



UNIVERSIIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÀLISIS
ESCUELA DE BIOANÀLISIS
DPTO. DE BIOANÀLISIS CLÌNICO
CATEDRÀ COMPONENTE DE INVESTIGACIÒN
Dr. “José Rafael Luna”
UNIDAD CURRICULAR TRABAJO DE GRADO II



Perfiles de Resistencia de cepas de
***Staphylococcus aureus*, en muestras de leche**
provenientes de vacas con Mastitis bovina.

Autor(a): María Isaura Sánchez M

C.I. V 16.563.847

Tutor(a): Prof.: Evelyn Alviàrez

Asesor Metodológico:

Prof. José G. Hernández

Mérida, diciembre de 2022



UNIVERSIIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÀLISIS
ESCUELA DE BIOANÀLISIS
DPTO. DE BIOANALISIS CLÍNICO
CATEDRÀ COMPONENTE DE INVESTIGACIÒN
Dr. “José Rafael Luna”
UNIDAD CURRICULAR TRABAJO DE GRADO II



Perfiles de Resistencia de cepas de
***Staphylococcus aureus*, en muestras de leche**
provenientes de vacas con Mastitis bovina.

Trabajo presentado como requisito para optar al grado de Licenciado en Bioanálisis

AGRADECIMIENTO

Este Trabajo Especial de Grado, se le dedica primeramente a Dios Todopoderoso, por ser el que me ha acompañado durante toda mi vida llenando de valor, tolerancia y la fortaleza para lograr cumplir con mis sueños y hacer de estos los más inolvidables.

Este estudio es el resultado de la constancia, perseverancia y esfuerzo en conjunto de todas las personas que hicieron posible obtener el éxito, por tal motivo agradezco a la ilustre Universidad de los Andes muy especialmente a la Facultad de Farmacia y Bioanálisis por darme la oportunidad de formar parte de ella, siendo para mí la mejor casa de estudios.

A todos los docentes y personal administrativo de la Universidad de los Andes, de manera muy especial a la MSC. María Evelyn Alviàrez, la cual dirigió esta investigación aportando con sus conocimientos y experiencia para hacer de este trabajo un final exitoso.

A todo el personal que trabaja en el Laboratorio de Bacteriología Roberto Gabaldòn del Departamento de Microbiología y Parasitología en la Universidad de los Andes (ULA) Mérida Venezuela, gracias por el apoyo incondicional.

Sánchez M, María I.

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a Dios Todopoderoso, que ha iluminado mi camino y me ha llenado de fortaleza para superar las adversidades y lograr alcanzar las metas que me he trazado con mucho esfuerzo y dedicación.

A mis padres, por inculcarme valores y principios, llenándome de amor, comprensión, apoyo durante este trayecto de mi vida.

A mis hermanos, Pilares fundamental de la familia. Este logro es de ustedes y por siempre estar allí en las buenas y las malas.

A mi Mamá Josefa y a prima Rosalba Monsalve, porque ahora desde el cielo me acompañan y siempre estuvieron allí dándome fuerzas y ánimos cuando lo necesite.

A mis hermanos y sobrinos, con los que compartí momentos inolvidables y que fueron de gran apoyo emocional.

A mis profesores que me tuvieron paciencia y supieron apoyarme durante toda mi etapa estudiantil, les estaré eternamente agradecida.

A todos mis amigos y compañeros por brindarme su amistad y acompañarme durante todo este tiempo estudiantil y hacer de esto una experiencia que siempre recordare, gracias por el apoyo a todo.

Sánchez M, María I.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
ÌNDICE DE TABLAS	x
ÌNDICE DE ESQUEMAS	xi
ÌNDICE DE FIGURAS	xii
ÌNDICE DE GRÀFICOS.....	xiii
RESUMEN.....	xiv
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO I	4
EL PROBLEMA	4
Planteamiento del Problema.....	4
Justificación e importancia de la Investigación	6
Objetivos de la investigación.....	8
<i>Objetivo General</i>	8
<i>Objetivos Específicos</i>	8
Alcance y limitaciones de la investigación	¡Error! Marcador no definido.
CAPITULO II	10
MARCO TEÒRICO	10
Trabajos previos	10
Antecedentes Históricos.....	13
Bases Teóricas	16
<i>Aproximaciones Teóricas sobre la mastitis</i>	16
<i>Ganado Bovino</i>	¡Error! Marcador no definido.
<i>Anatomía de la Glándula Mamaria</i>	¡Error! Marcador no definido.
<i>Inmunología de la Glándula Mamaria</i>	¡Error! Marcador no definido.
<i>Leche</i>	¡Error! Marcador no definido.
<i>Mastitis</i>	¡Error! Marcador no definido.
<i>Mastitis Bovina</i>	¡Error! Marcador no definido.
<i>Patogénesis de la Mastitis</i>	¡Error! Marcador no definido.
<i>Epidemiología de la Mastitis</i>	¡Error! Marcador no definido.

<i>Mastitis Contagiosa</i>	21
<i>Mastitis Ambiental</i>	21
<i>Mastitis Iatrogénica</i>	22
<i>Tipos de Mastitis</i>	¡Error! Marcador no definido.
<i>Mastitis Subclínica</i>	22
<i>Mastitis Clínica</i>	22
<i>Factores Predisponente de la Mastitis</i>	¡Error! Marcador no definido.
<i>Microorganismo</i>	¡Error! Marcador no definido.
<i>Prevención y Control de la Mastitis Bovina</i>	24
<i>Aproximaciones Teóricas sobre los Diagnósticos de Laboratorio para la Detección de la Mastitis Bovina</i>	26
<i>Observación y Palpación de la Ubre</i>	¡Error! Marcador no definido.
<i>Pruebas físicas</i>	¡Error! Marcador no definido.
<i>Pruebas químicas</i>	¡Error! Marcador no definido.
<i>Papel indicador de mastitis</i>	¡Error! Marcador no definido.
<i>Prueba de Whiteside</i>	¡Error! Marcador no definido.
<i>Pruebas biológicas</i>	¡Error! Marcador no definido.
<i>La Prueba de California Mastitis (CMT)</i> ...	¡Error! Marcador no definido.
<i>La Prueba de Wisconsin para Mastitis (WMT)</i>	¡Error! Marcador no definido.
<i>Pruebas bacteriológicas</i>	¡Error! Marcador no definido.
<i>Medios de cultivos</i>	31
<i>Agar sangre de carnero al 5%</i>	¡Error! Marcador no definido.
<i>Agar MacConkey</i>	¡Error! Marcador no definido.
<i>Agar manitol salado</i>	¡Error! Marcador no definido.
<i>Pruebas de sensibilidad por difusión en agar (Kirby-Bauer)</i>	¡Error! Marcador no definido.
<i>Medio Agar Mueller-Hinton (MH)</i>	¡Error! Marcador no definido.
<i>Concentración del inóculo</i>	¡Error! Marcador no definido.
<i>Concentración de los discos de antibióticos</i>	¡Error! Marcador no definido.

Pruebas Bioquímicas para Identificar el *Staphylococcus aureus*.. ¡Error! Marcador no definido.

Prueba de catalasa.....¡Error! Marcador no definido.

Prueba de Coagulasa.....¡Error! Marcador no definido.

Monitoreo del conteo de células somáticas ¡Error! Marcador no definido.

Aproximaciones Teóricas sobre los Antibióticos para la Mastitis Bovina. 35

Generalidades de los Antibióticos¡Error! Marcador no definido.

Uso de Antibióticos en el Ganado Bovino¡Error! Marcador no definido.

Tratamiento de la Mastitis¡Error! Marcador no definido.

Aproximaciones Teóricas sobre Género *Staphylococcus*..... 36

Bacterias.....¡Error! Marcador no definido.

Bacterias Gram positivas¡Error! Marcador no definido.

***Staphylococcus aureus* 38**

Aproximaciones Teóricas sobre la Resistencia Bacteriana..... 38

Tipos de resistencia antibiótica¡Error! Marcador no definido.

Mecanismos de resistencia a los antibacterianos .. ¡Error! Marcador no definido.

Resistencia cromosómica¡Error! Marcador no definido.

Resistencia Extracromosómica¡Error! Marcador no definido.

Transducción.....¡Error! Marcador no definido.

Conjugación¡Error! Marcador no definido.

Resistencia cruzada.....¡Error! Marcador no definido.

Definición Operacional de Términos¡Error! Marcador no definido.

Etiología 43

Infección..... 43

Inflamación..... 43

Mastitis..... 43

Microaerobio 43

Pezón..... 43

Prevalencia	43
Operacionalización del Evento de Estudio	43
CAPITULO III	45
MARCO METODOLÒGICO	45
Tipo de Investigación	45
Diseño de Investigación	46
Población y Muestra	46
<i>Unidad de Investigación</i>	<i>47</i>
<i>Selección del Tamaño de la Muestra</i>	<i>48</i>
Sistema de Variables	48
Instrumentos de Recolección de Datos	50
Procedimiento de la Investigación	51
<i>Recolección y transporte de las Muestras</i>	<i>51</i>
Aislamiento e identificación bacteriológicas.....	¡Error! Marcador no definido.
<i>Microorganismo de Ensayo.....</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
<i>Preparación de los inóculos bacterianos</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
<i>Siembra en las Placas de Agar Müller Hinton</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
<i>Colocación de los Discos Impregnados</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
<i>Procedimiento para el antibiograma</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
<i>Lectura de las placas</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
Diseño de Análisis	58
CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÒN	59
Resultados	59
Discusión	66
CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	68
Conclusiones	68
Recomendaciones	69
BIBLIOHEMEROGRAFÍA	70

Anexos.....	87
--------------------	-----------

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE TABLAS

Nº		Pág.
1	Descripción Taxonómica del ganado bovino.....	17
2	Componentes de la leche.....	19
3	Clasificación de la mastitis clínica.....	23
4	Pruebas físicas de mastitis bovina.....	27
5	Mecanismos de Resistencia del <i>S.aureus</i>	42
6	Operacionalización del evento de estudio.....	44
7	Operacionalización de las variables.....	44
8	Definición operativa de variables e indicadores.....	49
9	Resultados de la prueba california de mastitis bovina.....	62
10	California mastitis (CMT). Interpretación.....	63
11	Resumen de la prueba de california de mastitis bovina	64
12	Microorganismos aislados según el tipo de mastitis (CMT).....	65
13	Resultados de la prueba de susceptibilidad de 2 cepas de <i>S.aureus</i> aisladas de muestras de leche. Método Kirby Bauer	66

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Nº		Pág.
1	Procedimiento de aislamiento bacteriológico.....	53
2	Preparación de los inóculos bacterianos.....	54
3	Procedimiento para la evaluación de la actividad antibacteriana por el método de difusión (Kirby-Bauer).....	57

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE FIGURAS

Nº		Pág.
1	Pared celular de las bacterias Gram positivas.....	37
2	Bacteria Gram positiva <i>Staphylococcus aureus</i>	38
3	Siembra en placas de Agar Müller Hinton.....	55
4	Discos de Antibióticos utilizados en el estudio.....	55
5	Placas con Agar Müller Hinton.....	56

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Nº		Pág.
1	Análisis estadístico de resistencia del antibiótico (Penicilina) en el <i>Staphylococcus aureus</i>	67

www.bdigital.ula.ve



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DPTO. DE BIOANÁLISIS CLÍNICO
CATEDRÀ COMPONENTE DE INVESTIGACIÒN
Dr. “José Rafael Luna”
UNIDAD CURRICULAR TRABAJO DE GRADO II



**Perfiles de Resistencia de cepas de *Staphylococcus aureus*,
en muestras de leche provenientes de vacas con Mastitis
bovina.**

Autor(a): María Isaura Sánchez M
C.I. V 16.563.847

Tutor(a): Prof.: Evelyn Alviàrez

RESUMEN

La mastitis es una enfermedad que afecta la salud de las vacas, como consecuencia la producción y calidad de leche se ven gravemente disminuida (Srednik et al, 2019). El objetivo de este estudio fue determinar los perfiles de resistencia de *Staphylococcus aureus*, en muestras de leche provenientes de vacas con Mastitis bovina de la finca, “El Milagro” vía Jajì, Municipio Campo Elías en el Estado Mérida, entre marzo 2022 hasta julio 2022. Se recolectaron 60 muestras de leche de 15 vacas en producción, se aplicó el diagnóstico de mastitis mediante la prueba conocida como Test California Mastitis (CMT). Se encontró que el 23,33% dieron positivo a mastitis sub clínica (positivo débil, positivo evidente) y un 76,66% fue negativo a mastitis. Para el análisis microbiológico se sembraron las muestras en agar sangre, agar Manitol, agar MacConkey y se incubaron a 36°C por 48 horas. Se realizaron pruebas bioquímicas de catalasa y coagulasa. La susceptibilidad antimicrobiana se determinó mediante el método de Kirby-Bauer. De la población muestreada en la finca, “El Milagro” vía Jajì, municipio Campo Elías en el estado Mérida. *Staphylococcus aureus*, fue causante de mastitis, representando el 14,28 % de la población bacteriana encontrada en la finca “El Milagro” vía Jajì, municipio Campo Elías del estado Mérida, también se aislaron *Enterococcus sp* y *Escherichia coli*. La sensibilidad del *Staphylococcus aureus*, el 100% fueron sensibles a Amikacina, Ciprofloxacina, Doxicilina, Eritromicina, Clindamicina, Linezolid, Oxaciclina, Tetraciclina y Trimetopim /sulfametoxazol. Además, se encontraron cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la Penicilina en un 100%. Los microorganismos aislados en este estudio, demostraron sensibilidad antibiótica a más de un antibiótico.

INTRODUCCIÓN

La mastitis es la enfermedad más común en los bovinos en todo el mundo y la más costosa para el productor por la pérdida de leche, vacas afectadas y el dinero invertido en Médicos Veterinarios y medicamentos (Cano H. , 2018) Además, los cambios en la composición de la leche (reducción de calcio, fósforo, proteína y grasa, e incrementos de cloro y sodio), reduce su calidad (Agrobit Gestión Agropecuaria 2017).

La mastitis es un síndrome ya que es multifactorial, es solamente un signo de más de 100 enfermedades y clínicamente significa inflamación de la glándula mamaria; la inflamación se debe a la presencia de patógenos que pueden causar alteraciones en el epitelio mamario (Cano, H. 2018). La mastitis también puede ser provocada por: lesiones físicas, mala desinfección de las ubres en el ordeño, máquinas de ordeño mal utilizadas, deficiente sellado post-ordeño, mal estado del sitio donde reposan las vacas, entre otros factores que permiten el ingreso de microorganismos patógenos a las glándulas mamarias o causan daño físico del tejido, provocando así su inflamación.

Las pérdidas económicas por mastitis en el ganado bovino son para el productor, por las pérdidas directas, entre las que se pueden mencionar: la eliminación de leche con mastitis, el tratamiento de la enfermedad, la eliminación de leche con antibiótico, tiempo con baja producción hasta que el animal se recupere totalmente, entre otras y para la industria debido a la disminución en el suministro de materia prima para su procesamiento y la baja cantidad de la misma (Pedraza, J. 2017).

La leche es el principal alimento para niños y jóvenes, como para los mamíferos jóvenes antes de que sean capaces de digerir otro tipo de alimento; la leche contiene altos niveles de proteína, grasa, minerales y vitaminas,

constituyéndose como un alimento indispensable en la dieta, igual que los derivados lácteos que se preparan a partir de ella, la cantidad higiénica de la leche, así como la inocuidad de la misma, dependen de las buenas prácticas ganaderas, de una correcta rutina de ordeño y del cumplimiento, de los tiempos de retiro, cuando se aplican tratamientos en animales de producción (Momtz.L., et al.2017).

La producción y calidad de leche como la rentabilidad para los productores, se ve disminuida cuando se presenta patologías como la mastitis, la cual es una enfermedad inflamatoria de origen infeccioso, traumático o tóxico, de alta incidencia en los hatos lecheros a nivel mundial, causante de grandes pérdidas económicas para los productores, debidas al descenso de la producción de leche, impactando la inocuidad alimentaria (Pellegrino, F., et al. 2017).

Staphylococcus aureus, conocido como estafilococo áureo o estafilococo dorado, es una bacteria anaeróbica facultativa, Gram positiva, productora de coagulasa, catalasa, inmóvil y no esporulada que se encuentra ampliamente distribuida por todo el mundo.

La justificación de esta investigación es debido a que la mastitis subclínica es una patología infectocontagiosa que se da en ganado bovino lechero, por el contacto de patógenos como el *Staphylococcus aureus*, que es una cepa muy resistente a los antibióticos, utilizados por los veterinarios para determinar el test de resistencia de este patógeno ante el medicamento expuesto.

Aunque se empleará métodos para la identificación de los *Staphylococcus aureus*, usada en estudios epidemiológicos y bacteriológicos, ya que las cepas son específicas para cada rebaño. Los resultados de los estudios serán de gran utilidad en el desarrollo de prácticas más efectivas para el control de la mastitis bovina asociada a *Staphylococcus aureus* y con base en la

importancia a la eficacia de los tratamientos farmacológicos utilizados para controlar la mastitis bovina.

El presente trabajo de Grado está estructurado en capítulos, siendo el Capítulo I El Problema, planteamiento del problema, objetivo general y específicos, justificación de la investigación, delimitación de la investigación; el Capítulo II Marco Teórico, antecedentes de la investigación, bases teóricas, sistemas de variables, definición de términos básicos y en el Capítulo III. Marco Metodológico, el cual está conformado por el tipo y diseño de investigación, población y muestra, unidad de investigación, selección del tamaño de la muestra, en el sistema de variable con el cuadro de operacionalización, técnicas e instrumentos de recolección de datos, procedimientos de la investigación, así como el diseño de análisis. En este mismo orden de ideas, en el Capítulo IV. Resultados y Discusiones. Capítulo V. Conclusiones y Recomendaciones de los hallazgos obtenidos en el presente trabajo de grado. Finalmente, se incluyen las bibliohemerografía que se utilizaron para el desarrollo de la investigación.

Este estudio se realizará con la finalidad de analizar los perfiles de resistencia de cepas de *Stapylococcus aureus*, en muestra de leche provenientes de vacas con mastitis bovina, en el Laboratorio de Bacteriología Roberto Gabaldòn del Departamento de Microbiología y Parasitología en la Universidad de los Andes (ULA) Mérida - Venezuela.

CAPITULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

La mastitis bovina es una enfermedad que afecta la producción y la calidad de la leche, siendo una de las causas más significante de pérdidas económicas para el productor y para la industria lechera a nivel nacional. Se estima que un tercio de todas las vacas lecheras están afectadas en uno o más cuartos, es así que económicamente, la mastitis afecta al productor lechero a través de costos que pueden ser clasificados en directos, como la leche rechazada durante el tratamiento con antibióticos con el fin de evitar la contaminación de la totalidad de la misma y el factible daño a la salud pública, los gastos de servicio médico veterinario y los medicamentos; e indirectos, donde se destacan la reducción del rendimiento de leche durante la lactancia, alteración de sus componentes con una disminución de la lactosa, calcio, fosforo, grasa y caseína, y un aumento de las proteínas séricas, cloro, sodio y pH. De esta manera no solo afecta a la leche sino también sus subproductos causando rancidez y gusto indeseable durante la conservación. Se consideran también costos indirectos el requerimiento de tiempo extra para el tratamiento y la elevada tasa de reemplazo y desecho que lleva a una pérdida del potencial genético.

Dentro de las formas de presentación de mastitis, la subclínica es la más importante, ya que produce baja en la producción de la leche; se puede diseminar dentro de los hatos rápidamente y no es posible detectarla

clínicamente, ya que se requiere de pruebas químicas de campo y de laboratorio para determinar la existencia de la enfermedad.

Actualmente, la multirresistencia de cepas bacterianas ha permitido ocasionar un fuerte problema para la salud pública nacional e internacional por la ineficiencia en el tratamiento y la transmisión de enfermedades zoonóticas.

La presente investigación, consiste en analizar los perfiles de resistencia de cepas de *Staphylococcus aureus*, en muestras de leche provenientes de vacas con mastitis bovina, en el laboratorio de Bacteriología Roberto Gabaldón del Departamento de Microbiología y Parasitología en la Universidad de los Andes del Estado Mérida - Venezuela. Después de describir el problema de estudio, se plantea el siguiente enunciado holopráxico:

¿Cuál será el perfil de resistencia antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus aureus*, en muestra de leche provenientes de vacas con mastitis bovina, en el laboratorio de Bacteriología Roberto Gabaldón del Departamento de Microbiología y Parasitología en la Universidad de los Andes (ULA), Mérida – Venezuela, a partir de marzo de 2022 hasta julio de 2022?

Justificación e Importancia de la Investigación

Las bacterias comprenden el mayor número de especies patógenas para el ganado bovino. Son organismos unicelulares y contienen ADN y ARN, pero no están diferenciadas en núcleo y citoplasma; se reproducen por fisión binaria. Con este estudio se pretende mediante el examen bacteriológico de muestras de leche recolectadas asépticamente (que son el único método definitivo para diagnosticar una infección intramamaria), conocer la presencia de cepas de *Staphylococcus aureus* productora de mastitis bovina. El aislamiento e identificación de los patógenos mamarios tienen gran importancia epidemiológica porque nos permite orientarnos sobre las posibles soluciones, para así entender mejor la situación de mastitis bovina en el país y pueda ser utilizada en el establecimiento de medidas preventivas aceptables, que además de económicas, prácticas y factibles deben ser efectivas en la reducción de la prevalencia de los agentes causales para erradicar las cepas con mayor potencial patógeno.

La importancia de la mastitis, tanto por razones de salud pública como salud animal y los costos que este padecimiento representa en los sistemas de producción, ya sea por la disminución del producto, alteraciones físico químicas, además de la presencia de estos agentes que pudieran afectar la salud humana; justifican el estudio de los diferentes procesos patológicos que afecta la glándula mamaria, en especial la mastitis y ha sido considerada como el padecimiento de tipo sanitario más importante y costo del ganado bovino lechero, está considerada como un problema de la salud más común, cuyas pérdidas representan la mitad de los costos totales de salud en el ganado bovino, ya que esta enfermedad radica no solo, en que es la mayor causante de pérdidas económicas tanto para el productor como para la industria lechera, sino también, para el consumidor por el deterioro de la calidad nutritiva e

higiénica de la leche, que es hoy en día uno de los factores más importantes para poder competir en los mercados industriales lechera (Lam et al., 2015).

Desde el uso masivo de los antibióticos se ha constatado a nivel mundial un aumento muy importante de la prevalencia de la resistencia, la introducción de los antibióticos en la práctica clínica supuso una de las intervenciones más importantes para el control de las enfermedades infecciosas.

Los antibióticos han salvado millones de vidas y, sin embargo, una amenaza creciente deteriora la eficacia de estos fármacos: la resistencia bacteriana a los antibióticos.

Por este motivo se realizará este proyecto de investigación que se basará en analizar los perfiles de resistencia de cepas de *Staphylococcus aureus* en muestras de leche provenientes de vacas con mastitis bovina, para demostrar su capacidad de resistencia en presencia de agentes antimicrobianos y de esta forma contribuir al desarrollo científico.

Objetivos de la investigación

Objetivo General

Analizar los perfiles de resistencia de cepas de *Staphylococcus aureus*, en muestras de leche de vacas con mastitis bovina provenientes de la finca “El Milagro” en el Estado Mérida.

Objetivos Específicos

- Conocer los resultados de la prueba de california para mastitis (CMT) en muestras de leche provenientes de vacas con mastitis subclínica de la finca “El milagro”, Jaji-Estado Mérida.
- Identificar mediante el cultivo microbiológico la presencia de *Staphylococcus aureus* en muestras de leche de vacas con mastitis bovina, provenientes de la finca “El Milagro”, Jaji- Estado Mérida.
- Realizar el método de difusión en disco para evaluar la susceptibilidad de las cepas de *Staphylococcus aureus*, ante los agentes antimicrobianos en muestras de leche con mastitis bovina, provenientes de la finca “El Milagro”, Jaji- Estado Mérida.
- Determinar los perfiles de resistencia a los antimicrobianos de las cepas de *Staphylococcus aureus*, procedentes de muestras de leche de vacas con mastitis bovina, provenientes de la finca “El Milagro”, Jaji- Estado Mérida.

Alcance de la Investigación

Hernández y cols (2008). El alcance de una investigación se relaciona con la profundidad del conocimiento sobre el fenómeno de estudio. No se deben considerar los alcances como tipos de “investigación”.

El presente estudio se realizó específicamente en el laboratorio de Bacteriología Roberto Gabaldón del Departamento de Microbiología y Parasitología de la ULA-Mérida, donde se analizaron los perfiles de resistencia de cepas de *Staphylococcus aureus* en muestra de leche provenientes de vacas con mastitis bovina. El alcance de esta investigación está dirigido al personal de salud y médicos veterinarios, con el fin de aportar conocimientos y actualizar los datos existentes en cuanto al mecanismo de resistencia que presenta el *Staphylococcus aureus*, con el fin de elaborar nuevos antibióticos y erradicar las enfermedades zoonóticas.

Limitaciones de la Investigación

Las principales limitaciones para llevar a cabo esta investigación estuvieron representadas por la dificultad de adquirir los antibióticos, debido a su elevado costo y por la poca disponibilidad para adquirir antimicrobianos reconocidos y elaborados por industrias calificadas.

CAPITULO II

MARCO TEÒRICO

Trabajos previos

Pedrozo, P.R. et al. (2021), publicaron un estudio titulado: Prevalencia de microorganismos y perfil de resistencia antimicrobiana en bovinos lechero de Paraguay. La mastitis bovina es la inflamación de las glándulas mamarias, causada mayoritariamente por invasión de microorganismos patógenos. El objetivo del estudio fue identificar los microorganismos más frecuentes aislados y determinar el perfil de resistencia antimicrobiana en función de las especies o grupo de especies de microorganismos aislados. Se tomaron 411 muestras de leche de igual número de vacas de cuartos positivos al California Mastitis Test (CMT), de razas lecheras de 3 departamentos de Paraguay (224, 137 y 50 muestras), que se sometieron a cultivos microbianos de identificación fenotípica de especies. La sensibilidad microbiana a antimicrobianos se evaluó por dilución en placa. Las frecuencias absoluta y relativa de microorganismos, así como las resistencias, se cuantificaron con el software Epiinfo 7.0 y reportando el 37.4% de los microorganismos correspondieron a *Staphylococcus aureus*, el 35.3% al grupo *Staphylococcus coagulasa negativos* (SCN) y el 16,1% a los *Enterococcus sp.*

Nicolás Ramírez Vásquez. et al. (2018), publicaron un estudio titulado: Identificación de microorganismos patógenos en muestras de leche con mastitis bovina. La mastitis bovina es la inflamación de la glándula mamaria, la cual es considerada la enfermedad infecciosa más común de la vaca especializada en producción de leche Según el grupo de expertos A2 de la

Federación Internacional de Lechería, la forma clínica de la mastitis se caracteriza por inflamación con calor, dolor, rubor y aumento de tamaño de la glándula mamaria o cambios en la apariencia de la leche. La técnica utilizada para medir la frecuencia de la mastitis clínica (MC) en hatos lecheros es por medio del cálculo de la tasa de incidencia de mastitis clínica (TIMC), la cual se ha reportado de 14,4% casos por cada 100 vacas-año a riesgo, 41,95% casos por cada 100 vacas-año a riesgo y 43,3% casos por cada 100 vacas-año a riesgo. Los autores no encontraron estudios publicados que reportaran la incidencia de mastitis clínica (TIMC) en Colombia.

Cervantes, P. et al. (2017), publicaron un estudio titulado: La identificación primaria de microorganismos patógenos causantes de mastitis subclínica en una región del trópico, se utilizaron 214 vacas de 6 unidades de producción, 4 en sistemas de doble propósito constituidas por razas criollas locales y 2 de lechería familiar con razas europeas adaptadas, clasificadas por adopción buenas prácticas de ordeña calificadas como mediana (BPM) o baja (BPB) y de ordeña manual y mecánica. La prueba tamiz se realizó por la prueba de California Mastitis Test (CMT), a partir del resultado trazas se hizo conteo de células somáticas, valores $> 200,000$ células/mL, se cultivaron en medios enriquecidos y 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*. Los diferentes sistemas y/o prácticas se analizaron por H de Kruskal-Wallis y la prueba binomial (de dos colas), para analizar la proporción entre las prácticas ($p < 0.05$). El 100 % de las vacas padecían mastitis; la ordeña mecánica se asoció ($p > 0.05$) con CMT y cuentas > 900 CCS/mL, la ordeña manual con CCS > 600 /mL, ambas en lechería familiar y BPB; los hatos doble propósito, ordeña manual y vacas criollas locales se asociaron a BPB. 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 con doble propósito y ordeña manual fueron los Gram negativos.

Frola, D. et al. (2017), publicaron un estudio titulado: Resistencia a antibióticos de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de leche con mastitis bovina. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la resistencia de cepas de *S. aureus* aisladas de leche frente a antimicrobianos utilizados en el tratamiento de la mastitis bovina y estudiar la relación entre las cepas resistentes y la presencia de casos de la enfermedad. De las 271 muestras de leche se aislaron 300 cepas bacterianas, de las cuales 21% fueron identificadas como *S. aureus*. El 58,7% de las cepas de *S. aureus* mostraron resistencia por el método (Kirby-Bauer) a uno o más antibióticos, el 70,3% fueron aisladas de vacas con mastitis. Además, el 36,5%, 22,2% y 20,6% fueron resistentes a eritromicina, penicilina y estreptomicina, respectivamente, y el 19% presentaron multirresistencia. Todas las cepas de *Staphylococcus aureus* estudiados fueron sensibles a Gentamicina, ampicilina/sulbactam, rifampicina y oxacilina. El análisis de los datos permitió determinar que no existe asociación directa entre la presencia de mastitis y el aislamiento de *S. aureus* resistentes.

Antecedentes Históricos

Según Arias, D. (2017), los antecedentes históricos o epistemológicos “reflejan los avances y el estado actual del conocimiento en un área determinada y sirven de modelo o ejemplo para futuras investigaciones, es decir, se refieren a los estudios previos que guardan relación con el objeto de investigación”. A continuación, se presentan algunos antecedentes que fundamentan y sustentan el presente estudio.

El *Staphylococcus aureus*, fue descrito por primera vez en el año 1880, concretamente en la ciudad escocesa de Aberdeen, por el cirujano Alexander Ogston, en el pus que drenaba un absceso infectado. En 1884 Friederich Julius Rosen Bach, acuñó el nombre binomial de esta especie.

En el año 1928, Alexander Fleming, un científico escocés, descubrió de manera fortuita la penicilina, observando cómo un moho que contaminaba una de sus placas de cultivo inhibía el crecimiento de *Staphylococcus aureus*.

Fleming caracterizó el producto y como lo producía un hongo del género *Penicillium* lo denominó penicilina. Este hallazgo fue publicado en el año 1929 en el British Journal of Experimental Pathology. Sin embargo, no fue hasta 1939, cuando los investigadores Howard Florey y Ernst Chain, desarrollaron métodos para el análisis y ensayo de la penicilina para su producción en gran escala. En aquel momento estaban muy preocupados por el problema de la II Guerra Mundial y por las infecciones que afectaban a los soldados de guerra, que eran de muy difícil curación. Por ello, en 1941 se consiguió disponer de penicilina para su uso tanto a nivel militar como civil. Fleming compartió el Premio Nobel de Medicina en 1945, junto a Florey y Chain (Torres, G. 2017).

En 1941 las infecciones estafilocócicas eran erradicadas por penicilina. Un poco más tarde, en 1945, Sprink Ferris reportó una cepa de *S. aureus*

resistente a la penicilina que por la acción de una B-betalactamasa, la destruía. Para 1950, con la introducción de la penicilina y las sulfonamidas, los estreptococos fueron desplazados por los estafilococos como agentes de infección y para 1959, año en que apareció la meticilina (una penicilina semisintética), 60% de las cepas ya eran resistentes a la penicilina. En 1961 Jevons hizo el primer reporte de la existencia de un *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina; cuando esta era una causa importante de infección nosocomial en Europa.

El descubrimiento de la penicilina, que fue el primer compuesto natural con actividad antibacteriana, supuso un hito en la historia de la Medicina y un antes y un después en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. La industria farmacéutica inició una carrera para obtener nuevas moléculas de antibióticos a partir de diferentes microorganismos, preferentemente del suelo, o derivados semisintéticos de los mismos. Se descubrieron una gran variedad de estos compuestos pertenecientes a diversas familias (beta-lactámicos, amino glucósidos, tetraciclina, macrólidos, entre otras.). Fue la era dorada para estos fármacos y se creía que la batalla contra las enfermedades infecciosas estaban ya ganada. Así mismo, se investigó en el desarrollo de antimicrobianos sintéticos que fueron también empleados en terapéutica humana y animal. Disminuyó de manera muy importante la mortalidad y la morbilidad infantil (Torres, G. 2017).

En muchas bacterias de interés clínico se han producido cambios importantes en los fenotipos de resistencia a los antibióticos, y este fenómeno ha sido especialmente relevante en los últimos años para algunas asociaciones bacteria-antibiótico. En este sentido, cabe destacar los problemas clínicos derivados de la emergencia y diseminación a nivel hospitalario o comunitario de enterobacterias resistentes a cefalosporinas de amplio espectro o a carbapenémicos por producción de diferentes tipos de

beta-lactamasas; de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) y recientemente a linezolid o vancomicina; de *Enterococcus* resistente a vancomicina; de *Pseudomona aeruginosa* o *Acinetobacter* resistentes, incluyendo la producción de muy diversas carbapenemasas, entre otros. Actualmente existen, por ejemplo, cepas de *P. aeruginosa* o de *Acinetobacter* que son resistentes a la mayor parte de los antibióticos disponibles por lo que se plantean serios problemas terapéuticos y, en ocasiones, se tiene que recurrir a antibióticos muy antiguos que son a veces los únicos eficaces para tratar determinados patógenos, como por ejemplo la colistina Según (Pulcini, 2018).

Todos estos trabajos sirven de sustento a la presente investigación, puesto que en cada uno de ellos se refleja parte de la problemática seleccionada, al mismo tiempo que aportan ideas para enfrentarla y dar soluciones a la misma.

www.bdigital.ula.ve

Bases Teóricas

Aproximaciones Teóricas.

Son un conjunto de ideas generalmente ya conocidas en una disciplina que permite organizar el conocimiento, ya que las bases teóricas “implican un desarrollo amplio de los conceptos y proposiciones que conforman el punto de vista o enfoque adoptado, para sustentar o explicar el problema planteado”. Según lo expuesto por el autor, las bases teóricas son aquellas que permiten desarrollar los aspectos conceptuales del tema objeto de estudio. Por lo tanto, los constructos teóricos presentados se relacionan con la temática de la investigación. (Arias 2018)

Aproximaciones Teóricas sobre la Mastitis

Ganado bovino

Es un mamífero artiodáctilo de la familia de los bóvidos. Anteriormente era considerado una subespecie de *Bos Primigenius*, pero un estudio reciente lo considera una especie distinta. El nombre científico es el que se le asignó al animal vacuno. Se trata de un mamífero rumiante grande y de cuerpo robusto, con 1,2 – 1,5 m (metros) de altura y 600-800kg (Kilogramos) de peso medio.

En el contexto de la ganadería, se utiliza el término vacuno o bovino para designar esta especie, aunque este último término también designa de manera más amplia al conjunto de la familia Bovidae. (Bartlett, 2018)

Tabla.1.-Descripción Taxonómica del Ganado Bovino

Reino	Animal
Pylum	Chordata
Clases	Mammalia
Orden	Artiodactyla
Sub – orden	Rumiantae
Familia	Bovidae
Género	Bos
Especie	Bosprimigenius

Fuente: (Sagar. 2014)

Anatomía de la glándula mamaria

La ubre es un gran cuerpo glandular de origen dérmico, considerada como una glándula sudorípara modificada y cubierta externamente por una piel suave al tacto, provista de vellos finos excepto en los pezones. Su apariencia redondeada, se encuentra fuera de la cavidad del cuerpo, adosándose a la pared abdominal por medio del aparato suspensorio. (Patiño castaño, 2021).

La ubre cumple función de nutrir al becerro y consta de cuatro cuartos. Cada cuarto representa una unidad. Ello da como resultado que la enfermedad mastitis puede estar confinada a un cuarto, cada cuarto de la ubre consta del cuerpo glandular y el pezón. La ubre está formada por un sistema de conductos, compuestos por la cisterna del pezón, la cisterna de la glándula, los canales lácteos y los alvéolos (Castañeda, 2018)

Inmunología de la glándula mamaria

Existe una serie de características de defensa propia de la glándula que ayudan en gran medida a prevenir o disminuir estos cuadros infecciosos. A los mecanismos de la glándula se los puede clasificar en inmunológicas o específicos y no inmunológicas o inespecíficos. Estos últimos pueden ser físicos (esfínter del pezón, tapón de queratina del canal del pezón, ordeño) o humorales (lactoperoxidasa, lisozima, lactoferrina, complemento (Corbellini., 2017)

Los mecanismos inmunológicos o específicos están constituidos por el sistema humoral (anticuerpos y otros factores solubles) y el sistema inmunológico de base celular, incluyendo el sistema fagocítico (Macrófagos, neutrófilos y polimorfo nucleares) y el sistema linfoideo (linfocitos T y B) (Giraud, 2017).

Leche

Es una secreción nutritiva de color blanquecino opaco producida por las células secretoras de las glándulas mamarias de los mamíferos ya que proporciona nutrientes esenciales, energía alimentaria, proteínas de alta calidad y grasas (Mercedes García 2021)

Tabla.2.-Componentes de la Leche

Agua: 82%
Sólidos no grasos: 6%
Sólidos totales: 12%
Proteínas: caseína, globulinas, albumina
Azúcar: lactose
Minerales: Na, K, Mg, Ca, Mn, Fe, Co, Cu, P. Fluoruros y yoduros
Vitaminas: A, D, K, B1, B2, B6, B12, C, nicotinamida, biotina y ácido fólico.

Fuente: (Gómez, 2019)

Mastitis: (del griego mastos = glándula mamaria y del sufijo itis = inflamación). Se define como la inflamación de la glándula mamaria que generalmente se presenta como una respuesta a la invasión por microorganismos y se caracteriza por daños en el epitelio glandular, seguido por una inflamación clínica o subclínica, pudiendo presentarse con cambios patológicos localizados o generalizados, dependiendo de la magnitud del daño (Àvila, 2018)

Mastitis Bovina: constituye una reacción inflamatoria de la glándula mamaria que puede ser ocasionada por factores físicos, químicos, aumento del número de células somáticas por la presencia de microorganismos patógenos y finalmente cambios como la pérdida de la funcionalidad. Esta reacción inflamatoria ocurre como consecuencia de la respuesta de los tejidos a lesiones traumáticas, a sustancia irritantes o la presencia de agentes

infecciosos y sus toxinas que han logrado colonizar el tejido secretor (Miller, Y Bartlett, Z. 2018).

Patogénesis de la Mastitis

El desarrollo de mastitis es complejo y se puede explicar en tres etapas: invasión, infección e inflamación del área dañada. (Lòpez, 2017)

Invasión: Las bacterias causantes de la mastitis penetran a las glándulas mamarias a través del canal del pezón, que se convierte en la primera y más importante barrera de defensa de la glándula mamaria. De ahí la gran importancia de reducir la carga microbiana de la piel del pezón y preservar la funcionalidad del canal y del esfínter, antes que las bacterias penetren y colonicen el parénquima, porque en este último caso, ocurre la respuesta inflamatoria y con ella el daño al epitelio secretor y la calidad de la leche. Considerando lo pequeño de la longitud del canal (8-15mm), la estructura microscópica y bioquímica del canal son muy efectivas en evitar la penetración bacteriana, incluyendo el estado funcional del esfínter.

Infección: Es la etapa en la que los gérmenes se multiplican rápidamente e invaden el tejido mamario; se establece una población microbiana que se disemina por toda la glándula, dependiendo de la patogenicidad del microorganismo. El tipo de bacteria determina su capacidad de multiplicarse en la leche y adherirse al epitelio mamario. La virulencia de especies bacterianas individuales al parecer se debe, por lo menos en parte, a esta capacidad de adherencia. La infección se produce más fácilmente en el período de secado, debido a la ausencia de flujo. Se ha aceptado en términos generales este concepto, pero un análisis cuidadoso sugiere que la susceptibilidad es alta en el periodo de secado, aunque mucho menor en el cuarto glandular que ha permanecido seco durante algún tiempo.

Inflamación del área dañada: Una vez que las bacterias (o sus toxinas) superan la línea de defensa del canal del pezón y alcanzan los tejidos altos, comienza a operar la segunda línea de defensa, que incluye a factores humorales inespecíficos presentes en la leche o secreción de la ubre seca (lactoferrina, inmuno-lacto-peroxidasa, lisozima, fracciones del complemento y otros compuestos químicos) y los mecanismos de defensa inmunológicos o específicos, ya sea de tipo humoral (inmunoglobulinas y otros factores solubles) o de base celular, incluyendo el sistema fagocítico (macrófagos y polimorfonucleares) y el sistema linfocitario (linfocito T, B y sin clasificar). Polimorfonucleares, macrófagos, linfocitos y escasas células epiteliales constituyen las llamadas células somáticas.

Clasificación Epidemiológica de la Mastitis

De acuerdo a lo establecido por Cotrino, F. en el 2018, dependiendo del hábitat de los microorganismos causantes de la enfermedad y su mecanismo de transmisión, epidemiológicamente la mastitis se clasifica en:

Mastitis Contagiosa: El agente infeccioso habita en el interior de la glándula mamaria de animales enfermos de mastitis clínica o subclínica y se transmite de animal a animal o de pezón a pezón por las manos del ordeñador y la pezonera o cuando en el equipo de ordeño se generan problemas de reflujo. Pertenecen a esta categoría *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma bovis* y *Corynebacterium bovis*.

Mastitis Ambiental: Son producidas por una variedad de microorganismos presentes en el ambiente donde viven las vacas. Una multitud de microorganismos pueden causar mastitis ambientales, entre otros: especies de *Streptococcus* distintos de *agalactiae* (*Streptococcus uberis*, *dysgalactiae* y otros), bacterias coliformes (*E. coli*, *Klebsiella sp*).

Estos microorganismos ingresan al cuarto mamario entre un ordeño y otro. Las fincas con problemas de Mastitis ambientales tienen altos niveles de mastitis clínica y pueden tener bajos Contaje de Células Somáticas (si la detección y los tratamientos de Mastitis Clínica son eficaces).

Mastitis Iatrogénica: Es producida por el uso inadecuado de sondas intramamarias y/o la aplicación de medicamentos por esta vía sin cumplir con las medidas antisépticas requerida.

Clasificación de la Mastitis según su Sintomatología

Según Peralta, (2018), de acuerdo al grado de intensidad de la infección, la mastitis se puede clasificar según su sintomatología:

- **Mastitis Subclínica**

Es definida como la presencia de un microorganismo en combinación con un conteo elevado de células somáticas de la leche. El conteo elevado de células somáticas en la leche indica mastitis subclínica, este tipo de mastitis no presenta cambios visibles en la leche o ubre. Para detectarla debe realizarse un análisis clínico en el que se realice un recuento de células somáticas, cultivo de bacterias de la leche u otros análisis. (Schrack, V. et al., 2019).

Se caracteriza por el reducido rendimiento de leche y la composición alterada de la leche y la presencia de componentes inflamatorios y bacterias en la leche (Heringstad, 2018)

- **Mastitis Clínica**

Varios autores definen la mastitis bovina como una respuesta inflamatoria de la glándula mamaria. Se caracteriza por la entrada de células somáticas

principalmente neutrófilos y polimorfonucleares a la glándula mamaria por un aumento en el contenido de proteasa en la leche producida (Kers, 2017).

Se caracteriza por la tumefacción o dolor en la ubre, enrojecimiento, la leche presenta una apariencia anormal y, en algunos casos, hay aumento de la temperatura rectal, letargo, anorexia e incluso la muerte. Además, las bacterias están presentes en la leche, el rendimiento es muy reducido, y su contenido está alterado considerablemente (Heringstad, 2018)

Tabla 3. Clasificación de la Mastitis Clínica

CLASIFICACIÓN DE LA MASTITIS CLÍNICA	
Clasificación	Cuadro Clínico
<i>Mastitis Severamente Aguda</i>	Se presenta como una ubre roja, hinchada y dolorida, con tejido de la glándula mamaria dura, leche anormal y disminución de la producción de leche.
<i>Mastitis Suave Moderada</i>	De presentación súbita que se presenta con un decremento en producción de leche y alteraciones que pueden ser de aspecto seroso, con hilos de fibrina, coágulos y grumos.
<i>Mastitis Suave Ligera</i>	En este cuadro es frecuente en que no se aprecien cambios aparentes en la ubre y únicamente al inicio del ordeño se observen pequeños grumos en la secreción láctea.
<i>Mastitis Crónica</i>	Microscópicamente puede verse necrosis tisular, tejido de granulación o infiltración de células inflamatorias tales como linfocitos, células plasmáticas, macrófagos y células gigantes multinucleadas
<i>Mastitis Gangrenosa</i>	Esta forma clínica es ocasionada cuando los microorganismos involucrados o sus toxinas producen vasoconstricción, isquemia y muerte del tejido.

Fuente: (Ávila, T y Gutiérrez, R. 2018)

Factores Predisponentes de la Mastitis

Microorganismo

Según Hans Andresen. (2019) Los microorganismos causantes de mastitis pueden ser agrupados en 3 categorías:

- **Los que causan mastitis contagiosa:** (fundamentalmente *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, Coagulasa positivo y *Mycoplasmas* spp).
- **Patógenos comunes del entorno ambiental:** en que viven las vacas (fundamentalmente coliformes, *Streptococcus* ambientales y *Staphylococcus* coagulasa negativos)
- **Patógenos no comunes:** del ambiente (*Arcanobacterium pyogenes*, *Pseudomona aeruginosa*, levaduras, *Nocardia*, asteroides, el alga incolora *Prototheca* spp, y muchos más).

Prevención y Control de la Mastitis Bovina.

Prevención: La prevención de la mastitis puede conseguirse siguiendo pasos muy simples que tienen como objetivo el reducir el grado y la duración de la infección.

Adecuada higiene de ordeño, los pezones deben de ser limpiados y secados antes del ordeño.

La máquina de ordeño debe funcionar y ser operada adecuadamente. Los niveles de vacío en la unidad de ordeño deben estar entre 275 y 300 mm de mercurio y debe fluctuar lo menos posible. Las fluctuaciones pueden reducirse considerablemente evitando las entradas de aire o deslizamientos de la unidad durante el ordeño, y apagando el vacío de la unidad antes de que las

pezoneras sean removidas. El regulador de vacío debe ser mantenido limpio y su exactitud debe monitorearse en forma regular. Sellado de pezones luego del ordeño.

Las investigaciones indican que el grado de nuevas infecciones puede disminuir en más del 50% cuando un desinfectante adecuado se utiliza para sumergir o rociar los pezones completamente.

El sellado de pezones post-ordeño es más efectivo contra *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*, las dos bacterias productoras de mastitis más contagiosas. El sellado de pezones no afecta las infecciones existentes.

Tratamiento al secado de todos los cuartos. El uso efectivo de un antibiótico a largo plazo colocado en cada cuarto de la ubre en el último ordeño de la lactancia, reduce la incidencia de nuevas infecciones durante el período de seca.

www.bdigital.ula.ve

Control

El control de la mastitis implica la aplicación de un programa completo, que abarque medidas higiénicas y de manejo, cuyo objetivo final es reducir al máximo la necesidad de recurrir al tratamiento químico-terapéutico; usualmente muy costoso. Un programa completo comprende lo siguiente:

- Mantenimiento óptimo de las condiciones de limpieza en los alojamientos (camas individuales).
- Higiene personal de los ordeñadores (Manos y salud en general).
- Prácticas de ordeño que abarquen, lavado de ubre y pezón, secado y sellado de pezones con solución desinfectante después de cada ordeño.
- Mantenimiento funcional de los ordeños mecánicos.

- Diagnóstico periódico del funcionamiento del equipo.
- Pruebas mensuales de detección de mastitis (prueba de California para mastitis (CMT)).
- Muestreo frecuente de leche en casos clínicos para análisis bacteriológicos y de sensibilidad a los antibióticos.
- Tratamiento de todas las vacas al momento de secarse para reducir la incidencia a la siguiente lactación.
- Cambio periódico de pezoneras y piezas, de ser posible ordeñar vacas de primera lactación en grupos aparte para evitar contagios.
- Eliminación de casos crónicos y contagiosos.
- Factores de riesgo.
- Errores de manejo como el sobre ordeño Mamilas de ordeño de tamaño inadecuado Falta de sellado de los pezones al término del ordeño Lavado deficiente o inadecuado de la ubre. Equipo o material contaminado. Época de lluvia, edad, implantación de la ubre, etc. Un ambiente sucio predispone en gran medida a la presencia de mastitis.

Aproximaciones Teóricas sobre los Diagnósticos de Laboratorio para la Detección de la Mastitis Bovina

Observación y Palpación de la Ubre

En la mastitis subclínica, la ubre de la vaca permanece aparentemente sana, la leche que produce, a simple vista, es una leche normal, pero una infección incipiente puede estar dañando el tejido glandular y provocando por lo tanto una alteración en la leche que esta produce (Erans, 2018)

La infección puede provocar inflamación de uno, varios cuartos o de toda la glándula, aumento de la temperatura en el área afectada, así como

enrojecimiento de la zona y dolor, estos eventos provocan que el sistema inmune del animal actúe tratando de aliviar el problema, además de lograr la mayoría de las veces mantener la infección únicamente en el área afectada sin alterar otros órganos o sistemas del animal. Cuando se encuentran todos o alguno de los síntomas enumerados por medio de palpación se puede interpretar como un caso de mastitis clínica, donde además se encuentran cambios importantes en la leche que produce el tejido afectado, estos cambios pueden consistir en alteración del color, aparición de grumos, coágulos sanguinolentos, coágulos con pus, o una leche más acuosa, entre otros.

Pruebas Físicas

Estas sólo son útiles cuando la mastitis ya está avanzada y no detectan mastitis subclínica (Evans, A. et al. 2017).

Tabla 4. Pruebas Físicas de Mastitis Bovina

Clasificación	Cuadro Clínico
<i>Prueba de la escudilla de ordeño</i>	Para leches anormales, se recoge la leche sobre un tejido negro extendido encima de la escudilla, los grumos se hacen así muy visibles.
<i>Prueba del paño negro</i>	. Consiste en la detección de grumos en la leche (tolondrón) haciendo pasar los primeros chorros a través de una malla negra o bien utilizando una cubetilla especialmente diseñada para esta técnica.
<i>Taza probadora</i>	Consiste en examinar los primeros chorros de leche de cada ordeño sobre un recipiente (strip cup) de fondo oscuro. Los coágulos, escamas, hilos, materia fibrosa, secreciones acuosas, o color anormal indican que la leche no es normal y que hay problemas probables.

Fuente: (Evans, A. et al. 2017).

Pruebas químicas

Se clasifican en: La conductividad eléctrica de la leche, papel indicador de mastitis y la prueba de Whiteside.

La Prueba de Conductividad Eléctrica (PCE): Se ha utilizado como un indicador de la mastitis durante la última década, se basa en el aumento de conductividad eléctrica de la leche debido a su mayor contenido electrolítico especialmente iones de sodio y de cloro y se ha desarrollado como un método para monitorear el estado de la mastitis en la vaca (Medina, T. *et al.* 2018).

Esta técnica es importante porque mide la lesión, como es el caso del recuento celular. Sin embargo, sus limitaciones probablemente restringen su uso a vacas de producción elevada que se mantienen en rebaños pequeños, o en laboratorios con auto analizadores. Permite la identificación de la mastitis clínica con precisión, pero en el caso de las mastitis subclínicas, la precisión es solo del 50% en comparación con los métodos estándar (Radostits, M. 2017).

Papel indicador de mastitis: Este método, consiste en un papel sobre el que se hace caer directamente del pezón algunas gotas de leche, se consideran sospechosas las leches que dan una coloración correspondiente a un pH igual o superior a 7. La prueba descubre el 50% de las leches infectadas (Charles, H. 2017)-

Prueba de Whiteside: La mezcla de leche con una solución de NaOH al 4% ocasiona que la leche se gelifique formando grumos que son visibles. Los grumos serán más grandes conforme la leche contenga mayor número de células somáticas. Para hacer más visible la reacción es conveniente usar una placa de acrílico negro que puede tener dibujada 4 cuadros de 3cm x 3cm, uno por cada cuarto (Ávila, T. y Gutiérrez, R. 2018).

Pruebas biológicas

Se clasifican en: La prueba de California para mastitis, prueba de Wisconsin y el monitoreo de células somáticas, así como el diagnóstico bacteriológico por los métodos de aislamiento, cultivo, tinción, bioquímica e identificación (Erskine, M. 2018).

La prueba de california mastitis (CMT): Es una prueba sencilla que es útil para detectar la mastitis subclínica por valorar el recuento de células de la leche. No proporciona un resultado numérico, sino más bien una indicación de si el recuento es elevado o bajo, por lo que todo resultado por encima de una reacción vestigial se considera sospechoso (Bedolla, Z. 2017).

Es una prueba indirecta que determina la cantidad de ADN, que depende principalmente del número de leucocitos nucleados existentes en la leche.

Basada en la cantidad de gel que existe cuando reaccionan volúmenes iguales de leche y reactivo.

Pasos a seguir para la realización de la Prueba de California

1. Se desecha la leche del pre ordeño.
2. Se ordeñan uno o dos chorros de leche de cada cuarterón en cada una de las placas de la paleta.
3. Se inclina la paleta de modo que se desecha la mayor parte de esta leche.
4. Se añade a la leche un volumen igual de reactivo.
5. Se mezcla el reactivo y se examina en cuanto a la presencia de una reacción de gelificación. Antes de continuar con la vaca siguiente se debe enjuagar la placa.

Los resultados pueden ser expresados desde el resultado negativo en el que la leche y el reactivo siguen siendo acuosos, hasta el recuento de células más elevado en el que la mezcla de la leche y el reactivo casi se solidifica, esto se determina por la reacción de gelificación.

La prueba consiste en el agregado de un detergente a la leche, el alquil-arilsulfonato de sodio, causando la liberación del ADN de las células presentes y este se convierte en combinación con agentes proteicos de la leche en una gelatina. A mayor presencia de células se libera una mayor concentración de ADN, por lo tanto, mayor será la formación de la gelatina, traduciéndose en nuestra lectura e interpretación del resultado como el grado más elevado de inflamación. Además, la prueba posee un colorante (púrpura 40 de bromocresol) que indica los cambios de pH ocurridos en la leche a raíz de la inflamación (Bedolla, Z. 2017)

La prueba de Wisconsin para mastitis (WMT): Fue diseñada para el uso en el laboratorio, y es utilizada para estimar el contenido de células somáticas de muestras de leche fresca mezclada o leche de tanques de enfriamiento, así como para muestreo de vacas individuales.

Se utiliza una solución similar a la que se emplea con la prueba de California (CMT), pero en contraste con esta última, los resultados se miden cuantitativamente dependiendo de la viscosidad, no cualitativamente o de estimarla a ojo de buen cubero como en la CMT (Fernández, C. 2018).

Pruebas bacteriológicas

Los cultivos en laboratorios son necesarios para identificar los organismos específicos que se encuentran comprendidos en un caso clínico de mastitis y

para distinguir los animales sanos de aquellos que presentan un caso subclínico. (Erskine, M. 2018).

Los procedimientos bacteriológicos son esenciales para la selección de los agentes terapéuticos que tienen especificidad para el germen presente (Philpot, B. 2019).

- **Medios de cultivos**
- Agar sangre de carnero al 5%
- Agar MacConkey
- Agar Manitol Salado

Agar sangre de carnero al 5%: Este medio de cultivo es utilizado para el aislamiento de numerosos microorganismos. Al ser suplemento con sangre ovina, permite el crecimiento de microorganismos nutricionales exigentes y la clara visualización de reacciones de hemólisis, durante el estudio fue utilizado para el aislamiento de microorganismo Gram positivos y Gram negativos. (Hogan, A. et al. 2017).

En la preparación comercial del medio es visible la sangre de oveja o en lugar sangre de vaca controlando las colonias de *Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus aureus*, que producen zonas de hemólisis en estos medios (Hogan, A. et al. 2017). El suero y la sangre completa se añaden para promover el crecimiento de los microorganismos menos resistentes.

Agar MacConkey: Se emplea para el aislamiento de enterobacterias, debido a que las sales biliares y el cristal violeta ejercen una inhibición significativa sobre las bacterias Gram positivas. Las colonias lactosas positivas son de color rosado, las bacterias no fermentadoras son incoloras (BBL, 2017).

Agar manitol salado: Es un medio selectivo usado para el aislamiento de estafilococos patógenos, especialmente *Staphylococcus aureus*, considerado un patógeno bacteriano serio desde que desarrolló resistencia a la penicilina en 1950. El agar manitol salado o siglas MSA. Permite el crecimiento de bacterias Gram-positivas mientras inhibe el crecimiento de Gram-negativas, contiene peptonas y extractos de carne bovina, que suministran los nutrientes esenciales. Una concentración de cloruro sódico de 7,5% tiene como resultado una inhibición parcial o completa de los organismos bacterianos diferentes de los estafilococos. (Hogan, A. et al. 2017).

Pruebas de sensibilidad por difusión en agar (Kirby Bauer)

El principio de esta técnica se basa en colocar un disco de antibiótico sobre la superficie del agar, en el que previamente se ha inoculado la cepa bacteriana en estudio; el disco va a captar la humedad y el antibiótico difunde radialmente hacia fuera a través del agar, produciendo un gradiente de concentración del antibiótico. A medida que aumenta la distancia desde el disco, disminuye la concentración del antibiótico. Este método se utiliza en los laboratorios de práctica para evaluar la eficacia de un agente antimicrobiano. (Tortora, C. et al., 2017).

Medio Agar Müller Hinton (MH)

Es un medio estándar utilizado para la prueba de sensibilidad de bacterias aerobias de rápido crecimiento o anaerobias facultativas, como *Staphylococcus*, *Enterococcus*, miembros de especie Enterobacteriaceae y bacilos Gram negativos aerobios.

Concentración del inóculo

La concentración ideal del inóculo corresponde a una dilución de turbidez 0,5 en la escala de McFarland. Concentraciones diferentes pueden dar lugar a interpretaciones erróneas de los resultados (Bailey, L. et al., 2017).

Concentración de los discos de antibióticos

La concentración apropiada de fármacos para cada disco es establecida por la Food and Drug administration (FDA). Hay discos de diversos orígenes comerciales que deben mantenerse a -20°C en un desecador hasta su uso. Una vez descongelados los discos sin usarse a 4 y 8 C durante una semana. El almacenamiento inadecuado puede producir el deterioro de los agentes antimicrobianos y diámetros de halos engañosos (Bailey, L. et al., 2017).

Pruebas bioquímicas para la identificación del género de *Staphylococcus*

Prueba de catalasa: La prueba se considera positiva cuando se produce una efervescencia rápida con desprendimiento de burbujas, la enzima catalasa convierte el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular. Esta prueba se emplea para diferenciar los géneros *Micrococcus* y *Staphylococcus* (catalasa positiva) del género *Streptococcus* (catalasa negativa), (Marrero, B. 2017).

Prueba de coagulasa: Detecta el factor de coagulación asociado a células (denominado coagulasa), que reacciona con el fibrinógeno, es el método más ampliamente usado para distinguir *Staphylococcus aureus* de *Staphylococcus*

sp. Coagulasa-Negativa. La prueba en tubo de coagulasa es considerado más efectivo que la prueba en placa (Predari, E. et al. 2018).

Se utiliza para diferenciar especies del género *Staphylococcus*, específicamente *Staphylococcus aureus* (coagulasa positiva) del resto de las especies (coagulasa negativa)

Monitoreo del conteo de células somáticas

Con el nombre de células somáticas se designa a las células del propio organismo. Por tanto, las células somáticas son células corporales. Éstas pasan a la leche procedente de la sangre y del tejido glandular (Bedolla, Z. 2017)

Las glándulas mamarias que nunca se han infectado normalmente tienen un recuento de células somáticas de 20.000 a 50.000/mL. Un conteo de células somáticas mayor de 200.000 células/mL, indica la presencia de mastitis subclínica y un conteo de células somáticas mayores de 500.000 células/mL. Indica que un tercio de las glándulas se encuentran infectadas y que la pérdida de leche debido a mastitis subclínica es mayor de 10%. (Hernández, Bedolla y García, 2018).

La leche de una ubre sana presenta pocas células somáticas. En este caso se trata de células de tejido (células epiteliales) y células inmunes (neutrófilos polimorfo nucleares, granulocitos, macrófagos, linfocitos).

Aproximaciones Teóricas sobre los Antibióticos para la Mastitis Bovina.

Generalidades de los antibióticos

Los antibióticos son sustancias químicas producidas por organismos vivos y también de forma sintética (quimioterapéuticos) capaces de matar o inhibir el crecimiento de los microorganismos. Los antimicrobianos pueden ser clasificados de acuerdo a varios criterios y cada clase de antibiótico es caracterizado por una estructura química base y varios miembros de una clase se diferencian por la adición o remoción de una estructura química secundaria. De acuerdo al espectro de acción se clasifican como amplio y reducido, dependiendo del rango de especies bacterianas contra las cuales tienen efecto. En base a su efecto, se clasifican en bacteriostático cuando inhiben la reproducción bacteriana sin producir la muerte o lisis bacteriana, el efecto es reversible y en bactericida cuando producen la muerte celular bacteriana, su efecto es irreversible. (Guardabassi, B., y Courvalin, E., 2019)

Otra forma de clasificación es según su origen, en donde pueden ser naturales cuando se obtienen a partir de microorganismos bacterianos y fúngicos, semisintéticos que se obtienen por modificaciones químicas de otros antimicrobianos generales y los sintéticos que se obtienen por síntesis químicas. Adicionalmente, se clasifican de acuerdo a su mecanismo de acción, donde pueden inhibir la síntesis de la pared celular, alterar la permeabilidad de la membrana celular, inhibir la síntesis de proteínas, inhibir la síntesis de ácido nucleído, o inhibir una ruta metabólica (Cavalieri, A. et al. 2018).

Uso de antibióticos en el ganado bovino

En producción animal del ganado bovino, los agentes antimicrobianos son usualmente administrados a grupos de animales (rebaños) con tres propósitos diferentes: a) como medida profiláctica (para evitar o prevenir infecciones); b) uso terapéutico en animales individuales enfermos y combinado como medida profiláctica en el resto de los animales sanos para evitar un brote de la enfermedad (metafilaxis) como promotores del crecimiento. Los agentes antimicrobianos usados en salud animal como medida terapéutica, profiláctica o metafilaxis generalmente son de la misma clase que las usadas en medicina humana (Guardabassi, B., y Courvalin, E., 2019).

Tratamiento de la mastitis

No hay un tratamiento específico que utilicen los veterinarios ya que el resultado no es estándar para esta patología. Los antimicrobianos utilizados para cura bacteriológica para la mastitis dependen del patógeno, su perfil de resistencia, la gravedad del caso, la variación de inmunidad de las vacas, la eficacia del tratamiento, la prontitud del inicio del tratamiento (Hillerton, M., y Berry, T., 2019).

Aproximaciones Teóricas sobre el Género *Staphylococcus*

Bacterias

Las bacterias son microorganismos procariotas unicelulares, con movilidad propia y diversidad en su forma esferas, barras, hélices, entre otras. Las características distintivas de las procariotas son su tamaño relativamente

pequeño, casi siempre del orden de $1\mu\text{m}$ de diámetro, y la ausencia de una membrana nuclear. El ADN de casi todas las bacterias es un círculo con una longitud aproximada de $1\mu\text{m}$; este es el cromosoma procariótico (Jawets, S. et al., 2017).

Bacterias Gram positivas

Las bacterias Gram positivas poseen una pared celular gruesa que, consta de varias capas y está formada principalmente por peptidoglicano (mureína) que rodea la membrana citoplasmática (el peptidoglicano es un exoesqueleto en forma de malla con una función semejante a la del exoesqueleto de los insectos). Y dos clases de ácidos teicoicos: ácido lipoteicoico está en la superficie empotrado en la capa de peptidoglicano y unido a la membrana citoplasmática; y ácido teicoico de la pared que está en la superficie y se une solo a la capa de peptidoglicano. En la figura 1 se muestra la pared celular de las bacterias Gram positivas (Murray, H. et al., 2015).

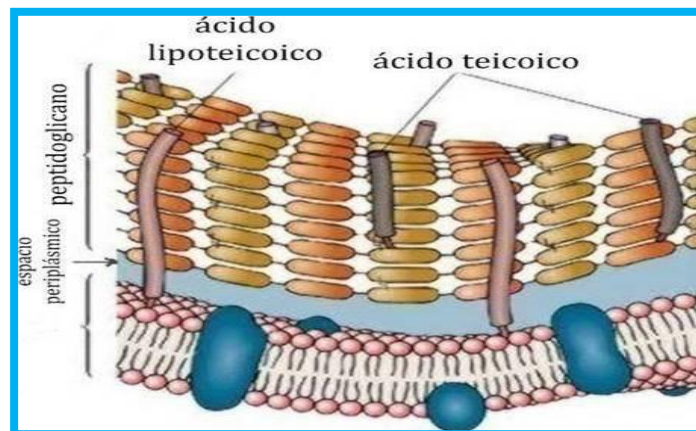


Figura 1.-Pared Celular de las Bacterias Gram Positivas

Fuente: (Murray, H. et al., 2015).

Existen gran variedad de bacterias Gram positivas, pero se describirá a continuación la empleada para este estudio.

Staphylococcus aureus

Es un microorganismo de gran importancia médica, Desde hace muchos años se le ha reconocido como uno de los principales agentes patógenos para el humano (Murray, H. et al., 2015). *Staphylococcus aureus* es un coco Gram positivo, con un diámetro de 0.5 a 1.5 μm no móvil. Agrupados como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas. Es un anaerobio facultativo, pero crece mejor en condiciones aerobias. El microorganismo produce catalasa (enzima capaz de desdoblar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre); característica que se utiliza para diferenciar el género *Staphylococcus* de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* que son catalasa negativos y crece rápidamente en agar sangre, sus colonias miden de 1 a 3 mm, producen un típico pigmento amarillo debido a la presencia de carotenoides y muchas cepas producen hemólisis a las 24-36 horas). Los datos clínicos y epidemiológicos fundamentales para orientar el diagnóstico microbiológico, así como la sospecha del agente etiológico causante de la infección, por lo que se requiere el aislamiento y la identificación de *S. aureus* a partir de muestras clínicas. (Murray, H. et al., 2015

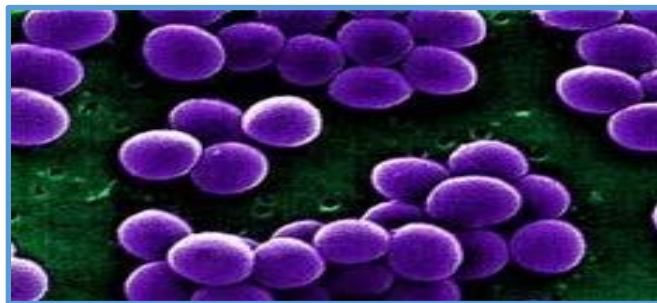


Figura 2. Bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus*

Fuente: (Paramedics, 2014)

Aproximación Teórica sobre Resistencia Antimicrobiana

Tipos de resistencia antibiótica

La resistencia antibiótica puede ser natural (intrínseca) o adquirida. La resistencia natural es propia de cada familia, especie o grupo bacteriano. Por ejemplo, todos los gérmenes Gram negativos son resistentes a la vancomicina, y esta situación no es variable. La resistencia adquirida es variable y es adquirida por una cepa de una especie bacteriana. Así, existen cepas de neumococo que han adquirido resistencia a la penicilina, cepas de *Escherichia coli* resistentes a la ampicilina, cepas de *estafilococos* resistentes a la meticilina. Esta resistencia adquirida es la que se estudia en el laboratorio y se informa al clínico. La resistencia adquirida es la que puede llevar a un fracaso terapéutico cuando se utiliza un antibiótico supuestamente activo sobre el germen que produce la infección. (Ruiz, C. et al., 2015).

Mecanismos de resistencia a los antibacterianos

Puede existir el origen no genético de la fármacorresistencia ya que en la mayor parte de las acciones antibacterianas es necesaria la replicación de las bacterias. Por lo tanto, los microorganismos que carecen de actividad metabólica (no se multiplican), son fenotípicamente resistentes a los fármacos. Sin embargo, su progenia es sensible. Por otra parte, la mayor parte de los microorganismos resistentes a fármacos emerge como resultado de algún cambio genético y una serie de procesos de selección por los antibacterianos. (Jawetz, G. et al., 2018).

Resistencia cromosómica: surge como resultado de una mutación espontánea en un locus que regula la sensibilidad a determinado antibacteriano. La presencia del antibacteriano sirve como mecanismo de selección para suprimir a los microorganismos sensibles y fomentar la proliferación de los mutantes resistentes. Constituyen una causa rara de resistencia clínica a los fármacos. Los mutantes cromosómicos por lo general son resistentes debido a un cambio en un receptor estructural para un fármaco. Por lo tanto, la proteína P12 en la subunidad 30S del ribosoma bacteriano sirve como receptor para el enlace de la estreptomicina. La mutación en el gen que regula a esa proteína estructural provoca resistencia a la estreptomicina. La mutación también puede provocar la pérdida de PBP, lo que hace que estos mutantes sean resistentes a los β -láctamicos (Jawetz, G. et al., 2018).

Resistencia Extracromosómica: Con frecuencia las bacterias contienen elementos genéticos extracromosómicos llamados plásmidos. Algunos plásmidos transportan genes de resistencia a uno, y con frecuencia a varios, antibacterianos. Los genes de los plásmidos para resistencia antibacteriana suelen regular la formación de enzimas que pueden destruir a los antibacterianos. Así, los plásmidos establecen la resistencia a las penicilinas y cefalosporinas al transportar genes para la formación de β -lactamasas. Los plásmidos codifican las enzimas que acetilan, adenilan o fosforilan diversos aminoglucósidos, para enzimas que determinan el transporte activo de las tetraciclinas a través de la membrana celular, y para otras. El material genético y los plásmidos se pueden transferir a través de transducción y conjugación (Jawetz, G. et al., 2018). La transducción es una recombinación genética en las bacterias mediada por bacteriófagos. En términos simples, una partícula de transducción puede considerarse como el ácido nucleico bacteriano en un fago cubierto. Incluso una población de fagos líticos puede contener algunas partículas en las cuales la cubierta del fago está rodeada por ADN derivado de

la bacteria más que del propio fago. Tal población se ha utilizado para transferir genes de una bacteria a otra. Los fagos atemperados son los vehículos preferidos para la transferencia genética porque la infección de las bacterias receptoras bajo condiciones que favorecen la lisogenia reduce la lisis celular y por tanto favorece la supervivencia de las cepas recombinantes (Jawetz, G. et al., 2018). La conjugación es un proceso durante el cual el ADN se transfiere de una bacteria donante a una bacteria receptora por medio de un mecanismo que implica un estrecho contacto celular. Los plásmidos son los elementos genéticos que más a menudo se transfieren por conjugación. Las funciones genéticas necesarias para la transferencia están codificadas por los genes *tra*, que son transportados por plásmidos autotransmisibles. Estos últimos pueden movilizar otros plásmidos o porciones del cromosoma para su transferencia. En algunos casos se logra la movilización porque los genes *tra* proporcionan las funciones necesarias para la transferencia de un plásmido por lo demás no susceptible de transmisión. En otros casos, los plásmidos autotransmisibles se integran con el ADN de otro replicón y, como una extensión de sí mismo, aportan cadenas de ADN a la célula receptora (Jawetz, G. et al., 2018).

Resistencia cruzada: Algunos microorganismos que son resistentes a cierto fármaco también son resistentes a otros fármacos que comparten un mecanismo de acción. Este tipo de relación existe principalmente entre fármacos con similitud química o que tienen un modo similar de enlace o acción. En determinadas clases de fármacos, el núcleo activo de la sustancia química es tan similar entre distintos congéneres que la resistencia cruzada es extensa (Jawetz, G. et al., 2018).

Tabla 5. Mecanismos de Resistencia de *Staphylococcus aureus*

Mecanismo	Método	Reporte
Producción de enzima	Prueba del Borde de Halo de Penicilina Menor/igual a 28mm (R) Mayor/igual a 29mm (S)	(R). El microorganismo sintetiza la enzima de tipo penicilinasa, por lo tanto es resistente a todos B-lactámicos excepto a las penicilinas resistentes a las penicilinasas.
Producción de Enzima Cefalosporina Cromogénico	Nitrocefina 5 µg (Incubar 30 min. Y 1hrs TA)	Sin cambio de color(Negativo), no hay producción de B-lactamasa. Presencia de color fucsia (Positiva), producción de B-lactamasa.
Alteración del sitio de Acción. Modificación de la PBP (gen mecA), codifica una PBP2A	Difusión del disco de Cefoxitin 30 µg (Fox) Disco Fox (Cefoxitin/Oxacilina) Menor/igual a 21mm (R) Mayor/igual a 22mm (S)	Cefoxitin (R), no reportar Fox, reportar oxacilina. El microorganismo confiere resistencia a todos los B-láctamicos, incluyendo los combinados de B-lactamasas, excepto cefalosporina de 5ta generación. Ceftalorina y Ceftobiprole.
Modificación a nivel ribosomal. Gen-erm MLS	Resistencia inducible a Clindamicina (D Test) Eritromicina y Clindamicina (DTest) 15mm-26mm, Género <i>Staphylococcus</i>	(DTest+) Eritromicina(R) Clindamicina(S) Distorsión del halo de inhibición alrededor del disco de Clindamicina. (Resistencia Inducible a la Clindamicina) (DTest-) Eritromicina(R) Clindamicina(S) No hay distorsión del halo de inhibición alrededor del disco de Clindamicina. (No hay Inducción Resistencia a Eritromicina medida por el gen mef.

Fuente: Velasco J. 2019, CLSI 2022.

Definición Operacional de Términos

La definición operacional de términos corresponde a las palabras más relevantes contenidas en el desarrollo del trabajo de investigación, deben presentarse ordenando los términos empleados por estricto orden alfabético, y deben ir sustentados por el autor, el año y la página. Según Tamayo (2014), la definición operacional de términos “es la aclaración del sentido en que se utilizarán las palabras o conceptos empleados en la identificación y formulación del problema. En este sentido se tiene:

Etiología: Causa de una enfermedad.

Infección: Invasión de los tejidos corporales por microorganismos que se multiplican y producen enfermedad.

Inflamación: la inflamación (del latín inflammatio: encender, hacer fuego), es la forma de manifestarse de muchas enfermedades. Se trata de una respuesta inespecífica frente a las agresiones del medio, esta generada por los agentes inflamatorio.

Mastitis: (Del Lat. Masto- e – itis) inflamación de mamas.

Microaerobio: Requiere una presión parcial menor que la del oxígeno atmosférico para crecer

Pezón: (del lat. Pedicellus, dim, de pes, pedís, pie). Parte central, erétil y más prominente de la glándula mamaria.

Prevalencia: En Epidemiología, proporción de animales que sufren una enfermedad con respecto al total de la población en estudio.

Operacionalización del Evento de Estudio

Constituye un conjunto de procedimientos que describe las actividades que un observador debe realizar para recibir las impresiones sensoriales, las cuales indican la existencia de un concepto teórico en mayor o menor grado. (Hernández, Fernández y Baptista 2008).

Tabla 6. Operacionalización de la Variable Dependiente Género *Staphylococcus*

Variable Dependiente	¿Cómo se mide?	Dimensiones	Indicadores
Género: <i>Staphylococcus</i> Es un coco Gram positivo, agrupados como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas. Es un anaerobio facultativo, productor de hemólisis, catalasa y coagulasa positiva.	.-Cultivos microbiológicos	.-Tinción de Gram .-Siembras en cultivos enriquecidos y manitol salado	Presencia de cocos Gram positivo en racimos de uva <i>Staphylococcus aureus</i> . Fermentador del manitol, catalasa y coagulasa positiva.

Tabla 7. Operacionalización de la Variable Independiente, Perfil de Resistencia de cepas de *Staphylococcus aureus* en muestra de leche con mastitis bovina.

Variable Independiente	¿Cómo se mide?	Dimensiones	Indicadores
Resistencia a los antimicrobianos	Método de difusión Kirby-Bauer	.-Cualitativa	Sensible (S): Describe aquella situación en la que los microorganismos como bacterias u hongos no son capaces de crecer en presencia de uno o varios fármacos antimicrobianos. Resistente (R): Es la capacidad que tienen las bacterias de soportar los efectos de los antibióticos destinados a eliminarlas o controlarlas

CAPITULO III

MARCO METODOLÒGICO

Uno de los aspectos fundamentales para el desarrollo de una investigación es el marco metodológico. Según Balestrini, J., (2018):

Está referido al momento que alude al conjunto de procedimientos lógicos, tecno-operacionales implícitos en todo proceso de investigación con el objeto de ponerlos de manifiesto y sistematizarlos; a propósito de permitir descubrir y analizar los supuestos del estudio y de reconstruir los datos, a partir de los conceptos teóricos convencionalmente operacionalizados.

En el marco metodológico se establecen las pautas con que se va a trabajar en la investigación: el tipo y diseño de investigación, población y muestra, sistema de variables con la tabla de operacionalización, técnicas e instrumentos para la recolección de datos, procedimiento de la investigación, así como diseño de análisis.

Tipo de Investigación

La presente investigación es de tipo analítica. Según Hurtado, J. (2010). Los estudios analíticos son aquellos que tratan de entender las situaciones en términos de las relaciones de sus componentes. Intenta descubrir los elementos que componen cada totalidad y las interconexiones quedan cuenta de su integración. Los estudios analíticos

pueden ser de tipo documental o de observaciones de campo; pueden agruparse tanto bajo el paradigma cuantitativo como el cualitativo.

La presente investigación fue de tipo analítica; por cuanto se analizó el evento de estudio relacionado con: la efectividad del tratamiento con antibióticos para inhibir la resistencia de cepas de *Staphylococcus aureus*, en muestras de leche proveniente de vacas con mastitis bovina.

-

Diseño de Investigación

Según Hurtado, D. (2010). Conjunto de estrategias que el investigador empleará para dar respuesta al enunciado holopráxico.

El diseño de la Investigación es de tipo experimental de campo, en esta investigación se llevó a cabo el análisis de los perfiles de resistencia de *Staphylococcus aureus* en muestras de leche provenientes de vacas con mastitis bovina, a través de técnicas y métodos bacteriológicos que fueron procesadas en el Laboratorio de Bacteriología Roberto Gabaldón del Departamento de Microbiología y Parasitología en la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA-Mérida.

Población

Según Hurtado, J. (2010), es el conjunto finito o infinito de elementos, personas o cosas pertinentes a una investigación y que generalmente suele ser accesible. En relación con la presente investigación, la población está

conformada por las 15 vacas, ubicadas en la finca “El Milagro”, vía Jajì ubicada en el Municipio Campo Elías en Mérida - Venezuela.

Muestra

Es un subconjunto de la población. Son los sujetos involucrados en el estudio; es decir, es la unidad contextual que aporta la información. Según Hurtado, J. (2010), es un subconjunto representativo y finito que se extrae de la población accesible.

Por otra parte, la muestra según Sabino, N. (2021), define a la muestra en un sentido bien amplio como, “una parte del todo llamado universo y que sirve para representarlo. De allí, que la muestra de esta investigación son 60 muestras de leche de vacas en producción ubicadas en la finca “El Milagro”, vía Jajì del Municipio Campo Elías en el Estado Mérida - Venezuela.

Unidad de Investigación

Según Hurtado, J. (2010), la unidad de estudio se refiere al contexto, al ser o entidad poseedores de las características, evento, cualidad o variable, que desea estudiar, una unidad de estudio puede ser una persona, un objeto, un grupo, una extensión geográfica o una institución.

La unidad de esta investigación son 60 muestras de leche de vacas en producción, ubicadas en la finca “El Milagro”, vía Jajì del Municipio Campo Elías en el Estado Mérida - Venezuela. A partir de marzo de 2022 hasta julio 2022.

Selección del Tamaño de la Muestra

Está representada por 60 muestras de leche de vacas en producción, con el fin de analizar a través de las técnicas y procedimientos, cuáles de estas muestras presentan *Staphylococcus aureus*.

Sistema de Variables

Las variables de la investigación son las características y propiedades cuantitativas o cualitativas de un objeto o fenómeno que adquieren distintos valores, o sea, varían respecto a las unidades de observación.

Generalmente a las variables se considera como una propiedad que puede variar y cuya variación es susceptible de medirse u observarse. El alcance de una investigación se relaciona con la profundidad del conocimiento sobre el fenómeno de estudio. No se deben considerar los alcances como tipos de “investigación” (Hernández, Fernández y Baptista 2008).

Variable Dependiente

Representan el producto o resultado cuya variación se está estudiando.

La variable dependiente de esta investigación es la siguiente:

Patógeno causante de la mastitis

Variable Independiente

Son aquellas variables que se manipulan por el investigador para describir, explicar el objeto durante su investigación.

La variable independiente de esta investigación es la siguiente:

Resistencia antibiótica de los agentes causantes de mastitis.

Tabla 7. Definición operativa de variables e indicadores.

VARIABLES	INDICADORES
Patógeno causante de mastitis bovina.	• Carga bacteriana (colonias ufc/mL)-
Resistencia antibiótica del <i>Sptaphylococcus aureus</i> causantes de mastitis bovina.	• Número de disco en la placa. • Medición de la zona de inhibición. Sensibilidad Resistencia Sensibilidad intermedia.

Instrumentos de Recolección de Datos

El instrumento de recolección de información, es uno de los aspectos más importantes a tomar en cuenta dentro del proceso investigativo, lo considera como “un aspecto muy importante en el proceso de una investigación, es el que tiene relación con la obtención de la información, ya que de ellos depende la fiabilidad del estudio. En la presente investigación, la recolección y clasificación de la información, se realizó teniendo en consideración los objetivos y las preguntas de investigación, por lo que, se aplicaron las técnicas del subrayado, lectura exploratoria, lectura comprensiva, fichaje, resumen, toma de notas y análisis. (Hernández, R. 2008) (Anexo 1)

Técnicas

En la finca “El Milagro” vía Jají en el Estado Mérida, se realizó el Test de “T.C.M” (Prueba Mastitis California), previo al estudio microbiológico para el diagnóstico de mastitis subclínica y los resultados fueron informados al laboratorio de Bacteriología Roberto Gabaldón del Departamento de Microbiología y Parasitología de la ULA-Mérida.

Para el aislamiento bacteriológico se siguió la técnica de cultivo microbiológico.

Para conocer la susceptibilidad y resistencia a los antibióticos se aplicó la técnica de Kirby Bauer, la cual consiste en utilizar una concentración de antibiótico y medir el tamaño de la zona de inhibición.

Instrumentos

La toma de muestras se realizó de acuerdo a las instrucciones recomendadas por el National Mastitis Council. (NMC).

Test de “T.C.M” (Prueba Mastitis California).

Procedimiento de la Investigación

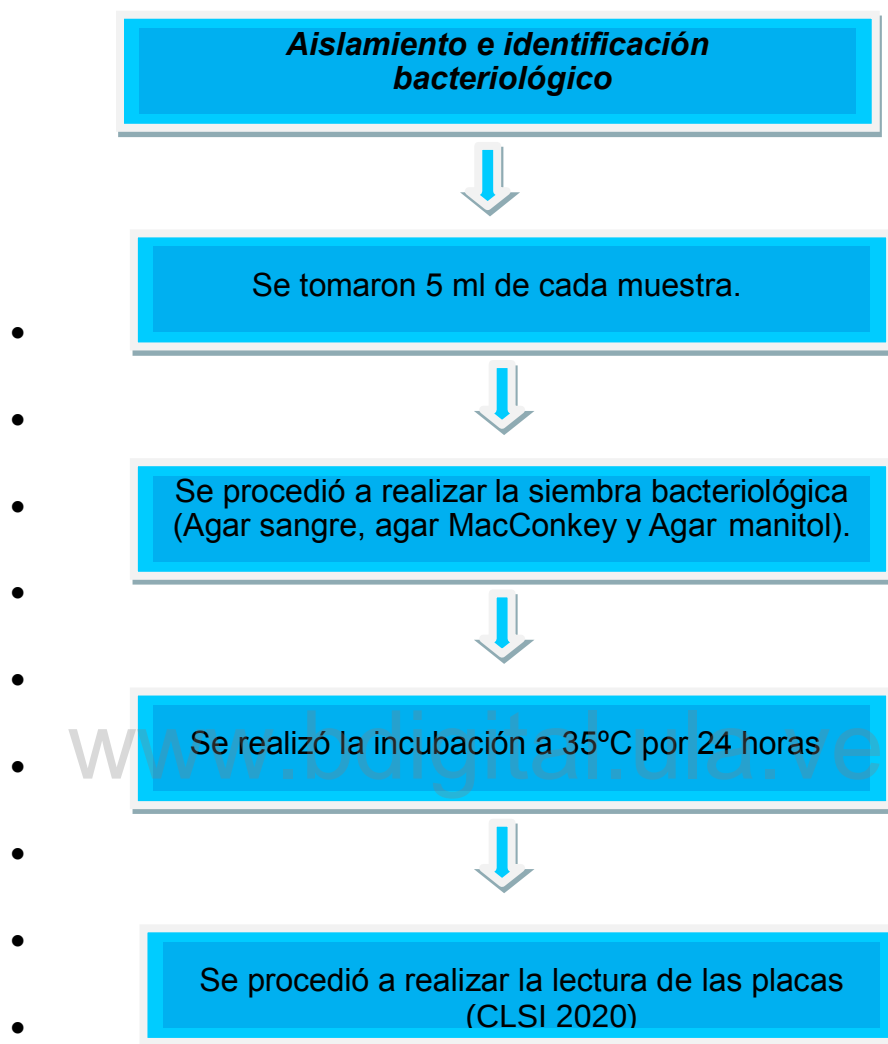
Recolección y Transporte de las Muestras

Teniendo clasificadas las vacas a utilizar se recolectó aproximadamente 10ml de leche en tubos falcón, identificando cada tubo y colocándolas en hielera para su respectivo transporte. El estudio se realizó en el Laboratorio de Bacteriología Roberto Gabaldón del Departamento de Microbiología y Parasitología en la Universidad de los Andes – Mérida Venezuela.

Aislamiento e identificación bacteriológicas

Para el análisis microbiológico, de las muestras, se tomaron 5 ml de cada muestra y se homogenizaron con 45 mL de agua peptonada(AP), al 0.1%, lo que constituyó la dilución de 0,1 a partir de esta se realizaron diluciones decimales hasta 0,0001 (1.0ml de muestra + 9.0 ml de agua peptonada 0.1%), luego se procedió a realizar la siembra bacteriológica dentro de la cámara de bioseguridad en los medios de cultivo marca comercial (Hi-Media), de 0,1 ml en cada Agar. (Agar Sangre, Agar manitol y Agar MacConkey). Dichos cultivos se incubaron a 36°C por 48 horas. Se realizó el conteo y la selección de las

colonias correspondientes al microorganismo. Luego se aplicó la técnica de Tinción de Gram, observándose cocos Gram positivos en racimos y cuyas células individuales mostraron variación de tamaño. Se realizó la prueba de catalasa, e interpretándose como una prueba positiva para el *Staphylococcus aureus*, ya que el microorganismo produce la enzima catalasa (hemoproteína), que descompone el peróxido de hidrogeno en oxígeno y agua, y posteriormente se realizó la técnica de coagulasa, ya que es una enzima que posee actividad similar a la protrombina y es capaz de convertir el fibrinógeno en fibrina, formándose un coágulo visible a simple vista, prueba positiva para el *Staphylococcus aureus* (coagulasa positiva). El microorganismo posee la enzima coagulasa, observándose la formación de una malla o coágulo, cuando en un tubo de ensayo se mezcla una cantidad de plasma con una suspensión de un cultivo bacteriano productora de coagulasa libre, después de 2-4 horas de incubación a 35°C, se puede observar la formación del coágulo.



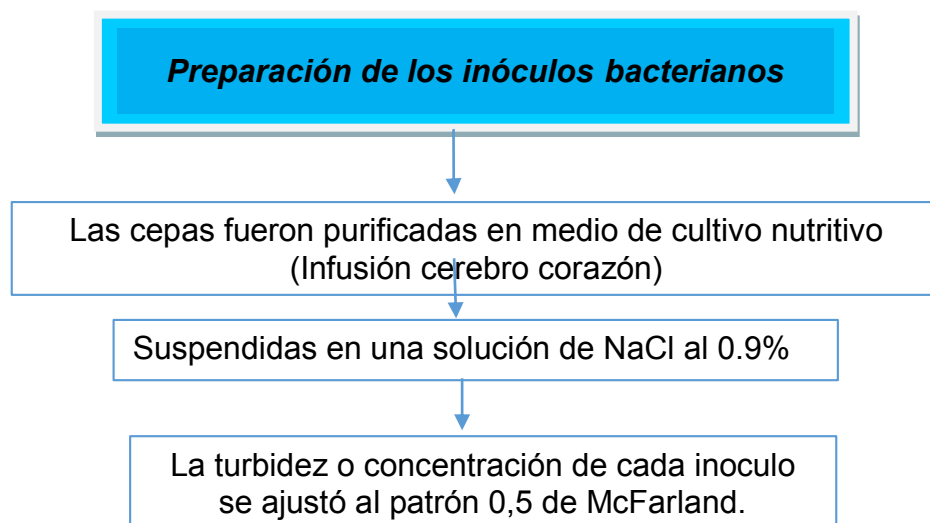
Esquema 1. Procedimiento de aislamiento bacteriológico.

Microorganismo de ensayo

Para este estudio se seleccionó, cepas de control de Bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus* de Referencia Internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC) 25923. Esta bacteria fue obtenida del cepario del área de preparación de medios de cultivo del Departamento de

Preparación de los inóculos bacterianos

Según Bailey y Scott (2009), un inóculo preparado en forma adecuada es la clave de cualquiera de los métodos de prueba de sensibilidad a los antimicrobianos. Los dos requisitos más importantes para la preparación del inóculo son el uso de un cultivo puro y un inóculo estandarizado. Una vez que se obtuvieron las cepas bacterianas frescas y purificadas se preparó el inóculo bacteriano con la ayuda de un asa estéril, tomándose de esta manera una pequeña cantidad de colonias para luego ser suspendidas en una solución de NaCl al 0.85% (5 mL en tubos 13x100 previamente estéril, hasta que alcanzó una turbidez equivalente al patrón 0,5 de Mac Farland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL).



Esquema 2. Preparación de los inóculos bacterianos.

Siembra en las placas de Agar Müller Hinton

Las placas se sembraron con un hisopo estéril que se sumergió en la suspensión bacteriana estandarizada de turbidez igual a 0,5 de Mac Farland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). La superficie de la placa sembró en tres direcciones para asegurar una distribución uniforme y completa del inóculo sobre toda la placa.

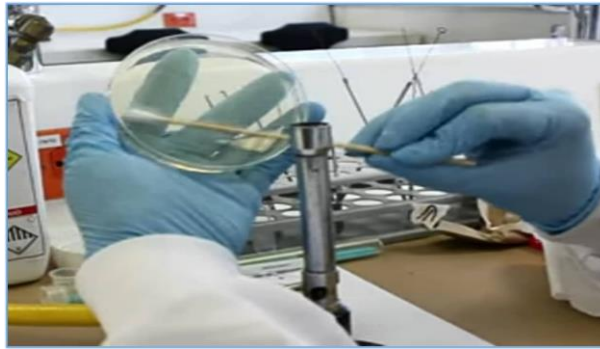


Figura 3. Siembra en las placas de Agar Müller Hinton

Colocación de los discos antimicrobianos

En las placas de Petri con agar Mueller Hinton (HIMEDIA®), se colocaron los discos de antibióticos comerciales.



Figura 4. Discos de antibióticos utilizados en el estudio

Procedimiento para el antibiograma

Teniendo el agente causal se realizó el antibiograma. Se utilizó una concentración de bacterias de 0.5 en la escala de Mc Farland.

Luego se realizó la siembra en Agar Mueller Hinton (HIMEDIA®). Se colocaron los discos con los antibióticos de elección: Amikacina, Ciprofloxacina, Doxicilina, Eritromicina, Clindamicina, Linezolid, Oxaciclina, Penicilina, Tetraciclina, Trimetopim/ sulfametoxazol, Ampicilina, Ampicilina-sulbactam, Ceftazidima, Gentamicina, Amoxicilina, Ácido Clavulánico y Levofloxacina.

Por último, se incubaron a 37°C, por 24 – 48 horas y luego se realizó la lectura para verificar la sensibilidad a los antibióticos colocados.



Figura 5. Placas con Agar Mueller Hinton

Lecturas de las placas

Luego de ser incubadas cada una de las placas por un lapso de 24 horas, se procedió a inspeccionar cada una de ellas; considerándose como resultado positivo o sensible (actividad antibacteriana) cuando un halo de inhibición del crecimiento bacteriano se observe alrededor del disco. Midiéndose con una regla milimetrada la zona clara alrededor del halo, en todas las placas utilizadas, en el caso contrario, la ausencia de dicho halo se interpretará como negativo o resistente (sin actividad antibacteriana) y empleado para la evaluación de la actividad antibacteriana por el método de difusión en agar (Kirby-Bauer). Posteriormente se realizó la lectura y de los halos y se comparó con el manual del CLSI, 2020 para *Staphylococcus* sp.



Esquema 3. Procedimiento empleado para la evaluación de la actividad antibacteriana por el método de difusión en agar (Kirby-Bauer).

Diseño de Análisis

Entre los diseños de investigación también se encuentra el enfoque mixto, el cual mezcla los principios y metodología de los enfoques cuantitativo y cualitativo. Dicho esto, el enfoque mixto es un proceso que recolecta, analiza y vincula datos cualitativos y cuantitativos en una misma investigación para responder a un planteamiento. Perfiles de resistencia de cepas de *Staphylococcus aureus*, en muestras de leche provenientes de vacas con mastitis bovina, en el laboratorio de Bacteriología Anaeróbica en la Universidad de los Andes del Estado Mérida – Venezuela, a partir de marzo de 2022 hasta julio de 2022.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente capítulo reseña los resultados y discusión de los datos obtenidos en la determinación del Perfil de Resistencia del *Staphylococcus aureus* en mastitis bovina.

Resultados

Antes de iniciar el diagnóstico microbiológico y la determinación de los perfiles de resistencia de las muestras de leche con mastitis bovina, provenientes de la finca El Milagro en Jaji, Estado Mérida, la prueba de California o CMT se utiliza para el diagnóstico presuntivo de la Mastitis Bovina, esta prueba se realizaron en los cuartos mamarias de las 15 vacas utilizadas en esta investigación.

De los 60 cuartos muestreados (15 vacas por cuatro cuartos igual a 60 cuartos), solo 14 resultaron positivos, 10 de ellos (16,6%), resultaron positivos débil (+) con rangos de conteo de células somáticas de 400.000 a 1.500.000 RCS/mm³, 4 (6,66 %) resultaron positivos evidentes con un rango de 800.000 a 5.000.000 RCS/mm³, y el resto de los cuartos, 46 que constituyen el 76,6%, presentaron prueba de California negativa (Tabla 9). Estos resultados demuestran que las vacas estudiadas no presentaban mastitis clínica, sino subclínica por presentar valores hasta 5.000.000 RCM/mm³ que son las unidades para células somáticas (Tabla 10).

Tabla 9. Resultados de las pruebas California Mastitis (CMT), a las 15 vacas en producción de la finca el Milagro vía Jajì, Municipio Campo Elías en el Estado Mérida.

Nº Vacas	Edad/Años	Cuartos Infectados			
		AI	AD	PI	PD
1	8	-	-	-	-
2	9	-	+	-	-
3	9	-	-	+	-
4	8	-	-	-	-
5	9	-	-	-	-
6	5	+	-	+	-
7	10	-	-	-	-
8	7	-	+	-	+
9	9	-	-	-	-
10	6	++	-	++	-
11	9	-	+	++	-
12	8	-	-	-	-
13	5	++	-	+	-
14	7	-	-	-	-
15	7	+	+	-	-

(-) Negativo, (+) Positivo débil, (++) Positivo evidente, (+++) Positivo fuerte.

AI: Anterior izquierdo, **AD:** Anterior derecho, **PI:** Posterior izquierdo, **PD:** Posterior derecho.

Tabla 10. California Mastitis Test (CMT): Interpretación

SCORE	SIGNIFICADO	DESCRIPCIÓN DE LA REACCIÓN	INTERPRETACIÓN (RCS/M3)
N	Negativo	La mezcla permanece en estado líquido y homogéneo.	0 – 200.000
T	Trazas	Hay algo de engrosamiento. La reacción es reversible y la viscosidad observada por primera vez tiende a desaparecer	150.000 – 500.000
+	Positivo débil	La mezcla espesa, pero no hay formación en el gel en el medio de la paleta y la viscosidad observada tiene a persistir. La mezcla cae poco a poco.	400.000 – 1.500.000
++	Positivo evidente	El gel se formará en el centro de la paleta durante el movimiento giratorio. El gel se acumula en la parte inferior de la paleta cuando el movimiento giratorio se interrumpe. Cuando se vierte la mezcla la masa gelatinosa cae y puede dejar un poco de líquido en el pocillo.	800.000 – 5.000.000
+++	Positivo fuerte	Gel se formará en el centro de la paleta y se pega en el fondo del pocillo, pero no a un lado, cuando se vierte la mezcla, se cae sin dejar líquido atrás.	>5.000.000

El resumen del resultado de la prueba de mastitis conocida como California Mastitis (CMT), se observa en la tabla 11, del total de vacas en producción de la finca El Milagro vía Jajì, Municipio Campo Elías en el Estado Mérida, el 23,33 % reflejó a mastitis sub clínica (positivo débil, positivo evidente), y un 76,66% fue negativo a mastitis.

Tabla 11. Resumen de la Prueba California Mastitis (CMT)

Resultado	Nº muestra	Total (%)
Mastitis clínica	0	0,00
Mastitis sub clínica	14	23,33
Negativo a mastitis	46	76,66
Total	60	99,99

De 60 muestras que se obtuvieron en la finca el Milagro, para el diagnóstico microbiológico de mastitis bovina, se obtuvieron 14 muestras positivas (+) para mastitis subclínica, el 14,28% (2/14) corresponde a cepas de *Staphylococcus aureus* con una promedio de 390.000 UFC/mL, seguido del 21,42% (3/14) de cepas de *Enterococcus sp* con 297.000 UFC/mL, y 21,42 % de cepas de *Escherichia coli* (3/14) con 280.000 UFC/mL, en cuanto a las muestras negativas, resultaron 6/14, que corresponden al 42,86 % del total (Tabla 12).

Tabla 12. Microorganismos aislados en las muestras de leche de vacas con mastitis bovina provenientes de la finca el Milagro vía Jajì, Municipio Campo Elías en el Estado Mérida.

Código cepa	Microorganismo	Nº Aislados	Porcentaje %	UFC/mL X
782791 782319	<i>Staphylococcus aureus</i>	2	14,28	390.000 UFC/mL
782201 782340 744491	<i>Enterococcus sp</i>	3	21,42	297.000 UFC/mL
782787 782904 782818	<i>Escherichia coli</i>	3	21,42	280.000 UFC/mL
782606 782307 782439 782814 782619 782799	<i>Sin crecimiento bacteriano</i>	6	42,86	0
	TOTAL	14	100	

En la tabla 13, se observan los resultados obtenidos en la prueba de susceptibilidad de las 2 cepas aisladas de *Staphylococcus aureus* ante diez (10) antibióticos ensayados para el Género *Staphylococcus*, El 100% de las cepas aisladas (2/2) resultaron sensibles a Amikacina, Ciprofloxacina, Doxicilina, Eritromicina Clindamicina, Linezolid, Oxaciclina. Tetraciclina, Trimetopim – sulfametoxazol, y el 100% resultaron resistentes Penicilina (2/2)

Tabla 13. Resultados en porcentaje de la prueba de Susceptibilidad de 2 cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas en muestras de leche. Método Kirby – Bauer

Antibacteriano	Resistencia	Intermedio	Sensible	Total %
	%	%	%	
Amikacina	0	0	100	100
Ciprofloxacina	0	0	100	100
Doxicilina	0	0	100	100
Eritromicina	0	0	100	100
Clindamicina	0	0	100	100
Linezolid	0	0	100	100
Oxacilina	0	0	100	100
Penicilina	100	0	0	100
Tetraciclina	0	0	100	100
Trimetopim- Sulfametoxazol	0	0	100	100

En cuanto al perfil de resistencia, en el Gráfico 1 se detallan los resultados de la ineficacia del antibiótico Penicilina, frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* de mastitis en el ganado bovino de la finca El Milagro vía Jajì, Municipio Campo Elías en el Estado Mérida, siendo resistente en un 100%(2/2) para Penicilina

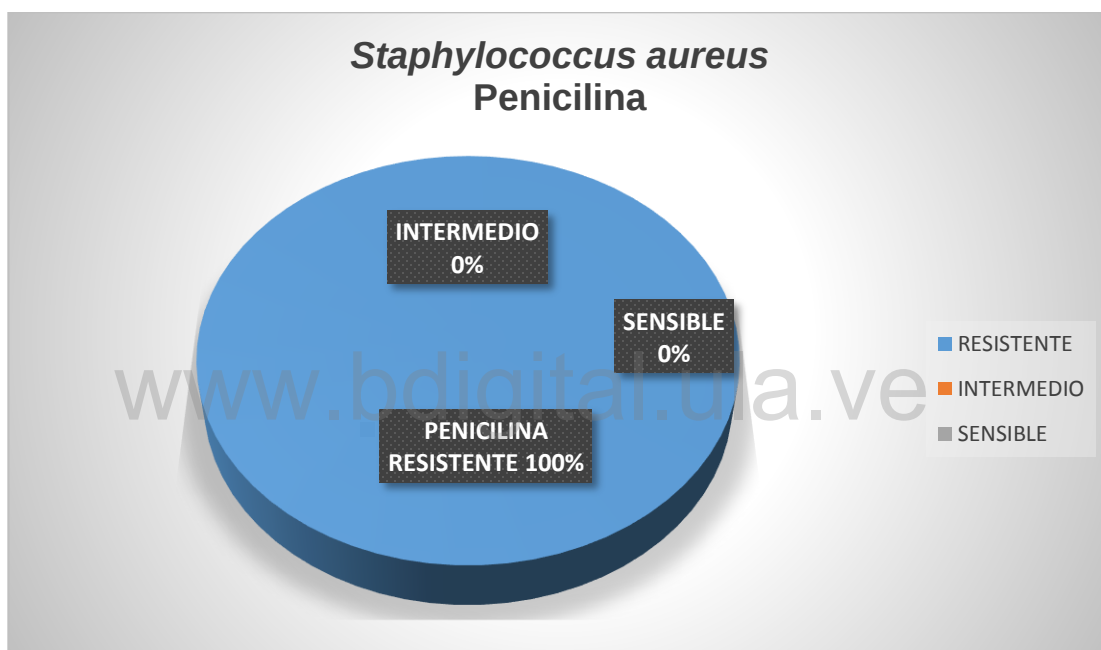


Gráfico 1: Resistencia del antibiótico Penicilina frente a las bacterias causantes de mastitis bovina de la finca El Milagro vía Jajì, Municipio Campo Elías en el Estado Mérida.

Discusión

La Discusión de Resultados, se refiere al contraste de la información obtenida con la teoría acerca del tema que se está investigando o los trabajos anteriores que fueron usados como antecedentes, contrastando o negando lo planteado. Finalmente, las conclusiones y recomendaciones significan el cierre de la investigación.

Cervantes et. al. 2017, realiza en su investigación la identificación microbiológica de microorganismos patógenos causantes de mastitis subclínica en región del trópico, (Europa) realizándose la prueba de California Mastitis Test (CMT), a partir del resultado trazas, se hizo el conteo de células somáticas y cultivo microbiológico donde se encontró que el *Staphylococcus aureus*, fue la bacteria mayor causante de mastitis, con un 59%.

Datos que son similares a los análisis bacteriológicos de esta investigación, realizándose la prueba biológica de California Mastitis Test (CMT), se procesaron 60 muestras de leche provenientes de vacas, de las cuales 14 muestras resultaron positivas para la mastitis bovina con un 53,32%.

Ayala en el 2018 señala que La bacteria *Staphylococcus aureus*, fue el mayor causante de mastitis, representando más del 44% de la población bacteriana encontrada, se menciona que durante años el *Staphylococcus aureus* ha sido y sigue siendo la principal causa de problemas relacionados con mastitis ya que posee varios factores de virulencia como enzimas, proteínas y ácidos entre otros, que le permiten sobrevivir y diseminarse en tejido de la ubre, dando lugar a infecciones de larga duración.

Datos superiores si se compara con los análisis bacteriológicos, para la identificación fenotípica que se hicieron en el Laboratorio de Microbiología Roberto Gabaldón del Departamento de Microbiología y Parasitología de la

Facultad de Farmacia y Bioanálisis, concluyendo que las bacterias causantes de mastitis bovina fueron cepas de *Staphylococcus aureus*, con un 14,28% de la población bacteriana, quedando por debajo de *Enterococcus* sp. y *E. coli*

Se realizó una investigación denominada: Prevalencia de microorganismos y perfil de resistencia antimicrobiana en bovinos lecheros a los cuales se les analizó la sensibilidad microbiana a antimicrobianos, se reportó el 37,4% de los microorganismos correspondientes a *Staphylococcus aureus*, el 35,3% al grupo de *Staphylococcus coagulasa negativa* (SCN) y el 16,1% a los *Enterococcus* sp. (Pedrozo, P. R. et al. 2021). A diferencia de la presente investigación *Staphylococcus aureus* sigue presentando el lugar número uno en cuanto a la prevalencia de microorganismos causantes de mastitis.

Frola D. et al. en el 2017, señala en su trabajo acerca de Resistencia de antibióticos de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de leche con mastitis bovina un reporte del 58,7% de resistencia en general a los antimicrobianos determinada por la técnica de difusión en disco Kirby Bauer. El 36,5%, 22,2% y 20,6% exhibieron resistencia a Eritromicina, Penicilina y Estreptomicina. Todos los *Staphylococcus aureus* fueron sensibles a Gentamicina, Ampicilina, Ampicilina/Sulbactam, Rifampicina y Oxacilina.

Datos que difieren ligeramente con los analizados en el laboratorio de Bacteriología Roberto Gabaldón del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, las cepas causantes de mastitis demostraron resistencia a uno o más antibióticos, las dos cepas de *Staphylococcus aureus*, aisladas en este estudio revelaron en un 100% resistencia a la Penicilina.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

Luego del análisis de los resultados obtenidos durante el proceso de investigación y recopilación de la información, tanto bibliográfica como de la muestra de objeto de estudio, se llegó a una serie de conclusiones que permiten dar respuestas a las interrogantes y a los objetivos planteados en el problema estudiado en cuanto a los perfiles de resistencia de cepas de *Staphylococcus aureus*, provenientes de vacas con mastitis bovina.

Se realizó el diagnóstico preventivo de California Mastitis Test (CMT), se procesaron 60 muestras de leche provenientes de vacas, de las cuales 14 muestras resultaron positivas para la mastitis subclínica con un 53,32%.

La bacteria *Staphylococcus aureus* ocupó el tercer lugar como agente productor de mastitis sub clínica, representando el 14,28% de la población bacteriana encontrada en el ganado bovino de la finca El Milagro vía Jajì, Municipio Campo Elías en el Estado Mérida.

Otros patógenos Gram positivos como *Enterococcus* sp, y Bacilos Gram negativos como *E. coli* representaron el 1 y segundo lugar respectivamente como responsables de mastitis en las muestras analizadas, provenientes de vacas con diagnóstico de mastitis de la Finca el Milagro- Jajì, Estado Mérida.

La sensibilidad de *Staphylococcus aureus* frente a los antibióticos, el 100% fueron sensible a: Amikacina, Ciprofloxacina, Doxicilina, Eritromicina, Clindamicina Linezolid, Oxaciclina Tetraciclina y Trimetopim-Sulf. Además, se encontraron cepas resistentes a la Penicilina, por producción de penicilinas.

Recomendaciones

- Las conclusiones del presente estudio permitieron formular las siguientes recomendaciones:
- Recomendar de la finca El Milagro vía Jajì, Municipio Campo Elías en el Estado Mérida. El tratamiento de mastitis con medicamentos que tengan como principio activo, Amikacina, Linezolid, Oxaciclina, Doxicilina, Ciprofloxacina y Eritromicina, ya que los microorganismos son muy sensibles a este antibiótico.
- Descartar el tratamiento con medicamentos que tengan como principio activo la penicilina, ya que todos los microorganismos aislados en este estudio, demostraron resistencia antibiótica frente a la penicilina.
- Realizar una higiene y desinfección estricta en la unidad del ordeño.
- Establecer un orden al momento del ordeño, de modo que las vacas que padezcan de mastitis, sean ordeñadas de último, evitando con esto la diseminación de la enfermedad.
- Realizar periódicamente la prueba de California mastitis test, para conocer y llevar un mejor control sobre el nivel de infección de la finca El Milagro vía Jajì, Municipio Campo Elías en el Estado Mérida.
- Recolectar muestras de leche de vacas con mastitis, para su análisis microbiológico y así conocer causal y realizar el tratamiento correcto, mediante los resultados obtenidos en el antibiograma.
- Implementar registros, sobre las vacas que presentan mastitis, y así llevar un control en la incidencia de mastitis e ir separando o descartando vacas con infección crónica. Así como llevar un registro de pruebas realizadas y tratamientos aplicados.
- Previo al secado del ganado bovino es importantes realizar pruebas físicas, químicas y microbiológicas

BIBLIOHEMEROGRAFÍA

- Alòs, T. (. (2021). Identificaciòn y Perfil de Resistencia a Antibióticos de *Staphylococcus aureus* en caso de Mastitis Bovina en Establos Lecheros de la Península de Baja California. *Reuniòn Internacional sobre producciòn de leche en climas càlidos.*, 127-135.
- Àvila, T. E. (2018). Aislamiento de bacterias Gram positivas de leche cruda con residuos de antimicrobianos en mastitis bovina. *Arch. Latinoam, Nutr.* 21(2) , 28-73.
- Bartlett, Z. C. (2018). Incidencia y epidemiología infecciosa de la mastitis bovina en la irrigaciòn la Joya Arequipa Perú. Universidad Nacional de Altiplano Tesis (Medico Veterinario).
- Bedolla, Z. y. (2017). Procedimientos y tènicas para el anàlisis de aptògenos aislados en leche cruda. *Rev. Cientif. FCV. LUZ*, 104-121.
- Berry, T. C. (s.f.). Sensibilidad a los genes antimicrobianos de algunos patògenos mastitogènicos aislados de leche de cuartos mestizos doble propòsito. *Rev. Cientif. FCV-LUZ XV (3):*, 227-234.
- Cano. (2006). doi:DOI
- Cano, H. (2018). Comportamiento de la mastitis bovina en la producciòn animal en fincas lecheras. 78 (4): 472-486.
- Castañeda, L. (2018). Factores que afectan las glàndulas mamarias en presencia de patògenos que ocasionan mastitis bovina en lecherías del Cantòn el Chaco. Provincia de Napo. Trabajo de grado presentado para optar por el título de Mèdico Veterinario Zootecnista.
- Cervantes, P. e. (s.f.). La identificaciòn primaria de microorganismos patògenos causantes de mastitis subclínica en una regiòn del tròpico. *Rev. Med. Vet*, 5,.
- Corbellini. (2017). Investigaciòn en mastitis subclínica agentes etiológicos bacterianos. *Rev. Vet. International Dairy Federation*, 15, 45-58.
- Erans, A. y. (2018). Determinaciòn de las bacterias mäs frecuentes causantes de mastitis subclínica y sensibilidad ante antibióticos en cabras criollas

del municipio de Santa Apolonia-Chimaltenango. *Licenciatura-Tesis. Universidad de San Carlos Guatemala.*

- Frola, D. e. (2017). Resistencia a antibióticos de cepas de *Staphylococcus* aisladas de leche con mastitis bovina. *Rev. Med. Vet. n2, 41-49, 41-49.*
- Girando. (2017). Prevalencia de agentes etiológicos causales de mastitis bovina. *Tecnología Láctea. Latinoamericana.*, Nº 21.
- Gómez, D. H. (2019). Caracterización y prevalencia de la situación clínico-epizootiológica de la mastitis subclínica en vacas primerizas Holstein de una lechería especializada. *Rev. Elect. Vet.*, V.9, n8 p. 1-12.
- Heringstad, F. (2018). Prevalencia de mastitis bovina subclínica y microorganismos asociados: Comparación entre ordeño manual y mecánico en Pernambuco, Brasil. *Rev. Salud. Animal. V33. n1.*, p 57-64.
- Hurray, e. a. (2015). Prevalence and Characteristics of *Staphylococcus aureus*, strains isolated from bulk and composite and cattle handlers J. *Food Protect.* 61: 629-632.
- Jawetz, G. e. (2018). Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos y Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), de bacterias Gram positivas aisladas de leche cruda (I). *Rev. Cientif. FCV-LUZ, VII (4): 315-322.*
- Kers, I. y. (2017). Mastitis therapy and pharmacology. *Vet. clin. food anim.*, 19, 109-138.
- López, S. y. (2017). Estudio comparativo entre los métodos diagnóstico para mastitis subclínica, en vacas Jersey, Diriambacarazo. *Trabajo de investigación. Univresidad de San Carlos de Guatemala.*
- Momtaz, L. y. (s.f.). Mastitis an economic consideration . *29th annual Meeting Procceding National Mastitis Council Atlanta G.A*, pp. 3-47.
- Nicolás Ramírez Vásquez, e. a. (2018). Identificación de microorganismos patógenos en muestra de leche con mastitis bovina de Colombia. *Rev. Med. Vet. Vol.12, n3, pp 24-30, pp 24-30.*
- Pedrozo, P. T. (2021). Prevalencia de microorganismos y perfil de resistencia antimicrobiana en bovino lechero de Paraguay. *Rev. Med. Vet, Vol, 32, n1., pp 10-15.*

- Pulcini, e. a. (2018). Caracterizaciòn de la situaciòn clìnico epizootiològica de la mastitis bovina en vacas primerizas Holstein de una lecherìa especializada. *Rev. Elect. Vet*, V9, n8, p 1-12, 1-12.
- Schrick, V. e. (2019). Recuento de cèlulas somàticas en leche bovina de cuartos mamarios con aislamiento negativo e infectados. *Rev. Med. Vet.* 28, 5-11.
- Tortora, C. e. (2017). Prueba de Susceptibilidad Antimicrobiana. *Organizaciòn Panamericana de la Salud. ASM. Press.*, pp. 215-231.

www.bdigital.ula.ve

Anexo 1



**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DPTO. DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA
ROBERTO GABALDÓN
MÉRIDA-ESTADO MÉRIDA**



SOLICITUD DE ESTUDIOS BACTERIOLÓGICOS

1.-Datos Epidemiológicos.

Fecha _____

Nombre: _____	Edad: _____
Sexo: _____	Procedencia: _____

Hist. Clínica

Dirección: _____

Ciudad: _____ Estado: _____

Tipo de muestra: _____ Especificar: _____

Patología: _____

Cuadro Clínico: _____

Antecedente de tratamiento: Nunca tratado ☐ Antes tratado: Recaída ☐

Recuperado ☐ Fracaso. ☐ Otro ☐ Especificar: _____

Control de tratamiento: Semanal ☐ Anual ☐ Otros ☐ Especificar: _____

Ex. Solicitado: Cultivo ☐ Antibiograma ☐ Otras(especificar N°) _____

Otro examen (especificar): _____

Fecha de obtención de la muestra: _____ Calidad de la muestra:

Adecuada ☐ Inadecuada ☐ Repetir muestra ☐

2.-Datos de solicitante:

Apellidos y Nombres: _____

Edad: _____ Teléfono: _____

Observaciones: _____

Características Microbiológicas:

MACROSCOPICAS			MICROSCOPICAS		
Forma:			Tinción:		
Elevación:			Características:		
Borde:					
Color:					
Condiciones de crecimiento	Incubación:	Medio de Cultivo:			
	Temperatura:				

ANTIBIOGRAMA

ANTIBIOTICOS	RESULTADO	ANTIBIOTICOS	RESULTADO
Amikacina		Imipenen	
Ampicilina		Kanamicina	
Ampicilina-Sulbactam		Meropenem	
Azitromicina		Meticilina	
Aztreonam		Nitrofurantoina	
Cefaclor		Levofloxacina	
Cefadroxilo		Oxaciclina	
Cefoperazona		Piperacilina	
Ceftazidima		Pefloxacina	
Ciprofloxacina		Penicilina	
Claritromicina		Tetraciclina	
Clindamicina		Ticarcilina	
Doxicilina		Tobramicina	
Eritromicina		Trimetopim –Sulfa	
Gentamicina		Vancomicina	

R: RESISTENTE, I: INTERMEDIO, S: SENSIBLE

Fecha de Entrega: _____

Apellidos y Nombre del Licenciado en Bioanálisis: _____

Observaciones: _____

Firma de la Licenciada en Bioanálisis.