el porcentaje de especies bacterianas resistentes a diversos agentes antimicrobianos, las cuales han sido aisladas de leche procedente de glándulas mamarias con mastitis. Esta resistencia trae como consecuencia dos aspectos importantes, el primero, una disminución en la respuesta al tratamiento en caso de mastitis clínica y el segundo, la transmisión de bacterias resistentes a los consumidores a través de la cadena alimentaria, más aún cuando se consumen productos elaborados a partir de leche cruda.

La identificación de los agentes causales es importante, por cuanto son indicadores de los factores predisponentes existentes en las explotaciones lecheras, permite la toma de decisiones en el diseño de programas de control, es una herramienta útil para evaluar la efectividad de las medidas tomadas y permite seleccionar la terapéutica sobre bases más firmes. El objetivo principal del estudio, fue identificar los principales agentes etiológicos causantes de la mastitis subclínica y a cuáles antimicrobianos son sensibles dichos agentes etiológicos en vacas lecheras del distrito y provincia de Anta, región de Cusco.

II. PROBLEMA OBJETO DE INVESTIGACION

2.1. Identificación de problema objeto de investigación

Azooz et al., (2020) definen la mastitis como la inflamación de la glándula mamaria, es una de las patologías más críticas dentro de los hatos lecheros a nivel mundial, debido a su impacto económico, provocando enormes pérdidas no solo reflejadas en disminución de la producción sino también en tasas de sacrificio.

Silva Goyes, (2021), menciona que la mastitis es una enfermedad que está presente en todo hato ganadero originando grandes pérdidas económicas en la producción láctea; los patógenos causantes de mastitis pueden ser clasificados, desde el punto de vista epidemiológico, en tres grandes grupos, de acuerdo a su origen y forma de difundir en el rebaño lechero: patógenos contagiosos, patógenos ambientales patógenos oportunistas.

Además, la resistencia bacteriana se ha convertido en una amenaza creciente a medida que los mecanismos de resistencia se están extendiendo por todo el mundo. Hasta la fecha, los tratamientos antibióticos tradicionales provocan fácilmente la aparición de cepas resistentes (Peng et al., 2022). Se ha informado ampliamente sobre la resistencia a antimicrobianos como penicilina, amoxicilina, tetraciclina, amikacina, gentamicina o eritromicina. Sin embargo, según estudios recientes, la resistencia a los nuevos antimicrobianos ha aumentado; los perfiles bacterianos indicaron resistencia a piperacilina, ceftazidima, cefquinoma, tigeciclina, colistina y vancomicina. Además, el problema de los residuos de medicamentos también está aumentando (Bonardi et al., 2023). Debido a las preocupaciones antes mencionadas, es necesaria la búsqueda de alternativas terapéuticas que no sean invasivas y no causen resistencia (Junior et al., 2023). Las investigaciones muestran que las medicinas a base de hierbas o plantas en la producción ganadera se han utilizado como promotoras de la salud y para el tratamiento de enfermedades .

Recientemente se han propuesto nuevas alternativas como péptidos, nanopartículas, nanocoloides o polímeros y, más recientemente, fototerapia, todas las cuales han demostrado eficacia .

OPS, (2021), indica que el uso indiscriminado de antibióticos en algunos países ha conllevado a un aumento en el porcentaje de especies bacterianas resistentes a diversos agentes antimicrobianos, las cuales han sido aisladas de leche procedente de glándulas mamarias con mastitis, esta resistencia trae como consecuencia dos aspectos importantes, el primero, una disminución en la respuesta al tratamiento en caso de mastitis clínica y el segundo, la transmisión de bacterias resistentes a los consumidores a través de la cadena alimentaria, más aún cuando se consumen productos elaborados a partir de leche cruda.

2.2. Planteamiento del problema

2.2.1. Problema general

¿Cuáles son los agentes etiológicos causantes de la mastitis subclínica y la sensibilidad a los agentes antimicrobianos en vacas lecheras del distrito de Anta, provincia de Anta, región Cusco?

2.2.2. Problemas específicos

- ¿Cuáles son los agentes etiológicos que causan la mastitis subclínica en vacas lecheras del distrito de Anta, región del Cusco?
- ¿A cuáles antimicrobianos presentan susceptibilidad los agentes etiológicos que causan la mastitis subclínica en vacas lecheras del distrito de Anta, región de Cusco?

III. OBJETIVOS Y JUSTIFICACION

3.1. Objetivos

3.1.1. Objetivo General

Identificar los principales agentes etiológicos causantes de la mastitis subclínica y la sensibilidad a los agentes antimicrobianos en vacas lecheras del distrito de Anta, región de Cusco.

3.1.2. Objetivos específicos

- Identificar los principales agentes etiológicos que causan la mastitis subclínica en vacas lecheras del distrito de Anta, región de Cusco.
- Determinar la sensibilidad antimicrobiana de los principales agentes etiológicos causantes de la mastitis subclínica en vacas lecheras del distrito de Anta, región de Cusco.

3.2. Justificación

Rollin et al., (2015) mencionan que la inflamación de la glándula mamaria comúnmente conocida como mastitis es una enfermedad compleja por su etiología, patogenicidad, intensidad, duración y secuelas. La mastitis clínica se caracteriza por inflamación, rubor, calor, dolor y pérdida parcial de la función de los cuartos o la glándula mamaria y en la leche se observa la presencia de coágulos o grumos y su color se torna amarillo o rojizo por la presencia de pus o de sangre; en casos severos hay aumento de la temperatura corporal y del pulso, decaimiento, pérdida del apetito y baja de la producción. La composición de la leche cambia y/o disminuye la producción de los diversos derivados de la misma, debido a fragmentos de caseína que se pierden en el suero, incrementos en el pH, en sodio y en cloruros. La mastitis representa el 16% al 26% del costo total de todas las enfermedades en el ganado lechero, las pérdidas por mastitis son el doble de altas que las pérdidas por infertilidad y problemas de reproducción, un cuarto glandular afectado experimenta un 30% de baja en su productividad y una vaca afectada pierde un 15% de su productividad.

Bedolla-Cedeño & León (2008), señalan que el 70 - 80% de todas las pérdidas son asociadas con la mastitis subclínica, mientras que solo del 20 al 30% se deben a la mastitis clínica. Se estima que un cuarto infectado produce aproximadamente 780 litros menos de leche por lactancia que un cuarto sin infección, esta baja en la producción es debido al daño sufrido en los alveolos producto de la infección.

Con este estudio se pretende determinar la sensibilidad de los principales agentes etiológicos presentes en la leche de vacas en producción del distrito y provincia de Anta, región Cusco.

Los datos que se obtendrán con este estudio, servirán como marco de referencia para realizar un tratamiento eficaz contra esta enfermedad presente en la zona, así también para tomar medidas necesarias que disminuyan la problemática que generan cuantiosas pérdidas económicas al sector lechero del lugar, por la mala utilización de los antimicrobianos.

IV. HIPÓTESIS

4.1. Hipótesis general

Los agentes etiológicos causantes de la mastitis subclínica en vacas lecheras del distrito de Anta, región de Cusco es multivariado y presentan resistencia a ciertos antimicrobianos.

4.2. Hipótesis específicas

- Los principales agentes etiológicos causantes de la mastitis subclínica en vacas lecheras del distrito de Anta, región de Cusco son *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus sp* y *Escherichia. Coli*.
- Existe sensibilidad de susceptibilidad antimicrobiana de los agentes etiológicos causantes de la mastitis subclínica en vacas lecheras del distrito de Anta, región Cusco.

V. MARCO TEÓRICO

5.1. Antecedentes de la investigación o marco referencial

Demil et al., (2022) realizaron un estudio transversal en Etiopía, con el objeto de estimar la prevalencia, identificar factores de riesgo de MSC y prueba de susceptibilidad antimicrobiana de bacterias aisladas de cuartos de MSC. Comprobaron la susceptibilidad a los antimicrobianos de las bacterias aisladas. Los resultados del estudio mostraron que el 60,1% de las vacas eran CMT positivos. Las bacterias aisladas fueron 29,5% *Staphylococcus aureus* y 9,3% *Streptococcus agalactiae*. De las especies bacterianas aisladas, el 75,7% y el 71,4% de los aislados de *S. aureus* fueron resistentes a los efectos de la penicilina y la ampicilina, respectivamente. *Streptococcus agalactiae* fue resistente a los efectos de la oxitetraciclina (76,9%), estreptomina (61,5%) y cloxacilina (53,8%). Mientras que la mayoría de *S. aureus* (98,6%) y *Str. agalactiae* (88,5%) fueron susceptibles a los efectos de la gentamicina y la clindamicina respectivamente. Concluyeron que la mastitis subclínica tenía un alto nivel de prevalencia y los patógenos fueron resistentes a los antimicrobianos de uso común.

Ranasinghe et al., (2021) realizaron un estudio que tuvo como objetivo investigar la prevalencia, los factores de riesgo de la MSC y los efectos sobre la reproducción de las vacas lecheras en las principales zonas productoras de leche de Sri Lanka. La prevalencia de MSC fue de 57,5, 11,8 y 45,5% en las regiones A, B y C, respectivamente. El patógeno más común fue *Staphylococcus aureus*, con 87,1, 56,5 y 92,3% en las regiones A, B y C, respectivamente.

Ndahetuye et al., (2020) realizaron un estudio transversal con el objeto investigar la prevalencia, los patógenos causantes de la mastitis y su resistencia a los antimicrobianos (RAM). Se tomaron muestras de leche de cuartos de ubre con una puntuación CMT ≥ 3 (escala 1-5) para análisis bacteriológico. Se evaluó la resistencia a los antimicrobianos en 60 aislados seleccionados de *S. aureus*, encontraron una prevalencia de MSC de 37,3 % a nivel de cuarto y del 62,0 % a nivel de vaca. De las cepas de *S. aureus* el 83,3 % fueron resistentes a la penicilina, el 100 % a la clindamicina y el 20 % a la tetraciclina. En conclusión, la prevalencia

de MSC fue alta en todos los CRL. La mayoría de los patógenos identificados eran de naturaleza contagiosa y presentaban resistencia a la penicilina.

Persson et al., (2011) realizaron un trabajo en granjas lecheras de Suecia, el objetivo fue investigar el panorama microbiano y la aparición de resistencia a los antimicrobianos. Se analizaron los estafilococos para determinar la producción de betalactamasas y se evaluó la presencia de resistencia en todos los patógenos específicos de la ubre. Donde encontraron que de los aislamientos más comunes fueron *Staphylococcus aureus* (19%) y estafilococos coagulasa negativos (16%) seguido de *Streptococcus dysgalactiae* (9%), *Streptococcus uberis* (8%), *Escherichia coli* (2,9%) y *Estreptococos spp.* (1,9%). Hubo un mayor riesgo de encontrar *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* o *Streptococcus dysgalactiae* en muestras de leche de vacas crónicamente infectadas en comparación con los hallazgos en muestras de leche de vacas recién infectadas. Cuatro por ciento de los *Staphylococcus aureus* y el 35% de los aislados estafilococos coagulasa negativos fueron resistentes a la penicilina G. En general, la resistencia a otros antimicrobianos además de la penicilina G fue poco común. Por lo mismo concluyeron que *Staphylococcus aureus* y los estafilococos coagulasa negativos fueron los patógenos aislados con mayor frecuencia y la resistencia a los antimicrobianos fue rara.

Petrovski et al., (2006) realizaron un estudio con el objetivo de comparar los patrones de susceptibilidad antimicrobiana de tres patógenos de mastitis comunes (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* y *Str. dysgalactiae*) aislados de muestras de leche de Nueva Zelanda y EE. UU. Un total de 182 *S. aureus*, 126 *Str. uberis* y 89 *str.* Los aislamientos de disgalactia de Nueva Zelanda (107, 106 y 41, respectivamente) y EE. UU. (75, 20 y 48, respectivamente). La resistencia a la lincomicina fue la más frecuente (susceptibilidad del 8,6%) en todas las especies. Se identificaron aislamientos no susceptibles (es decir, resistentes o intermedios) de *S. aureus* para las tres penicilinas no isoxazolil (amoxicilina, ampicilina y penicilina: 20.6% y 36.0%) y lincomicina (99.9% y 94.6).

Gitau et al., (2014), realizaron un estudio cuyos objetivos del estudio fueron: (1) investigar la prevalencia y distribución de mastitis clínica y subclínica en ganado lechero en los distritos de Mukurwe-ini y Nakuru, Kenia, y (2) determinar la sensibilidad antibacteriana de los organismos que causan la mastitis bovina en estos distritos.

Los resultados obtenidos durante la primera y segunda visitas mostraron que la prevalencia de mastitis clínica es muy baja: 0,9% y 0,5%, respectivamente; El 56.0% y el 65.0% de las vacas fueron CMT positivas en al menos un cuarto y el 49.6% y el 58.7% de las vacas fueron positivas para el cultivo, respectivamente. Otros agentes frecuentemente aislados incluido *Streptococcus agalactiae*, y otros *Streptococcus spp.*, *S. aureus* y *S. agalactiae* fueron los más sensibles a la gentamicina y la norfloxacin, y los menos sensibles al cotrimazol y la ampicilina. Persson et al., (2011), realizaron un estudio con el objetivo de investigar el panorama microbiano y la aparición de resistencia antimicrobiana. Además, se investigaron las diferencias entre vacas recién infectadas y vacas con infección crónica. Las muestras de leche fueron investigadas bacteriológicamente y se calificaron utilizando CMT. Los aislamientos más comunes de 590 diagnósticos bacteriológicos fueron *Staphylococcus aureus* (19%) y estafilococos coagulasa negativos (SNC; 16%) seguidos de *Streptococcus (Str) dysgalactiae* (9%), *Str. uberis* (8%), *Escherichia (E.) coli* (2,9%) y *Streptococcus spp.* (1.9%). Las muestras sin crecimiento o contaminación constituyeron el 22% y el 18% de los diagnósticos, respectivamente. La distribución de las bacterias más comúnmente aisladas considerando solo muestras bacteriológicas positivas fue: *S. aureus* - 31%, SCN - 27%, *Str. dysgalactiae* - 15%, *estr. uberis*: 14%, *E. coli*: 4,8% y *Streptococcus spp.*: 3,1%. Hubo un mayor riesgo de encontrar *S. aureus*, *Str. uberis* o *str. dysgalactiae* en muestras de leche de vacas con infección crónica en comparación con hallazgos en muestras de leche de vacas recién infectadas. *Staphylococcus aureus* y el SCN fueron los patógenos aislados con mayor frecuencia y la resistencia a los antimicrobianos fue rara.

McDougall et al., (2014) realizaron un estudio para determinar las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de los antimicrobianos para los patógenos de mastitis comunes de las vacas lecheras en Nueva Zelanda; y evaluar el efecto de la fuente de los aislamientos. Las concentraciones inhibitorias mínimas para *Staphylococcus aureus* (n = 364), *Streptococcus dysgalactiae* (n = 65) y *Streptococcus uberis* (n = 102) aisladas de muestras de leche de vacas lecheras se determinaron para una variedad de antimicrobianos utilizando microdilución de caldo.

La distribución de CIM varió entre las especies bacterianas para cada antimicrobiano probado ($p < 0,001$). De los aislamientos de *S. aureus*, 28, 2 y 0.5%

fueron resistentes a penicilina, ampicilina y trimetoprim/sulfametoxazol, respectivamente. Para *S. dysgalactiae* y *S. uberis* aislados, 17 y 13% fueron resistentes a trimetoprim / sulfametoxazol, respectivamente. Un aislado (1%) de *S. uberis* fue resistente a la penicilina. La distribución de la CIM de *S. aureus* varió con el estado clínico, entre los rebaños y con la edad de la vaca ($p < 0.05$). La distribución de CIM para *S. aureus* para penicilina, amoxicilina / ácido clavulánico, cloxacilina y ampicilina fue menor en los casos clínicos que en los subclínicos, y la de amoxicilina / ácido clavulánico y oxitetraciclina en aislamientos de laboratorios veterinarios fue menor que en estudios de investigación. Se encontró resistencia a algunos antimicrobianos beta-lactámicos y trimetoprim/sulfametoxazol en aislamientos de casos de mastitis bovina.

Mendoza et al., (2017), realizaron un estudio con la finalidad de determinar la prevalencia de mastitis, los microorganismos asociados y los factores de riesgo relacionados en explotaciones lecheras de municipios pertenecientes a la provincia de Pamplona (Norte de Santander, Colombia). Se realizó la prueba de CMT a 1.208 cuartos provenientes de 302 animales ubicados en 108 predios. De los cuartos positivos (de trazas a 3+), se obtuvo una muestra de leche y se realizó aislamiento microbiológico. Mediante un cuestionario se analizaron 64 variables. Se determinó una prevalencia individual de 54,6% (165/302) (95% CI 48,8-60,3) animales positivos al CMT. En 67,6% (73/108) (95% CI 58,3-75,7) de los predios se presentó al menos un animal positivo, mientras que un total de 21,6% (260/1.208) (95% CI 19,3-23,9) de los cuartos presentaron reactividad al CMT. De las muestras en las cuales se pudo realizar aislamiento y caracterización microbiológica, en 74,4% se aisló *Staphylococcus aureus*, 12,3% *Streptococcus agalactiae* y 13,3% coliformes.2

Bengtsson et al., (2009) realizaron un estudio con el objeto de investigar la aparición de la resistencia antimicrobiana adquirida en los CIM patógenos de la ubre en *Staphylococcus aureus* (n = 211), estafilococos coagulasa negativos (SCN) (n = 56), *Streptococcus uberis* (n=113), *Streptococcus dysgalactiae* (n = 152), *Streptococcus dysgalactiae agalactiae* (n = 6), *Escherichia coli* (n = 163) y *Klebsiella spp.* (n = 42).

La presencia de resistencia adquirida se evaluó mediante valores de corte epidemiológicos específicos de la especie emitidos por European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Sin embargo, la resistencia a la

penicilina o la meticilina en los estafilococos se evaluó mediante la producción de β -lactamasa o la presencia del gen *mecA*, respectivamente. Los estafilococos eran en su mayoría susceptibles a los antimicrobianos probados, pero el 7.1% de *S. aureus* y el 12.5% del SCN eran resistentes a la penicilina por la producción de β -lactamasas. La resistencia a la meticilina no se encontró en *S. aureus*. Todos los *Streptococcus dysgalactiae* y *S. agalactiae* fueron susceptibles a la penicilina. Las distribuciones bimodales de MIC para la tetraciclina en *S. dysgalactiae* y *S. uberis* indican resistencia adquirida en algunos aislamientos. Entre *E. coli*, 12.3% de los aislamientos fueron resistentes a uno o más antimicrobianos. Los rasgos más comunes fueron la resistencia a estreptomina (11.0%), sulfametoxazol (8.6%), ampicilina (7.4%) o tetraciclina (4.9%). *Klebsiella spp.*, fueron resistentes a la ampicilina y algunos aislamientos también a la tetraciclina (7,1%) o sulfonamida (9,5%).

Cervantes et al., (2017) realizaron un estudio con el objetivo de realizar la identificación primaria de microorganismos patógenos causantes de mastitis subclínica. La prueba tamiz se realizó por la prueba de CMT, a partir del resultado trazas se hizo conteo de células somáticas, valores > 200,000 células/mL, se cultivaron en medio cromogénico selectivo para Gram positivos (G+) *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* y *Staphylococcus aureus* y Gram negativos (G-), *E. coli*, *Klebsiella*, *Pseudomona*, *Candida albicans* y *Proteus mirabilis*. El 100 % de las vacas padecían mastitis. Las frecuencias relevantes de microorganismos fueron: G+, *S. agalactiae* (70.6 %), *S. uberis* (60.3 %) en total y en doble propósito y ordeña manual; *Pseudomona* (100 %), *S. aureus* (59 %) en lechería familia y ordeña mecánica. *Klebsiella* (49.5 %) y *E. coli* (28.5 %), este último en doble propósito y ordeña manual fueron los G- más frecuentes.

Hoque et al., (2018) realizaron un estudio con el objeto de caracterizar el *Staphylococcus aureus* es un agente causal común de la mastitis bovina en hatos lecheros en todo el mundo. De las 175 vacas seleccionadas al azar, se detectó mastitis en 50 vacas mediante la prueba de CMT, y de esas vacas mastíticas, se recolectaron 200 muestras de leche para el cultivo posterior y la identificación basada en PCR. La prevalencia de mastitis en rebaños, vacas y cuartos fue de 73.3, 28.6 y 29.5% respectivamente, y la mastitis subclínica (MSC) fue el tipo predominante en todos los casos. Según la bacteriología, la prevalencia general de mastitis por *Staphylococcus aureus*

en rebaños, vacas y cuartos fue de 72.7, 74.0 y 62.0%, respectivamente, y el patógeno se asoció principalmente con la mastitis clínica (MC).

Amer et al., (2018) realizaron un estudio para describir la aparición de formas clínicas y subclínicas de mastitis en 250 bovinos de 5 granjas lecheras alrededor de las ciudades de Santa Rosa y Machala, provincia de El Oro, Ecuador. Se detectaron MC y MSC en 30 (12.0%) y 150 (60%) de los 250 bovinos analizados, respectivamente. Predominio en el nivel del trimestre en la ubre fue de 57.7% (577/1,000), que fue mayor entre los cuartos delanteros (369/577; 63.9%) que en los cuartos traseros. De las 577 muestras de leche mastítica sometidas a análisis microbiológico, 35 se excluyeron debido a la contaminación y 20 dieron negativo. La identificación de aislados bacterianos reveló que el 33,3% de las muestras de 93 MC contenían coliformes, 25,8% de estafilococos coagulasa positivos, 20,4% de estafilococos coagulasa negativos (SCN), 9,7% de estreptococos, 7,5% de *Bacillus spp.* y 3,2% de *Klebsiella spp.* El perfil bacteriano de las 429 muestras de leche MSC mostró que el 55,4% contenía SCN, el 22,1% de *Bacillus spp.*, El 9,3% de estreptococos y el 6,1% de estafilococos coagulasa positivos. La prueba de susceptibilidad antibiótica in vitro de los aislamientos obtenidos indicó que todos eran susceptibles a la amoxicilina, ampicilina, cefotaxima, enrofloxacina, sulfametoxazol-trimetoprim. gentamicina y neomicina. No se observaron cepas resistentes a múltiples fármacos.

Birhanu et al., (2017) realizaron un estudio transversal para estimar la prevalencia, evaluar los factores de riesgo y aislar el principal agente etiológico de la mastitis subclínica en la ciudad de Bishoftu. El estudio se realizó en 262 vacas lactantes de raza cruzada seleccionadas de 12 granjas lecheras de manejo intensivo. La prueba CMT y los métodos de cultivo bacteriológico se utilizaron como herramientas de diagnóstico. De las 262 vacas examinadas, 105 (40.1%) y de 1048 trimestres examinados, 170 (16.1%) dieron positivo para mastitis subclínica usando CMT.

Al-Farha et al., (2017), realizaron un estudio con el objetivo de este estudio fue determinar la relación causal de *Mycoplasma spp.* y *A. laidlawii* a la mastitis y compararlos con la MSC causada por patógenos de mastitis convencionales de un solo rebaño lechero en el sur de Australia; *Mycoplasma spp.* y *A. laidlawii* se detectaron mediante PCR aplicada directamente a muestras de leche. La manada tenía mastitis. Problema con alto recuento de células somáticas y baja tasa de

respuesta a la terapia antimicrobiana convencional. Encontrando los siguientes resultados: El cultivo convencional mostró un predominio de estafilococos coagulasa negativos, seguido de estafilococos coagulasa positivos, *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *E. coli* y *Klebsiella spp.*

Abrahmsén et al., (2014) realizaron un estudio cuyo objetivo fue establecer la prevalencia de mastitis subclínica en el ganado lechero en las zonas urbanas y periurbanas de Kampala, Uganda, y obtener información sobre los patógenos y los patrones de resistencia a los antibióticos. El estudio se realizó como un estudio de campo en 18 granjas lecheras de pequeños productores en el periurbano de Kampala, Uganda. El resultado bacteriológico más común fue la infección por *estafilococos* coagulasa negativos (54,7%), seguido de un crecimiento negativo (24,9%) y estreptococos (16,2%); todos los cuales (n = 34) fueron sensibles a la penicilina. De los estafilococos probados (n = 17), la mayoría (58.9%) fue positiva para la producción de penicilinas.

Sanotheran & Mylvaganam, (2016), realizaron un estudio en la región Sri Lanka-India con el objeto de determinar la prevalencia de mastitis subclínica (MSC) en vacas lecheras y los factores de riesgo asociados a ella. Un total de 152 vacas en lactación fueron elegidas al azar de 15 ranchos y examinadas mediante la prueba de CMT, determinando una prevalencia de 43%. Por otro lado, señalan que la prevalencia es alta en vacas con rendimiento diario de 3-5 litros.

Zeryehun et al., (2013) determinaron en el distrito de Ababa, región Ethiopia-África, la prevalencia, los patógenos bacterianos y factores de riesgo asociados a mastitis bovina en 38 pequeñas explotaciones lecheras, mediante el examen clínico y prueba de CMT, encontraron en un total de 499 vacas cruzadas, una prevalencia total de 74.7%, de los cuales representa el 19.6% a mastitis clínica y 55.1% a subclínica. De acuerdo a las etapas de lactación: Temprana, media y tardía, se halló un 87.2, 65.9 y 73.1%, respectivamente, siendo esta variación significativa ($p < 0.05$). Según el uso de la toalla como una práctica de higiene, se obtuvieron tasas de infección de 62.9% en los lugares donde la usaban y 79.7% en las que no la usaban, de la misma manera, los lugares de buenas condiciones higiénicas mostraron una tasa de infección de 59.6% frente a las de pobres condiciones higiénicas (82.6%).

Rodríguez-Pérez & Muñoz-Ganoza, (2017) realizaron un estudio con el objeto de determinar la frecuencia y susceptibilidad antimicrobiana de bacterias causantes de mastitis en bovinos de un establo del distrito de Conache, Trujillo, Perú Las

bacterias gram negativas más frecuentes fueron *E. coli* (28%) y *Klebsiella sp.* (24%), y la bacteria gram positiva más frecuente fue *Staphylococcus aureus* (16%). *Pseudomonas aeruginosa* fue resistente a la mayoría de antibióticos, excepto a la eritromicina (susceptibilidad intermedia). *E. coli* presentó susceptibilidad intermedia a la eritromicina y resistencia a la oxacilina y rifampicina. *Staphylococcus aureus* presentó susceptibilidad intermedia a la clindamicina y eritromicina y resistencia a la ampicilina.

Colque-Cruz, (2015), realizó un estudio en el distrito de Chamaca, provincia de Chumbivilcas, Cusco-Perú, para determinar la prevalencia de MSC en vacas Brown Swiss, mediante la prueba de CMT, se encontró en un total de 136 una prevalencia de 19.85%, que estuvo influenciada por el número de parto, de la siguiente manera, 0.00, 0.74, 2.94, 5.88, 5.15, 2.20, 1.47 y 1.47% de prevalencia para vacas del primer, segundo, tercero, cuarto, quinto, sexto, sétimo y octavo a más partos, respectivamente ($P>0.05$), para los meses de lactación se encontró 4.41, 8.82 y 6.62% para 1 a 3 meses, 4 a 6 meses, y de 7 a 9 meses de lactación, respectivamente ($P>0.05$), mientras que en los cuartos mamarios se encontró 18.52, 11.11, 33.33 y 51.85 % para el anterior derecho, anterior izquierdo, posterior derecho y posterior izquierdo, respectivamente ($P<0.05$).

Santivañez-Ballón et al.,(2013) realizaron un estudio en el distrito de Tamburco, provincia Abancay-Apurímac-Perú, en 209 bovinos de producción determinaron la prevalencia y los factores asociados a la mastitis subclínica, utilizando la prueba de CMT, hallaron una prevalencia de 72.25%, que estuvo influenciada por la raza, edad e higiene de mano, al analizar con el modelo de regresión logística, determinan dos veces más riesgo a la mastitis subclínica en vacas de raza Holstein (OR = 2.117) que en otras razas, y en vacas con ausencia de higiene de manos antes del ordeño (OR = 2.096) que en vacas donde se realiza esta higiene, mientras tanto la edad de 3 a 4 años de las vacas (OR = 0.396) fue un factor de protección que aquellas mayores a 4 años.

Quezada & Morales-Cauti, (2022), realizaron un estudio con el objetivo de determinar la resistencia antibiótica de bacterias aisladas de cuadros de mastitis subclínica en cuatro establos lecheros del distrito de Lurín, Lima - Perú, el año 2017. Se evaluaron 586 vacas Holstein sin cuadros de mastitis clínica durante la estación de verano, mediante la prueba de CMT. Se colectaron muestras de leche de los

cuartos que resultaron positivas al CMT (+, ++, +++) y se procedió al cultivo bacteriológico (agar sangre y agar McConkey) y se realizaron pruebas bioquímicas. Se evaluó la resistencia microbiana a ocho antibióticos utilizando la prueba de sensibilidad Kirby-Bauer. Se encontró 43.7% (256/586) de vacas con mastitis subclínicas y 12.4% (291/2344) de cuartos mamarios afectados. Las bacterias aisladas con mayor frecuencia fueron *Klebsiella oxytoca* (20.2%), *Enterobacter cloacae* (12.1%), y *Streptococcus agalactiae* (9.1%). Se observó resistencia a antibióticos en *K. oxytoca* a penicilina, cefalotina, amikacina, estreptomina, tetraciclina, gentamicina, cefalexina y enrofloxacin entre un 62.9% y 91.9%. Las cepas de *E. cloacae* presentaron 100% de resistencia a la penicilina y para cefalotina, amikacina, estreptomina, tetraciclina, gentamicina, cefalexina y enrofloxacin, entre 86.5% y 97.3%. En los aislados de *S. agalactiae* la resistencia observada a la penicilina, cefalotina, estreptomina, tetraciclina, gentamicina, cefalexina y enrofloxacin estuvo entre el 10.7% y 82.1%. Para la amikacina la sensibilidad registrada fue del 100%.

Najarro, (2024), realizó un estudio con el objetivo de identificar los agentes patógenos que generan la mastitis clínica y subclínica en hatos Brown Swiss de producción láctea ubicados en Melgar, Puno, Perú. Se realizó un estudio transversal en 171 vacas en lactación, empleándose la prueba de CMT para el diagnóstico de mastitis subclínica y la prueba de fondo negro para la mastitis clínica. Se tomaron muestras de leche de vacas con mastitis clínica y subclínica (2+ y 3+); para la identificación de los patógenos se realizó cultivos, microscopia, pruebas bioquímicas y para la resistencia antimicrobiana se determinó por el método de Kirby-Bauer. La frecuencia de mastitis subclínica fue de 42.1% (72 vacas con 55 cepas) y de mastitis clínica 2.92% (5 vacas con 8 cepas). La frecuencia de los patógenos identificados en mastitis subclínica fueron de *Staphylococcus aureus* 52.7%, *Staphylococcus intermedius* 23.6%, *Staphylococcus hyicus* 12.7%, *Staphylococcus sp.* 7.3% y *Streptococcus uberis* 3.6%; y en mastitis clínica fue de *S. aureus* 50%, *S. intermedius* 25% y *S. hyicus* 25%. El antibiograma determinó una resistencia antimicrobiana para neomicina de 32.3 %, penicilina g de 17.1%, oxitetraciclina de 25.3%, cefalexina de 7%, amoxicilina con ácido clavulánico de 4.4%, ceftriaxona de 10.1%, enrofloxacin de 0.6%, ceftiofur de 1.9% y ceftazidima de 1.3 %, no hubo resistencia con gentamicina, florfenicol, sulfatrimetropim y

estreptomicina. *S. aureus*, *S. intermedius* y *S. hyicus* fueron los principales patógenos en mastitis clínica y subclínica bovina, con alta frecuencia y resistencia antimicrobiana. La sensibilidad in vitro a neomicina, oxitetraciclina y penicilina G fue ineficiente, mientras gentamicina, florfenicol, sulfatrimetropim y estreptomicina resultaron efectivos.

5.2. Bases teóricas

5.2.1. Anatomía y fisiología de la glándula mamaria

Nickerson & Akers, (1985), señalan que la ubicación de la glándula mamaria es la región inguinal, consta de cuatro cuartos mamarios, funcionalmente cada glándula es una entidad por separado, el interior de cada cuarto mamario consta de un tejido secretor, cisterna del pezón, cisterna de la glándula y numerosos conductos galactóforos. El tejido secretor o porción glandular está rodeada por una cápsula de tejido conectivo que forma parte del aparato suspensorio mamario, cuyas prolongaciones laminares penetran en el interior y dividen el parénquima en lóbulos y por medio de ellas los vasos y nervios alcanzan el interior de la glándula mamaria. La glándula mamaria contiene millones de sacos microscópicos denominados alveolos en cada alveolo está incluido las células epiteliales (lactocitos) que también está rodeada de capilares sanguíneos y células mioepiteliales, además se presentan en grupos encapsulados por tejido conjuntivo (115 a 220 alvéolos) y tienen un tamaño de 7-8 mm de diámetro y forman los lobulillos, la separación entre lobulillo y lobulillo es por medio de tejido conectivo intralobulillar y conjunto de lobulillos dentro del tejido conectivo forman lóbulos.

Farinango, (2015) menciona que la leche se forma por sustancias sanguíneas que pasan hacia los alvéolos mamarios, específicamente los lactocitos son los encargados de la síntesis, posteriormente la leche es drenada a los espacios alveolares y terminan desembocando en la cisterna glandular. Este último se comunica con la cisterna del pezón, a través de una constricción formada por un anillo de vasos venosos denominado roseta.

Nickerson & Akers, (2011), mencionan que para facilitar la retirada de la leche, las células mioepiteliales que rodean a los alvéolos y los conductos se contraen en respuesta a la oxitocina; la estimulación del pezón, bien por la succión

de la cría o por la estimulación manual del lavado previo al ordeño, genera un estímulo neuroendocrino, el cual es transportada a lo largo de la médula espinal hasta el hipotálamo, donde se produce la estimulación de las neuronas de los núcleos supraóptico y paraventricular y bajo el reflejo tracto hipotalamomohipofisario, la neurohipófisis sintetiza y libera la oxitocina. El estrés o la excitación, puede inhibir la liberación de oxitocina de la hipófisis o la unión de la oxitocina a las células mioepiteliales, lo que evita la eyección de leche.

5.2.2. Estructura del pezón

Philips, (2003), indica que la estructura del pezón es la primera línea de defensa contra la mastitis, está recubierto por epitelio estratificado escamoso, cuya superficie contiene una gran cantidad de tejido queratinizado muerto lo que supone un medio hostil para el crecimiento bacteriano. En el ápice tenemos un canal de 8-12 mm rodeado por un esfínter (músculo liso) que se cierra antes de haber pasado 20-30 minutos tras el ordeño, la efectividad de la defensa está relacionado con el diámetro del conducto del pezón, profundidad, constitución y distribución de la capa de queratina. La queratina es producida continuamente por células epiteliales que recubren el conducto galactóforo del pezón, su función es taponar físicamente el conducto y atrapar a los microorganismos invasores mediante interacciones electrostáticas y por ser una sustancia cerosa limita la disponibilidad de humedad para las bacterias colonizadoras, se ha determinado que en las vacas de alta producción puede haber una pérdida excesiva de tejido epitelial queratinizado en el interior del canal del pezón, lo que reduce sus propiedades protectoras entre ordeños.

5.2.3. Clasificación de la mastitis bovina

Cobirka et al., (2020) menciona que la mastitis se puede clasificar según las características clínicas, en mastitis clínica y mastitis subclínica. El primero se caracteriza por la presencia de escamas, coágulos o secreciones acuosas en la leche. Generalmente los cuartos infectados están hinchados, calientes y dolorosos. En algunos casos clínicos agudos se pueden encontrar signos generales (hipertermia, anorexia y depresión). Las consecuencias son graves, provocando la muerte de la vaca o agalactia, lo que lleva a un sacrificio prematuro y una

disminución de la producción de leche. La duración subclínica dura más que la clínica y la infección permite la propagación de patógenos dentro del rebaño (recuento de células somáticas). El segundo la mastitis subclínica es más difícil de diagnosticar debido a la falta de signos evidentes en la leche o en los animales. Sus principales síntomas están relacionados con un aumento del recuento de células somáticas y una disminución de la producción de leche. La duración subclínica dura más que la clínica y la infección permite la propagación de patógenos dentro del rebaño.

Ashraf & Imran, (2020), mencionan que las lesiones mecánicas asociadas con el ordeño mecánico pueden provocar daños graves en los cuartos, lo que los hace más vulnerables, ascendiendo a infecciones debido al daño a la queratina o a las membranas mucosas que recubren los senos del pezón.

Ramírez et al., (2014) señalan que están muy relacionadas las malas prácticas higiénicas, como la ubre sucia al inicio del ordeño. Además, las vacas Holstein son más susceptibles a sufrir mastitis que otras razas. Los desequilibrios dietéticos también están relacionados con los casos de mastitis.

Pérez et al., (2020), determino que vacas con siete o más partos presentaron mayor prevalencia de mastitis. Los días de lactancia también pueden aumentar la prevalencia de la enfermedad.

Ashraf & Imran, (2020b), señalan que la etiología no está completamente descrita; hasta la fecha, casi 200 microorganismos están asociados con la mastitis, y continuamente se detectan e informan nuevos patógenos, incluidos levaduras, hongos, virus y bacterias.

Ashraf & Imran, (2020b), señalan que en los últimos años se han reportado tasas de morbilidad más altas causadas por mastitis micótica en el ganado vacuno. Un estudio reciente detectó levaduras zoonóticas, incluidas *Candida albicans* y *Kodamaea ohmeri* Awankdar. Otras especies de *Candida* fueron reportadas *C. guilliermondii*, *C. famata*, *C. tropicalis*, *C. colliculosa*, *C. krusei*, *C. rugosa*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. inconspicua*; *Trichosporon sp.*, *Rhodotorula glutinis*, *Saccharomyces fragilis*; *Pichia kudriavzevii*, *Cyberlindnera rhodanensis*.

Dalanezi et al., (2018); Hayashi et al., (2013); Ksouri et al., (2015); Zhou et al., (2013), encontraron especies de moho *Aspergillus amstelodami*, *A. fumigatus*, *Geotrichum candidum*, *Prototheca zopfii* y *Prototheca blaschkeae*.

Mastitis viral

Es probable que la inmunosupresión inducida por virus sea la base de la mastitis. Se ha informado que el herpesvirus bovino 1, el virus de la fiebre aftosa y el virus de la parainfluenza causaron mastitis clínica, y el herpesvirus bovino 4 causa mastitis subclínica. Por otro lado, las lesiones en los pezones asociadas con el herpesvirus bovino 2, la viruela vacuna, el pseudovirus de la viruela vacuna, la fiebre aftosa, el virus de la estomatitis vesicular, el virus del papiloma y el virus de la leucemia bovina contribuyen indirectamente a la mastitis (Cuesta et al., 2020; Herlekar et al., 2013)

Mastitis bacteriana

Las bacterias son los agentes etiológicos más comunes y prevalentes asociados con la mastitis. Más de 150 bacterias Gram positivas y Gram negativas se identifican como patógenas de mastitis, que se pueden dividir en contagiosas (propagadas desde otros lugares infectados) y ambientales (entorno circundante) (Ashraf & Imran, 2020b; Cobirka et al., 2020; Ndahetuye et al., 2020; Ruegg, 2009).

Ashraf & Imran, (2020^a); Cobirka et al., (2020); Cvetnic et al., (2016), señalan que la ubre sirve como reservorio de patógenos contagiosos que se transmiten de los pezones infectados a los no infectados durante el proceso de ordeño. Incluyen principalmente *Mycoplasma bovis*, *Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus aureus*.

Se informó una mayor incidencia de *S. agalactiae* aislada de vacas con mastitis. Debido a esto, muchos países consideran que este patógeno es predominante entre otros patógenos contagiosos. A pesar de esto, un número diverso de informes todavía considera a *S. aureus* como el agente contagioso más prevalente asociado con la mastitis, ya que esta bacteria persiste dentro de la ubre (Lamari et al., 2021; Rainard et al., 2018).

Otro patógeno contagioso menos común es *M. bovis*, aunque pocos estudios reportan su prevalencia. Sin embargo, los brotes debidos a *M. bovis* se están volviendo comunes y se consideran la especie de micoplasma más prevalente que causa mastitis bovina en todo el mundo (Gelgie et al., 2022; Liu et al., 2020). Por otro lado, los patógenos ambientales se transmiten a través de las heces, el ambiente interior y los pastos, siendo los más comunes *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Streptococcus uberis* (Klaas & Zadoks, 2018).

E. coli es el coliforme Gram negativo más común responsable de causar mastitis clínica ambiental debido principalmente a su alta variabilidad genotípica (Alawneh et al., 2020).

Cheng et al., (2021); Fu et al., (2022), indican que *K. pneumoniae* es la segunda causa más común de mastitis bovina y se considera la más perjudicial en la disminución de la producción y calidad de la leche, así como en términos económicos. Aunque está clasificado como un patógeno ambiental, también se ha descubierto que se transmite de vacas infectadas a vacas sanas.

Abureema et al., (2014); Monistero et al., (2021) mencionan que *Streptococcus uberis* causa aproximadamente un tercio de todos los casos de infección intramamaria en vacas en todo el mundo, invadiendo el canal del pezón después del ordeño o después de sufrir daños. Un estudio reportó micobacterias como agentes causantes de mastitis, se identificaron dos cepas como *Mycobacterium fortuitum* II y *Mycobacterium mageritense*, las cuales son resistentes a la claritromicina (Cvetnić et al., 2022).

5.2.4. Mastitis subclínica

La mastitis subclínica es un proceso multifactorial donde se conjugan, factores propios del animal, agente causal, ambiental, manejo y se incluyen las técnicas de ordeño, los cuales juegan un papel determinante en la presencia de la mastitis; una técnica inadecuada de ordeño es caracterizada por pobres condiciones higiénicas, falta de desinfección en el pre-ordeño y ordeños prolongados, estas condiciones conllevan a una probabilidad entre 70 a 80% de los casos, (Gómez-Sanz et al., 2013).

La duración de la mastitis subclínica depende del microorganismo causal y de la eficacia de los mecanismos de defensa del huésped (Reyes & Arguello, (2015)). No presentan signos clínicos ni cambios en el aspecto de la leche, es detectable solamente por ensayos que demuestren un alto recuento de células somáticas (RCS), (Deng et al., 2015).

5.2.5. Etiología

Los patógenos causantes de mastitis subclínica según su orden de importancia: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli* y *Klebsiella*.(Islam et al., 2016). Mientras

tanto (Acuña & Rivaneira, 2008), clasifica a los patógenos causantes de la mastitis subclínica de la siguiente manera:

- ✓ **Patógenos contagiosos:** *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium bovis*, *Mycoplasma spp.*
- ✓ **Patógenos ambientales:** *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella spp.*
- ✓ **Patógenos oportunistas:** *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus chromogenes*.

5.2.6. Mecanismos de defensa de la glándula mamaria

5.2.6.1. La inmunología de la glándula mamaria de la vaca

Sordillo, (2005), menciona que la ubre es el órgano productor de leche de los animales lecheros; por lo tanto, para una producción óptima, debe estar saludable. La mastitis es la respuesta inflamatoria del tejido de la glándula mamaria (GM) a cambios fisiológicos y metabólicos, traumatismos y alergias y, con mayor frecuencia, a lesiones causadas por diversos microorganismos. La mastitis se considera la mayor amenaza para la industria láctea desde tres perspectivas: económica, higiénica y legal. La inflamación de la glándula mamaria, acompañada de cambios inmunológicos y patológicos en el tejido de la GM, ocurre en diferentes grados de intensidad y resulta en una amplia gama de consecuencias en cuanto a alteraciones físicas, químicas y, a menudo, microbiológicas de la leche secretada.

Sordillo, (2005), mencionan que las funciones inmunes adecuadas son esenciales para la defensa del huésped contra las inflamaciones intramamarias. La inmunidad de la GM depende de la compleja combinación y coordinación de elementos protectores específicos e inespecíficos, incluidas las características anatómicas de la glándula, así como los componentes de defensa celular y humoral. Sin embargo, la defensa inmune de GM varía según las diferentes etapas de la lactancia en los animales lecheros y típicamente se deprime con la exposición al estrés y alrededor del secado y el parto, lo que aumenta la susceptibilidad a la mastitis.

Tommasoni et al., (2023) señalan que se ha acumulado un considerable conjunto de evidencia que sugiere que la mastitis es un complejo multifactorial, y que varios factores ambientales y de manejo deben interactuar para aumentar la exposición del huésped a los patógenos de la mastitis, reducir la resistencia natural de los

animales a las enfermedades o ayudar a los patógenos a ingresar al medio. Entorno de GM para causar infección.

5.2.6.2. El sistema de defensa inmune MG y sus componentes relacionados

Sistema de defensa de la piel del pezón y del canal del pezón

Paulrud, (2005); Sordillo et al., (1997); Zecconi et al., (2000), mencionan que el principal mecanismo de defensa de la MG está representado estructuralmente en el canal del pezón, que actúa como barrera física y fuente de sustancias antimicrobianas. La barrera física la proporciona el esfínter de músculo liso que rodea el canal del pezón, que impide el escape de la leche y constituye una barricada contra la entrada de diferentes patógenos al mantener un cierre hermético. La defensa antimicrobiana, por otra parte, consta de varios componentes. Normalmente, la piel sana del pezón está recubierta con un manto protector de ácidos grasos (AG) que retardan el crecimiento de bacterias patógenas (T. Sharma et al., 2017). Además, el epitelio escamoso estratificado del conducto del pezón produce queratina, un material ceroso que recubre el canal del pezón, que atrapa las bacterias invasoras y dificulta la migración de microorganismos hacia la cisterna de la glándula.

Paulrud, (2005) indica que la queratina contiene agentes antimicrobianos que ayudan a combatir las infecciones. Esta queratina está compuesta por:

- ✓ Primero: AG bacteriostáticos de tipo esterificado y no esterificado, como los ácidos láurico, mirístico, palmitoleico y linolénico.
- ✓ Segundo: Proteínas fibrosas, que se unen electrostáticamente a los microorganismos, alterando la pared celular y haciéndola más susceptible a cambios de presión osmótica y, por tanto, a lisis y muerte.

Hibbitt & Benians, (1971) descubrieron que las proteínas catiónicas tienen un efecto inhibitorio contra algunos patógenos como *Staph. aureus* y *S. agalactiae*, que era igual al de las proteínas aisladas de neutrófilos bovinos.

Bitman et al., (1991) han demostrado que el contenido de lípidos y la composición de la queratina del conducto del pezón varían a lo largo del proceso de ordeño, entre animales lactantes y de leche seca. Se descubrió que la MSC no afecta el contenido de lípidos de la queratina del conducto del pezón, mientras que se

demonstró que la MC está asociada con niveles significativamente más altos de lípidos totales.

Miller et al., (1992) recientemente han documentado funciones centinela del pezón frente a patógenos invasores, ya que el tejido del canal del pezón respondió rápida e intensamente, con expresión de varios receptores tipo Toll (RTL) y producción de citoquinas y péptidos antimicrobianos. Además, los AG libres en la leche de los cuartos clínicos contenían menos AG de cadena corta, mientras que los AG poliinsaturados eran significativamente más altos o con composición lipídica similar de cuartos no infectados y según la gravedad de la Inflamación Intramamaria (IMI).

Inmunidad innata y adaptativa (adquirida)

Sordillo et al., (1997), mencionan que La GM normalmente está protegida por respuestas inmunes (RI) tanto innatas como adaptativas, que se coordinan y operan juntas para proporcionar una defensa óptima contra las infecciones. Las RI también facilitan la presencia transitoria constitutiva o aguda de una amplia gama de componentes relacionados con el sistema inmunológico en la leche. El sistema inmunológico adaptativo (SIA) responde con mayor solidez a las amenazas a las que ha estado expuesto anteriormente, sin embargo, tarda en responder a nuevas amenazas (Riollet et al., 2000). Por el contrario, el sistema inmunológico innato (SII) es la primera línea de defensa contra los patógenos una vez que han penetrado la barrera física del canal del pezón y antes de que el SIA entre en juego, y evoluciona hasta convertirse en una defensa altamente eficaz del huésped (Akira et al., 2006; Akira & Takeda, 2004; Bannerman et al., 2005).

Este proceso está mediado por varias cascadas de transducción de señales intracelulares que desencadenan una regulación positiva aguda de varios componentes inmunes innatos, incluidos diferentes leucocitos, moléculas de adhesión y citocinas (Stelwagen et al., 2009).

5.2.7. Fisiopatología de la mastitis

5.2.7.1. Fase de invasión de pezón

Alvarado-Montenegro, (2006) indica que los patógenos atraviesan el canal del pezón a través de dos mecanismos: el primer mecanismo se relaciona con la extracción de la leche, donde en forma pasiva los gérmenes ingresan por reflujo y el segundo mecanismo, consiste en la penetración activa de gérmenes. Luego del ordeño el canal del pezón permanece dilatado por 20-30 minutos, inclusive el canal del pezón dañado puede permanecer parcialmente o permanentemente abierto y los microorganismos presentes en el medio ambiente (materia fecal, cama, etc.) o aquellos que se encuentran en lesiones de la piel y en la punta del pezón pueden invadir fácilmente el canal del pezón.

Kremer et al., (1990), mencionan que, en la etapa temprana de invasión de la cisterna del pezón, los patógenos invasores tienen que vencer la acción repulsiva del ordeño, además tiene que enfrentarse a algunos mecanismos inmunológicos, especialmente en la región distal de la roseta Furstenbergs, donde hay una infiltración de polimorfonucleares (PMN).

5.2.7.2. Fase de infección

Kenneth, (2011) indica que el primer evento imprescindible durante el proceso de infección de un patógeno es la adherencia a las células de la glándula mamaria, las bacterias y células hospedadoras poseen una carga neta negativa en la superficie y por lo tanto repelen las fuerzas electrostáticas, estas fuerzas son vencidas por acciones hidrófobas, cuanto más hidrófoba sea la superficie de la célula bacteriana mayor es su adherencia a la célula hospedadora. Asimismo, los patógenos están dotados de adhesinas y pilosidades, las pilosidades a menudo fijan manosa y la fibronéctina que se encuentran en las superficies de las células hospedadoras, esta interacción es potenciada por la adhesina/receptor. Entre las propiedades antifagocíticas se tiene a cápsulas polisacáridos y factor H, la capsula polisacárido interfiere con la deposición del complemento en la superficie de la célula bacteriana al fijar los reguladores del complemento (C3b) y el factor H acelera la degradación de complemento (C3b), con ello elimina el daño directo por parte del complemento y hace que los receptores reconocidos por la fagocitosis no se encuentren disponibles, el patógeno engullido por un fagocito es incapaz de multiplicarse allí, pero aún tiene oportunidades de sobrevivir si mata a la célula hospedadora, para ello desactiva el potencial mortal del fagocito y reduce el número de defensores disponibles para inhibir a otros invasores bacterianos, reduciendo

los procesos celulares normales de citocinas y quimiotácticos que indican muerte necrótica. El *Staphylococcus aureus* produce coagulasa, un factor de aglutinación, se une de manera no enzimática al fibrinógeno, generando agregación de las bacterias, que también contribuye a depositar fibrina en la superficie alterando su ingestión por las células fagocíticas o su destrucción dentro de tales células por tanto, la producción de coagulasa se considera sinónimo del potencial patógeno invasor, también *Staphylococcus spp*, *streptococcus spp* producen hialuronidasas, esta enzima hidrolizan ácido hialurónico, componente de la sustancia base del tejido conjuntivo y ayudan a su diseminación de los patógenos en los tejidos.

5.2.7.3. Fase de inflamación

Los macrófagos residentes en la glándula mamaria, estimulados por patógenos invasores o por LPS en su etapa inicial producen sustancias quimiotácticas y citosinas proinflamatorias que conducen al desarrollo de una reacción inflamatoria local (Zadoks & Fitzpatrick, 2009). La inflamación que involucran cambios en el flujo sanguíneo local con un influjo de leucocitos polimorfonucleares (PMN) con afluencia de componentes de suero (complemento, inmunoglobulinas, lactoferrina, etc.) y con la producción de sustancias que producen daño celular (Kremer et al., 1990). Por lo tanto, la efectividad de este sistema depende de la prontitud y la magnitud de la migración de polimorfonucleares (PMN) a la ubre (quimiotaxis), la opsonización y las actividades fagocíticas y bactericidas de estos PMN fagocitan téis. Se ha determinado que la intensidad de la respuesta inflamatoria determina si la mastitis es clínica o subclínica, ello dependerá de los mecanismos de defensa, si la infección se combate con rapidez y eficacia, la mastitis será leve y transitoria, pero cuando los mecanismos de defensa se ven alterados o el microorganismo es capaz de evadir las defensas normales, puede aparecer una mastitis grave o crónica (Craven & Williams, 1985).

5.2.7.4. Fase de destrucción de tejido alveolar

Reyes & Arguello, (2015), mencionan que a medida que la enfermedad progresa el número de células somáticas en la leche se eleva y se asocia con una reducción permanente en la producción debido a las sustancias liberadas por el

sistema inmune que produce congestión capilar, edematización del tejido secretor y obstrucción de los conductos intralobulares que conducen a una lisis de las células alveolares y su reemplazo por tejido conectivo afuncional.

5.2.7.5. Control de la mastitis subclínica

Gómez-Quispe et al., (2015) indican que la infección por *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* y *Corynebacterium bovis*, etc., se puede controlarse poniendo en práctica 7 puntos críticos en una rutina de ordeño:

- El ordeño se debe de realizarse en un ambiente limpio, evitar el estrés en los animales.
- Realizar la higiene de las manos y de los pezones.
- Prevenir daño de los pezones durante el ordeño.
- Realizar el despunte o eliminación de los primeros chorros y detección temprana de mastitis clínica y subclínica.
- Siempre secar con toallas individuales y desinfectar los pezones con solución desinfectante que contenga yodo.
- Se debe realizar el sellado de pezones con productos desinfectantes de buena calidad que limiten el contagio y protejan la piel del pezón.
- Al finalizar el ordeño los animales deben permanecer parados para permitir que se cierre el esfínter del pezón, antes de que la ubre entre en contacto con microorganismos, para tal efecto se debe ofrecer alimento al animal

5.2.7.6. Medidas de control en el futuro

Philips, (2003), indica que, en el futuro, el control tendrá que basarse, en mayor medida, en las medidas preventivas que en el uso de antibióticos y lo recomienda las siguientes actividades:

1. Minimizar el contacto entre la vaca y las heces/purines.
2. Evitar los pastos y los caminos embarrados.
3. Eliminar a las vacas que se tumben en los pasillos en lugar de hacerlo en los cubículos o en los establos con lecho de paja.
4. Mejorar el diseño de los cubículos para potenciar que las vacas los utilicen.
Adiestrar a las vacas para que utilicen los cubículos.

5. Limpiar los cubículos regularmente y mejorar la provisión de lecho para reducir la contaminación bacteriana del mismo. Limpiar la sociedad que queda entre grupos de vacas durante el ordeño.

5.2.7.7. Prueba de California Mastitis Test (CMT)

Farinango, (2015) indica que con la prueba de CMT sólo se estima el número de células somáticas, la leche de una vaca tiene menos de 100 000 células somáticas/ml de las cuales menos de 10% son polimorfonucleares, de 66-88% macrófagos, de 10-27% linfocitos y menos de 7% son células epiteliales, pero cuando se presenta la enfermedad los neutrófilos se incrementan exponencialmente dependiendo de grado de infección como mecanismo de defensa, se fundamentada en la capacidad que tiene el reactivo Lauril Sulfato de Sodio de formar el gel en presencia de ADN celular convirtiéndose en un recuento celular indirecto de células somáticas.

Conlago, (2013) indica que a mayor presencia de células somáticas se liberaran una mayor concentración de ADN, por tanto, mayor será la formación de la gelatina, traduciéndose en nuestra lectura e interpretación del resultado como el grado más elevado de inflamación, es decir permite determinar la respuesta inflamatoria en base a la viscosidad del gel que se forma al mezclar el reactivo con la misma cantidad de leche en una paleta con cuatro pozos independientes y siendo una técnica que permite evaluar cada cuarto independiente con una sensibilidad de 97% y una especificidad del 93%, sus ventajas principales son: es una técnica muy sensible, el material extraño no interfiere con la prueba (pelo u otro material), la prueba es simple y no requiere de equipo costoso, la paleta es fácil de limpiar después de cada uso, pueden presentarse falsos positivos en leche de animales con menos diez días de paridos o en vacas próximas a secarse.

5.2.7.8. Células somáticas

Olechnowicz & Jaśkowski, (2012), mencionan que las células somáticas son células corporales que están conformadas por leucocitos y células epiteliales, migran desde la sangre a los tejidos y conductos de la glándula mamaria, en respuesta defensiva contra una lesión inflamatoria generalmente de tipo infecciosos de la glándula mamaria y son un indicador directo de mastitis, se encuentran constituidos

en mayor proporción por neutrófilos (50-90%), macrófagos (10-35%), linfocitos (1-20%) y células epiteliales (0-2%).

5.3. Marco conceptual

Ruegg, (2017); Taponen et al., (2017), mencionan que la mastitis, que es la inflamación de la ubre y los pezones, existe en dos formas principales: mastitis clínica y subclínica. La mastitis clínica, que es menos prevalente, se caracteriza por signos sistémicos en la vaca y anomalías visibles en la ubre y la leche. Por el contrario, la mastitis subclínica es más común y resulta en una producción reducida de leche sin signos clínicos observables o anomalías en la ubre o la leche. Por esta razón, la mastitis subclínica es difícil de diagnosticar, persiste por más tiempo en el rebaño y se asocia con mayores pérdidas en comparación con la mastitis clínica.

Motaung et al., (2017) indican que se ha documentado una amplia gama de microbios como agentes causantes de mastitis a nivel mundial. Estos incluyen bacterias tanto contagiosas como ambientales, además de hongos, algas y virus, las bacterias son las principales causas de mastitis y se han informado más de 140 especies patógenas diferentes. Los estudios basados en evidencia han demostrado una variación significativa en la distribución de mastitis y patógenos que causan mastitis entre países, regiones y granjas. Estas variaciones están influenciadas por las prácticas de gestión agrícola y factores ambientales regionales.

Anteriormente, los estudios habían documentado los principales patógenos de la mastitis, como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y coliformes. Sin embargo, estudios actuales realizados por varios académicos han informado de un cambio de los agentes causantes de la mastitis de los patógenos principales a patógenos menores como el estafilococo coagulasa negativo y otros bacilos. Estos informes han demostrado que estos patógenos menores pueden estar desempeñando un papel importante en la patogénesis de la mastitis y varían de un rebaño a otro. Por lo tanto, esta transición justifica una revisión de las medidas tradicionales de control y prevención de la enfermedad (Piessens et al., 2011).

La pronta identificación y comprensión de la diversidad de patógenos asociados con la mastitis son esenciales para una prevención y control efectivos (Bi et al., 2016).

5.4. Terminología

Conlago, (2013) define los siguientes términos de la siguiente manera:

- **Antibiótico:** Se define como una sustancia química producida por un microorganismo capaz de inhibir el desarrollo de microorganismos ajenos.
- **Antibióticos bactericidas:** Ejercen una acción letal e irreversible sobre el microbio.
- **Antibióticos bacteriostáticos:** Inhiben el crecimiento, pero no matan al microorganismo, permitiendo que las propias defensas del huésped pueden eliminar a las bacterias.
- **Sensible:** Indica que la infección ocasionada por la cepa para la que se ha determinado la CMI o su correspondiente halo de inhibición puede tratarse de forma adecuada empleando las dosis habituales de antimicrobiano, en función del tipo de infección y de la especie considerada.
- **Intermedio:** Indica que el halo de inhibición traducido en valores de CMI se aproxima a las concentraciones de antimicrobiano alcanzables en sangre o tejidos y que puede esperarse eficacia clínica en aquellas localizaciones en las que se alcanzan altas concentraciones de antimicrobiano o cuando se emplean dosis más elevadas de lo habitual. El NCCLS también incluye en esta categoría aquellos casos de antimicrobianos con márgenes de toxicidad estrechos en los que pequeños errores técnicos podrían suponer cambios de interpretación en la categoría clínica.
- **Resistente:** Se refiere a aquellos microorganismos que no se inhiben por las concentraciones habitualmente alcanzadas en sangre/tejidos del correspondiente antimicrobiano, o a aquellos microorganismos en los que existen mecanismos de resistencias específicos para el agente estudiado en los que no ha habido una adecuada respuesta clínica cuando se ha usado como tratamiento el correspondiente antimicrobiano.
- **Halo de Inhibición:** Un método simple de resumirse es la zona alrededor de un disco de antibiótico en un antibiograma en el que no se produce crecimiento bacteriano en una placa de agar inoculada con el germen. Es una medida de la potencia del antibiótico frente al germen.

- **Resistencia natural:** Es un carácter constante de todas las cepas de una misma especie bacteriana. El conocimiento de las resistencias naturales permite prever la inactividad de la molécula frente a bacterias identificadas o sospechosas.
- **Resistencia adquirida:** Es una característica propia de ciertas cepas, dentro de una especie bacteriana naturalmente sensible, cuyo patrimonio genético ha sido modificado por mutación o adquisición de genes, son evolutivas, y su frecuencia depende a menudo de la utilización de los antibióticos.
- **Resistencia cruzada:** Es 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.
- **Resistencia asociada:** Es cuando afecta a varios antibióticos de familias diferentes. En general, se debe a la asociación de varios mecanismos de resistencia.

Procedimiento para la identificación de bacterias

Preparación de medios

Los medios de cultivo son fuentes nutritivas, naturales o sintéticas, que semejan el nicho ecológico de los microorganismos. Especies bacterianas diferentes, cultivadas en el mismo tipo de medio, pueden aparecer diferentes, de este modo el conocimiento de la apariencia o de las características culturales, de las especies bacterianas, es útil para el reconocimiento de cierto tipo de bacterias.

Fundamento

Cada individuo tiene propio ambiente y forma de vida, y para cultivar o hacer multiplicar a los microorganismos, se le somete a un ambiente parecido donde haya alimentos, temperatura, pH, presión atmosférica, y presión osmótica adecuados.

- **Agar sangre.** Un medio enriquecido que soporta el crecimiento de la mayoría de las bacterias patógenas y que se utiliza para su aislamiento primario. Permite el reconocimiento de la producción de hemolisina.

Suspender 40 g en 1 litro de agua destilada llevar a ebullición para que se disuelva por completo esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Para agar sangre, enfriar la base a 50°C y añadir un 7% de sangre. Mezclar con rotación suave y verter en placas de Petri.

- **Manitol salt agar.** Suspender 111,02 gramos en 1000 ml de agua destilada. Calentar hasta ebullición para disolver el medio por completo. Esterilizar en autoclave a 15 libras de presión (121°C) durante 15 minutos enfriar a 45-50°C. sí lo desea, agregue 5% v/v de emulsión de yema de huevo. Mezclar bien y verter en placas de Petri estériles.

Nota: Este producto contiene 7,5% de cloruro de sodio como uno de sus ingredientes. Por exposición repetida al aire y absorción. El cloruro de sodio tiene a formar grumos, por lo recomendamos encarecidamente su almacenamiento en recipientes bien cerrados. En un lugar seco y alejado de la luz brillante.

- **Agar MacConkey.** Un medio selectivo que contiene bilis lo que le hace especialmente útil para el aislamiento de enterobacterias y algunas otras bacterias Gram negativas. Permite la diferenciación de fermentadores de la lactosa y no fermentadores de la lactosa. Las colonias de los fermentadores de la lactosa y el medio que las rodea son rosas.

- **EMB (Eosin Methylene Blue Agar)**

Suspender 37.46 g del polvo en 1 litro de agua destilada. Reposar 5 minutos. Calentar con agitación frecuente y llevar a ebullición hasta su disolución total. Esterilizar en autoclave 121°C durante 15 minutos. Distribuir en placas de Petri estériles.

- **Agar Müller Hilton:** Suspender 38 gramos en 1000 mL de agua destilada. Calentar hasta ebullición para disolver el medio por completo. Esterilizar en autoclave a 15 libras de presión (121°C) durante 15 minutos. Enfriar a 45-50°C. mezclar bien y verter en placas de Petri esterilizadas.

NOTA: El rendimiento de este lote ha sido probado y estandarizado según el documento CLSI (anteriormente NCCLS) protocolos para la evaluación del agar Mueller Hinton deshidratado (CLSI-VET01S, 2024) .

A. **Métodos para la siembra y aislamiento de microorganismos.**

SIEMBRAS DIRECTAS:

Siembra por estría.

- Poseer la muestra, tomada ya sea con un hisopo o torunda, aguja hipodérmica o asa de kolle.
- La muestra tomada se toca la superficie del medio de cultivo depositado en la placa petri, colocándola en un extremo del medio.
- Con un asa de siembra estéril, se da inicio a la siembra, a partir de donde se depositó la muestra, produciendo líneas zigzagueantes.
- Concluida la siembra, cerrar la placa y dejarla sobre la mesa con la base hacia arriba.
- Etiquetar la placa, y dejarla en la estufa a 37°C por 24 a 48 horas
- Realizar este procedimiento con asepsia cerca del mechero bunsen.

Coloración GRAM

La observación de las bacterias fijadas sobre una lámina portaobjetos debe hacerse mediante el empleo de tinciones. El tamaño de la mayoría de las células bacterianas es tal que resultan difíciles de ver con el microscopio óptico. La principal dificultad es la falta de contraste entre la célula y el medio que la rodea. El modo más simple de aumentar el contraste es la utilización de colorantes, uno muy usado en microbiología es la tinción Gram.

Esta tinción fue desarrollada empíricamente por Christian Gram en 1884. A pesar del tiempo transcurrido, la tinción apenas se ha modificado y es uno de los primeros pasos que se realiza para cualquier identificación bacteriana. La técnica es capaz de diferenciar dos grandes grupos de eubacterias: Gram positivas (G+) y Gram negativas (G-).

Esta tinción tiene gran importancia en taxonomía bacteriana ya que indica diferencias fundamentales de la pared celular de las distintas bacterias. Mientras que las bacterias gram-negativas son constantes en su reacción, los microorganismos gram-positivos pueden presentar respuestas variables en ciertas condiciones (son gram-lábiles). Por ejemplo, los cultivos viejos de algunas bacterias gram-positivas pierden la propiedad de retener el cristal violeta, y en consecuencia, se tiñen por la safranina apareciendo como gram-negativas. Análogo efecto se

produce en ocasiones por cambio en el medio del organismo, o por ligeras modificaciones en la ejecución de la técnica.

Para explicar el mecanismo de la tinción de Gram se han propuesto varias hipótesis fundadas en la naturaleza química de las paredes celulares de los microorganismos. Diferencias estructurales y químicas de los dos tipos de pared bacteriana:

Técnicas de frotis y tinción Gram.

Para ello se debe limpiar un portaobjeto con alcohol se evapora este pasándolo rápidamente por el mechero, se deja enfriar y se marca con un lápiz la parte que vamos a tomar.

Preparación del frotis:

El frotis tiene como finalidad una delgada película del preparado para una adecuada tinción y observación microscópica. La preparación de un frotis se hace de la siguiente manera:

- **Extensión:**

Se coloca una gota de agua destilada en el centro del portaobjetos y enseguida se esteriliza un asa de argolla colocándola directamente en el mechero y se toma un poco del material biológico a examinar. Se emulsiona la pequeña cantidad de bacteria con la gota de agua del portaobjetos, luego, se incinera el asa en el mechero.

- **Secado:**

Pasar el portaobjetos por la parte más alta del mechero (flamear) hasta que la gota con bacterias quede seca (se hace sin que el portaobjetos se quemara ya que puede carbonizar las células), hasta que obtenemos una marca de una gota con material biológico en el portaobjetos.

Fundamento

Se usa primero el cristal violeta (violeta genciana) el que penetra la pared celular tanto de bacterias gram positivas como gram negativas. A continuación, se agrega el lugol (yodo + yoduro), que actúa como mordiente formando un complejo con el cristal violeta. Al decolorar con una mezcla de alcohol y acetona, la pared de

los gram positivos formada por una gruesa capa de peptidoglicano impide la salida del complejo cristal violeta-lugol, manteniéndose la coloración violeta. En los gram negativos por el contrario el complejo cristal violeta-lugol sale por los poros que ha generado el alcohol-acetona en la membrana externa de la pared celular. La bacteria por lo tanto se decolora y al agregar la safranina se tiñe de rojo.

Procedimiento de la tinción Gram

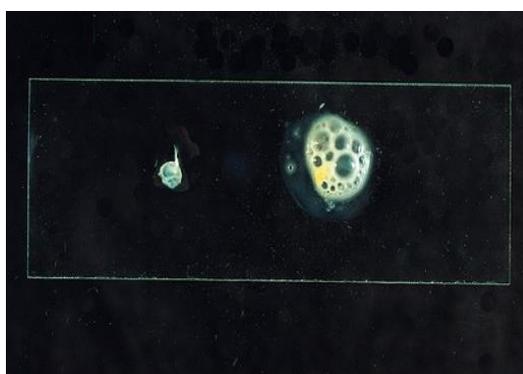
- Se desinfecta y rotula convenientemente cada uno de los portaobjetos.
- Se preparó extendidos de los microorganismos
- Tomar material de una colonia, con un asa esterilizada
- Suspender la muestra en una gota de agua destilada sobre el portaobjetos y extenderla en 1 cm²
- Dejar secar al aire y/o junto a la llama del mechero.
- Cubrir completamente el frotis con "cristal violeta", y se deja actuar 60 segundos
- Lavar con abundante agua destilada.
- Agregar "lugol" y se dejó actuar durante 60 segundos
- Lavar con abundante agua destilada.
- Decolorar el frotis con alcohol acetona dejando actuar por 60 segundos
- Lavar con abundante agua destilada.
- Cubrir el frotis con gotas de "safranina", dejándola actuar durante 30 segundos.
- Lavar con abundante agua destilada nuevamente.
- Observar al microscopio con el objetivo de 100X con aceite de inmersión

➤ **Prueba de la catalasa:**

Según (Czuprynski & Chengappa, 2022).

- **Método 1:** extraer un asa del crecimiento bacteriano de la parte superior de las colonias evitando el medio de agar sangre. Las células bacterianas se colocan en un portaobjetos de microscopio limpio y se agrega una gota de peróxido de hidrógeno al 3%, indica una reacción positiva como se muestra en la figura.

Figura 1. Prueba de catalasa en un portaobjetos: negativo (izquierda) y positivo (derecha).



5.4.4. Técnicas e instrumentos de recopilación de información

En una hoja individual registrar los resultados a la prueba de CMT, estado de pezón, presencia de lesiones en la ubre, sistema de crianza, higiene del lugar alojamiento, lugar de ordeño, higiene del lugar de ordeño, tipo de suelo y según un cuestionario (anexos) aplicado a los productores se recolectará la siguiente información: número de lactancia, producción diaria de leche, higiene de la mano, sellado de pezón, prácticas de amamantamiento de ternero, ordeño manual, modalidad de ordeño y conocimientos preventivos.

5.4.5. Técnicas para el procesamiento y análisis de la información

Fichas clínicas, Excel, SPSS v. 29

Pruebas de susceptibilidad

El aislamiento de un agente infeccioso a partir de un paciente no es con frecuencia suficiente para establecer la terapia adecuada. Muchas bacterias y algunos hongos presentan resistencia a los agentes antimicrobianos y algunos virus han desarrollado resistencia a los agentes antivirales más actuales. Los patrones de resistencia

cambian en forma constante y no importa lo rápidamente que se introduzcan los nuevos agentes terapéuticos porque los microbios parecen siempre dispuestos a superarlos.

Ya que no se puede predecir la susceptibilidad de las bacterias, hongos y virus a los agentes antimicrobianos, con frecuencia es necesario estudiar la sensibilidad individual de cada patógeno a estas drogas, pudiéndose elegir entonces el agente apropiado (el más activo contra el patógeno, el menos tóxico para el huésped, con las características farmacológicas apropiadas y el más económico), que proporciona mayores posibilidades de una evolución favorable.

Un concepto importante sobre el que es necesario insistir es que no se pueden realizar pruebas de sensibilidad in vitro con cultivos mixtos, sólo los cultivos puros proporcionarán resultados válidos sobre la eficacia de un antibiótico.

Procedimiento.

- El microorganismo a investigar inocular cepas recientemente incubadas y previamente diluidas en agua destilada en una o varias placas de agar.
- Sobre su superficie colocar los discos correspondientes de los antibióticos.
- Incubar las placas durante 16-24 horas a 35°C y al cabo de este tiempo observar el crecimiento en ellas.
- Medir el diámetro de la zona de inhibición que se forma alrededor de cada disco y se comparó con las referencias publicadas por el Comité Nacional de Estándares de Laboratorio. (NCCLS).
- Con esta referencia podemos informar si el microorganismo es Sensible, Intermedio o Resistente (S, I, R) a cada uno de los antibióticos ensayados en las placas.

La sensibilidad de los aislamientos se determina mediante el método de difusión en disco según lo descrito por Bauer y la interpretación realizar según la tabla de interpretación del tamaño de zona (CLSI-VET01S, 2024). Todas las bacterias aisladas analizar en los discos antimicrobianos diferentes (M/s Hi Media Laboratories Ltd., Mumbai, India), a saber: amoxiclav (30 mcg), amoxicilina+sulbactam (30/15 mcg), ampicilina+cloxacilina (10 mcg), ampicilina+sulbactam (10/10 mcg), cefotaxima+ácido clavulánico (30/10 mcg),

ciprofloxacina (5 mcg), cloranfenicol (30 mcg), colistina (10 mcg), enrofloxacina (10 mcg), gentamicina (10 mcg), oxitetraciclina (30 mcg) y estreptomicina (10 mcg).

Para aislar el tipo de microorganismo se asumió como mastitis subclínica los niveles de CMT desde una cruz (+), hasta tres cruces (+++).

Tabla 1 Diámetros de halos de inhibición según CLSI-VET01S, 2024

| Antibiótico | Especie Bacteriana | Sensible (S) mm | Intermedio (I) mm | Resistente (R) mm |
|-------------------------------|----------------------------|------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Penicilina | <i>Staphylococcus spp.</i> | ≥ 29 | 20-28 | ≤ 19 |
| Penicilina | <i>Streptococcus spp.</i> | ≥ 24 | 18-23 | ≤ 17 |
| Penicilina | <i>Escherichia coli</i> | No aplicable | No aplicable | No aplicable |
| Tetraciclina | <i>Staphylococcus spp.</i> | ≥ 19 | 15-18 | ≤ 14 |
| Tetraciclina | <i>Streptococcus spp.</i> | ≥ 23 | 19-22 | ≤ 18 |
| Tetraciclina | <i>Escherichia coli</i> | ≥ 15 | 12-14 | ≤ 11 |
| Enrofloxacina | <i>Staphylococcus spp.</i> | ≥ 23 | 20-22 | ≤ 19 |
| Enrofloxacina | <i>Streptococcus spp.</i> | ≥ 21 | 17-20 | ≤ 16 |
| Enrofloxacina | <i>Escherichia coli</i> | ≥ 20 | 16-19 | ≤ 15 |
| Amoxicilina | <i>Staphylococcus spp.</i> | ≥ 20 | 17-19 | ≤ 16 |
| Amoxicilina | <i>Streptococcus spp.</i> | ≥ 22 | 19-21 | ≤ 18 |
| Amoxicilina | <i>Escherichia coli</i> | ≥ 18 | 14-17 | ≤ 13 |
| Estreptomicina | <i>Staphylococcus spp.</i> | ≥ 15 | 12-14 | ≤ 11 |
| Estreptomicina | <i>Streptococcus spp.</i> | ≥ 15 | 12-14 | ≤ 11 |
| Estreptomicina | <i>Escherichia coli</i> | ≥ 15 | 12-14 | ≤ 11 |
| Gentamicina | <i>Staphylococcus spp.</i> | ≥ 15 | 13-14 | ≤ 12 |
| Gentamicina | <i>Streptococcus spp.</i> | ≥ 18 | 14-17 | ≤ 13 |
| Gentamicina | <i>Escherichia coli</i> | ≥ 15 | 13-14 | ≤ 12 |
| Amoxicilina-ácido clavulánico | <i>Staphylococcus spp.</i> | ≥ 20 | 17-19 | ≤ 16 |
| Amoxicilina-ácido clavulánico | <i>Streptococcus spp.</i> | ≥ 22 | 19-21 | ≤ 18 |
| Amoxicilina-ácido clavulánico | <i>Escherichia coli</i> | ≥ 18 | 14-17 | ≤ 13 |

| Antibiótico | Especie Bacteriana | Sensible (S) mm | Intermedio (I) mm | Resistente (R) mm |
|--------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Cefotaxima | <i>Staphylococcus spp.</i> | ≥ 26 | 23-25 | ≤ 22 |
| Cefotaxima | <i>Streptococcus spp.</i> | ≥ 24 | 21-23 | ≤ 20 |
| Cefotaxima | <i>Escherichia coli</i> | ≥ 26 | 23-25 | ≤ 22 |
| Bacitracina | <i>Staphylococcus spp.</i> | No aplicable | No aplicable | No aplicable |
| Bacitracina | <i>Streptococcus spp.</i> | No aplicable | No aplicable | No aplicable |
| Bacitracina | <i>Escherichia coli</i> | No aplicable | No aplicable | No aplicable |

(CLSI-VET01S, 2024)

VI. DISEÑO DE LA INVESTIGACION

6.1. Tipo de investigación:

Explicativo, no experimental

6.2. Ubicación espacial:

6.2.1. Ubicación política

| | |
|--------------------|-------------------------------------------|
| Región | : Cusco |
| Provincia | : Anta |
| Distrito | : Anta |
| Lugar | : Anta |
| Comunidades | : Compone, Pacca, Aparquilla y Inquilpata |

6.2.2. Ubicación geográfica

| | |
|-----------------------------|-------------|
| Altitud | : 3377 msnm |
| Coordenada Este (X) | : -13.471°, |
| Coordenada Norte (Y) | : -72.148°, |
| Zona | : 19 L Sur |

6.2.3. Ubicación hidrográfica

| | |
|---------------------|-------------------------|
| Cuenca | : Vilcanota |
| Sub-cuenca | : Huarcondo |
| Micro-cuenca | : Katañiray e Izcuchaca |

6.3. Método de la investigación

El estudio es de tipo observacional, transversal, prospectivo y analítico.

6.3.1. Población y muestra:

- a) **Población:** 120 vacas en producción, para el cálculo de la muestra se utilizó la fórmula descrita por, Thursfield, (2018).

$$n = \frac{Z^2 * p * q}{e^2 + (Z^2 * p * q)/N}$$

Donde:

N = Tamaño de la población total (en este caso, 120 vacas en producción).

p = Proporción poblacional esperada o prevalencia estimada (se usa 50% = 0.5 cuando no hay datos previos).

q = Complemento de la prevalencia, $q=1 - p = 0.5$

Z = Valor de la distribución normal estándar para un 95% de confianza, que equivale a 1.96

e = Margen de error permitido (5% = 0.05)

n = Número de animales que deben ser utilizados como muestra.

$$n = \frac{1.96^2 * 0.5 * 0.5}{(0.05)^2 + (1.96)^2 * (0.5) * (0.5)/120}$$

$$n = \frac{0.9604}{0.0105} = 91.46$$

$$n = 91.46 \cong 91$$

b) Muestra: 91 vacas en producción

c) Diseño estadístico: Al ser un estudio observacional descriptivo, se aplicó estadística descriptiva, como son la presentación de tablas y figuras.

6.4. Prueba de California Mastitis Test (CMT)

Para el diagnóstico de la mastitis subclínica se procedió de la forma siguiente:

- Lavado y desinfección de manos.
- Despunte (eliminación de los primeros chorros de leche).
- Desinfección de pezones con yodo (30 mL de yodo concentrado disuelto en un litro de agua).
- Secado de pezones.
- Se muestreó leche de cada cuarto mamario en la paleta de cuatro compartimientos y se inclinará para escurrir el exceso de leche, quedando sólo una muestra de aproximadamente 2 ml de leche.
- Se agregó también 2 mL del reactivo de CMT; su principio activo es detergente Alquilaryl Sulfonato de Sodio.
- Se giró la paleta con movimientos circulares hasta mezclar totalmente el contenido. Esta homogenización se realizará durante 10 a 20 segundos.
- Se procedió a realizar la lectura e interpretación de la leche sometida a la prueba CMT:

Negativo = La solución permanece líquida.

Positivo = La solución se torna viscosa o gelatinosa.

- De las vacas que dieron positivo al reactivo (CMT) se realizó la identificación de bacterias.

Tabla 01. Identificación macroscópica de las colonias

| Características | <i>Staphylococcus spp</i> | <i>Streptococcus sp</i> | <i>E. coli</i> |
|-----------------|---------------------------|-------------------------|----------------|
| Elevación | Plana | Plana | Plana |
| Color | Blanco | Blanco lechoso | Fucsia |
| Textura | Viscoso | Viscoso | Viscoso |
| Forma | Puntiforme | Circular | Irregular |
| Bordes | Redondo | Redondo | Rizado |
| Superficie | Lisa | Lisa | Lisa |

Tabla 02. Identificación macroscópica de las colonias de tinción gran

| Agente etiológico | Color | Forma | Tinción |
|---------------------------------------------|--------------|-----------------|---------|
| <i>Staphylococcus spp</i> catalasa positiva | Azul violeta | Racimos de uva | + |
| <i>Streptococcus sp.</i> Catalasa negativa | Azul violeta | Cocos en cadena | + |
| <i>Escherichia coli</i> | Rojo | Bacilos | - |

6.5. Materiales y equipos

Diagnóstico de CMT

Biológicos

- Leche muestreada.

Físicos

- Material de muestreo (frascos)
- Paleta de prueba para mastitis.
- Toallas individuales.
- Lapicero.
- Hojas de registro.
- Tablero.
- Cámara fotográfica
- Pulverizador.
- Algodón.
- Cooler

Químicos

- Reactivo California Mastitis Test (CMT).

Para identificación de bacterias

- Estufa de incubación.
- Matraz de Erlenmeyer.
- Mechero bunsen.
- Espátula de Drigalsky.
- Probeta graduada de 100 mL
- Medios de cultivo en placa petri
- Cultivo de bacterias de 24 horas de crecimiento.
- Agua destilada estéril.
- Placas de Petri.

Prueba de catalasa

- Alcohol 96%
- Agua destilada
- Agua oxigenada
- Algodón
- Laminas

Para el procedimiento de la tinción gram

- Pipetas graduadas.
- Cepas.
- Alcohol.
- Yodo.
- Cultivo de bacterias.
- Cristal violeta (1 g de cristal violeta en 100 cc de agua destilada).
- Lugol (1 g de yodo en 2 g. de yoduro potásico en 100 cc de agua destilada).
- Safranina (1 g de safranina en 100 cc de agua destilada).
- Aceite de inmersión.
- Microscopio binocular.
- Portaobjetos.

Prueba de sensibilidad

- Cepas.
- Tubos de ensayo.
- Asa de kolle, y espátula de drigalsky.
- Estufa eléctrica a 25°C.
- Placas petri con medio Mueller-Hinton.
- Medios de cultivo
- Discos de sensibilidad
- Tubo de ensayo.
- Asa de Kolle.
- Pipeta graduada de 5 - 10 mL
- Gradilla y canastillas.

Materiales de escritorio

- Hojas de registro.
- Lápiz.

Equipos

- Computadora
- Memoria USB.
- Impresora.

Técnicas e instrumentos de recopilación de información

En una hoja individual se registró los resultados a la prueba de CMT, estado de pezón, presencia de lesiones en la ubre, sistema de crianza, higiene del lugar alojamiento, lugar de ordeño, higiene del lugar de ordeño, tipo de suelo y según un cuestionario aplicado a los productores se recolectó la siguiente información: número de lactancia, producción diaria de leche, higiene de la mano, sellado de pezón, prácticas de amamantamiento de ternero, ordeño manual, modalidad de ordeño y conocimientos preventivos.

Procedimiento:

Obtención de muestras en el campo

A. Preparación

- Limpieza: se lavó bien las manos con agua y jabón antes de comenzar
- Antisepsia: se realizó la limpieza la ubre y el pezón de la vaca con una solución de alcohol adecuada y secarlos con una toalla limpia desechable

B. Recolección de la muestra:

- Primeras gotas: desecha los primeros chorros de leche, ya que pueden contener contaminantes externos
- Muestras individuales: se toma una pequeña cantidad de leche (de 2ml) de cada cuarto de la ubre en una paleta de CMT, que tiene cuatro compartimientos
- Adición del reactivo: se agregó una cantidad igual de solución CMT a cada compartimiento
- Mezcla: se rota la paleta con movimientos circulares durante unos 10 segundos para mezclar el contenido
- Lectura de resultados: la reacción debe leerse rápidamente, ya que desaparece en unos 20 segundos. La formación de gel indica la presencia de mastitis subclínica

- Se recolecto la leche que salieron positivos al CMT, en un recipiente estéril con boca ancha
- Se etiqueto el recipiente con la información necesaria: número de cuartos, fecha y hora
- Transporta la muestra al laboratorio lo antes posible en un cooler 4°C (hielo biológico) al Laboratorio de Microbiología de la escuela profesional de Medicina Veterinaria filial Sicuani—UNSAAC para su procesamiento.

C. Preparación de medios de cultivo

Medición y mezcla: se pesó la cantidad necesaria de agar – agar y otros nutrientes según las especificaciones del medio que estás trabajando así

La preparación de los medios de cultivo Agar Sangre, Agar McConkey se realizará según la indicación que sugiera el fabricante de cada una.

Pasos que se realizó para la preparación de agar sangre

- Se suspendió 40 gramos de agar base en un litro de agua destilada
- Calentar y girando en el matraz hasta que se disuelva
- Esterilizó la mezcla en una autoclave 121°C durante 15 minutos
- Se realizo el enfriamiento a una temperatura 45°C para evitar la coagulación y se añadió sangre de vacuno 5%
- Se mezclo suavemente para evitar burbujas
- Se realizo el plaqueo en placas Petri estériles y se dejó solidificar a la temperatura ambiental
- Sembró con un hisopo estéril las muestras de leche en cada placa previa identificación
- Se encubo las placas a 37°C por 24 horas y se colocó agua en la incubadora para mantener la humedad

Pasos que se realizó para la preparación de agar McConkey

- Se pesó en una balanza de precisión 47.53 gramos de agar McConkey deshidratado en 1000 ml de agua destilada
- Se calentó la mezcla en un matraz girando sobre el mechero hasta disolver
- Esterilizo la solución en una autoclave 121° C por 15 minutos
- Enfrió la solución a una temperatura 45°C
- Se plaqueo en placas de Petri previo identificación en placas Petri estériles hasta solidificarse
- Sembró con un hisopo estéril las muestras de leche en cada placa
- Se encubo las placas a 37°C por 24 horas y se colocó agua en un recipiente en la incubadora para mantener la humedad

Identificación macroscópica

- Una vez que se obtengan las colonias en las placas de agar sangre y agar McConkey, se determinara las características macroscópicas como el tamaño, forma, bordes, elevación, textura, hemolisis y color de las colonias bacterianas presentes.

Se realizo las técnicas de frotis y tinción Gram.

- Se coloca una gota de agua destilada en el centro del portaobjetos y enseguida se esteriliza un asa de argolla colocándola directamente en el mechero y se toma un poco del material biológico a examinar. Se emulsiona la pequeña cantidad de bacteria con la gota de agua del portaobjetos, luego, se incinera el asa en el mechero.
- Pasamos el portaobjetos por la parte más alta del mechero (flamear) hasta que la gota con bacterias quede seca (se hace sin que el portaobjetos se quemé ya que puede carbonizar las células), hasta que obtenemos una marca de una gota con material biológico en el portaobjetos.

Procedimiento de la tinción Gram

- Se desinfectó y rotuló convenientemente cada uno de los portaobjetos.
- Se preparó extendidos de los microorganismos

- Se tomó material de una colonia, con un asa esterilizada
- Se suspendió la muestra en una gota de agua destilada sobre el portaobjetos y extenderla en 1 cm²
- Se dejó secar al aire y/o junto a la llama del mechero.
- Se cubrió completamente el frotis con "cristal violeta", y se deja actuar 60 segundos
- Se lavó con abundante agua destilada.
- Se agregó "lugol" y se dejó actuar durante 60 segundos
- Se lavó con abundante agua destilada.
- Se decoloró el frotis con alcohol acetona dejando actuar por 60 segundos
- Se lavó con abundante agua destilada.
- Se cubrió el frotis con gotas de "safranina", dejándola actuar durante 30 segundos.
- Se lavó con abundante agua destilada nuevamente.
- Se observó al microscopio con el objetivo de 100X con aceite de inmersión

Identificación microscópica

- Se determinarán características de la forma individual (cocos, bacilos) y de la forma agrupada (cadena, racimos) de las bacterias que estén presentes, mediante la técnica de coloración o tinción Gram

Prueba de la catalasa

- Se realiza esta prueba se colocará una gota de peróxido de hidrogeno encima de un portaobjeto y luego se agregará la muestra bacteriana y como resultados se dará la presencia de efervescencia. la presencia de burbujas de aire indica la presencia de una bacteria aerobia y por lo tanto resulta ser catalasa positiva, caso contrario (no formación de burbujas) resulta ser una bacteria catalasa negativa.

Aislamiento de microorganismos

- Agar EMB (eosina azul de metilo = selectivo para grma negativos) es un medio selectivo que se utilizó y diferenciar utilizando para el aislamiento de bacilos gran negativos.

- Se diferenciaron las bacterias que fermentan lactosa o sacarosa producen un precipitado ácido que reacciona con el colorante en caso de nuestra colonia se pudo ver un color brillo metálico verde
- Para la preparación del agar se consideró la sugerencia del fabricante, y luego se procedió a realizar la siembra de la muestra estría por agotamiento llevando posteriormente a la estufa a incubar en aerobiosis, a 33-37 °C durante 18-24 horas.
- Manitol salt agar Suspende 111,02 gramos en 1000 ml de agua destilada
- Se calentó hasta ebullición para disolver el medio por completo.
- Se esterilizó en autoclave a 15 libras de presión (121°C) durante 15 minutos
- Se dejó enfriar la mezcla a una temperatura de 45-50°C
- Se realizó el plaqueo en placas estéril
- Se dejó que el agar se solidifique y se almacena las placas en una nevera hasta su uso
- Luego se procedió a realizar la siembra de la muestra estría por agotamiento llevando posteriormente a la estufa a incubar en aerobiosis, a 33-37 °C durante 18-24 horas (colonias amarillas indica la fermentación del manitol típicamente por *staphylococcus aureus*).

Prueba de sensibilidad

- Ya identificado el agente se realizó la prueba de sensibilidad, así como se menciona a continuación.
- Se preparó agar 30 gr de agar Muller Hinton deshidratado en 1 litro de agua destilada
- Se calentó la mezcla mientras se agita en el matraz hasta su disolución
- Se esterilizó la mezcla en la autoclave a 121°C durante 15 minutos
- Se realizó el plaqueo en sus respectivas placas estériles
- El microorganismo a investigar se inoculó cepas recientemente incubadas y previamente diluidas en agua destilada en una o varias placas de agar.

- Sobre su superficie se dispuso de los discos correspondientes a varios antibióticos.
- Se incubaron las placas durante 16-24 horas a 35°C y al cabo de este tiempo se estudió el crecimiento en ellas.
- Se valoró el diámetro de la zona de inhibición que se forma alrededor de cada disco y se comparó con las referencias publicadas por el (CLSI-VET01S, 2024).
- Con esta referencia se identificó si el microorganismo es Sensible, Intermedio o Resistente (S, I, R) a cada uno de los antibióticos ensayados en las placas.

Técnicas para el procesamiento y análisis de la información

Fichas clínicas, Excel, SPSS v. 29

6.6. Variables/categorías

Variable dependiente: Sensibilidad antimicrobiana

Variables independientes: Patógeno mastitígeno

Tabla 03. Operacionalización de las variables

| DEFINICIÓN | DIMENSIÓN | INDICADORES | TECNICA |
|------------------------------------------------------|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| | CATEGORÍA | | |
| VARIABLE DEPENDIENTE: Sensibilidad antimicrobiana | ANTIBIOGRAMA | Formación o no de halos Antimicrobianos | Antibiograma |
| VARIABLES INDEPENDIENTES: Agente etiológico | Ag. Causales Contagiosos | <i>Streptococcus spp, Staphylococcus spp,</i> | Cultivos bacteriológicos |
| | Ag. Causales Ambientales | <i>Escherichia coli, Enterobacter spp, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella spp, Serratia spp, Citrobacter freundii.</i> | |
| | Ag. Causal latrogénico: | Mohos o levaduras de los géneros: <i>Candida, Cryptococcus y Trichosporum</i> | |

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Análisis, interpretación y discusión de resultados

Resultado 1: Sobre la identificación de los principales agentes etiológicos que causan la mastitis subclínica en vacas lecheras del distrito de Anta, región de Cusco.

En la tabla 4 y en la figura 1 se observa que *Staphylococcus spp.* es el agente predominante, representando el 62% de los casos, seguido por *E. coli* con un 24%, y *Streptococcus sp.* con un 14%. Estos datos sugieren que *Staphylococcus spp.* es el agente más comúnmente asociado con la mastitis subclínica en la población estudiada, proporcionando información valiosa para el objetivo de identificar los principales agentes etiológicos de la enfermedad en esta región específica.

Esta heterogeneidad en los patógenos coincide con estudios previos como el dado por (Cervantes et al., 2017) en el que se obtuvo que el 100 % de vacas padecían mastitis y como agentes causantes al *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* y *Staphylococcus aureus* y Gram negativos (G-), *E. coli*, *Klebsiella*, *Pseudomona*, *Candida albicans* y *Proteus mirabilis*, estos resultados verifican que los agentes causantes son similares cuando se trata de la mastitis subclínica en vacas. La heterogeneidad en los patógenos identificados en este estudio y su coincidencia con estudios previos subraya la importancia de estos agentes en la etiología de la mastitis subclínica en vacas lecheras. Estos agentes y la presencia de *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus sp.* y *Escherichia coli* como principales agentes etiológicos de la mastitis subclínica en vacas lecheras puede ser atribuida a su ubicuidad en el medio ambiente, contaminación durante el ordeño, factores de manejo deficientes, resistencia a los antimicrobianos y factores de virulencia que les permiten causar infecciones persistentes en la glándula mamaria (Bedolla-Cedeño & León, 2008).

La consistencia en los resultados entre este estudio y la literatura existente proporciona una sólida base para la comprensión de la epidemiología de la mastitis subclínica en la región estudiada. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la prevalencia de agentes etiológicos puede variar según factores como la ubicación

geográfica, las prácticas de manejo del ganado y la temporada, por lo que es fundamental continuar monitoreando y evaluando la situación local para implementar medidas efectivas de control y prevención (Ruegg, 2017; Taponen et al., 2017).

El trabajo de (Zeryehun & Abera, 2017a), tuvo por resultados que la mayor proporción de bovinos presentó mastitis subclínica, algo que recalcar de este estudio es que en la etapa de lactancia temprana fue donde se halló con más frecuencia y estos resultados sufrieron variaciones al aplicar técnicas de higiene por lo que las tasas de prevalencia se vieron afectas significativas y donde no usaron técnicas de higiene la prevalencia era casi total con respecto al bovino de mastitis subclínica.

Otro del resultado es el de (Hoque et al., 2018) en el que se halló que de 175 vacas seleccionados al azar se detectó mastitis en 50 vacas mediante el CMT de las cuales se recolectaron 200 muestras, de donde se determinó la prevalencia de mastitis en rebaños, vacas y cuartos con un porcentaje alto y que de ellos la prevalencia general de mastitis a causa del agente etiológico *Staphylococcus aureus* fue también elevado, lo que indica que este agente en particular se asocia con la raza, partos, rendimiento de la leche y principalmente con la mastitis clínica, esto resultados resaltan la preocupación de las industrias lácteas debido a que los agentes se vuelven resistentes poco a poco a los antimicrobianos. Ambas conclusiones destacan la presencia de estos patógenos como causantes de mastitis bovina. Este paralelismo fortalece la validez de los resultados locales y sugiere la universalidad de ciertos agentes patógenos.

Los hallazgos en el trabajo (Gitau et al., 2014b) refuerzan nuestros resultados debido a que durante la primera y segunda visitas mostraron que la prevalencia de mastitis clínica era baja, las vacas fueron CMT positivas en al menos cuarto y el resto de ellas fueron positivas para el cultivo, respectivamente. *Staphylococcus aureus* se aisló de las muestras durante la primera y segunda visita, respectivamente.

Otro de los antecedentes que apoyan a nuestros hallazgos es el de (Persson et al., 2011) en el que los aislamientos más comunes de 590 diagnósticos bacteriológicos fueron *Staphylococcus (S) aureus* (19%) y estafilococos coagulasa negativos (SNC; 16%) seguidos de *Streptococcus (Str) dysgalactiae* (9%), *Str. uberis* (8%), *Escherichia (E.) coli* (2,9%) y *Streptococcus spp.* (1.9%). En términos

generales el *Staphylococcus aureus* y el SCN fueron los patógenos aislados con mayor frecuencia y la resistencia a los antimicrobianos fue rara.

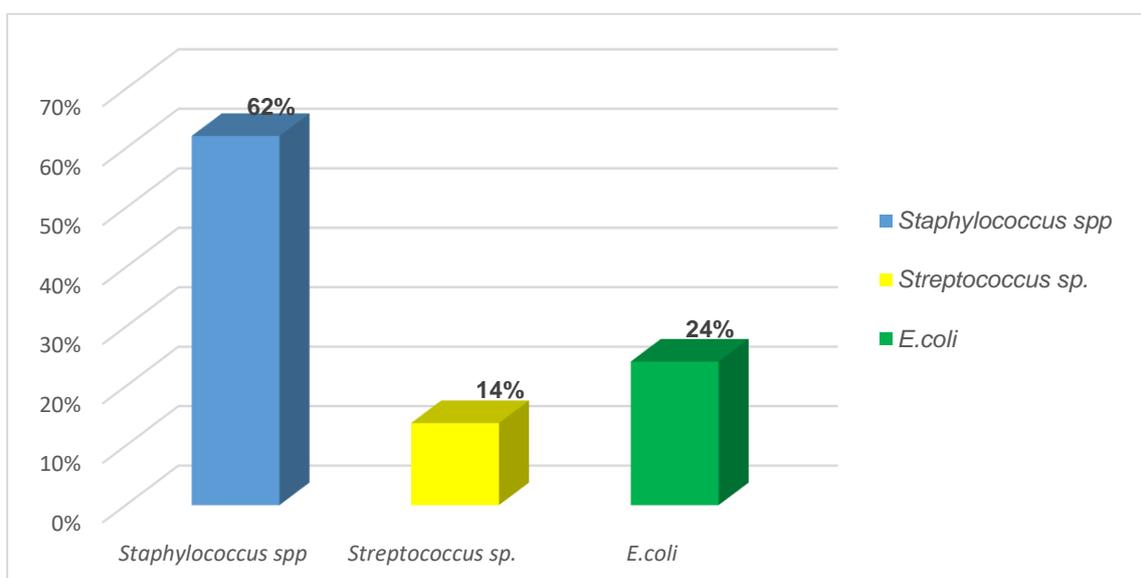
En relación a nuestros resultados, dónde se encontró que *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus sp.* *E.coli*, se encuentran con mayor frecuencia, esto puede deberse a la ubicuidad y colonización, ya que son microorganismos comunes presentes en el medio ambiente, lo que aumenta la probabilidad de que entren en contacto con la glándula mamaria durante el proceso de ordeño; contaminación durante el ordeño: estos microorganismos pueden contaminar los pezones de las vacas debido a una higiene inadecuada durante el proceso de ordeño (Arbab et al., 2021).

Por ejemplo, *Staphylococcus spp.* y *Streptococcus sp.* pueden residir en la piel de las ubres y transmitirse al ambiente durante el ordeño (Woudstra et al., 2023), mientras que *Escherichia coli* puede contaminar la leche a través de materia fecal presente en el entorno (Desmarchelier & Fegan, 2011); factores de manejo: prácticas de manejo deficientes, como la falta de limpieza adecuada de las instalaciones y equipo de ordeño, así como condiciones ambientales desfavorables, pueden favorecer la proliferación y transmisión de estos microorganismos entre el ganado y resistencia a los antimicrobianos: Estos patógenos pueden desarrollar resistencia a los antibióticos comúnmente utilizados en el tratamiento de la mastitis, lo que puede dificultar su erradicación una vez que se establece la infección; también pueden influir factores de virulencia: *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus sp.* y *Escherichia coli* poseen diferentes factores de virulencia que les permiten adherirse a las células epiteliales de la glándula mamaria, evadir el sistema inmunológico del hospedador y causar inflamación en la ubre, lo que contribuye a su capacidad de causar mastitis subclínica (Persson et al., 2011).

Tabla 04. Principales agentes etiológicos causantes de la mastitis subclínica en vacas en vacas en producción de la provincia de Anta

| Agente etiológico | Frecuencia | % |
|---------------------------|------------|------|
| <i>Staphylococcus spp</i> | 18 | 62% |
| <i>Streptococcus sp.</i> | 4 | 14% |
| <i>E.coli</i> | 7 | 24% |
| Total | 29 | 100% |

Gráfico 1. Principales agentes etiológicos causantes de la mastitis subclínica en vacas en vacas en producción de la provincia de Anta.



Resultado 2: sobre la determinación de la sensibilidad antimicrobiana de los principales agentes etiológicos causantes de la mastitis subclínica en vacas lecheras del distrito de Anta, región de Cusco.

La Tabla 5 presenta los resultados del diámetro del halo de inhibición para diferentes antimicrobianos evaluados contra el agente etiológico *Staphylococcus spp.*, vinculado a casos de mastitis subclínica en vacas lecheras del distrito de Anta, región de Cusco. La prueba con ERR5_Enrofloxacina (5 ug) mostró un máximo de 28 mm, un mínimo de 19 mm, con un potencial de 11 mm. Del mismo modo, la evaluación con S10_Estreptomicina (300 ug) reveló un rango de 10 mm (máximo 18 mm, mínimo 8 mm). Los resultados de otras pruebas, como CN10_Gentamicina (10 ug), TE30_tetraciclina (30 ug), AML30_Amoxicilina (30 ug),

AUG30_Amoxicilina_Acido_Clavulanico (20/10 ug), P10_Penicilina (10 ug), CTX30_Cefotaxine (30 ug), E15_Eritromicina (15 ug) y BA10_bacitracina (15 ug), se presentan detalladamente, proporcionando información clave para identificar patrones de sensibilidad antimicrobiana en *Staphylococcus spp.* Estos datos son cruciales para alcanzar el objetivo general de la investigación, que es identificar los agentes etiológicos de la mastitis subclínica y su sensibilidad a antimicrobianos en vacas lecheras de la región de Cusco.

Tabla 05. Diámetro del halo de para el agente etiológico *Staphylococcus spp*

| | | Diámetro del halo | | | | |
|---------------------------|-------------------------------------|---------------------|-------------|-------------|------------|----------------|
| | Antimicrobiano | Contenido del disco | Máximo (mm) | Mínimo (mm) | Rango (mm) | Potencial (mm) |
| <i>Staphylococcus spp</i> | ERR5_Enrofloxacina | 5 ug | 28 | 19 | 9 | 11 |
| | S10_Estreptomicina | 300 ug | 18 | 8 | 10 | 10 |
| | CN10_Gentamicina | 10ug | 20 | 10 | 10 | 10 |
| | TE30_tetraciclina | 30 ug | 28 | 10 | 18 | 6 |
| | AML30_Amoxicilina | 30 ug | 30 | 20 | 10 | 10 |
| | AUG30_Amoxicilina_Acido_Clavulanico | 20/10 ug | 33 | 19 | 14 | 7 |
| | P10_Penicilina | 10 ug | 30 | 19 | 11 | 9 |
| | CTX30_Cefotaxine | 30 ug | 30 | 18 | 12 | 8 |
| | E15_Eritromicina | 15 ug | 29 | 8 | 21 | 5 |
| | BA180_bacitracina | 15 ug | 23 | 10 | 13 | 8 |

La Tabla 6 presenta los resultados del diámetro del halo de inhibición para distintos antimicrobianos evaluados contra el agente etiológico *Streptococcus sp.* en casos de mastitis subclínica en vacas lecheras del distrito de Anta, región de Cusco. Al emplear ERR5_Enrofloxacina (5 ug), se observó un máximo de 30.0 mm, un mínimo de 27.0 mm, Asimismo, la prueba con S10_Estreptomicina (10 ug) indicó un rango de 5.0 mm (máximo 14.0 mm, mínimo 9.0 mm, potencial 20 mm). Detalles similares se presentan para CN10_Gentamicina (10 ug), TE30_tetraciclina (30 ug), AML30_Amoxicilina (30 ug), AUG30_Amoxicilina_Acido_Clavulanico (30 ug),

P10_Penicilina (10 ug), CTX30_Cefotaxine (30 ug), E15_Eritromicina (15 ug) y BA10_bacitracina (15 ug).

Tabla 06. Diámetro del halo de inhibición para el agente etiológico *Streptococcus sp.*

| A.E. | Antimicrobiano | Contenido del disco | Máximo (mm) | Mínimo (mm) | Rango (mm) | Potencial (mm) |
|--------------------------|--------------------|---------------------|-------------|-------------|------------|----------------|
| <i>Streptococcus sp.</i> | ERR5_Enrofloxacina | 5 ug | 30.0 | 27.0 | 3.0 | 33 |
| | S10_Estreptomicina | 10 ug | 14.0 | 9.0 | 5.0 | 20 |
| | CN10_Gentamicina | 10ug | 20.0 | 15.0 | 5.0 | 20 |
| | TE30_tetraciclina | 30 ug | 20.0 | 15.0 | 5.0 | 20 |
| | AML30_Amoxicilina | 30 ug | 20.0 | 15.0 | 5.0 | 20 |
| | AUG30_Amoxicilina | 30 ug | 20.0 | 15.0 | 5.0 | 20 |
| | _Acido_Clavulanico | 30 ug | 20.0 | 15.0 | 5.0 | 20 |
| | P10_Penicilina | 10 ug | 20.0 | 15.0 | 55.0 | 20 |
| | CTX30_Cefotaxine | 30 ug | 20.0 | 15.0 | 5.0 | 20 |
| | E15_Eritromicina | 15 ug | 20.0 | 15.0 | 5.0 | 20 |
| | BA10_bacitracina | 15 ug | 20.0 | 15.0 | 5.0 | 20 |

La Tabla 7 proporciona los resultados de la sensibilidad antimicrobiana de *E. coli*, causante de mastitis subclínica en vacas lecheras del distrito de Anta, región de Cusco. El antimicrobiano FFC30_florfenicol (30 ug) un máximo de 27.0 mm, un mínimo de 18.0 mm. Para SXT25_trimetropim_sulfamethoxazole (1,25/23,75 ug), el rango fue un máximo de 27.0 mm, 20.0 mm y un mínimo de 14.0 mm. La Eritromicina (15 ug) no presentó halo de inhibición. Para TE30_tetraciclina (30 ug), se observó un máximo de 26.0 mm, un mínimo de 19.0 mm. CN10_Gentamicina (10 ug) mostró un máximo de 23.0 mm, un mínimo de 15.0 mm. Otros antimicrobianos evaluados fueron S10_Streptomicina (10 ug), ENR5_Enrofloxacina (5 ug), MTZ5_Metronidazol (30 ug) y AML30_Amoxicilina (30 ug).

Tabla 07. Diámetro del halo de inhibición para el Agente etiológico *E.coli*

| | Antimicrobiano | Contenido del disco | Máximo (mm) | Mínimo (mm) | Rango (mm) | Potencial (mm) |
|---------------|-------------------------------------|---------------------|-------------|-------------|------------|----------------|
| <i>E.coli</i> | FFC30_florfenicol | 30 ug | 27.0 | 18.0 | 9.0 | 11.0 |
| | SXT25_trimetropim_ Sulfamethoxazole | 1,25/23,75 ug | 27.0 | 20.0 | 7.0 | 14.0 |
| | E15_Eritromicina | 15 ug | Sin halo | Sin halo | Sin halo | Sin halo |
| | TE30_tetraciclina | 30 ug | 26.0 | 19.0 | 7.0 | 14.0 |
| | CN10_Gentamicina | 10 ug | 23.0 | 15.0 | 8.0 | 13.0 |
| | S10_Streptomicina | 10 ug | 20.0 | 10.0 | 10.0 | 10.0 |
| | ENR5_Enrofloxacina | 5 ug | 30.0 | 20.0 | 10.0 | 10.0 |
| | MTZ5_Metronidazol | 30 ug | Sin halo | Sin halo | Sin halo | Sin halo |
| | AML30_Amoxicilina | 30 ug | 24.0 | 8.0 | 16.0 | 6.0 |

La Tabla 08 proporciona información sobre la sensibilidad y resistencia de *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus sp.* y *Escherichia coli* frente a distintos antimicrobianos, lo que permite evaluar patrones de resistencia bacteriana y su impacto en el tratamiento de mastitis subclínica en vacas lecheras. *Staphylococcus spp.* (G⁺) frente a enrofloxacina: Muestra una distribución equitativa, con un 50% de resistencia y 50% de sensibilidad, lo que indica la presencia de cepas con distintos grados de susceptibilidad; gentamicina y tetraciclina: Presentan patrones mixtos, con una proporción de 28% resistente, 39% sensible y 33% intermedio en el caso de la gentamicina, y 22% resistente, 61% sensible y 17% intermedio para la tetraciclina; amoxicilina: Mayoritariamente presenta sensibilidad intermedia (83%), lo que indica que podría ser efectiva en algunos casos, pero con eficacia variable; en cuanto a la eritromicina y bacitracina: Predomina la sensibilidad intermedia, con 61% y 72%, respectivamente, lo que sugiere que su efectividad puede depender de la concentración administrada. *Staphylococcus spp.* muestra una resistencia parcial a varios antibióticos y una alta proporción de cepas con sensibilidad intermedia, lo que sugiere la necesidad de pruebas de susceptibilidad antes de elegir el tratamiento.

Streptococcus sp. (G⁺), frente a enrofloxacina, amoxicilina + ácido clavulánico, penicilina y cefotaxima: Se observa sensibilidad completa, lo que indica que estos

antibióticos son efectivos contra este patógeno; tetraciclina: presenta una eficacia equitativa entre resistencia (50%) y sensibilidad (50%), lo que sugiere una eficacia limitada; eritromicina y bacitracina: Mayoritariamente presentan sensibilidad intermedia, con 75% y 50%, respectivamente. *Streptococcus sp.* sigue siendo sensible a varios antibióticos clave, lo que facilita su tratamiento. Sin embargo, la resistencia parcial a tetraciclina y la sensibilidad intermedia a eritromicina y bacitracina deben considerarse en la selección del tratamiento.

Escherichia coli (G⁻), frente a enrofloxacina: Presenta 86% de resistencia y solo 14% de sensibilidad, lo que indica una baja efectividad de este antibiótico; gentamicina, tetraciclina y amoxicilina: Se observa una alta proporción de resistencia en amoxicilina (57%), pero una mejor respuesta a tetraciclina y gentamicina, que muestran mayor sensibilidad; el florfenicol y metronidazol: presenta resistencia total, lo que descarta su uso como opciones terapéuticas; frente a trimetoprim-sulfametoxazol: Presenta una sensibilidad completa, lo que lo convierte en una opción efectiva. *E. coli* muestra un alto grado de resistencia a enrofloxacina, florfenicol y metronidazol, limitando las opciones de tratamiento. Sin embargo, la sensibilidad a trimetoprim-sulfametoxazol sugiere que este antibiótico podría ser una alternativa eficaz.

Estos resultados son similares con los estudios realizado por Petrovski, Nyman, Gronlund, (2015), donde encontraron una susceptibilidad antimicrobiana de tres patógenos de mastitis comunes (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* y *Str. Dysgalactiae*) aislados de muestras de leche de Nueva Zelanda y EE. UU. En los todos los aislamientos fueron susceptibles a la combinación de amoxicilina y ácido clavulánico; la resistencia de la lincomicina fue la más frecuente en todas las especies, se identificaron aislamientos no susceptibles para las 3 penicilinas (Amoxicilina, ampicilina y penicilina) la resistencia a la eritromicina y a la tetraciclina se vio diferenciada para las *str. uberis* y *str. disgalactia*. La mayoría de los aislamientos probados fueron susceptibles a la mayoría de los antimicrobianos comúnmente utilizados para el tratamiento de la mastitis bovina, con la excepción de las lincosamidas.

Otro de los trabajos que son similares a nuestros hallazgos es el de (McDougall et al., 2014), en el que la distribución de CIM varió entre las especies bacterianas para cada antimicrobiano probado, de los aislamientos de *Staphylococcus aureus* fueron resistentes a penicilina, ampicilina y

trimetoprim/sulfametoxazol, respectivamente. Para *S. dysgalactiae* y *S. uberis* aislados fueron resistentes a trimetoprim/sulfametoxazol, respectivamente y un aislado de *S. uberis* fue resistente a la penicilina. La distribución de CIM para *S. aureus* para penicilina, amoxicilina / ácido clavulánico, cloxacilina y ampicilina fue menor en los casos clínicos que en los subclínicos, y la de amoxicilina / ácido clavulánico y oxitetraciclina en aislamientos de laboratorios veterinarios fue menor con respecto a estudios anteriores. La resistencia a la penicilina se encontró cuarto en los aislamientos de *S. aureus*, pero prácticamente en ningún aislante de *Streptococcus*; por lo tanto, la identificación microbiana y las pruebas de sensibilidad serían beneficiosas al evaluar las opciones de tratamiento.

Con respecto a la sensibilidad antimicrobiana de los principales agentes etiológicos causantes de la mastitis subclínica en vacas lecheras del distrito de Anta, región de Cusco.

Tabla 08. Resumen de la sensibilidad de los agentes patógenos

| Antimicrobiano | GRAM POSITIVO | | GRAM NEGATIVO |
|---------------------------------------------|-------------------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------------------------|
| | <i>Staphylococcus spp</i> | <i>Streptococcus sp.</i> | <i>E. coli</i> |
| | Patrones de estándares | Patrones de estándares | Patrones de estándares |
| ERR5_Enrofloxacin | Resistente 50% y 50% Sensibles | Sensible | Resistente 86% y 14% sensible |
| S10_Estreptomycin | Sensible 83%, Intermedio 17% | Sensible 75%; intermedio 25% | Sensible |
| CN10_Gentamicin | Resistente 28%; sensible 39%; Intermedio 33% | Sensible 75%; Intermedio 25% | Sensible |
| TE30_tetracycline | Resistente 22%; sensible 61%; Intermedio 17% | Resistente 50%; sensible 50% | Sensible |
| AML30_Amoxicilina | Sensible 17%; Intermedio 83% | Sensible 25%; Intermedio 75% | Resistente 57%; Sensible 29%; Intermedio 14% |
| AUG30_Amoxicilina_Ac ido_ Clavulanico | Sensible | Sensible | |
| P10_Penicilina | Sensible | Sensible | |

| CTX30_Cefotaxine | Sensible | Sensible | |
|------------------------------------|----------------------------------------------|--------------------------------|------------|
| E15_Eritromicina | Resistente 6%; sensible 33%; Intermedio 61% | Sensible 25%; Intermedio 75% | Resistente |
| BA10_bacitracina | Resistente 17%; sensible 11%; Intermedio 72% | Resistente 50%; Intermedio 50% | |
| FFC30_florfenicol | | | Resistente |
| SXT25_trimetropim_Sulfamethoxazole | | | Sensible |
| MTZ5_Metronidazol | | | Resistente |

La Tabla 9 presenta un análisis detallado de la sensibilidad antimicrobiana de los agentes etiológicos gran positivos. Se utilizaron diferentes antimicrobianos, y los resultados se interpretaron en función de los puntos de interrupción del diámetro de la zona estipulados por el (CLSI-VET01S, 2024). Para ERR5_enrofloxacin, se observa que el 50% de las cepas de *Staphylococcus spp.* son sensibles, así como también el 50% de las cepas son resistentes a dicho fármaco, mientras que *Streptococcus sp.* muestra sensibilidad en el 100% de los casos. En el caso de S10_Estreptomina, se destaca la alta sensibilidad de *Staphylococcus spp.* (83%) y *Streptococcus sp.* (17%); este antimicrobiano parece ser una opción viable contra estas cepas. CN10_Gentamicina frente a *Staphylococcus spp* muestra resultados interesantes, con un 39% de sensibilidad, el 33% es intermedio, mientras que el 28% presentan resistencia a dicho antimicrobiano; en el caso de *Streptococcus sp* el 75% de las cepas son sensibles, mientras que el 25% presentan una resistencia intermedia al mencionado fármaco. TE30_tetraciclina exhibe sensibilidad en el 61% de *Staphylococcus spp.*, asimismo presentan una sensibilidad intermedia el 17% de las cepas y el 22% de las cepas son resistentes a la tetraciclina; en el caso *Streptococcus sp* 50% de las cepas presentan sensibilidad, mientras que también el 50% presentan una resistencia a dicho antibiótico. La AML30_Amoxicilina muestra resistencia intermedia el 83% y sólo el 17% de *Staphylococcus spp* son sensibles al mencionado antibiótico. AUG30_Amoxicilina_Acido_Clavulanico presenta una sensibilidad del 100% en *Staphylococcus spp.* y un 100% en *Streptococcus sp.* Este hallazgo sugiere que este antimicrobiano puede ser una opción efectiva en casos de infección por

Staphylococcus spp. En relación a la P10_Penicilina y la E15_Cefotaxin son eficaces en el 100% de las cepas tanto para *Streptococcus sp.*, como para *Staphylococcus spp.* La E15_eritromicina, sólo presenta sensibilidad en el 33% de las cepas, y una sensibilidad intermedia en el 61% de las cepas, mientras que 6% de las cepas de *Staphylococcus spp.* son resistentes al antibiótico; con relación a *Streptococcus sp.*, presenta una eficacia en el 25% de las cepas, mientras que el 75% de las cepas presentan una resistencia intermedia. La BA10_bacitracina, frente a *Staphylococcus spp.*, presenta una eficacia variable, por ejemplo, presenta una sensibilidad en el 11% de las cepas, una sensibilidad intermedia del 72%, mientras que el 17% de las cepas presentan una resistencia frente al antibiótico; con relación a *Streptococcus sp.*, presenta una sensibilidad intermedia el 50% de las cepas lo mismo que el 50% de las cepas son resistentes a la bacitracina.

Tabla 09 Descripción de la sensibilidad antimicrobiana de los agentes etiológicos

| 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_Enrofloxacin | 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

La Tabla 10 sobre la descripción de la sensibilidad contra gram negativo específicamente de *Escherichia coli* (*E.coli*). Se observa resistencia variable, esto evidenciado por los diámetros del halo de inhibición a los puntos de interrupción establecidos por (CLSI-VET01S, 2024); así podemos señalar que frente al FFC30_florfenicol, presenta una resistencia el 100% de los casos, en relación al SXT25_trimetropim_sulfamethoxazole, presenta una sensibilidad en el 100% de los casos, en el caso de la E15_Eritromicina, presenta una resistencia en el 100% de los casos; TE30_tetraciclina, presenta una sensibilidad en el 100% de los casos al igual que frente a la CN10_Gentamicina, S10_Streptomina, frente a la ENR5_Enrofloxacin, es sensible en el 86%, resistencia intermedia 14%; frente al MTZ5_Metronidazol, presenta una resistencia el 100% de los casos y frente a la AML30_Amoxicilina presenta una sensibilidad variable, es decir es sensible el 29%, presenta una resistencia intermedia el 14% y el 57% de los casos presentó resistencia. Estos resultados subrayan la importancia de una estrategia de tratamiento precisa y adaptada, considerando la resistencia observada en la población de *Escherichia coli* analizada.

La elevada resistencia al florfenicol (FFC30), eritromicina (E15) y Metronidazol (MTZ5), se observó en el 100% de las cepas analizadas de *E. coli*. Estos resultados son similares a los reportados por (Keyes et al., 2000), donde reportó niveles elevados de resistencia a florfenicol en cepas ambientales de *E. coli* en sistemas de producción lechera, lo cual puede atribuirse al uso indiscriminado de este antibiótico. En el caso del metronidazol, su ineficacia contra *E. coli* es ampliamente documentada, dado que su mecanismo de acción es más efectivo en microorganismos anaerobios (Larsson & Flach, 2022). Resistencia Total a Eritromicina (E15): La resistencia del 100% a eritromicina se alinea con reportes previos que indican que este antibiótico es inefectivo contra bacterias Gram negativas como *E. coli* (Saini et al., 2012). Este hallazgo destaca la importancia de evitar el uso de eritromicina en el tratamiento de infecciones causadas por este patógeno.

Alta Sensibilidad a Trimetropim-Sulfametoxazol (SXT25), Tetraciclina (TE30), Gentamicina (CN10) y Estreptomina (S10), en este estudio, se encontró que el 100% de las cepas de *E. coli* fueron sensibles a trimetropim-sulfametoxazol,

tetraciclina, gentamicina y estreptomina. Investigaciones en Argentina (Peñaloza Piña et al., 2021), han demostrado que trimetopim-sulfametoxazol sigue siendo altamente efectivo contra infecciones urinarias causadas por *E. coli*, lo que concuerda con nuestros hallazgos. La sensibilidad total a gentamicina y estreptomina concuerda con estudios en (Tello et al., 2022), que resaltan la eficacia de estos antibióticos en infecciones bacterianas en el ganado. Sensibilidad Variable a Amoxicilina (AML30), los resultados muestran que el 29% de las cepas fueron sensibles a amoxicilina, un 14% presentó resistencia intermedia y el 57% mostró resistencia. Este patrón sugiere que la resistencia a betalactámicos está aumentando en las poblaciones de *E. coli* en ganado bovino, posiblemente debido a la producción de betalactamasas (C. Sharma et al., 2018). Alta Sensibilidad a Enrofloxacin (ENR5), se encontró que el 86% de las cepas fueron sensibles a enrofloxacin, mientras que un 14% presentó resistencia intermedia. Estos resultados reflejan la efectividad continua de las fluoroquinolonas en el tratamiento de infecciones por *E. coli*, aunque su uso debe ser regulado para evitar el desarrollo de resistencia ((WHO, 2022).

En el presente estudio se encontró una variabilidad diversa en cuanto a la resistencia de agentes etiológicos Gram negativos y específicamente de *Escherichia coli*, esto se puede deber a: Uso excesivo e inadecuado de antibióticos; si las bacterias son expuestas repetidamente a estos antibióticos, algunas cepas pueden adquirir mutaciones que les permiten resistir su efecto (Abdi et al., 2021); selección natural: Las bacterias tienen la capacidad de adaptarse a su entorno, y aquellas cepas que poseen resistencia a los antibióticos tendrán una ventaja selectiva cuando son expuestas a ellos. Con el tiempo, estas cepas resistentes pueden predominar en la población bacteriana (Shi et al., 2021); transferencia de genes de resistencia: Las bacterias pueden intercambiar genes de resistencia entre sí a través de procesos como la conjugación, transformación o transducción. Si una cepa bacteriana adquiere genes de resistencia a los antimicrobianos de otras bacterias, puede volverse resistente a estos antibióticos (Coleman & Smith, 2014); mecanismos de resistencia intrínseca: Algunas cepas bacterianas pueden tener mecanismos de resistencia intrínseca a los antibióticos que les permiten sobrevivir incluso en presencia de los mismos. Estos mecanismos pueden incluir la producción de enzimas que modifican o degradan los antibióticos, bombas de eflujo

que eliminan los antibióticos de la célula bacteriana, o modificaciones en los sitios de unión de los antibióticos (Baran et al., 2023). Presión selectiva en el entorno: Las prácticas de manejo en las granjas, como el uso de antibióticos en la alimentación del ganado o en el tratamiento de enfermedades, pueden crear un entorno en el que las cepas resistentes bacterianas son más propensas a sobrevivir y propagarse (Marutescu et al., 2022).

Tabla 10. Descripción de la sensibilidad antimicrobiana de los agentes etiológicos para Gram negativo

| 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_Enrofloxacina | 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

VIII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

8.1. Conclusiones

- Los principales agentes etiológicos responsables de la mastitis subclínica en vacas lecheras del distrito de Anta, región de Cusco, son *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus sp.*, *Escherichia coli*.; esto puede deberse a la ubicuidad y colonización de dichos agentes, contaminación durante el ordeño, factores de manejo, resistencia a los antimicrobianos
- El análisis de sensibilidad antimicrobiana revela que *Staphylococcus spp.* presenta un patrón mixto de resistencia y sensibilidad intermedia, lo que limita las opciones de tratamiento sin una prueba previa de susceptibilidad. *Streptococcus sp.* sigue siendo altamente sensible a varios antibióticos, incluyendo penicilina y cefotaxima, lo que permite su control con tratamientos convencionales. Por otro lado, *Escherichia coli* muestra alta resistencia a enrofloxacina, florfenicol y metronidazol, indicando un riesgo significativo de fracaso terapéutico si no se eligen antimicrobianos adecuados. Estos hallazgos destacan la necesidad de uso racional de antibióticos y estrategias de control para evitar la propagación de resistencia bacteriana.
- Los resultados obtenidos evidencian una alta resistencia bacteriana en patógenos asociados a mastitis subclínica, especialmente en *E. coli* y *Staphylococcus spp.*, lo que sugiere un uso inadecuado o excesivo de antibióticos en la región. La presencia de sensibilidad intermedia en varios antimicrobianos indica que la eficacia del tratamiento puede ser variable, requiriendo ajustes según cada caso clínico.

8.2. Recomendaciones

- Es fundamental implementar monitoreos periódicos de resistencia antimicrobiana, fomentar prácticas de manejo adecuado del ganado y promover protocolos de bioseguridad en las unidades de producción lechera para reducir la selección y diseminación de cepas resistentes.
- Basándonos en la identificación de agentes etiológicos, se recomienda implementar medidas de control y prevención específicas para la mastitis subclínica. Esto puede incluir mejoras en las prácticas de manejo y protocolos de higiene para reducir la incidencia de la enfermedad.
- Dada la variabilidad en la sensibilidad antimicrobiana, se sugiere realizar una selección más racional de antimicrobianos en los protocolos de tratamiento. Esto implica adaptar los tratamientos según la susceptibilidad específica de los agentes etiológicos, reduciendo así la presión selectiva sobre los antimicrobianos.
- Para garantizar la eficacia a largo plazo de las estrategias implementadas, se recomienda un monitoreo continuo de la resistencia antimicrobiana y la incidencia de mastitis subclínica. Este enfoque permitirá ajustes proactivos en las prácticas de manejo y tratamiento para mantener la salud óptima del ganado lechero en la región de Cusco.

IX. REFERENCIAS

- Abdi, R. D., Gillespie, B. E., Ivey, S., Pighetti, G. M., Almeida, R. A., & Kerro Deogo, O. (2021). Antimicrobial Resistance of Major Bacterial Pathogens from Dairy Cows with High Somatic Cell Count and Clinical Mastitis. *Animals : an Open Access Journal from MDPI*, 11(1), 131. <https://doi.org/10.3390/ani11010131>
- Abebe, R., Hatiya, H., Abera, M., Megersa, B., & Asmare, K. (2016). Bovine mastitis: Prevalence, risk factors and isolation of *Staphylococcus aureus* in dairy herds at Hawassa milk shed, South Ethiopia. *BMC Veterinary Research*, 12(1), 270. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0905-3>
- Abrahmsén, M., Persson, Y., Kanyima, B. M., & Båge, R. (2014). Prevalence of subclinical mastitis in dairy farms in urban and peri-urban areas of Kampala, Uganda. *Tropical Animal Health and Production*, 46(1), 99-105. <https://doi.org/10.1007/s11250-013-0455-7>
- Abureema, S., Smooker, P., Malmø, J., & Deighton, M. (2014). Molecular epidemiology of recurrent clinical mastitis due to *Streptococcus uberis*: Evidence of both an environmental source and recurring infection with the same strain. *Journal of Dairy Science*, 97(1), 285-290. Scopus. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7074>
- Akira, S., & Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews. Immunology*, 4(7), 499-511. <https://doi.org/10.1038/nri1391>
- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4), 783-801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>
- Alawneh, J. I., Vezina, B., Ramay, H. R., Al-Harbi, H., James, A. S., Soust, M., Moore, R. J., & Olchoway, T. W. J. (2020). Survey and Sequence Characterization of Bovine Mastitis-Associated *Escherichia coli* in Dairy Herds. *Frontiers in Veterinary Science*, 7. Scopus. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.582297>

- Al-Farha, A. A.-B., Hemmatzadeh, F., Khazandi, M., Hoare, A., & Petrovski, K. (2017). Evaluation of effects of *Mycoplasma mastitis* on milk composition in dairy cattle from South Australia. *BMC Veterinary Research*, 13(1), 351. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1274-2>
- Alvarado-Montenegro, P. (2006). *Incidencia de la mastitis subclínica, en el sector descanso de sucre parroquia victoria del portete*. https://rraae.cedia.edu.ec/Record/UAZUAY_1031e96cb4beb454a3e9953790ae4a4df
- Amer, S., Gálvez, F. L. A., Fukuda, Y., Tada, C., Jimenez, I. L., Valle, W. F. M., & Nakai, Y. (2018a). Prevalence and etiology of mastitis in dairy cattle in El Oro Province, Ecuador. *Journal of Veterinary Medical Science*, 80(6), 861-868. <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0504>
- Amer, S., Gálvez, F. L. A., Fukuda, Y., Tada, C., Jimenez, I. L., Valle, W. F. M., & Nakai, Y. (2018b). Prevalence and etiology of mastitis in dairy cattle in El Oro Province, Ecuador. *Journal of Veterinary Medical Science*, 80(6), 861-868. <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0504>
- Arbab, S., Ullah, H., Wang, W., Li, K., Akbar, A., & Zhang, J. (2021). Isolation and Identification of Infection-Causing Bacteria in Dairy Animals and Determination of Their Antibiogram. *Journal of Food Quality*, 2021, e2958304. <https://doi.org/10.1155/2021/2958304>
- Ashraf, A., & Imran, M. (2020a). Causes, types, etiological agents, prevalence, diagnosis, treatment, prevention, effects on human health and future aspects of bovine mastitis. *Animal Health Research Reviews*, 21(1), 36-49. Scopus. <https://doi.org/10.1017/S1466252319000094>
- Ashraf, A., & Imran, M. (2020b). Causes, types, etiological agents, prevalence, diagnosis, treatment, prevention, effects on human health and future aspects of bovine

- mastitis. *Animal Health Research Reviews*, 21(1), 36-49. Scopus.
<https://doi.org/10.1017/S1466252319000094>
- Azooz, M., El-Wakeel, S., & Yousef, H. (2020). *Financial and economic analyses of the impact of cattle mastitis on the profitability of Egyptian dairy farms*.
<https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-85094829610&origin=inward&txGid=01cb37edaada47de530233b55729f18a>
- Bannerman, D. D., Chockalingam, A., Paape, M. J., & Hope, J. C. (2005). The bovine innate immune response during experimentally-induced *Pseudomonas aeruginosa* mastitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 107(3-4), 201-215.
<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2005.04.012>
- Baran, A., Kwiatkowska, A., & Potocki, L. (2023). Antibiotics and Bacterial Resistance-A Short Story of an Endless Arms Race. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5777. <https://doi.org/10.3390/ijms24065777>
- Barkema, H. W., Schukken, Y. H., & Zadoks, R. N. (2006). Invited Review: The Role of Cow, Pathogen, and Treatment Regimen in the Therapeutic Success of Bovine *Staphylococcus aureus* Mastitis. *Journal of Dairy Science*, 89(6), 1877-1895.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72256-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72256-1)
- Bedolla-Cedeño, C., & León, M. (2008). Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina en la industria lechera—Economic causalities inflicted by the bovine mastitis in the milk industry). *REDVET*.
- Bengtsson, B., Unnerstad, H. E., Ekman, T., Artursson, K., Nilsson-Ost, M., & Waller, K. P. (2009). Antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of acute clinical mastitis in dairy cows. *Veterinary Microbiology*, 136(1-2), 142-149.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.10.024>
- Beyene, T., Hayishe, H., Gizaw, F., Beyi, A. F., Abunna, F., Mammo, B., Ayana, D., Waktole, H., & Abdi, R. D. (2017). Prevalence and antimicrobial resistance profile of

- Staphylococcus in dairy farms, abattoir and humans in Addis Ababa, Ethiopia. *BMC Research Notes*, 10(1), 171. <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2487-y>
- Bhosale, R., Osmani, R., Ghodake, P., Shaikh, S., & Chavan, S. (2014). Mastitis: An Intensive Crisis in Veterinary Science. *International Journal of Pharma Research and Health Sciences*, 2(2), 96-103.
- Bi, Y., Wang, Y. J., Qin, Y., Vallverdú, R. G., García, J. M., Sun, W., Li, S., & Cao, Z. (2016). Prevalence of Bovine Mastitis Pathogens in Bulk Tank Milk in China. *PLOS ONE*, 11(5), e0155621. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155621>
- Birhanu, M., Leta, S., Mamo, G., & Tesfaye, S. (2017). Prevalence of bovine subclinical mastitis and isolation of its major causes in Bishoftu Town, Ethiopia. *BMC Research Notes*, 10(1), 767. <https://doi.org/10.1186/s13104-017-3100-0>
- Bitman, J., Wood, D. L., Bright, S. A., Miller, R. H., Capuco, A. V., Roche, A., & Pankey, J. W. (1991). Lipid composition of teat canal keratin collected before and after milking from Holstein and Jersey cows. *Journal of Dairy Science*, 74(2), 414-420. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78184-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78184-8)
- Bonardi, S., Cabassi, C. S., Fiaccadori, E., Cavirani, S., Parisi, A., Bacci, C., Lamperti, L., Rega, M., Conter, M., Marra, F., Crippa, C., Gambi, L., Spadini, C., Iannarelli, M., Paladini, C., Filippin, N., & Pasquali, F. (2023). Detection of carbapenemase- and ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* from bovine bulk milk and comparison with clinical human isolates in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 387, 110049. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.110049>
- Bradley, A. J., Leach, K. A., Breen, J. E., Green, L. E., & Green, M. J. (2007). Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. *Veterinary Record*, 160(8), 253-258. <https://doi.org/10.1136/vr.160.8.253>
- Cervantes, P., Portela-Alvarado, S., Beltrán, A., Dominguez-Mancera, B., Boucrin, F., Villagómez-Cortés, J. A., & Barrientos-Morales, M. (2017). Isolation of pathogens

- causing subclinical mastitis in cows in the wet tropics of Veracruz, México. *Actas Iberoamericanas en Conservación Animal*, 2017, 103-109.
- Cheng, J., Zhou, M., Nobrega, D. B., Barkema, H. W., Xu, S., Li, M., Kastelic, J. P., Shi, Y., Han, B., & Gao, J. (2021). Genetic diversity and molecular epidemiology of outbreaks of *Klebsiella pneumoniae* mastitis on two large Chinese dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 104(1), 762-775. Scopus. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19325>
- 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/veterinary-medicine/documents/vet01s/>
- Cobirka, M., Tancin, V., & Slama, P. (2020). Epidemiology and Classification of Mastitis. *Animals*, 10(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/ani10122212>
- Coleman, J. P., & Smith, C. J. (2014). Microbial Resistance☆. En *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.05148-5>
- Colque-Cruz, P. (2015). *Determinación de la prevalencia e incidencia de mastitis subclínica en vacunos Brown Swiss del distrito de Chamaca—Chumbivilcas—Cusco*. chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/http://tesis.unap.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14082/1851/Colque_Cruz_Pedro_Ubert.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Conlago. (2013). *Pruebas Biológicas California Mastitis Test (CMT)*. <https://1library.co/article/pruebas-biol%C3%B3gicas-california-mastitis-test-cmt.zxojm5wz>

- Craven, N., & Williams, M. R. (1985). Defences of the bovine mammary gland against infection and prospects for their enhancement. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 10(1), 71-127. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(85\)90039-x](https://doi.org/10.1016/0165-2427(85)90039-x)
- Cuesta, L. M., Liron, J. P., Farias, M. V. N., Dolcini, G. L., & Ceriani, M. C. (2020). Effect of bovine leukemia virus (BLV) infection on bovine mammary epithelial cells RNA-seq transcriptome profile. *PLoS ONE*, 15(6). Scopus. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234939>
- Cvetnic, L., Samardžija, M., Habrun, B., Kompes, G., & Benic, M. (2016). Microbiological monitoring of mastitis pathogens in the control of udder health in dairy cows. *Slovenian Veterinary Research*, 53(3), 131-140. Scopus.
- Cvetnić, L., Špičić, S., Kompes, G., Habrun, B., Katalinić-Janković, V., Cvetnić, M., Zdelar-Tuk, M., Reil, I., Duvnjak, S., Cvetnić, Ž., & Benić, M. (2022). Bovine mastitis caused by rapid-growth environmental mycobacteria. *Veterinarska Stanica*, 53(5), 493-501. <https://doi.org/10.46419/vs.53.5.11>
- Czuprynski, C., & Chengappa, M. m. (2022). Basic Mycology. En *Veterinary Microbiology* (pp. 29-34). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119650836.ch3>
- Dalanezi, F. M., Souza da Paz, G., Joaquim, S. F., Guimarães, F. F., Bosco, S. D. M. G., & Langoni, H. (2018). Short communication: The first report of *Cyberlindnera rhodanensis* associated with clinical bovine mastitis. *Journal of Dairy Science*, 101(1), 581-583. Scopus. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13347>
- Demil, E., Teshome, L., Kerie, Y., Habtamu, A., Kumilachew, W., Andualem, T., & Mekonnen, S. A. (2022). Prevalence of subclinical mastitis, associated risk factors and antimicrobial susceptibility of the pathogens isolated from milk samples of dairy cows in Northwest Ethiopia. *Preventive Veterinary Medicine*, 205, 105680. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2022.105680>

- Deng, Y., Berhantamir, & Asebe, G. (2015). Assessment of Hygienic Milk Production and Prevalence of Mastitis in Dairy Cows in Jikawo Woreda of Nuer Zone, Gambella Region, Ethiopia ARTICLE INFO ABSTRACT. *The Journal of Agriculture and Natural Resources Sciences*, 2, 480-486.
- Desmarchelier, P., & Fegan, N. (2011). Pathogens in Milk | Escherichia coli. En J. W. Fuquay (Ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)* (pp. 60-66). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00393-9>
- Farinango, A. H. (2015). *Prevalencia de mastitis bovina mediante la prueba de california mastitis test con identificación del agente etiológico, en el centro de acopio de leche de la comunidad de Puliza, Cayambe – Ecuador, 2014* [bachelorThesis]. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/9826>
- Fidelis, C. E., de Freitas Leite, R., Garcia, B. L. N., Gonçalves, J. L., Good, L., & Dos Santos, M. V. (2023). Antimicrobial activities of polyhexamethylene biguanide against biofilm-producing *Prototheca bovis* causing bovine mastitis. *Journal of Dairy Science*, 106(2), 1383-1393. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22468>
- Fu, S., Wen, C., Wang, Z., Qiu, Y., Zhang, Y., Zuo, J., Xu, Y., Han, X., Luo, Z., Chen, W., & Miao, J. (2022). Molecular Epidemiology and Antimicrobial Resistance of Outbreaks of *Klebsiella pneumoniae* Clinical Mastitis in Chinese Dairy Farms. *Microbiology Spectrum*, 10(6). Scopus. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02997-22>
- Gelgie, A. E., Korsá, M. G., & Kerro Dego, O. (2022). *Mycoplasma bovis* Mastitis. *Current Research in Microbial Sciences*, 3. Scopus. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2022.100123>
- Gitau, G. K., Bundi, R. M., Vanleeuwen, J., & Mulei, C. M. (2014a). Mastitogenic bacteria isolated from dairy cows in Kenya and their antimicrobial sensitivity. *Journal of the South African Veterinary Association*, 85(1), 950. <https://doi.org/10.4102/jsava.v85i1.950>

- Gitau, G. K., Bundi, R. M., Vanleeuwen, J., & Mulei, C. M. (2014b). Mastitogenic bacteria isolated from dairy cows in Kenya and their antimicrobial sensitivity. *Journal of the South African Veterinary Association*, 85(1), 950. <https://doi.org/10.4102/jsava.v85i1.950>
- Gomes, F., Saavedra, M. J., & Henriques, M. (2016). Bovine mastitis disease/pathogenicity: Evidence of the potential role of microbial biofilms. *Pathogens and Disease*, 74(3), ftw006. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw006>
- Gómez-Quispe, O. E., Santivañez-Ballón, C. S., Arauco-Villar, F., Espezua-Flores, O. H., & Manrique-Meza, J. (2015). Criterios de interpretación para California Mastitis Test en el diagnóstico de mastitis subclínica en bovinos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 26(1), 86-95. <https://doi.org/10.15381/rivep.v26i1.10912>
- Gómez-Sanz, E., Torres, C., Ceballos, S., Lozano, C., & Zarazaga, M. (2013). Clonal Dynamics of Nasal *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in Dog-Owning Household Members. Detection of MSSA ST398. *PLoS ONE*, 8(7), e69337. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069337>
- Gruet, P., Maincent, P., Berthelot, X., & Kaltsatos, V. (2001). Bovine mastitis and intramammary drug delivery: Review and perspectives. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 50(3), 245-259. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(01\)00160-0](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(01)00160-0)
- Hayashi, T., Sugita, T., Hata, E., Katsuda, K., Zhang, E., Kiku, Y., Sugawara, K., Ozawa, T., Matsubara, T., Ando, T., Obayashi, T., Ito, T., Yabusaki, T., Kudo, K., Yamamoto, H., Koiwa, M., Oshida, T., Tagawa, Y., & Kawai, K. (2013). Molecular-based identification of yeasts isolated from bovine clinical Mastitis in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 75(3), 387-390. Scopus. <https://doi.org/10.1292/jvms.12-0362>
- Herlekar, D. A., Shashikant, C. S., Gurjar, A. A., & Jayarao, B. M. (2013). Presence of viral and bacterial organisms in milk and their association with somatic cell counts.

Journal of Dairy Science, 96(10), 6336-6346. Scopus.
<https://doi.org/10.3168/jds.2013-6631>

Hibbitt, K. G., & Benians, M. (1971). Some Effects in vivo of the Teat Canal and Effects in vitro of Cationic Proteins on Staphylococci. *Microbiology*, 68(1), 123-128.
<https://doi.org/10.1099/00221287-68-1-123>

Hoque, M. N., Das, Z. C., Rahman, A. N. M. A., Haider, M. G., & Islam, M. A. (2018). Molecular characterization of Staphylococcus aureus strains in bovine mastitis milk in Bangladesh. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 6(1), 53-60. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2018.03.008>

Islam, S., Jarosch, S., Zhou, J., Parquet, M. del C., Toguri, J. T., Colp, P., Holbein, B. E., & Lehmann, C. (2016). Anti-inflammatory and anti-bacterial effects of iron chelation in experimental sepsis. *The Journal of Surgical Research*, 200(1), 266-273.
<https://doi.org/10.1016/j.jss.2015.07.001>

Junior, R. C. da S., Campanholi, K. da S. S., Maciel, B. C., Pinto, L. A. de M., de Moraes, F. A. P., Rando, F. D. S., Pereira, P. C. de S., Pozza, M. S. D. S., Nakamura, C. V., & Caetano, W. (2023). Natural photosensitizer-loaded in micellar copolymer to prevent bovine mastitis: A new post-dipping protocol on milking. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 42, 103337. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2023.103337>

Kenneth. (2011). *Sherris: Microbiología médica (5a. ed.)*.

Keyes, K., Hudson, C., Maurer, J. J., Thayer, S., White, D. G., & Lee, M. D. (2000). Detection of Florfenicol Resistance Genes in Escherichia coli Isolated from Sick Chickens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(2), 421-424.

Klaas, I. C., & Zadoks, R. N. (2018). An update on environmental mastitis: Challenging perceptions. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65, 166-185. Scopus.
<https://doi.org/10.1111/tbed.12704>

- Kremer, W. D., Noordhuizen-Stassen, E. N., & Lohuis, J. A. (1990). Host defence and bovine coliform mastitis. Host defence mechanisms and characteristics of coliform bacteria in coliform mastitis in bovine: A review. *The Veterinary Quarterly*, 12(2), 103-113. <https://doi.org/10.1080/01652176.1990.9694252>
- Ksouri, S., Djebir, S., Hadeif, Y., & Benakhla, A. (2015). Survey of Bovine Mycotic Mastitis in Different Mammary Gland Statuses in Two North-Eastern Regions of Algeria. *Mycopathologia*, 179(3-4), 327-331. Scopus. <https://doi.org/10.1007/s11046-014-9845-2>
- Kuralkar, P., & Kuralkar, S. V. (2021). Role of herbal products in animal production—An updated review. *Journal of Ethnopharmacology*, 278, 114246. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114246>
- Lamari, I., Mimoune, N., & Khelef, D. (2021). Effect of feed additive supplementation on bovine subclinical mastitis. *Veterinarska Stanica*, 52(4), 0-0. <https://doi.org/10.46419/vs.52.4.12>
- Larsson, D. G. J., & Flach, C.-F. (2022). Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews Microbiology*, 20(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00649-x>
- Laven, R., Balcomb, C., Tulley, W., & Lawrence, K. (2014). Effect of dry period length on the effect of an intramammary teat sealant on the risk of mastitis in cattle treated with antibiotics at drying off. *New Zealand Veterinary Journal*, 62(4), 214-220. <https://doi.org/10.1080/00480169.2013.879689>
- León-Galván, M. F., Barboza-Corona, J. E., Lechuga-Arana, A. A., Valencia-Posadas, M., Aguayo, D. D., Cedillo-Pelaez, C., Martínez-Ortega, E. A., & Gutierrez-Chavez, A. J. (2015). Molecular detection and sensitivity to antibiotics and bacteriocins of pathogens isolated from bovine mastitis in family dairy herds of central Mexico. *BioMed Research International*, 2015, 615153. <https://doi.org/10.1155/2015/615153>

- Liu, Y., Xu, S., Li, M., Zhou, M., Huo, W., Gao, J., Liu, G., Kastelic, J. P., & Han, B. (2020). Molecular characteristics and antibiotic susceptibility profiles of *Mycoplasma bovis* associated with mastitis on dairy farms in China. *Preventive Veterinary Medicine*, 182. Scopus. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105106>
- Marques-Bastos, S. L. S., Coelho, M. L. V., de Sousa Santos, I. N., Moreno, D. S. A., Barrias, E. S., de Mendonça, J. F. M., Mendonça, L. C., Lange, C. C., de Paiva Brito, M. A. V., & do Carmo de Freire Bastos, M. (2022). Effects of the natural antimicrobial peptide aureocin A53 on cells of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* involved in bovine mastitis in the excised teat model. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 39(1), 5. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03443-w>
- Marutescu, L. G., Jaga, M., Postolache, C., Barbuceanu, F., Milita, N. M., Romascu, L. M., Schmitt, H., de Roda Husman, A. M., Sefeedpari, P., Glaeser, S., Kämpfer, P., Boerlin, P., Topp, E., Gradisteanu Pircalabioru, G., Chifiriuc, M. C., & Popa, M. (2022). Insights into the impact of manure on the environmental antibiotic residues and resistance pool. *Frontiers in Microbiology*, 13, 965132. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.965132>
- McDougall, S., Hussein, H., & Petrovski, K. (2014). Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* and *Streptococcus dysgalactiae* from dairy cows with mastitis. *New Zealand Veterinary Journal*, 62(2), 68-76. <https://doi.org/10.1080/00480169.2013.843135>
- Mendoza, J. A., Vera, Y. A., & Peña, L. C. (2017). Prevalencia de mastitis subclínica, microorganismos asociados y factores de riesgo identificados en hatos de la provincia de Pamplona, norte de Santander. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 64(2), 11-24. <https://doi.org/10.15446/rfmvz.v64n2.67209>

- Miller, R. H., Bitman, J., Bright, S. A., Wood, D. L., & Capuco, A. V. (1992). Effect of clinical and subclinical mastitis on lipid composition of teat canal keratin. *Journal of Dairy Science*, 75(6), 1436-1442. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)77898-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)77898-9)
- Monistero, V., Barberio, A., Cremonesi, P., Castiglioni, B., Morandi, S., Lassen, D. C. K., Astrup, L. B., Locatelli, C., Piccinini, R., Addis, M. F., Bronzo, V., & Moroni, P. (2021). Genotyping and Antimicrobial Susceptibility Profiling of *Streptococcus uberis* Isolated from a Clinical Bovine Mastitis Outbreak in a Dairy Farm. *Antibiotics*, 10(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060644>
- Motaung, T. E., Petrovski, K. R., Petzer, I.-M., Thekiso, O., & Tsilo, T. J. (2017). Importance of bovine mastitis in Africa. *Animal Health Research Reviews*, 18(1), 58-69. <https://doi.org/10.1017/S1466252317000032>
- Najarro, J. M. (2024). *Frecuencia de patógenos bacterianos y de resistencia antibiótica en mastitis bovina clínica y subclínica de ganado Brown Swiss al pastoreo en Melgar, Puno*. <https://repositorio.upch.edu.pe/handle/20.500.12866/15542>
- Ndahetuye, J. B., Persson, Y., Nyman, A.-K., Tukei, M., Ongol, M. P., & Båge, R. (2019). Aetiology and prevalence of subclinical mastitis in dairy herds in peri-urban areas of Kigali in Rwanda. *Tropical Animal Health and Production*, 51(7), 2037-2044. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-01905-2>
- Ndahetuye, J. B., Twambazimana, J., Nyman, A.-K., Karege, C., Tukei, M., Ongol, M. P., Persson, Y., & Båge, R. (2020). A cross sectional study of prevalence and risk factors associated with subclinical mastitis and intramammary infections, in dairy herds linked to milk collection centers in Rwanda. *Preventive Veterinary Medicine*, 179, 105007. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105007>
- Nickerson, S., & Akers, R. (2011). Mammary gland. En *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 328-337). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00290-9>

- Nickerson, S. C. (1985). Immune mechanisms of the bovine udder: An overview. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 187(1), 41-45.
- Nielsen, C. (2009). *Economic Impact of Mastitis in Dairy Cows*. 81.
- Olechnowicz, J., & Jaśkowski, J. M. (2012). Somatic cells count in cow's bulk tank milk. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 74(6), 681-686.
<https://doi.org/10.1292/jvms.11-0506>
- Oliver, S. P., Murinda, S. E., & Jayarao, Bhushan. M. (2011). Impact of Antibiotic Use in Adult Dairy Cows on Antimicrobial Resistance of Veterinary and Human Pathogens: A Comprehensive Review. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(3), 337-355.
<https://doi.org/10.1089/fpd.2010.0730>
- Omara, S. T. (2017). MIC and MBC of Honey and Gold Nanoparticles against methicillin-resistant (MRSA) and vancomycin-resistant (VRSA) coagulase-positive *S. aureus* isolated from contagious bovine clinical mastitis. *Journal, Genetic Engineering & Biotechnology*, 15(1), 219-230. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.02.010>
- OPS. (2021). *La resistencia antimicrobiana pone en riesgo la salud mundial—OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud*. <https://www.paho.org/es/noticias/3-3-2021-resistencia-antimicrobiana-pone-riesgo-salud-mundial>
- Östensson, K., Lam, V., Sjögren, N., & Wredle, E. (2013). Prevalence of subclinical mastitis and isolated udder pathogens in dairy cows in Southern Vietnam. *Tropical Animal Health and Production*, 45(4), 979-986. <https://doi.org/10.1007/s11250-012-0320-0>
- Paduch, J.-H., & Krömker, V. (2011). [Colonization of the teat skin and the teat canal of lactating dairy cattle by mastitis pathogens]. *Tierärztliche Praxis. Ausgabe G, Grosstiere/Nutztiere*, 39(2), 71-76.
- Paulrud, C. O. (2005). Basic concepts of the bovine teat canal. *Veterinary Research Communications*, 29(3), 215-245.
<https://doi.org/10.1023/b:verc.0000047496.47571.41>

- Peng, J., Lu, Q., Liu, X., Deng, Y., Shang, T., Yuan, L., Zhang, H., & Zeng, Q. (2022). Antibacterial effect of synthetic ultra-short lipopeptide on *Streptococcus agalactiae* and its active on bacterial mastitis in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 601, 153-159. Scopus. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.02.061>
- Peñaloza-Piña, L. M., Aspiazu Hinostroza, K. A., Peñaloza Piña, L. M., & Aspiazu Hinostroza, K. A. (2021). Mecanismos de resistencia de *Escherichia Coli* en América Latina. *Vive Revista de Salud*, 4(11), 90-103. <https://doi.org/10.33996/revistavive.v4i11.88>
- Perales-Palacios, I. (2016). Diagnóstico microbiológico de mastitis: ¿qué sabemos sobre recuentos y microorganismos significativos? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 34(10), 692-693. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.06.001>
- Pérez, C., Lovón, S., Rodríguez, J., Chauca, L., Huamán, M., & Killerby, M. (2020). Caracterización genética y patrones de resistencia antimicrobiana en cepas de *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar *Typhimurium* en cuyes de crianza intensiva. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 31(1) <https://doi.org/10.15381/rivep.v31i1.17542>
- Pérez-Morales, R., Padilla-Ramírez, F., González-Ríos, H., De-la-Cruz-Leyva, M., Castañeda-Vázquez, H., & Hernández-Moreno, M. (2022). Factores asociados a la prevalencia de mastitis subclínica en ganado bovino de doble propósito. *Abanico Veterinario*, 12, e2021-41.
- Persson, Y., Nyman, A.-K. J., & Grönlund-Andersson, U. (2011). Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of subclinical mastitis in dairy cows in Sweden. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 53(1), 36. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-53-36>
- Petrovski, Grinberg, A., Williamson, N., Abdalla, M., Lopez-Villalobos, N., Parkinson, T., Tucker, I., & Rapnicki, P. (2015). Susceptibility to antimicrobials of mastitis-causing

- Staphylococcus aureus, Streptococcus uberis and Str. Dysgalactiae from New Zealand and the USA as assessed by the disk diffusion test. *Australian Veterinary Journal*, 93(7), 227-233. <https://doi.org/10.1111/avj.12340>
- Petrovski, K. R., Trajcev, M., & Buneski, G. (2006). A review of the factors affecting the costs of bovine mastitis: Review article. *Journal of the South African Veterinary Association*, 77(2), Article 2. <https://doi.org/10.4102/jsava.v77i2.344>
- Phillips, C. (2003). *Principios de producción bovina—Editorial Acribia, S.A.* https://www.editorialacribia.com/libro/principios-de-produccion-bovina_53680/, https://www.editorialacribia.com/libro/principios-de-produccion-bovina_53680/
- Piessens, V., Van Coillie, E., Verbist, B., Supré, K., Braem, G., Van Nuffel, A., De Vuyst, L., Heyndrickx, M., & De Vliegher, S. (2011). Distribution of coagulase-negative Staphylococcus species from milk and environment of dairy cows differs between herds. *Journal of Dairy Science*, 94(6), 2933-2944. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3956>
- Pol, M., & Ruegg, P. L. (2007). Relationship Between Antimicrobial Drug Usage and Antimicrobial Susceptibility of Gram-Positive Mastitis Pathogens. *Journal of Dairy Science*, 90(1), 262-273. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)72627-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)72627-9)
- Prevalence and antimicrobial resistance profile of Staphylococcus in dairy farms, abattoir and humans in Addis Ababa, Ethiopia | BMC Research Notes | Full Text.* (s. f.). Recuperado 30 de octubre de 2022, de <https://bmcresearchnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13104-017-2487-y>
- Rainard, P., Foucras, G., Fitzgerald, J. R., Watts, J. L., Koop, G., & Middleton, J. R. (2018). Knowledge gaps and research priorities in Staphylococcus aureus mastitis control. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65, 149-165. Scopus. <https://doi.org/10.1111/tbed.12698>

- Ramírez, N. F., Keefe, G., Dohoo, I., Sánchez, J., Arroyave, O., Cerón, J., Jaramillo, M., & Palacio, L. G. (2014). Herd- and cow-level risk factors associated with subclinical mastitis in dairy farms from the High Plains of the northern Antioquia, Colombia. *Journal of Dairy Science*, 97(7), 4141-4150. Scopus. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6815>
- Ranasinghe, R. M. S. B. K., Deshapriya, R. M. C., Abeygunawardana, D. I., Rahularaj, R., & Dematawewa, C. M. B. (2021). Subclinical mastitis in dairy cows in major milk-producing areas of Sri Lanka: Prevalence, associated risk factors, and effects on reproduction. *Journal of Dairy Science*, 104(12), 12900-12911. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20223>
- Restrepo-Botero, J. E., Cardona Lopera, X., Ortiz Román, L. F., & Olivera Ángel, M. (2012). *Evaluación de la sensibilidad y especificidad del diagnóstico molecular del Staphylococcus aureus en leche de vacas afectadas por mastitis*. <https://bibliotecadigital.udea.edu.co/handle/10495/31538>
- Reyes Sánchez, E. A., & Arguello Sánchez, J. S. (2015). *Estudio comparativo entre los métodos diagnósticos para mastitis subclínicas, California Test y DRAMINSKI 4Q en vacas Jersey, Diriamba – Carazo, Agosto – Octubre, 2015* [Bachelor, Universidad Nacional Agraria]. <https://repositorio.una.edu.ni/3214/>
- Riollet, C., Rainard, P., & Poutrel, B. (2000). Cells and cytokines in inflammatory secretions of bovine mammary gland. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 480, 247-258. https://doi.org/10.1007/0-306-46832-8_30
- Rodríguez-Pérez, R., & Muñoz-Ganoza, E. (2017). Frecuencia y susceptibilidad antimicrobiana de bacterias causantes de mastitis en bovinos de un establo de Trujillo, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 28(4), 994-1001. <https://doi.org/10.15381/rivep.v28i4.13874>

- Rollin, E., Dhuyvetter, K. C., & Overton, M. W. (2015). The cost of clinical mastitis in the first 30 days of lactation: An economic modeling tool. *Preventive Veterinary Medicine*, 122(3), 257-264. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.11.006>
- Ruegg, P. L. (2009). Management of mastitis on organic and conventional dairy farms. *Journal of Animal Science*, 87(13 Suppl), 43-55. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1217>
- Ruegg, P. L. (2017). A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 10381-10397. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13023>
- Saeed, S. I., Vivian, L., Zalati, C. W. S. C. W., Sani, N. I. M., Aklilu, E., Mohamad, M., Noor, A. A. M., Muthoosamy, K., & Kamaruzzaman, N. F. (2023). Antimicrobial activities of graphene oxide against biofilm and intracellular *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *BMC Veterinary Research*, 19(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03560-6>
- Saini, V., McClure, J. T., Léger, D., Keefe, G. P., Scholl, D. T., Morck, D. W., & Barkema, H. W. (2012). Antimicrobial resistance profiles of common mastitis pathogens on Canadian dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 95(8), 4319-4332. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5373>
- Sanotheran, N., & Mylvaganam, P. (2016). *Prevalence of Bovine Subclinical Mastitis and its Association with Bacteria and Risk Factors in Milking Cows of Batticaloa District in Sri Lanka*. 3.
- Santivañez-Ballón, C., Gomez-Quispe, O., Cárdenas Villanueva, L., Bustinza-Cardenas, R., Peña-Sánchez, M., & Escobedo Enriquez, M. (2013). Prevalencia y factores asociados a la mastitis subclínica bovina en los Andes peruanos. *Veterinaria y Zootecnia*, 7, 92-104. <https://doi.org/10.17151/vetzo.2013.7.2.7>

- Sharma, C., Rokana, N., Chandra, M., Singh, B. P., Gulhane, R. D., Gill, J. P. S., Ray, P., Puniya, A. K., & Panwar, H. (2018). Antimicrobial Resistance: Its Surveillance, Impact, and Alternative Management Strategies in Dairy Animals. *Frontiers in Veterinary Science*, 4, 237. <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00237>
- Sharma, T., Das, P. K., Ghosh, P. R., Banerjee, D., & Mukherjee, J. (2017). Association between udder morphology and in vitro activity of milk leukocytes in high yielding crossbred cows. *Veterinary World*, 10(3), 342-347. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.342-347>
- Shi, A., Fan, F., & Broach, J. R. (2021). Microbial adaptive evolution. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 49(2), kuab076. <https://doi.org/10.1093/jimb/kuab076>
- Silva Goyes, F. R. (2021). *Caracterización de los agentes bacterianos casuales de Mastitis Bovina* [bachelorThesis, BABAHOYO: UTB, 2021]. <http://dspace.utb.edu.ec/handle/49000/10332>
- Silveira-Filho, V. M., Luz, I. S., Campos, A. P. F., Silva, W. M., Barros, M. P. S., Medeiros, E. S., Freitas, M. F. L., Mota, R. A., Sena, M. J., & Leal-Balbino, T. C. (2014). Antibiotic resistance and molecular analysis of *Staphylococcus aureus* isolated from cow's milk and dairy products in northeast Brazil. *Journal of Food Protection*, 77(4), 583-591. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-343>
- Sordillo, L. M. (2005). Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Livestock Production Science*, 98(1), 89-99. <https://doi.org/10.1016/j.livprodsci.2005.10.017>
- Sordillo, L. M., Shafer-Weaver, K., & DeRosa, D. (1997). Immunobiology of the mammary gland. *Journal of Dairy Science*, 80(8), 1851-1865. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76121-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76121-6)

- Stelwagen, K., Carpenter, E., Haigh, B., Hodgkinson, A., & Wheeler, T. T. (2009). Immune components of bovine colostrum and milk. *Journal of Animal Science*, *87*(13 Suppl), 3-9. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1377>
- Stevens, M., Piepers, S., & Vliegheer, S. D. (2016). Mastitis prevention and control practices and mastitis treatment strategies associated with the consumption of (critically important) antimicrobials on dairy herds in Flanders, Belgium. *Journal of Dairy Science*, *99*(4), 2896-2903. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10496>
- Taponen, S., Liski, E., Heikkilä, A.-M., & Pyörälä, S. (2017). Factors associated with intramammary infection in dairy cows caused by coagulase-negative staphylococci, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Corynebacterium bovis*, or *Escherichia coli*. *Journal of Dairy Science*, *100*(1), 493-503. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11465>
- Tello, M., Ocejó, M., Oporto, B., Lavín, J. L., & Hurtado, A. (2022). Within-farm dynamics of ESBL-producing *Escherichia coli* in dairy cattle: Resistance profiles and molecular characterization by long-read whole-genome sequencing. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 936843. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.936843>
- Thrusfield, M., Christley, R., Brown, H., Diggle, P., French, N., Howe, H., Kelly, L., O'Connor, A., Sargeant, J., & Wood, H. (2018). Describing disease occurrence. En *Veterinary Epidemiology* (pp. 58-85). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118280249.ch4>
- Tommasoni, C., Fiore, E., Lisuzzo, A., & Gianesella, M. (2023). Mastitis in Dairy Cattle: On-Farm Diagnostics and Future Perspectives. *Animals*, *13*(15), Article 15. <https://doi.org/10.3390/ani13152538>
- Vakkamäki, J., Taponen, S., Heikkilä, A.-M., & Pyörälä, S. (2017). Bacteriological etiology and treatment of mastitis in Finnish dairy herds. *Acta Veterinaria Scandinavica*, *59*(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s13028-017-0301-4>

- WHO. (2022). *Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report: 2022*. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240062702>
- Woudstra, S., Wente, N., Zhang, Y., Leimbach, S., Kirkeby, C., Gussmann, M. K., & Krömker, V. (2023). Reservoirs of *Staphylococcus* spp. And *Streptococcus* spp. Associated with Intramammary Infections of Dairy Cows. *Pathogens*, *12*(5), 699. <https://doi.org/10.3390/pathogens12050699>
- Zadoks, R., & Fitzpatrick, J. (2009). Changing trends in mastitis. *Irish Veterinary Journal*, *62*(4), S59. <https://doi.org/10.1186/2046-0481-62-S4-S59>
- Zecconi, A., Hamann, J., Bronzo, V., Moroni, P., Giovannini, G., & Piccinini, R. (2000). Relationship between teat tissue immune defences and intramammary infections. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *480*, 287-293. https://doi.org/10.1007/0-306-46832-8_33
- Zeryehun, T., & Abera, G. (2017a). Prevalence and Bacterial Isolates of Mastitis in Dairy Farms in Selected Districts of Eastern Harrarghe Zone, Eastern Ethiopia. *Journal of Veterinary Medicine*, *2017*, e6498618. <https://doi.org/10.1155/2017/6498618>
- Zeryehun, T., & Abera, G. (2017b). Prevalence and Bacterial Isolates of Mastitis in Dairy Farms in Selected Districts of Eastern Harrarghe Zone, Eastern Ethiopia. *Journal of Veterinary Medicine*, *2017*, 6498618. <https://doi.org/10.1155/2017/6498618>
- Zeryehun, T., Aya, T., & Bayecha, R. (2013). Study on prevalence, bacterial pathogens and associated risk factors of bovine mastitis in small holder dairy farms in and around addis Ababa, Ethiopia. *Journal of Animal and Plant Sciences*, *23*, 50-55.
- Zhou, Y., Ren, Y., Fan, C., Shao, H., Zhang, Z., Mao, W., Wei, C., Ni, H., Zhu, Z., Hou, X., Piao, F., & Cui, Y. (2013). Survey of mycotic mastitis in dairy cows from Heilongjiang Province, China. *Tropical Animal Health and Production*, *45*(8), 1709-1714. Scopus. <https://doi.org/10.1007/s11250-013-0419-y>

X. ANEXOS

Presentación de la mastitis de acuerdo a la raza, edad, número de partos, cuarto mamario

Estadísticos

| | | | | | CUARTO | | | |
|------------------|--------|------|---------------|--------------|---------------------|---------------|----------------------|------------------------|
| | | | | CUARTO | ANTERIOR | CUARTO | CUARTO | |
| | | RAZA | EDAD/ Años | N° PARTOS | ANTERIOR DERECHO | IZQUIERD O | POSTERIOR DERECHO | POSTERIOR IZQUIERDO |
| N | Válido | 91 | 91 | 91 | 91 | 91 | 91 | 91 |
| Desv. Desviación | | | 2,684 | 1,569 | | | | |

Tabla 2 Tabla de frecuencias

| RAZA | | | | | |
|-------------|-------------|------------|-------|----------|-------------|
| | | Frecuencia | % | % válido | % acumulado |
| Válido | Brown Swiss | 53 | 58,2 | 58,2 | 58,2 |
| | Holstein | 37 | 40,7 | 40,7 | 98,9 |
| | HIBRIDA | 1 | 1,1 | 1,1 | 100,0 |
| Total | | 91 | 100,0 | 100,0 | |

La raza predominante es Brown Swiss (58.2%), seguida por Holstein (40.7%) y una minoría de híbridos (1.1%).

Esto indica que la población de estudio está compuesta principalmente por razas especializadas en producción lechera.

Interpretación: Se podría evaluar si existe una relación entre la raza y la susceptibilidad a la mastitis subclínica, considerando factores genéticos o diferencias en el manejo.

Tabla 3 Prevalencia de la mastitis subclínica en vacas, según edad

| EDAD/Años | | | | |
|--------------|------------|--------------|--------------|-------------|
| Edad | Frecuencia | % | % válido | % acumulado |
| 2 | 16 | 17,6 | 17,6 | 17,6 |
| 6 | 16 | 17,6 | 17,6 | 35,2 |
| 8 | 16 | 17,6 | 17,6 | 52,7 |
| 7 | 13 | 14,3 | 14,3 | 67,0 |
| 3 | 9 | 9,9 | 9,9 | 76,9 |
| 10 | 7 | 7,7 | 7,7 | 84,6 |
| 4 | 6 | 6,6 | 6,6 | 91,2 |
| 9 | 4 | 4,4 | 4,4 | 95,6 |
| 5 | 2 | 2,2 | 2,2 | 97,8 |
| 11 | 1 | 1,1 | 1,1 | 98,9 |
| 12 | 1 | 1,1 | 1,1 | 100,0 |
| Total | 91 | 100,0 | 100,0 | |

- Las edades con mayor prevalencia de mastitis subclínica son 2, 6 y 8 años (17.6% cada una).
- Las vacas más jóvenes (2-3 años) y de edad intermedia (6-8 años) son las más afectadas, mientras que las vacas de 10 años en adelante tienen una menor prevalencia.
- Esto sugiere que la mastitis puede estar influenciada por la edad, posiblemente debido a la inexperiencia de las vacas jóvenes o el desgaste fisiológico en vacas adultas. Se recomienda evaluar el manejo del ordeño en estos grupos etarios.

Tabla 4 Prevalencia de mastitis según número de partos

| NUMERO DE PARTOS | | | | | |
|-------------------------|---|------------|-------|----------|-------------|
| | | Frecuencia | % | % válido | % acumulado |
| Válido | 1 | 25 | 27,5 | 27,5 | 27,5 |
| | 3 | 21 | 23,1 | 23,1 | 50,5 |
| | 4 | 20 | 22,0 | 22,0 | 72,5 |
| | 2 | 11 | 12,1 | 12,1 | 84,6 |
| | 5 | 7 | 7,7 | 7,7 | 92,3 |
| | 6 | 7 | 7,7 | 7,7 | 100,0 |
| Total | | 91 | 100,0 | 100,0 | |

- La mayor frecuencia de mastitis subclínica se observa en vacas con 1 parto (27.5%), 3 partos (23.1%) y 4 partos (22.0%).
- Se observa una tendencia decreciente a partir del quinto parto.
- Es posible que vacas primerizas sean más susceptibles debido a su falta de exposición previa a infecciones. Sin embargo, vacas con múltiples partos pueden desarrollar resistencia o recibir un mejor manejo preventivo.

Tabla 5 Prevalencia de mastitis subclínica en el cuarto anterior derecho

| CUARTO ANTERIOR DERECHO | | | | | |
|--------------------------------|----------|------------|-------|----------|-------------|
| | | Frecuencia | % | % válido | % acumulado |
| Válido | Negativo | 85 | 93,4 | 93,4 | 93,4 |
| | Positivo | 6 | 6,6 | 6,6 | 100,0 |
| Total | | 91 | 100,0 | 100,0 | |

- 6.6% de los casos fueron positivos, con 93.4% de negatividad.
- Es el cuarto menos afectado, lo que podría deberse a una menor exposición a contaminantes.

Tabla 6 Prevalencia de mastitis subclínica en el cuarto anterior izquierdo

| CUARTO ANTERIOR IZQUIERDO | | | | | |
|----------------------------------|----------|------------|-------|----------|-------------|
| | | Frecuencia | % | % válido | % acumulado |
| Válido | Negativo | 81 | 89,0 | 89,0 | 89,0 |
| | Positivo | 10 | 11,0 | 11,0 | 100,0 |
| | Total | 91 | 100,0 | 100,0 | |

- 11.0% de los casos fueron positivos, mostrando un incremento con respecto al anterior derecho.
- Esto sugiere que la mastitis puede no distribuirse equitativamente en los cuartos anteriores.

Tabla 7 Prevalencia de mastitis subclínica en el cuarto posterior derecho

| CUARTO POSTERIOR DERECHO | | | | | |
|---------------------------------|----------|------------|-------|----------|-------------|
| | | Frecuencia | % | % válido | % acumulado |
| Válido | Negativo | 82 | 90,1 | 90,1 | 90,1 |
| | Positivo | 9 | 9,9 | 9,9 | 100,0 |
| | Total | 91 | 100,0 | 100,0 | |

- 9.9% de los casos positivos, con 90.1% negativos.
- Tiene una prevalencia mayor que los cuartos anteriores

Tabla 8 Prevalencia de mastitis subclínica en el cuarto posterior izquierdo

| CUARTO POSTERIOR IZQUIERDO | | | | | |
|-----------------------------------|----------|------------|-------|----------|-------------|
| | | Frecuencia | % | % válido | % acumulado |
| Válido | Negativo | 78 | 85,7 | 85,7 | 85,7 |
| | Positivo | 13 | 14,3 | 14,3 | 100,0 |
| | Total | 91 | 100,0 | 100,0 | |

- 14.3% de los casos positivos, siendo el cuarto más afectado.

- Interpretación global:
 - Los cuartos posteriores son más susceptibles, especialmente el posterior izquierdo.
 - Esto concuerda con estudios previos que indican que los cuartos posteriores soportan mayor producción de leche y están más expuestos a contaminación.
 - Se recomienda mejorar la higiene en el ordeño y monitorear estos cuartos con mayor frecuencia.
 - La mastitis subclínica tiene una mayor prevalencia en vacas jóvenes (2-3 años) y de edad intermedia (6-8 años), lo que sugiere una relación con la experiencia de ordeño y resistencia inmunológica.
 - La raza Brown Swiss es la más representada, por lo que se podría analizar si tiene mayor susceptibilidad a la mastitis en comparación con la Holstein.
 - El cuarto posterior izquierdo es el más afectado (14.3%), mientras que el anterior derecho es el menos afectado (6.6%), indicando que los cuartos posteriores deben recibir mayor atención en el control de infecciones.
 - Se recomienda implementar estrategias de manejo preventivo en vacas jóvenes y cuartos posteriores, así como realizar un seguimiento del número de partos para entender mejor su impacto en la mastitis subclínica.

Anexo 1. Prueba de CMT y realizar la encuesta



Anexo 2. Desinfección de la paleta



Anexo 3. Recolección leche en paleta



Anexo 4. Adición del reactivo de CMT



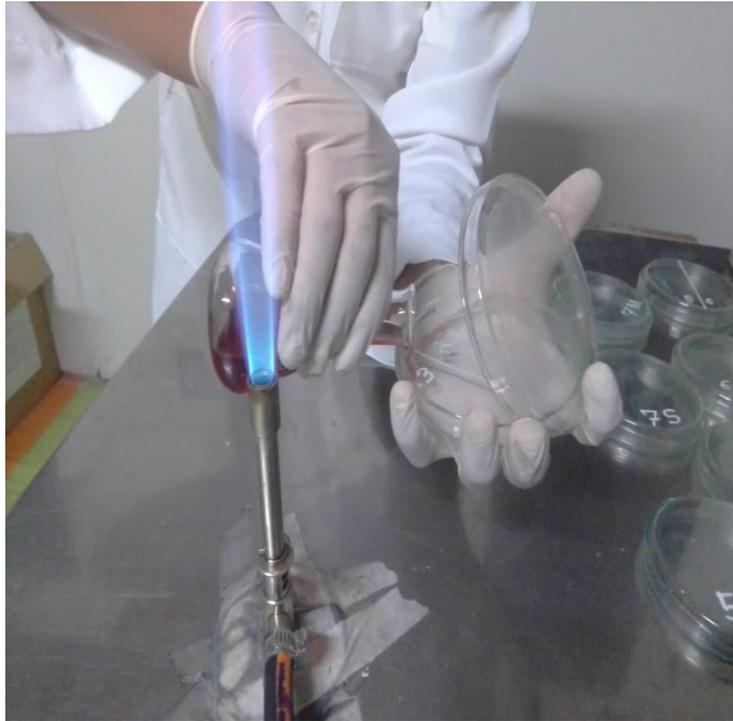
Anexo 5. Recolección de muestra que salió positivo al CMT



Anexo 6. Medios de cultivo y placas esterilizados en autoclave



Anexo 7. Adición de medio de cultivo a las placas



Anexo 8. Placas con medio de cultivo previa identificación



Anexo 9. Siembra de muestra con hisopo en medio de cultivo



Anexo 10. Crecimiento de colonias



Anexo 11. Tinción Gram



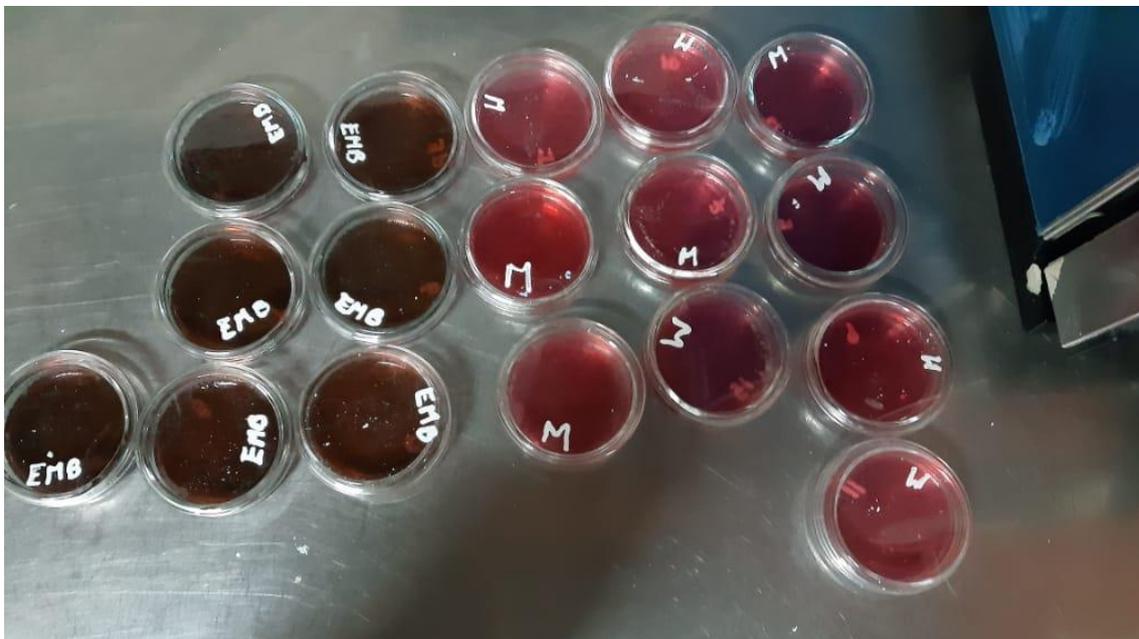
Anexo 12. Aplicación de reactivo en la tinción Gram



Anexo 13. Reactivo para realizar la prueba de catalasa



Anexo 14. Aislamiento a medios más selectivos



Anexo 15. Crecimiento de colonias en medio selectivo



Anexo 16. Preparación en tubo de ensayo las colonias



Anexo 17. Extracción de colonias para su dilución en tubo de ensayo



Anexo 18. Halo inhibición



Anexo 20. Medición de los halos

