



**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DTO DE BIOANÁLISIS CLÍNICO
CATEDRA COMPONENTE DE INVESTIGACION
"Dr Jose Rafael Luna"
UNIDAD CURRICULAR TRABAJODE GRADO II**



**Prevalencia de Enterobacterias en el aislamiento e identificación de
Mastitis Clínica en Bovinos.**

www.bdigital.ula.ve

Autor:

Magaly, Valero.

CI: 25.643.272

Tutor:

María Evelyn Alviárez.

Mérida, Enero 2024



**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DTO DE BIOANÁLISIS CLÍNICO
CATEDRA COMPONENTE DE INVESTIGACION
"Dr Jose Rafael Luna"
UNIDAD CURRICULAR TRABAJODE GRADO II**



**Prevalencia de Enterobacterias en el aislamiento e identificación de
Mastitis Clínica en Bovinos.**

(Trabajo de Grado presentado como requisito parcial para optar al título de Licenciada en Bioanálisis)

www.bdigital.ula.ve

Autor:

Magaly, Valero.

CI: 25.643.272

Tutor:

María Evelyn Alviarez.

Mérida, Enero 2024

AGRADECIMIENTOS

A Dios Todopoderoso, quien ha estado a mi lado toda mi vida, siendo mi mejor amigo, el que siempre escucha mis súplicas, oraciones y me ha demostrado que su tiempo es perfecto y que sus planes siempre serán mejores que los míos. Sin él en mi corazón nada de lo que he logrado habría sido posible, este día soñado estuvo en el libro de la vida que él escribió para mí y que virtud es vivirlo en su divina presencia. Toda la gloria siempre será para ti mi Amado Dios.

A la Universidad de los Andes por abrirme las puertas, donde conocí la calidad de personas que componen cada rincón de ella, especialmente a la Facultad de Farmacia y Bioanálisis que se convirtió en mi segunda casa por más de siete años, y que brindó las mejores experiencias que se pueden vivir.

A todo el personal que labora en la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, administrativo, obrero, especialmente a sus profesores que siempre dan lo mejor de sí para brindar conocimientos y formar profesionales de calidad. En particular a mi tutora MSc María Evelyn Alviarez por siempre estar a completa disposición para llevar a cabo este trabajo de investigación. Gracias por ser tan incondicional y única.

A mis familiares y compañeros de estudio entre ellos Natalia, Maryori Patricia, Smailyn, Daniela, Nelianny, Melvis y Gabriela que desde los primeros semestres me han brindado su amistad fiel e incondicional. Los llevo siempre en mi corazón.

Valero R, Magaly Y.

DEDICATORIA

Este trabajo de investigación se lo dedico primeramente a Dios Todopoderoso de quien ha provenido todo para poder llegar hasta aquí hoy día. Por la sabiduría y el entendimiento derramado sobre mí para lograr todas las metas propuestas desde un principio.

A mi hijo **Luciano Gabriel**, todo lo que hago es por ti y para ti mi príncipe hermoso, desde que llegaste a mi vida me hice más fuerte, valiente y decidida. Gracias a ti he conocido el verdadero significado del amor. Te Amo con todas las fuerzas de mi corazón.

A mis padres por ser ese pilar fundamental y mi impulso a lo largo de toda mi carrera, sin su apoyo nada de esto habría sido posible. Los Amo.

A mis hermanos, especialmente Lorena y Beatriz por siempre estar para mí, por brindarme palabras de apoyo en todo momento. También a mi hermano mayor que es mi estrellita desde el cielo, sé que desde allá arriba me cuidas. Este logro también es de ustedes.

A mi compañero de vida y padre de mi hermoso hijo, por acompañarme en este largo camino y brindarme todo el apoyo necesario para llegar hoy hasta aquí. Gracias a ti todo ha sido mejor.

Valero R, Magaly Y.

TABLA DE CONTENIDO

VEREDICTO.....	i
AGRADECIMIENTO.....	ii
DEDICATORIA.....	iv
INDICE DE TABLAS.....	vii
INDICE DE FIGURAS.....	viii
RESÚMEN.....	ix
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO I: EL PROBLEMA.....	3
Planteamiento del problema.....	3
Justificación de la investigación.....	5
Objetivos de la investigación.....	7
Alcances y limitaciones.....	8
CAPITULO II: MARCO TEORICO.....	9
Trabajos previos.....	9
Bases Teóricas.....	15
Definición operacional de términos.....	32
Operacionalización de la variables.....	35
CAPITULO III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
Tipo de investigación.....	37
Diseño de investigación.....	37
Población y muestra.....	38
Sistema de variable.....	39
Procedimiento de la investigación.....	43
Diseño de análisis.....	46

CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSION	47
Resultados.....	47
Discusión.....	52
CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	55
Conclusiones.....	55
Recomendaciones.....	56
BIBLIOHEMEROGRAFÍA.....	57
ANEXOS.....	62

www.bdigital.ula.ve

Índice de Tablas

N°		Pág
1	Conteo de células somáticas en leche bovina.....	22
2	Interpretación de la prueba Wisconsin.....	25
3	Interpretación de los resultados de la prueba CMT.....	27
4	Operacionazilación del evento de estudio.....	35
5	Operacionalización del criterio de análisis Enterobacterias	36
6	Variables estadísticas según su naturaleza, escala de medida e indicadores estadísticos.....	46
7	Porcentaje general de cultivos analizados en muestras de leche bovina.....	47
8	Correlación de las especies de Enterobacterias y otras muestras en estudio.....	48
9	Cantidad de microorganismos aislados por especie.....	49
10	Cantidad y porcentaje de las especies del género Enterobacterias.....	50
11	Susceptibilidad de los antibióticos en diferentes muestras correspondientes a <i>E.coli</i> y <i>Proteus</i> sp.....	51

www.bdigital.ula.ve

Índice de Figuras

N°	Figuras	Pág
1	Unidad de secreción de leche bovina.....	19
2	Factores celulares y estructurales que participan en la respuesta inmune post infección.....	21
3	Papel indicador de pH usado para el diagnóstico de mastitis.....	24
4	Representación de la prueba de fondo negro.....	26
5	Prueba de mastitis California (CMT).....	28
6	Preparación del inóculo.....	45
7	Inoculación en Müller Hilton.....	45
8	Colocación de los antibióticos y viales de antibióticos	45
9	Medición de los halos de inhibición en milímetros.....	45

www.bdigital.ula.ve

**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DTO DE BIOANÁLISIS CLÍNICO
CATEDRA COMPONENTE DE INVESTIGACION
"Dr Jose Rafael Luna"
UNIDAD CURRICULAR TRABAJODE GRADO II**



**Prevalencia de *Enterobacterias* mediante el aislamiento e identificación
en bovinos con mastitis clínica**

Autora: Magaly Yoselin Valero Ramírez

Tutora: María Evelyn Alviarez

Asesor: José Gregorio Hernández

Resumen

El presente trabajo de investigación analiza la prevalencia de Enterobacterias mediante el aislamiento e identificación en bovinos con Mastitis Clínica. El diseño de la presente investigación es de tipo analítica, con un diseño retrospectivo, transeccional y univariable. Las muestras de leche fueron obtenidas mediante el ordeño mecánico o manual en bovinos lactando y con el primer parto. Se realizó la prueba de California Mastitis Test la cual será un criterio de inclusión para la realización de las pruebas microbiológicas pertinentes. Si el test arroja positividad por la gelificación del reactivo presente en este, se realizó la tinción de gram a las muestras, para la identificación del grupo bacteriano y valoración de polimorfonucleares presente en la evaluación microscópica. Al obtenerse en el gram bacilos gram negativos, se realizó la siembra e inoculación de la muestra en Agar Sangre y Agar Mac Conkey, también se realizó la prueba clave de la oxidasa la cual si arroja positivo identifica el género de bacterias gramnegativas no fermentadoras y si arroja negativa es indicativa del orden *Enterobacterales*. Se obtuvo un predominio de *E. coli* con un 88,8% de frecuencia en el aislamiento y solo se aislo una sola cepa perteneciente al género *Proteus*. En cuanto a la susceptibilidad antimicrobiana se hallaron 4 perfiles de susceptibilidad en las cepas de *E. coli*, predominando en todas la resistencia a la Ampicilina seguido de la resistencia a la cefalosporina de 1 generación. Esta investigación presentó un enfoque cuantitativo ya que se analizan numéricamente los datos recolectados de la unidad de estudio con el fin de medir la prevalencia de Enterobacterias en bovinos con mastitis clínica.

Palabras claves: Enterobacterias, mastitis clínica, bovinos, California Mastitis Test, aislamiento e identificación bacteriana.

INTRODUCCIÓN

La producción y calidad de leche como la rentabilidad para los productores, se ve disminuida cuando se presentan 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 y a los costos de las terapias instauradas, que también disminuye la calidad de la leche, impactando la inocuidad alimentaria (Franco, 2020).

Las bacterias que causan mastitis varían y reflejan los factores predisponentes involucrados (Lucas, 2021). Algunos patógenos ambientales, como las Enterobacterias, son verdaderamente oportunistas y la respuesta inmune los elimina con éxito después de un breve período de enfermedad clínica leve. Sin embargo, estas bacterias aprovechan situaciones favorables para colonizar la glándula mamaria (Mino, 2018). La gravedad de la enfermedad está asociada a diferentes factores como el hospedador, el medio ambiente y el agente infeccioso. Estos factores se asocian a la velocidad de respuesta inflamatoria de la glándula mamaria al momento en que el agente infeccioso muestra su poder de virulencia causando una severa y rápida alteración de la normalidad de la ubre (Ríos, 2020).

A pesar de la intensa investigación y la implementación de varias estrategias de control de mastitis a lo largo de las décadas, no ha desaparecido. Aunque se han implementado muchas técnicas de detección precoz y control, el cultivo microbiano sigue siendo el método de referencia para la identificación de enfermedades infecciosas. A nivel de veterinaria, esta técnica representa una ventaja al permitir obtener información de la presencia o ausencia de un grupo bacteriano específico y la identificación de

organismos patógenos prevalentes en el hato lechero, para con ello implementar programas de control de la enfermedad (Herrera, 2020).

Por consiguiente, es necesario aislar e identificar los microorganismos que estén presentes en la leche bovina una vez ordeñada, en aquellos animales que, tras cribado con pruebas de california mastitis test, presente un indicio de infección. En consecuencia, nace el interés de aislar e identificar Enterobacterias a partir de muestras de leche de bovinos con mastitis clínica, con el objetivo de determinar la prevalencia de esta bacteria en bovinos de la Tendida estado Táchira, considerando que es de importancia en la industria de la ganadería lechera y no existiendo estudios frecuentes del aislamiento de dichas bacterias.

En efecto, metodológicamente es necesario sistematizar esta investigación según las Normas APA. Por ende, el manuscrito está estructurado en tres capítulos: El Capítulo I, denominado el problema, formado por los siguientes subtítulos: Planteamiento del Problema, Justificación de la Investigación, Objetivos de la Investigación, Alcances y Limitaciones del proyecto llevado a cabo. El Capítulo II, llamado Marco Teórico, donde se describen los Trabajos Previos, Antecedentes Históricos, Bases Teóricas, Definición de Términos, Operacionalización del criterio de análisis. El Capítulo III, titulado Materiales y métodos, consta de los siguientes subtítulos: Tipo de Investigación, Diseño de la Investigación, Población y Muestra, Procedimientos o Metodología de la Investigación y Diseño de análisis.

Finalmente, el objetivo de esta investigación es: analizar la prevalencia de Enterobacterias mediante el aislamiento e identificación en bovinos con Mastitis Clínica en el laboratorio de investigaciones en bacteriología “Roberto Gabaldón” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes desde marzo 2019 hasta enero de 2024

CAPITULO I

El Problema

Planteamiento del Problema

La mastitis clínica es una respuesta inflamatoria de la glándula mamaria que ejerce un gran impacto en la producción animal, bienestar animal, y calidad de la leche producida. Esta inflamación se caracteriza por la presencia de células somáticas, principalmente neutrófilos polimorfonucleares en la glándula mamaria. Se han identificado más de 140 especies de patógenos causantes de mastitis. Existen pruebas biológicas para su detección, tales como la prueba de california para mastitis que ha sido utilizada durante décadas y sigue siendo la prueba más utilizada a nivel del campo para el diagnóstico de mastitis en el ganado bovino lechero (Fernández, Trujillo, Peña, Cerquera, Granja, 2012).

De acuerdo a su hábitat, interacción con el pezón, canal y patogenicidad los microorganismos pueden ser clasificados como microorganismos contagiosos, ambientales, oportunistas y otros microorganismos. Dentro de los microorganismos ambientales se encuentra el orden *Enterobacterales* ellos posee una amplia distribución en el medio ambiente y sus posibilidades de alcanzar el tejido glandular aumentan en condiciones de mala higiene (Puerta y Mateos, 2010). Las Enterobacterias son bacilos gramnegativos que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, están ampliamente dispersos en la naturaleza, se encuentran en la tierra, el agua y también en el tubo digestivo de seres humanos y animales (Koneman, 2017).

Trastornos ocasionados por el daño en la glándula mamaria de los bovinos, producen en el continente americano un 26.5% de los sacrificios en los mataderos. Los patógenos ambientales causantes de mastitis incluyen tanto a bacterias Gram negativas (tales como *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp.) y a bacterias Gram positivas (como *Streptococcus uberis* y *Streptococcus dysgalactiae*). Los patógenos ambientales tienden a estar menos adaptados para la supervivencia en la ubre y, a menudo desencadenan una respuesta inmune y una mastitis con síntomas clínicos leves o moderados (Mino, 2018).

De acuerdo a esto, la presente investigación será sustentada con la teoría microbiana de la enfermedad y con las siguientes aproximaciones teóricas Enterobacterias como agente causal de mastitis, fisiopatología de la mastitis y los métodos de detección de mastitis. Por consiguiente, la teoría microbiana propone que los microorganismos son la causa de una amplia gama de enfermedades, estos pequeños microorganismos afectan a los humanos, animales y otros huéspedes vivos. Los microorganismos causantes de enfermedad son llamados patógenos y las enfermedades infecciosas (Díaz, 2015).

A su vez las Enterobacterias como agente causal de mastitis se reconocen como los coliformes más comunes en la mastitis bovina. La exposición de los cuartos no infectados que presentan una mastitis con presencia de coliformes ocurre principalmente por la transmisión entre ordeños y durante el proceso. Estos patógenos son esencialmente oportunistas ya que su principal camino de transmisión son las heces, agua, tierra y virutas que contaminan el canal del pezón (Ribeiro y cols, 2008).

Asimismo, la fisiopatología se caracteriza por una reacción inflamatoria de la glándula mamaria en respuesta a un daño caracterizado por cambios físicos, químicos y usualmente bacteriológicos en la leche, así como patológicos en el tejido glandular (Spickler, Roth, Galyon, Lofstedt y Lenardon 2011). Finalmente, los métodos de detección se basan en los

signos clínicos o en los resultados de ensayos diseñados para descubrir aumentos en el recuento leucocitario en la leche en casos subclínicos (Lucas, 2021).

La situación actual del problema se refiere a las evidencias que muestran cómo el evento de estudio se ha presentado en el transcurso de años recientes. Diversos autores concluyeron que la prevalencia de mastitis clínica es mayoritariamente leve y que los microorganismos ambientales también son responsables de la enfermedad (Yera y Martínez, 2016).

Después de describir la situación actual del problema la autora de esta investigación formula el siguiente Enunciado Holopráxico:

¿Cuál es la correspondencia entre la prevalencia de Enterobacterias y el aislamiento e identificación en bovinos con mastitis clínica en el Laboratorio de Investigaciones en Bacteriología “Roberto Gabaldón” del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, desde marzo 2019 hasta enero de 2024?

www.bdigital.ula.ve

Justificación de la investigación

La justificación debe responder a los por qué o razones de la investigación. Específicamente, estas razones pueden ser categorizadas como necesidades, curiosidades y preocupaciones, motivaciones, intereses, valores, potencialidades, oportunidades, tendencias, contradicciones (Hurtado, 2010). Los autores de esta investigación identificaron las necesidades tales como: actualmente la presencia de los microorganismos en el ambiente pueden representar alteraciones en los animales siendo la causa de patologías como la mastitis (Spickler, Roth, Galyon, Lofstedt, Lenardon 2011). Del mismo modo es importante conocer que unos de los muchos microorganismos afectan la glándula de los bovinos, son las Enterobacterias que forman parte del tubo digestivo del animal y del medio ambiente (Puerta y Mateos. 2010).

Los investigadores del presente proyecto identificaron la razón que le motivaron, esto debido a que la amplia lucha contra la mastitis ha influenciado a la creación de programas de sanidad de la ubre. De manera que disminuya en un gran porcentaje la prevalencia de mastitis en el ganado lechero (Realpe, 2022).

Los investigadores deciden focalizar su interés sobre el evento de estudio Prevalencia de Enterobacterias en el aislamiento e identificación de bovinos con mastitis clínica desde el punto de vista analítico por varias razones. Primera, la prevalencia de la mastitis requiere el análisis de todas las muestras de bovinos, el aislamiento e identificación de las mismas. Segundo los criterios de análisis para la mastitis es el aislamiento y la identificación bacteriana como perspectiva primordial. Tercera la correlación entre la prevalencia de Enterobacterias y la mastitis en bovinos solo se puede realizar de manera analítica puesto que alguna bacteria será siempre el agente causal de la mastitis en un inicio desconocido.

Los autores de esta investigación identifican las oportunidades como una manera eficaz de aplicar una prueba y conocer a los patógenos implicados en la investigación tales como *Staphylococcus aureus* y *Enterobacter* spp García, Sánchez, López y Benítez (2018). Por consiguiente la identificación de los microorganismos es vital en esta investigación, ya que por medio de la observación se podrá identificar si están afectadas o no las células y en caso de estar alteradas ver que microorganismo está presente para ver sus características morfológicas y que pruebas claves son adecuadas para dicha observación (Ramírez y cols 2010).

Al considerar los por qué anteriores, los autores de esta investigación también encontraron razones con categoría de potencialidad, debido a que la mastitis ejerce un gran impacto en la producción animal, bienestar animal y producción de la leche. Una manera de evitar pérdidas es por medio de programas de sanidad animal en el cual el principal objetivo es disminuir la frecuencia en bovinos con clínica de mastitis. (Fernández, Trujillo, Peña,

Cerquera, Granja, 2012). A través del método de aislamiento e identificación se permite conocer el patógeno causante de muchas enfermedades, tanto a nivel ambiental como en el microbiológico (Gobernado y López, 2003).

Objetivos de la investigación

Objetivo general

- Analizar la presencia de Enterobacterias en el aislamiento e identificación de bovinos con Mastitis Clínica en el Laboratorio de Investigaciones en Bacteriología “Roberto Gabaldón” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes desde marzo 2019 hasta enero 2024.

Objetivos específicos

- Aislar Enterobacterias en cultivos microbiológicos, a partir de muestras de leche de bovinos con mastitis clínica de la Tendida, estado Táchira.
- Identificar las Enterobacterias aisladas, mediante pruebas bioquímicas microbiológicas convencionales.
- Evaluar el perfil de susceptibilidad de las cepas de Enterobacterias aisladas de las muestras de leche bovina.

Alcances y limitaciones de la investigación

Alcances de la Investigación

El alcance de una investigación está relacionado con la profundidad en cuanto al conocimiento que se desea adquirir sobre la problemática de estudio durante el proceso de investigación (Hernández, Fernández y Baptista, 2012). En correlación a esta afirmación, el alcance de esta investigación será analítica, ya que se estudiará una relación de entre la presencia de Enterobacterias aisladas de mastitis clínica bovina analizada en el Laboratorio de Investigaciones en Bacteriología “Roberto Gabaldón” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes desde marzo 2019 hasta enero 2024.

Limitaciones de la investigación

Las limitaciones son obstáculos que eventualmente pudieran presentarse durante el desarrollo del estudio y que escapan del control del investigador (Arias, 2006). Están relacionadas con los recursos teóricos, técnicos y de presupuesto económico durante el desarrollo de la investigación (Hernández y cols., 2010). En tal sentido, durante esta investigación se pudieran presentar limitaciones técnicas a la hora de recolectar las muestras, así como para ejecutar la parte experimental por razones de costos económicos, de transporte, materiales y medios de cultivo para las pruebas de identificación pertinentes. Cabe señalar que las fallas de los servicios públicos como eléctricos, agua, gas e internet en la zona, son obstáculos a los que los investigadores se enfrentan al momento de la ejecución de la investigación.

CAPITULO II

Marco Teórico

Trabajos Previos

Ormaza, Rueda, Huera e Ibarra (2022), estudiaron la **mastitis bovina en el cantón Montúfar – Carchi. Prevalencia, agente causal y factores de riesgo**. El objetivo de la presente investigación fue determinar la prevalencia, agentes causales y factores de riesgo asociados a la mastitis bovina en el cantón Montúfar, provincia del Carchi, Ecuador. Se utilizó la prueba de California Mastitis Test (CMT) aplicada a 386 vacas en producción pertenecientes a 70 Unidades Productivas Agropecuarias (UPAs). De los animales diagnosticados con mastitis se tomó una muestra de leche que fue llevada a cultivo en placas Petrifilm 3M para identificar: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, mohos y levaduras, posibles agentes causantes de la mastitis bovina.

El proceso de cultivo se realizó siguiendo las especificaciones para cada tipo de microorganismo dado por la casa Petrifilm 3M. La identificación de los factores de riesgo se realizó mediante un cuestionario estructurado utilizando la técnica de la entrevista a cada uno de los propietarios de las UPAs en estudio y con los resultados se determinó la prevalencia y el análisis de chi cuadrado de Pearson para los factores de riesgo. La prevalencia de mastitis bovina en el cantón Montúfar, fue del 35,71%. Los agentes causales reconocidos como causantes de la mastitis bovina fueron según su frecuencia: *Staphylococcus aureus* 100,00%, *Escherichia coli* 64,00%, mohos y levaduras 0,00%. Se identificó como factores de riesgo diferencias

significativas al tipo de ordeño (ordeño mecánico) y el tipo de camino (caminos húmedos), no se definieron como factor de riesgo el desconocimiento de la enfermedad, el sellado de los pezones, el período de secado y tipo de limpieza de la ubre. Lo antes expuesto permite definir a la mastitis bovina como una enfermedad infectocontagiosa multifactorial, que debe analizarse desde el punto de vista del animal, del ambiente y del manejo, al momento de plantear estrategias de control. Esta investigación tiene relación directa con el presente estudio, debido a la implicancia de las Enterobacterias aisladas de leche bovina. Lo cual es esencial para la comparación de resultados.

Realpe (2022), trabajó en la **caracterización de Patógenos Causantes de Mastitis Clínica y Subclínica y Perfil de Sensibilidad “*In Vitro*” en Dos Fincas con Diferentes Condiciones Climáticas**. El objetivo del presente estudio es caracterizar los patógenos causantes de mastitis bovina, clínica y subclínica por medio de pruebas especializadas en dos fincas con diferentes condiciones climáticas y a su vez se llevó a cabo una comparación de resultados, ya que se trabajó con animales de ambas fincas con la finalidad de determinar si este factor interfiere en la presentación de los diferentes microorganismos. Adicionalmente se realizó un perfil de sensibilidad *in vitro* de los patógenos para determinar la eficacia de los antibióticos más utilizados en dichos lugares, considerando la gran importancia que tiene este aspecto a la hora de buscar el mejor tratamiento para los animales que presentan mastitis.

La investigación que se ha desarrollado es de tipo descriptivo transversal, encaminado al bienestar y salud animal, realizado con una muestra de 36 vacas en ordeño de ambas fincas. Como técnica principal se utilizó la recolección de muestras con prueba de CMT, cultivos y antibiogramas. Se

obtuvo como resultado que los patógenos predominantes son: *Staphylococcus* spp y *Staphylococcus aureus* y con menor presentación: *E. coli*, *Citrobacter diversus* y *Klebsiella oxytoca*. Y que los microorganismos de la finca # 1 presentan una mayor resistencia a la cefalexina, amikacina, penicilina, ampicilina y amoxicilina + ácido clavulánico, mientras que los animales de la finca #2 hacen mayor resistencia a la amikacina y en menor proporción a la ampicilina y al amoxicilina + ácido clavulánico.

La autora concluye que la mastitis bovina es un gran problema cuando no se toman medidas pertinentes como lo son los muestreos regulares y el uso de tratamientos eficaces y que la mejor elección siempre será la prevención. Este estudio aporta bases fundamentales para el desarrollo de la presente investigación.

Franco (2020), estudió la **prevalencia y perfil de resistencia antimicrobiana de bacterias causantes de mastitis aisladas en leche cruda bovina en un establecimiento de la localidad de Shoenweide del departamento de Presidente Hayes – Paraguay**. El objetivo del trabajo fue identificar bacterias y su resistencia antimicrobiana, en muestras de leche cruda a partir de bovinos con mastitis subclínica (MSC) y clínica (MC), determinadas por recuentos de células somáticas (RCS). El RCS, fue clasificado en 2 categorías; las determinantes de MSC ≥ 200.000 hasta ≤ 260.000 cel/ml, y las determinantes de MC > 260.000 cél/ml, se obtuvieron 142 aislamientos bacterianos.

Para analizar la susceptibilidad antimicrobiana, se utilizó el método de concentración inhibitoria mínima, con tarjetas de uso veterinario en el equipo Vitek. Como resultado se obtuvo 56 animales con MC, aislándose las siguientes bacterias: Las especies bacterianas encontradas en mastitis clínicas fueron *Streptococcus dysgalactiae* 100 %, *Streptococcus uberis* 100

%, *Enterococcus faecium* 100 %, *Enterococcus gallinarum* 100 % (1/1) y *Escherichia coli* 100 %, *Staphylococcus aureus* 96,2 %, SCN 92 %, *Pseudomonas aeruginosa* 91,8%, *Kocuria kristinae* 88,9%. La presencia de *E. coli* resultó sensible a todos los antibióticos testados. Concluyendo que el problema en este tambo no sería la higiene precisamente sino el control de la mastitis por causas de otra índole y el agua contaminada con *Pseudomonas* sp probablemente. Esta investigación se relaciona con la presente en cuanto a que abarca el mismo objeto y sujeto de estudio, para una unidad de investigación semejante.

Mino (2018), determinó la **prevalencia de mastitis clínica por *Escherichia coli* en diferentes establos del distrito de Chiclayo, departamento de Lambayeque**, en el presente estudio se hizo el análisis bacteriológico de secreción láctea de 50 vacas lecheras de diferentes razas, edad, número de partos y cuartos mamarios. Para ello se colectó 200 muestras de leche en frascos estériles de 50 vacas con mastitis clínica. Estas muestras se procesaron en un laboratorio de microbiología, sembrándolas en agar Mc Conkey y agar sangre, incubándolos a temperatura de 37°C por 24 horas, procediéndose a la identificación de la bacteria *Escherichia coli* a través de pruebas bioquímicas. El número de muestras positivas fue de 12, arrojando una prevalencia de 24% de mastitis clínica por *Escherichia coli*.

La prevalencia por raza en vacas fue la siguiente: Holstein 18.60%, Fleckvieh 50%, Jersey 50%, criollo 100%. La prevalencia por edades fue siguiente: 2 años 100%, 3 años 19.05%, 4 años 22.22%, 5 años 23.08%, 6 años 0% y 7 años 0%. La prevalencia por partos se obtuvo lo siguiente: 1 parto 33.33%, 2 partos 25%, 3 partos 22.22%, 4 parto 0%. Una de las causas menos común en mastitis clínica, es por *Escherichia coli* ya que no todos los ganaderos tienen un manejo adecuado en el control sanitario, pero es una de

las más costosas para el ganadero porque baja la producción y puede llegar hasta la muerte del animal. En dicho estudio existe una correspondencia con el presente estudio planteado. Debido a que se limita a estudiar a un género específico de las Enterobacterias.

García, Sánchez, López y Benítez (2018), publicaron un artículo de investigación, en el cual divulgan la **prevalencia de Mastitis clínica y microorganismos asociados a esta**. El objetivo de esta investigación fue evaluar la prevalencia de mastitis subclínica y los microorganismos asociados ella. Utilizando un diseño de investigación de campo cualitativo. Se tomaron muestras de la leche de cada animal (10ml) específicamente en frascos estériles, para la determinación de los porcentajes de grasa y de los contenidos de proteína, lactosa y sólidos totales, así mismo se realizó un diagnóstico de la enfermedad mediante la prueba de california, con conteo de células somáticas, y se determinaron los agentes microbiológicos causantes de esta patología.

Entre los resultados se encontraron, los principales agentes etiológicos causantes de la elevada prevalencia de mastitis subclínica en el rebaño en abril y mayo fueron *Staphylococcus aureus* y *Enterobacter* spp. El 50% de los animales mostraron conteos de células somáticas superiores a 200.000 células/ml. Se concluye que la patología tuvo alta prevalencia en el rebaño y que predominaron los agentes etiológicos contagiosos con una frecuencia del 50%. La leche tuvo una buena calidad nutricional; sin embargo, presento altos conteos de células somáticas que traen consigo mala calidad higiénico sanitaria. El encontrar microorganismos que propagan la mastitis contagiosa, hace notorio la falta de capacitación y asesoría en las prácticas de ordeño. Este estudio se considera relevante para sustentar la presente investigación,

debido a su relación en cuanto al objeto sujeto y unidad de investigación planteada.

Antecedente histórico o epistemiológico de la mastitis

La mastitis es un complejo inflamatorio de la glándula mamaria, primaria o secundaria, aguda o crónica, con alteración anatómica y funcional, la cual resulta de la interacción entre agentes infecciosas y prácticas administrativas deficientes, generalmente, esta enfermedad está asociada a una infección bacteriana. Los primeros reportes sobre la etiología de la enfermedad fueron realizados por Nocard y Mollerau. Estos investigadores no dieron nombre específico a los agentes aislados. En 1840, Guilleveau dio el nombre de *Streptococcus Mastitis Sporadicae* a los microorganismos aislados en los casos esporádicos de mastitis y *Streptococcus mastitis contagiasae* a los encontrados en los casos de mastitis enzoóticas (Spickler, Roth, Galyon, Lofstedt y Lenardon 2011).

En 1884, Rosembach aisló y clasificó sistemáticamente otros gérmenes presentes en las infecciones de la ubre que los llamo Micrococcus, posteriormente clasificados como *Staphylococcus* basándose para ello en la capacidad de producir pigmentos. En los años comprendidos entre 1890—1945 la bacteriología de la mastitis estuvo encaminada a descubrir métodos de laboratorio específicos para clasificar los *Streptococcus* y *Staphylococcus*. El descubrimiento de los antibióticos bajó las pérdidas causadas por mastitis reduciendo la incidencia de cuartos ciegos; no obstante, los usos inadecuados de ellos han contribuido a ocultar temporalmente los síntomas clínicos de la enfermedad, favoreciendo así el incremento de resistencia de los gérmenes (Spickler, Roth, Galyon, Lofstedt y Lenardon 2011)

Bases teóricas

Teoría Microbiana de la enfermedad

A mediados del siglo XIX investigadores como Louis Pasteur establecieron el desarrollo de ciertas enfermedades y la presencia de microorganismos en el enfermo. Sin embargo, la asociación de los microorganismos con la enfermedad no aseguraba que estos fueran su causa, Roberth Koch fue el responsable de poner a prueba experimentalmente la denominada teoría microbiana de la enfermedad. Roberth Koch centro sus primeros trabajos en el estudio de una enfermedad del ganado, el carbunco que también afecta a las personas.

Koch observó al microscopio preparaciones de sangre de los enfermos y comprobó que siempre había una bacteria llamada *Bacillus anthracis*. Tomó una pequeña cantidad de sangre de un ratón enfermo de carbunco y se la inyectó a un ratón sano que enfermó de esta misma enfermedad y murió, hizo lo mismo 20 veces y pasaba lo mismo. Así comprobó que incluso después de muchas transferencias de cultivo la bacteria seguía causando la misma enfermedad cuando se inoculaba a un animal. Con ello no solo confirmó el papel de los microorganismos en las infecciones sino también la idea de que cada enfermedad está producida por un microorganismo determinado y cada microorganismo genera una enfermedad diferente. Los postulados de Koch señalan lo siguiente (Díaz, 2015):

1. El microorganismo causal debe estar presente en cada caso de enfermedad, pero ausente en los organismos sanos.
2. Hay que aislar y desarrollar en cultivo puro al microorganismo sospechoso.

3. Al inocular el microorganismo aislado en un huésped sano, se debe desarrollar la misma enfermedad.
4. El mismo microorganismo debe aislarse de nuevo a partir del huésped enfermo.

Aproximación teórica sobre Enterobacterias como agente causal de mastitis

La principal causa de esta enfermedad es infecciosa; los agentes patógenos infecciosos causantes de mastitis son variados, en los bovinos los agentes causantes más frecuentes son los agentes patógeno bacterianos como *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Pasteurella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Nocardia asteroides*, *Mycoplasma bovis*, *Corynebacterium pyogenes*, *Pseudomonas* sp., *Leptospira* sp., *Serratia* sp., *Klebsiella* sp., *Fusobacterium* sp.; algas, como *Prototheca* sp.; hongos, como *Aspergillus fumigatus*, *Trichosporon* sp. y *Candida* sp.; además de levaduras, como *Cryptococcus neoformans* entre otros, a pesar de que no todas pueden ser aisladas, son conocidas en la presentación de esta enfermedad. Cabe resaltar que básicamente son patógenos asociados y se aíslan dependiendo del agente que predomine (Radostits, 2002).

En efecto, casi cualquier bacteria o microorganismo micótico que, de un modo oportunista invade tejidos y causa infección puede producir mastitis. No obstante, la mayoría de las infecciones son causadas por varias especies bacterianas. En relación a los bacilos Gram negativos, los agentes causales son especialmente organismos de origen entérico fermentadores de lactosa, comúnmente denominados coliformes (Carvajal, Villaroel y Ticona, 2021).

Desde un punto de vista epidemiológico, la fuente de infección puede ser considerada como contagiosa o ambiental, donde se desarrolla la actividad productiva de la vaca lechera. Estas infecciones representan la contaminación de la ubre en toda la vida del animal y son la causa primera de las mastitis con manifestación clínica en granjas de bajo recuento de células somáticas. Por orden de prevalencia en Gram negativos se destacan: *Escherichia coli*, y géneros como *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Pseudomonas*. La infección está influenciada sobre todo por temperatura y humedad ambiental, época de lactación, estado de lactación, número de parto y sistema de manejo (Ruiz, 2014)

Además, el 90 % de la mastitis causada por coliformes es principalmente por *E. coli*. Aunque no viven en la piel de la ubre, entran al canal del pezón cuando la vaca entra en contacto con un medio ambiente sucio. Ya que estas bacterias se encuentran en las heces, camas y alimentos. Sin embargo, estas mastitis pocas veces exceden el 10% de los casos totales en el hato, los coliformes (bacilos Gram negativos fermentadores de lactosa de la familia *Enterobacteriaceae*), son la forma más común de las mastitis clínicas severas (Sánchez, Gutiérrez y Posada, 2018).

Tras la infección, el número de coliformes en la leche aumenta rápidamente, a menudo alcanzando el pico de concentración bacteriana a las pocas horas. La mayoría de las infecciones por coliformes son eliminadas de la glándula con pocos síntomas clínicos. No obstante, si las concentraciones bacterianas son lo suficientemente altas para producir una reacción inflamatoria aguda, la alteración sistémica es una consecuencia frecuente. El tratamiento antibacteriano esta idealmente basado en la identificación del agente causal (Mino, 2018).

Franco en el 2020 señala que los microorganismos de mayor frecuencia en casos de mastitis: *E. coli*, *Klebsiella aerogenes*, y especies de *Klebsiellas*. Géneros como *Citrobacter*, género *Enterobacter*, género *Klebsiella* y *Escherichia* forman el grupo coliformes de bacterias entéricas. La mastitis coliforme, generalmente se encuentra en mayor proporción en grandes rebaños con lotes sobrecargados de vacas donde se ha permitido la acumulación de estiércol y paja de pesebrera. Una situación similar puede producirse cuando se emplea demasiada agua para lavar las ubres, lo que dificulta el secado apropiado, y permite que el agua con gran concentración de coliformes se introduzca en las pezoneras después que el flujo de leche ha cesado.

Aproximación teórica sobre la fisiopatología de la mastitis

La glándula mamaria es clasificada como una glándula de composición túbulo-alveolar, que está formada por tejido intersticial, parénquima (epitelio secretor), ductos, vasos y nervios. Posee una ubicación inguinal con mitades de derecha a izquierda diferenciadas, y cada mitad posee un cuarto anterior y posterior, cada mitad es independiente con su contra parte en lo que respecta al suministro de sangre, nervios, drenado linfático y aparato suspensorio (Ashdwn y Done 2011).

La unidad secretora de leche es el alveolo; un número de estos, agrupados juntos y rodeados por una capa de tejido conectivo, es conocido como lobulillo; la división de tejido conectivo rodea a un número de lobulillos para formar el llamado lóbulo; donde las unidades secretoras de la glándula mamaria están divididas en lobulillos y lóbulos, estos están rodeados por células mioepiteliales contráctiles, que son también llamadas células

canasta; estas células se contraen para expulsar leche (también conocida como bajada de la leche) como respuesta a la liberación de oxitocina. Los alveolos se convergen en conductos que conducen la leche a la cisterna dentro de la glándula y finalmente a la cisterna de cada pezón. La expulsión de la leche de cada pezón ocurre a través del canal del pezón, que se mantiene bien cerrado por un esfínter muscular (Figura 1) (Mino, 2018).

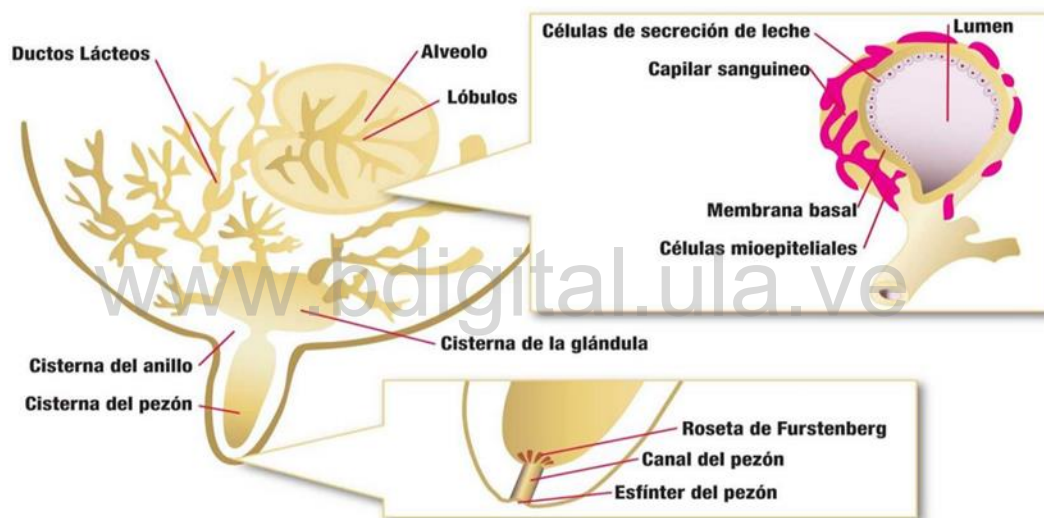


Figura 1. Unidad de secreción de leche bovina

Fuente: Mino, 2018.

La glándula mamaria posee una serie de mecanismos de defensa para hacerla menos accesible a diversos patógenos infecciosos; los cuales están conformados por la piel de la glándula y su respectivo estrato corneo; el musculo liso que le da mayor elasticidad del conducto del pezón; así también la presencia de la lactoferrina y lactoperoxidasa quienes conforman el grupo de mecanismos no inmunológicos solubles; al igual que el complemento sérico que a comparación de las anteriores si es inmunológico soluble, como

las inmunoglobulinas, células somáticas y las citoquinas que están en la glándula mamaria. Sin embargo debe considerarse que los puntos vulnerables de infección de la glándula son el meato del pezón que debe impedir el ingreso ascendente de microorganismos, y por soluciones de continuidad de la piel, las cuales permiten el ingreso al tejido glandular de agentes infecciosos, favoreciendo la colonización, invasión, e infección de la glándula mamaria (Meglia, 2001).

Las células somáticas están constituidas por una asociación de leucocitos y células epiteliales y normalmente están presentes en la leche en niveles bajos. Los leucocitos en la leche son una respuesta a la inflamación que puede aparecer debido a una enfermedad o, a veces, tras una lesión. Cuando los microorganismos invaden un cuarto de la ubre y empiezan a multiplicarse o cuando el número de estos aumenta significativamente en un cuarto infectado, el organismo del bovino responde con leucocitos para combatir a dichos microorganismos causando la mastitis (Philpot, 2011).

Por lo tanto, varios autores han definido la mastitis, como la respuesta inflamatoria de la glándula mamaria ante una agresión. La cual puede ser una alteración física, química y casi siempre bacteriológica de la leche, por modificaciones patológicas del tejido glandular (Figura 2). Se caracteriza por la entrada de células somáticas, principalmente neutrófilos polimorfonucleares (PMN), a la glándula mamaria y por un aumento en el contenido de proteasa en la leche producida (Kerr y Wellnitz, 2003). Una vez que las bacterias ingresan a las células en el interior de la glándula mamaria se inicia la respuesta inmunitaria del organismo enviando glóbulos blancos para neutralizar a las bacterias invasoras. Estos glóbulos blancos son en esencia lo que constituye los recuentos de células somáticas (RCS) (Herrera, 2020). En este punto, las células epiteliales se desprenden del revestimiento

del tejido de la ubre. Así pues, un incremento del número de estas células dentro del alveolo es un indicador como respuesta a la infección; aun cuando no han sido detectadas al observar la leche de la vaca (Carrión, 2011). El contenido de células somáticas en la leche permite conocer datos claves sobre la función y el estado de salud de la glándula mamaria lactante y debido a su cercana relación con la composición de la leche es un criterio muy importante que constituye la calidad de la leche (Tabla 1) (Franco, 2020).

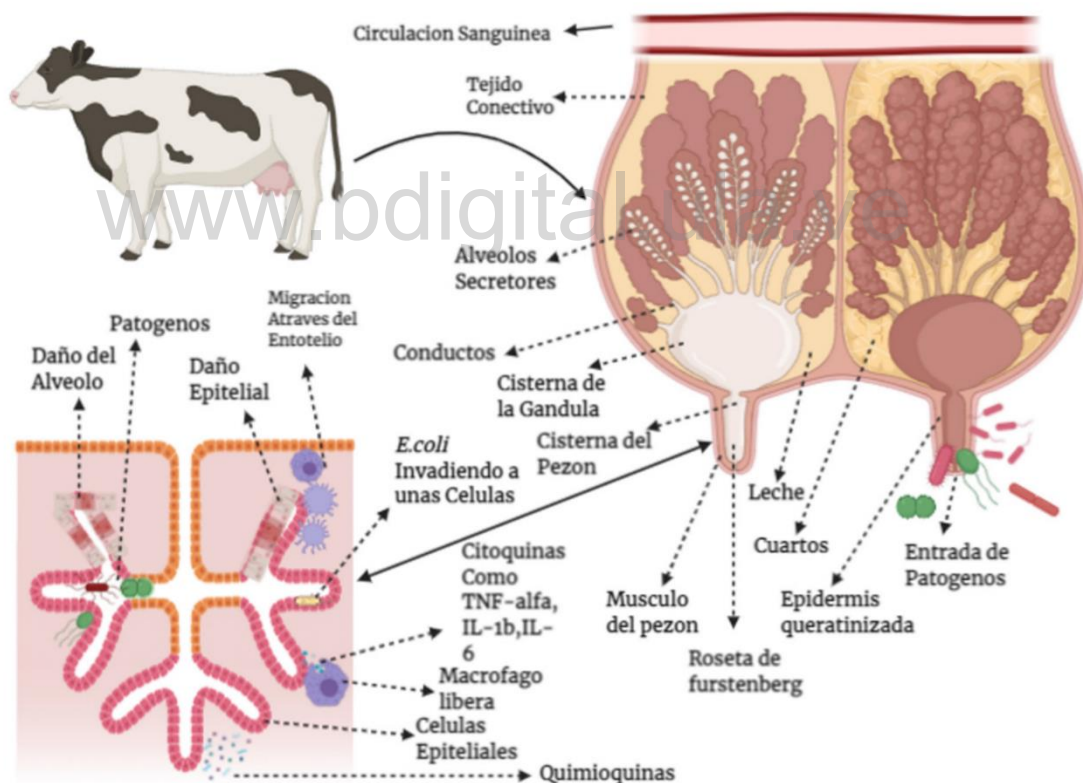


Figura 2. Factores celulares y estructurales que participan en la respuesta inmune luego de la mastitis.

Fuente: López, Ramos y Muñoz (2022).

Tabla 1.

Contenido de células somáticas en la leche bovina

Células/ml de leche	Estado de la ubre
Hasta 100.000	Sana, leche normal
De 100.000 a 200.000	Sospechoso, nivel fisiológico superior
Más de 200.000	Mastitis, leche anormal

Fuente: Franco (2020).

En general las células somáticas aumentan con la edad y el estado de lactancia. Al final de la lactancia y en las primeras semanas posteriores al parto se puede producir aumento del RCS independientemente del nivel de infección en la glándula mamaria. Este aumento parece ser producto de un mecanismo natural de defensa inmunitario preparatorio del parto para incrementar las defensas orgánicas de la glándula mamaria en el momento tan crítico como lo es el periodo perinatal. Aquellos cuartos sin infección reducen rápidamente el RCS dentro de pocas semanas posteriores al parto (Realpe, 2022).

Sin embargo, cuando altos RCS alteran la composición de la leche y causan anomalías en los tejidos glandulares se considera un cuadro de mastitis, que dependiendo, si los cambios son detectables mediante inspecciones o palpación se habla de mastitis clínica (MC), si no hay cambios detectables clínicamente y se recurre a métodos indirectos de campo o laboratorio se habla de mastitis subclínica (MSC), si los resultados son positivos (Carvajal, Villaroel y Ticona, 2021). La MC es una enfermedad reconocida comúnmente por los signos clínicos que puede desencadenar signología sistémica como hipertermia, cuartos mamarios inflamados, con tumefacción, calor, dolor, endurecimiento aumento de tamaño y enrojecidos. Hay una disminución en la cantidad y calidad de la leche, la que se presenta

alterada tanto en su apariencia macroscópica (cambio de color, presencia de coágulos y grumos) como microscópica (presencia de diferentes células y gran número de leucocitos). En algunos casos, llega a estados de fibrosis con pérdida de la función por atrofia de los alvéolos galactóforos (Calderón, Rodríguez, Arrieta y Mattar 2011)

Aproximación teórica sobre los métodos de detección de mastitis

El descubrimiento de la mastitis se basa en los signos clínicos o en los resultados de ensayos diseñados para descubrir aumentos en el recuento leucocitario en la leche en casos subclínicos (Franco, 2020).

Palpación de la ubre. Este tipo de prueba puede revelar engrosamiento y estrechamiento de algunos de los cuartos, lesiones traumáticas y alteraciones de la piel y pezón. Con la palpación de la ubre se pueden apreciar zonas endurecidas y con dolor. Además, se puede apreciar un aumento de grosor en el tejido epitelial, los mismos que originan trastornos en la emisión de leche. Si mediante la palpación se logra observar una inflamación aguda, el cuarto tiende a tener un aspecto aumentado de tamaño mostrando enrojecimiento con elevada temperatura (40°C) (Bedolla, Castañeda y Wolter 2007).

Papel indicador: Calderón, Rodríguez Arrieta y Mattar (2011), mencionan que se pueden comprobar las alteraciones del pH de la leche. Según la gravedad de la mastitis el pH puede aumentar de normal (6.6) hasta un grado alcalino.

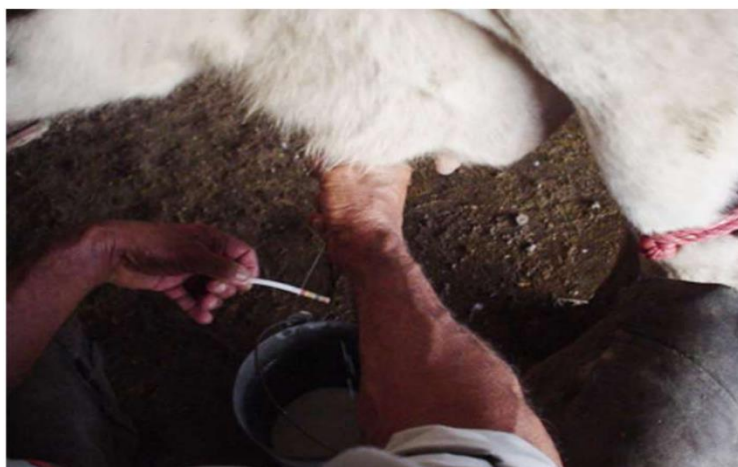


Figura 3. Papel indicador de pH usado para el diagnóstico de mastitis.

Fuente: Lucas (2021)

Conductividad eléctrica. Se basa en el aumento de la conductividad eléctrica en la leche debido a un aumento electrolítico de iones de sodio y cloro, es un método para monitorear el estado de la mastitis permitiendo el monitoreo individual por cuarto. Permite la identificación de mastitis clínica con precisión, en caso de mastitis subclínica la precisión es solo del 50%. A veces da un resultado de un gran número de falsos positivos o de falsos negativos, por lo que no es muy confiable (Bedolla, Castañeda y Wolter 2007).

Prueba de Whiteside. En concordancia con Bedolla, Castañeda y Wolter (2007) señalan que consiste en la mezcla de la leche con una solución de NaOH al 4%, ocasionando que la leche se gelifique formando grumos visibles. Si el contenido de la leche tiene mayor número de células somáticas los grumos serán más grandes.

Prueba de Wisconsin (WMT). De acuerdo con Bedolla, Castañeda y Wolter (2007), aseguran que los rebaños con una puntuación baja de 3 y 12 ml estarán en condiciones de buena a regular, mientras que los rebaños con

puntuaciones superiores a 12 ml requieren de atención inmediata, esta prueba fue diseñada para el uso en laboratorios y es utilizada para el conteo de células en muestras de leche fresca mezclada o leche de tanques de enfriamiento, los resultados se miden cuantitativamente dependiendo de la viscosidad. Los resultados se miden en mililitros y su valor de células somáticas, para ello se emplea la siguiente:

Tabla 2.

Interpretación de la prueba Wisconsin

(Mililitro)	Cantidad de Células somáticas x 10 ³	Perdida de producción
3-7	140 - 260	5 %
8 - 16	300 - 675	8 %
17 - 30	730 - 1700	9 – 18 %
31 - 35	1800 - 2800	19 – 25 %

Fuente: Bedolla, Castañeda y Wolter (2007).

Prueba de fondo negro. Los primeros chorros de leche son los que tienen mayor contaminación, ya que es la leche que se encuentra en la cisterna del pezón por lo tanto debe ser extraída, pues se podrá observar la presencia de grumos y alteración del color Bedolla, Castañeda y Wolter (2007). Para esta prueba se utilizan tazas o paletas color negro que permite visualizar copos, grumos, restos de fibrina, moco o cualquier otro material extraño en la leche (Lucas, 2021).



Figura 4. Representación de la prueba fondo negro

Fuente: Lucas (2021)

California mastitis test (CMT). En concordancia con Bedolla, Castañeda y Wolter (2007), aseguran que se considera uno de los mejores métodos para detectar el índice de mastitis (CMT). Es de fácil manejo y buena sensibilidad que se fundamenta en la capacidad que tiene el reactivo Lauril Sulfato de sodio para reaccionar con el DNA celular produciendo viscosidad directamente proporcional al número de células somáticas en la muestra de leche.

Hernández, Fernández y Baptista (2010), aseguran que la prueba consiste en el agregado de un detergente a la leche, causando la liberación del ADN de los leucocitos presentes en la ubre convirtiéndose en agentes proteicos de la leche en gelatina. A mayor presencia de células se libera una mayor concentración de ADN, es por lo que se da la formación espesa (Figura 5). Los resultados pueden ser interpretados en cinco clases (Tabla 3).

Tabla 3.*Interpretación de los resultados de la prueba de CMT*

Grado CMT	Descripción	Significado	RCS x 10³	Interpretación
N	No hay precipitado, por ende, no hay infección. La mezcla permanece en estado líquido y homogéneo.	Negativo	0 - 200	Cuarto sano
T	Hay algo de engrosamiento. La reacción es reversible y la viscosidad tiende a desaparecer.	Trazas	200 – 400	Mastitis subclínica
1	La mezcla espesa, pero no hay formación de gel en medio de la paleta y la viscosidad observada tiende a persistir. La mezcla cae poco a poco.	Ligeramente positivo	400 - 1200	Mastitis subclínica
2	Formación de gel en el centro de la paleta durante la agitación. El gel se acumula en la parte inferior de la paleta cuando el movimiento giratorio se interrumpe. Cuando se vierte la mezcla la más gelatinosa cae y puede dejar un poco de líquido en el pocillo.	Positivo	1200 - 5000	Infección seria
3	Se forma gel en el centro de la paleta y se pega en el fondo del recipiente, pero no a los lados. Cuando se vierte la mezcla, se cae sin dejar líquido detrás.	Muy positivo	Más de 5000	Infección seria

Fuente: Hernández, Fernández y Baptista (2010).



Figura 5. Prueba de mastitis California (CMT)

Fuente: Realpe (2022)

Conteo de células somáticas. Es un indicador del estado de salud de la glándula mamaria, permite conocer el número de células por mililitro de leche, es decir mide la concentración de leucocitos en la leche. Denominado método óptico, es el recuento directo mediante el microscopio utilizando un aumento de 500x. Este método es el más preciso, a pesar de que requiere más tiempo y los equipos son costosos (Bedolla, Castañeda y Wolter 2007).

Exámen de Muestra de Leche en Laboratorio. Para realizar un examen bacteriológico concluyente es necesario obtener muestras de leche por ordeño separado de los cuarterones, adoptando las máximas medidas higiénicas. Es preciso que no existan gérmenes en las proximidades del animal que puedan llegar a la leche extraída. Si no es así, los gérmenes de la suciedad ambiental dificultaran el análisis y resultado. La extracción de la leche, ha de hacerse indispensablemente en tubos estériles, de plástico, de un solo uso. Los tubos deben contener un medio de conservación que no modifique el estado bacteriológico de la leche durante las 24-48 horas siguientes a la extracción. Las muestras serán tomadas de los cuatro

pezones desinfectados, desechando el primer chorro de leche, llenando los tubos hasta dos tercios de su capacidad y cerrando inmediatamente, procurando no tocar el tapón ni el borde del tubo para seguidamente refrigerarlas, identificadas y embaladas para su posterior envío al laboratorio. El examen de la leche (y de la secreción seca), pueden revelar alteraciones que indican claramente la existencia de trastornos de la ubre. El estado de la ubre se establece por el contenido celular de la leche. Por otra parte, la identificación del germen causal de una infección solo puede realizarse con un estudio bacteriológico, asociado a cultivo y/o a la demostración microscópica. El cultivo se hace en medios adecuados y con la temperatura idónea, por lo que los gérmenes presentes en la leche se multiplican a las pocas horas en una proporción que llega a las 100.000. Las diversas bacterias muestran un crecimiento distinto por lo que pueden diferenciarse entre sí por su forma y color. El diagnóstico se asegura con medios selectivos de cultivo, en los que crecen preferentemente una bacteria determinada. Junto a esto el examen microscópico confirman el tipo de bacteria responsable. Los gérmenes patógenos detectados proporcionan las bases con que iniciar el tratamiento o realizar las medidas adecuadas de saneamiento de los animales (Carvajal, Villaroel y Ticona, 2021)

Generalidades de las Enterobacterias

Las Enterobacterias son un grupo heterogéneo y extenso de bacilos gramnegativos cuyo hábitat natural es el intestino del ser humano y de los animales. La familia comprende más de 40 géneros y cientos de especies y subespecies, identificados en función de sus propiedades bioquímicas, 20 estructura antigénica, hibridación ADN-ADN y secuenciación del ARNr 16S. Entre los géneros más comunes se citan: *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus*, entre otros. Las Enterobacterias son aerobios o anaerobios facultativos, fermentan una amplia gama de

hidratos de carbono, poseen una estructura antigénica compleja y producen diversas toxinas. Estas también se conocen como bacilos gramnegativos entéricos, bacterias entéricas, o coliformes (Brooks, 2014).

Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* u orden *Enterobacterales* son bacilos gramnegativos de tamaño intermedio (0,3 a 1 x 1 a 6 µm). Comparten un antígeno común, pueden ser inmóviles o móviles con flagelos peritricos, y no forman esporas; son anaerobios facultativos y pueden desarrollar en medios de cultivo básicos, enriquecidos y selectivos diferenciales. Entre otras características se describen como: fermentadores de la glucosa y otros carbohidratos, reducen los nitratos a nitritos, son catalasa-positivos y oxidasa-negativos (Murray y cols., 2017).

Las Enterobacterias, una de las vías de entrada más importantes de los microorganismos al ser humano es a través de la cadena alimentaria; en todo el mundo, el consumo de alimentos contaminados ocasiona la muerte de dos millones de personas al año. Diferentes miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, incluidas *Salmonella* spp y los patotipos diarreicos de *E. coli* son considerados microorganismos patógenos transmitidos por alimentos. Las Enterobacterias aunque se reportan en diferentes tipos de alimentos, se encuentran principalmente en productos derivados de la carne, debido a que forman parte de su microbiota intestinal. Del mismo modo a presencia de *Salmonella* spp está vinculada frecuentemente al consumo de pollo, huevos o sus productos derivados (Ruiz, Martínez, Gomes, Palma y Riveros 2018).

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, 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 progenie 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, 2018).

Definición Operacional de Términos

Mastitis Subclínica

La mastitis subclínica se caracteriza por la presencia de un microorganismo, esta puede desarrollar fácilmente una inflamación y no tener tratamiento. Esta forma de mastitis es el tipo más frecuente de infección intramamaria y tanto la ubre como la leche tienen aspecto normal. La mastitis subclínica no es advertida a simple vista ni por el ordeñador ni por el productor, pero puede ser detectada por distintos tipos de análisis que manifiestan la presencia de los microorganismos o un aumento en el Conteo de Células Somáticas (Franco. 2020)

Mastitis Clínica

La mastitis clínica 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)

Microbiota

Es el conjunto de microorganismos que reside en nuestro cuerpo formado por una mezcla microscópica de miles y millones de bacterias, actinomicetos, hongos, protozoos, etc., por cada gramo de suelo. La cual cumple un rol especial en los procesos bioquímicos de la materia (Murray, 2017).

Patogenia

La infección de la glándula mamaria se produce siempre siguiendo la vía del conducto del pezón y el desarrollo de la mastitis (Herrera, 2020).

Invasión

Es la etapa en que los microorganismos pasan del exterior de la ubre a la leche que se encuentra en el conducto del pezón (Herrera, 2020).

Infección

Es la etapa en que los gérmenes se multiplican rápidamente e invaden el tejido mamario (Herrera, 2020).

Inflamación

Después de la invasión, puede establecerse una población bacteriana en el conducto del pezón y utilizando esa resistencia como base, ocurre una serie de multiplicaciones y diseminaciones en el tejido mamario, dependiendo la infección del mismo, de la susceptibilidad del animal. Esto a su vez produce inflamación, etapa en la cual aparece la mastitis clínica y en la que aumenta notablemente el recuento de leucocitos de la leche ordeñada (Lucas 2021).

Antibiótico

Sustancia química producida por un microorganismo, que desarrolla una actividad antimicrobiana. Su origen puede ser: Natural o biológico. Se obtiene de cultivos de microorganismos que pueden ser hongos o bacterias.

Método Kirby-Bauer

(Método de difusión en agar) es empleado para determinar la sensibilidad de un agente microbiano frente a un antibiótico. Este método comprende lo

que se denomina un antibiograma o prueba de susceptibilidad bacteriana frente a fármacos específicos.

Prueba de la oxidasa

Esta prueba sirve para determinar la presencia de enzimas oxidasas. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema de citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo el cual es reductor por el oxígeno molecular produciéndose agua o peróxido de hidrogeno según la especie bacteriana. El oxígeno actúa por tanto como aceptor final de electrones en la cadena transportadora de electrones. Por lo general el sistema citocromo oxidasa solo se encuentra en las bacterias aerobias, algunas anaerobias facultativas y excepcionalmente en alguna microaerófila, pero las bacterias anaerobias estrictas carecen de actividad oxidasa. La presencia de oxidasa va ligada a producción de catalasa, ya que está degradada al peróxido de hidrogeno que se produce como consecuencia de la reducción del oxígeno y cuya acumulación es toxica (Murray, 2017).

Pruebas de identificación bacteriana

Son consideradas pruebas utilizadas para evaluar la actividad metabólica o bioquímica de las bacterias, por medio de las cuales se puede efectuar la identificación final de las especies, se realiza subcultivando el aislamiento primario a una serie de medios diferenciales de prueba, los resultados de los cuales pueden ser interpretados tras uno o más días de incubación adicional (Koneman, Allen, Janda, Schreckenberger y Winn, 2011).

Agar Mac Conkey

Es un medio de cultivo selectivo diferencial por la selección y recuperación de *Enterobacteriaceae* y bacilos gramnegativos entéricos, las sales biliares y el cristal violeta inhiben el crecimiento de bacterias grampositivas y de

algunos gramnegativos exigentes. Las bacterias fermentadoras de lactosa producen colonias que tienen distintos tonos de rojo variara de acuerdo al pH. Las colonias no fermentadoras de lactosa aparecen sin color y transparentes. (Koneman, Allen, Janda, Schreckenberger y Winn, 2011).

Operacionalización de las variables

Para operacionalizar el sistema de variables o el evento de estudio con el respectivo criterio de análisis, es necesario la definición conceptual y la operacional de las mismas las variables se operacionalizan con la finalidad de identificar los elementos y datos empíricos que expresan su presencia. El proceso de la operacionalización de las variables garantiza que los objetivos propuestos sean alcanzados (Hurtado, 2010). En tal sentido, en las Tablas 4 y 5 se presenta la operacionalización de los eventos de estudio.

Tabla 4.

Operacionalización del evento mastitis

1.Evento de estudio	2.Definición conceptual ¿Quiénes?	3.Definición Operacional ¿Cómo se mide?
Mastitis	Es la inflamación de la glándula mamaria, en la mayoría de los casos como consecuencia de infecciones causadas por distintos microorganismos, especialmente bacterias, y con menos frecuencia debido a traumatismos, lesiones e irritaciones de origen químico	Se basa en los signos clínicos o en los resultados de ensayos diseñados para descubrir aumentos en el recuento leucocitario en la leche
4.Dimensiones	5.Indicador	
Clínica	Contaje celular somático mayor de 200.000.	
Subclínica	Sintomatología de inflamación.	

Fuente: Valero y Alviarez (2023).

Tabla 5.

Operacionalización del criterio de análisis Enterobacterias

1.Criterio de análisis	2.Definición conceptual ¿Quiénes?	3.Definición Operacional ¿Cómo se mide?
Enterobacterias	Las Enterobacterias pertenecen al grupo de la familia Enterobacteriaceae, constituyen el grupo más grande y heterogéneo de los bacilos Gram negativos.	Cultivo de muestras de leche
4.Dimensiones	5.Indicadores	
<i>Presente</i> <i>Ausente</i>	• Positivo para las pruebas de identificación químicas microbiológicas	

Fuente: Valero y Alviarez (2023).

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO III

Materiales y Métodos

Tipo de Investigación

La investigación en general responde a ciertos objetivos. De acuerdo a cada uno de estos objetivos, es posible derivar un tipo particular de investigación. En relación a lo anterior, la Investigación Holística ha organizado y clasificado los objetivos, así como sus correspondientes tipos de investigación. Específicamente pueden ser: exploratoria, descriptiva, analítica, comparativa, explicativa, predictiva, proyectiva, confirmativa y evaluativa. A su vez, las investigaciones de tipo analítica tienen como fin estudiar la estructura de los fenómenos, ya que no están a simple vista, dirigidos a analizar la correspondencia del evento de estudio con un criterio de análisis y clasificación (Hurtado, 2010). En tal sentido, esta investigación es analítica ya que se analizó la relación entre la presencia de Enterobacterias y el aislamiento e identificación de bovinos con mastitis clínica.

Diseño de la Investigación

El diseño de investigación hace explícitos los aspectos operativos de la misma. Si el tipo de investigación se define con base al objetivo, el diseño se define con base al procedimiento, el cual se debe determinar a través de las estrategias que se implementan para recolectar la información en una fuente determinada, en un tiempo específico y en una cantidad o amplitud asociada a lo que se quiere saber. Hay un grupo de diseños que son específicos de las investigaciones de nivel integrativo, en especial de las confirmatorias y evaluativas, las cuales responden a dos criterios que no

aplican a los demás tipos de investigación; estos criterios son: el grado de intervención del investigador y la rigurosidad del control de variables extrañas (Hurtado, 2010).

En concordancia con lo antes expuesto, la presente investigación tiene un diseño retrospectivo, transeccional y univariable, donde el investigador hace un control estricto de variables extrañas para descartar que los cambios hayan sido originados por otros factores distintos a las variables de estudio (Hurtado, 2010).

Población y muestra

Unidad de Investigación

La población es el conjunto de elementos que se quiere conocer o investigar algunas de sus características. La muestra es un subconjunto representativo de un universo o población (Arias, 2006). La unidad de investigación está representada por las muestras de leche de bovinos con mastitis, situados en la población de la Tendida, solo para aquellos que arrojen positivo para California Mastitis Test, muestras que serán procesadas en el Laboratorio de Investigaciones en Bacteriología “Roberto Gabaldón” del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes y por ser época de pandemia por el virus SARS Cov 2 se analizaron conjuntamente en el Laboratorio Microbiológico Veterinario (VATCA.CA) Ejido – Mérida. Los criterios de inclusión son: Bovinos que ya tengan el primer parto, Bovinos que no están recibiendo antibióticos al momento de la toma de muestra, Bovinos que aplicándole el Test de California Mastitis (TCM) arroje un resultado positivo.

Selección del Tamaño de la Muestra

Las muestras serán no probabilísticas por conveniencia. Debido a la falta de insumos para el desarrollo experimental. En tal sentido se incluyeron 71 bovinos, de los cuales solo 40 resultaron positivos para cultivo. El tipo de muestra utilizada es no probabilística, respecto a que la elección de los elementos no depende de la probabilidad, sino de causas relacionadas con las características de la investigación o de quien hace la muestra. Aquí el procedimiento no es mecánico ni con base en fórmulas de probabilidad, sino que depende del proceso de toma de decisiones de un investigador o de un grupo de investigadores y desde luego, las muestras seleccionadas obedecen a otros criterios de investigación (Hernández, Fernández y Baptista, 2010).

Sistema de Variable

Existen diferentes tipos de variables como son: la variable dependiente, variable independiente y variable interviniente. Teniendo de esta forma que la variable dependiente es la que se modifica por acción de la variable independiente, constituye los efectos o consecuencias que se miden. En relación a la variable independiente es la causa que genera y explica los cambios en la variable dependiente y en cuanto a la variable interviniente es la que se interpone entre la variable independiente y la variable dependiente pudiendo influir en la modificación de esta última (Arias, 2006). Las variables que guardan relación con el objetivo de la investigación son las siguientes; la prevalencia de Enterobacterias y las categorías son: presencia de Enterobacterias o ausencia de Enterobacterias. No está sistematizada como dependiente e independiente porque no es confirmatoria.

Procedimientos de la Investigación

Es importante que el investigador describa con detalle, paso por paso, el procedimiento que llevará a cabo durante la investigación, esta descripción permite, no sólo verificar que el procedimiento utilizado cumplió con los requerimientos metodológicos del proceso de investigación, sino además hará posible que otros investigadores puedan apoyarse en la información para investigaciones similares en otros contextos (Hurtado, 2010).

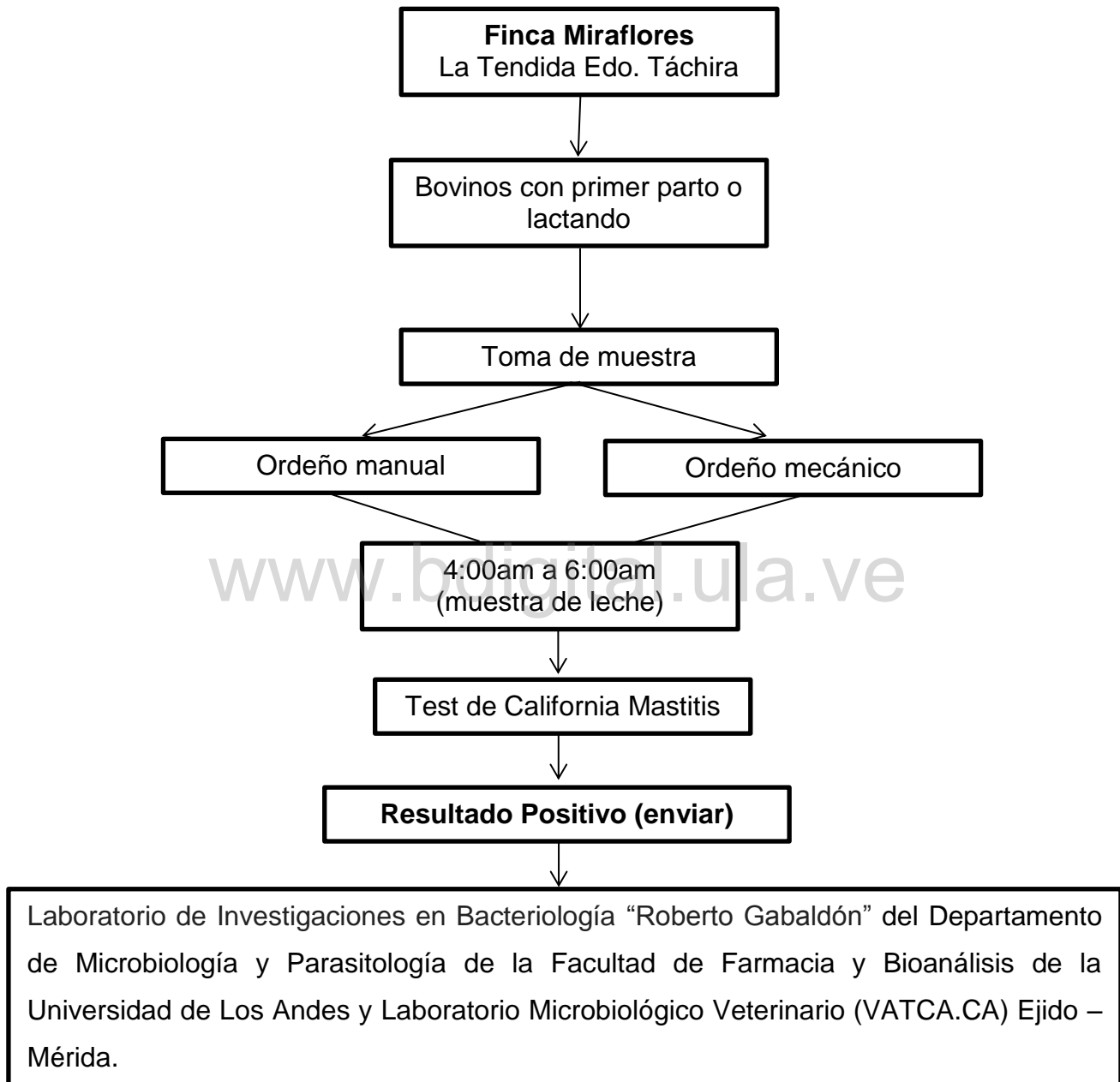
El procedimiento que se llevara a cabo en esta investigación comprende la recolección de las muestras a partir de los datos suministrados por la finca. La recolección de la leche, se realiza mediante ordeño mecánico o manual en las primeras horas de la mañana de 4:00am a 6:00am, a bovinos con un primer parto y lactando. Las muestras fueron recolectadas en la zona de la Tendida estado Táchira y procesadas en el Laboratorio de Investigaciones en Bacteriología “Roberto Gabaldón” del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes y Laboratorio Microbiológico Veterinario (VATCA.CA) Ejido – Mérida.

A estas se le ejecutó el Test de Mastitis California, las muestras que arrojaron resultados positivos o reactivos se denotan mediante la gelificación del reactivo presente en el test. Esta metodología permite que el encargado de la finca o médico veterinario tratante, envíe las muestras positivas al Laboratorio donde se realizan las pruebas pertinentes; las cuales comienzan con una tinción de gram en la leche y con la valoración de polimorfonucleares y la morfología bacteriana. Según lo encontrado en el gram, ya sea cocos o bacilos se procede a seguir la marcha analítica.

Posteriormente se realizó el cultivo bacteriano según lo evidenciado mediante la tinción de gram realizada arrojando bacilos gramnegativos. Posteriormente se realiza la inoculación en diferentes medios de cultivo es importante señalar que la marca utilizada para esta investigación

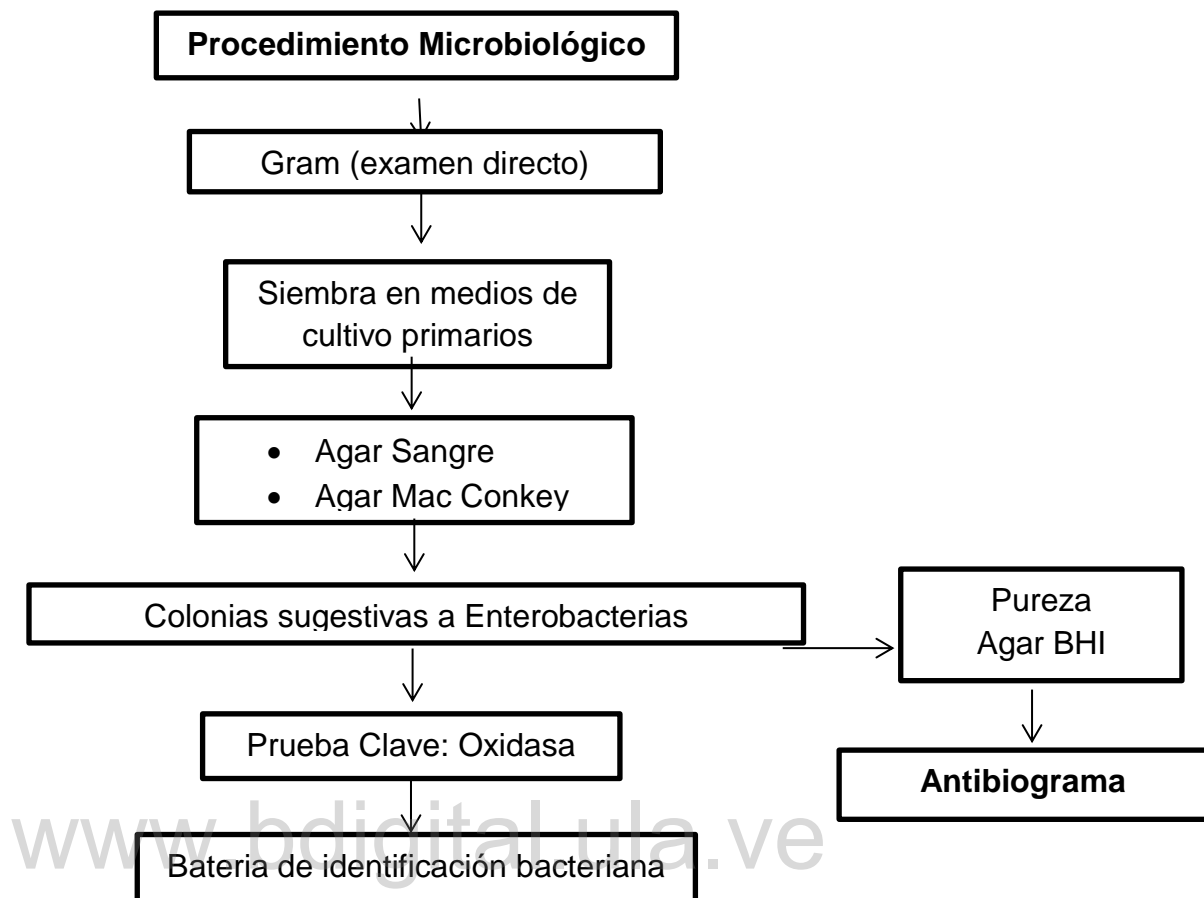
corresponde a la casa comercial BBL, seguidamente inocula la muestra en agar Sangre como medio enriquecido, que permite el crecimiento de bacterias nutricionalmente exigentes como medio primario. De la misma manera se inocula en Agar Mac Conkey el cual sirve como medio selectivo diferencial, para el aislamiento de bacilos gramnegativos, se debe tomar una o dos colonias para luego ser inoculadas en agar BHI durante 24 horas a 37°C La prueba clave es la prueba de oxidasa, la cual si arroja positividad es indicativa de bacterias lactosas negativas no fermentadoras y se usa la batería bioquímica específica para ellas entre las que se incluyen KIA, O/F, Glucosa, Caldo BHI y Citrato, para la posterior identificación. Si la prueba clave arroja negatividad es indicativa de bacterias lactosa positiva o negativa donde hablamos de la familia *Enterobacteriaceae* a las cuales de igual manera se le realiza la selección de la batería bioquímica que incluye Kliger, LIA, MIO, Citrato, Urea y Rojo de metilo para la posterior identificación. Seguidamente se realiza el antibiograma utilizando el método de Kirby-Bauer, en la cual inicialmente se seleccionan una o dos colonias de la placa del microorganismo puro, tomándolo con un asa esterilizada con ayuda de un mechero, luego se prepara el inóculo utilizando 5ml de solución salina estéril en un tubo y colocando la pequeña porción de microorganismo dentro del tubo, se procede a comparar con el inóculo estandarizado de McFarland, luego se usa un hisopo estéril que se debe impregnar en el inóculo realizado y seguidamente realizar la inoculación en agar Müller Hilton, realizando un efecto colchón, seguidamente se colocan de 5 a 6 antibióticos de manera equidistante con ayuda de una pinza estéril, y presionando suavemente los antibióticos utilizados fueron Amikacina, Ampicilina, Ampicilina-Sulbactam, Ceftazidima, Ciprofloxacina, Trimetropim-sulfametoxasol, Cefepime, Aztreonam, Imipenem, Meropenem, Tetraciclina, Cefadroxilo perteneciente a la casa comercial OXOID, se lleva a incubación de 16 a 18 horas, luego de transcurrido este tiempo se miden los halos de inhibición en milímetros con ayuda de una regla, comparando estos resultados con un Sistema de

Reporte Veterinario, correlacionado los puntos de corte con las bacterias en estudio (Enterobacterias) finalmente se interpretan los resultados de dicho antibiograma como Resistente o Sensible y se realiza el reporte.



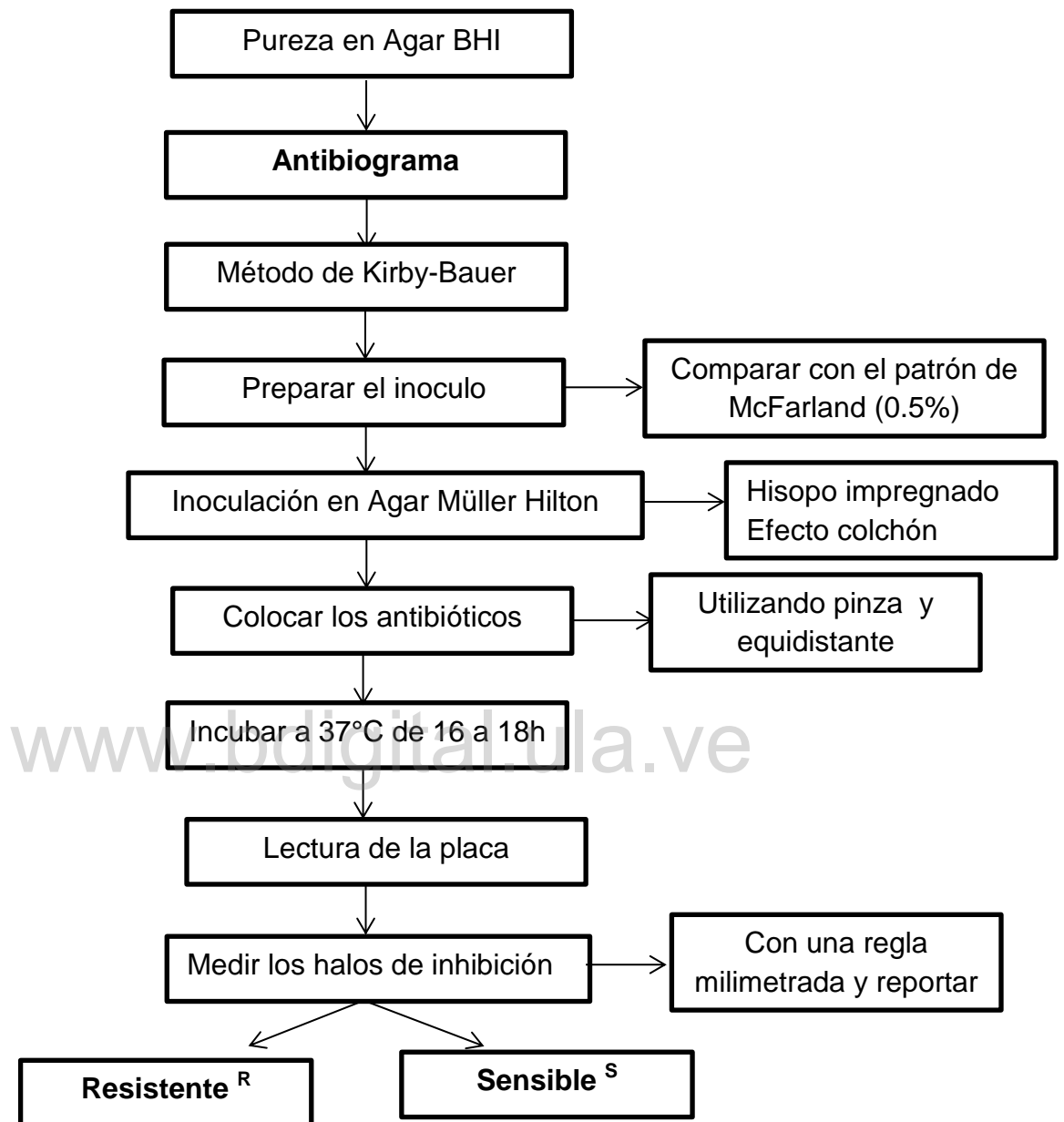
Esquema 1: Procedimiento empleado para la recolección de la muestra de leche

Fuente: Valero y Alviárez (2023)



Esquema 2: Procedimiento empleado en el laboratorio para la identificación microbiológica.

Fuente: Valero y Alviárez (2023)



Esquema 3: Procedimiento para la realización de antibiograma.

Fuente: Valero y Alviarez (2023)



Figura 6: Preparación del inóculo

Fuente: Valero y Alviarez (2023)



Figura 7: Inoculación en Müller Hilton

Fuente: Valero y Alviarez (2023)



Figura 8: Colocación de los antibioticos y viales de antibióticos.

Fuente: Valero y Alviarez (2023)



Figura 9: Medición del halo de inhibición en milímetros

Fuente: Valero y Alviarez (2023)

Diseño de Análisis

Existen dos tipos de enfoques de investigación: cualitativo y cuantitativo. La metodología cuantitativa se basa en métodos de recolección de datos con medición numérica y análisis matemático (Hernández, Fernández y Baptista, 2010). Por lo tanto, esta investigación tendrá un enfoque cuantitativo ya que se analizarán numéricamente los datos recolectados de la unidad de estudio con el fin de medir la prevalencia de Enterobacterias en bovinos con mastitis clínica.

Variables estadísticas

Las variables estadísticas de esta investigación serán clasificadas desde su naturaleza y escala de medida. El fin es identificar el indicador estadístico pertinente (Tabla 6).

Tabla 6.

Variables estadísticas según su naturaleza, escala de medida e indicadores estadísticos

Variables	Tipo de variables			Escala de medida				Indicador Estadístico
	Cualitativa	Cuantitativa		Nominal	Ordinal	Intervalo	Razón	
		Discreta	Continua					
Enterobacterias	Si	No	No	Si	No	No	No	Frecuencias absolutas y porcentajes/ Medidas de tendencia central
Otros microorganismos	Si	No	No	Si	No	No	No	Frecuencias absolutas y porcentajes/ Medidas de tendencia central

Fuente: Valero y Alviarez, (2023)

CAPITULO IV

Resultados y discusión.

El presente capítulo reseña los resultados y discusión de los datos obtenidos en la determinación de la prevalencia de Enterobacterias en muestras de leche de bovinos con mastitis clínica. Mediante diferentes pruebas bacteriológicas que permiten el aislamiento e identificación de los microorganismos que resulta interés para los investigadores.

Resultados

Las muestras en estudio son provenientes de la Finca Miraflores ubicada en la Tendida estado Táchira y corresponden al periodo comprendido desde marzo 2019 hasta enero 2024, en tal sentido corresponden a 71 bovinos y de cada uno de ellos se les realizó cultivo de leche por diagnóstico de mastitis, de los cuales solo 40 resultaron positivos para el cultivo microbiológico. Cabe destacar que a todas las muestras se les realizó un gram para identificar la morfología colonial de cada una de las muestras para luego proceder a realizar el cultivo.

De las 71 muestras analizadas, el 56,33% corresponde a cultivos positivos y el 43,66% a cultivos negativos o sin ningún crecimiento bacteriano hasta las 72 horas de incubación (tabla 7).

Tabla 7.

Porcentaje general de cultivos analizados en muestras de leche bovina.

CULTIVOS POSITIVOS	40	56.33%
CULTIVOS NEGATIVOS	31	43.66%
TOTAL DE CULTIVOS	71	99.99%

Fuente: Valero y Alviárez, (2023)

Desde Marzo del 2019 de los cultivos analizados positivos, se observó la presencia de microorganismos pertenecientes a cocos gram positivos como *Staphylococcus*, *Streptococcus*, bacilos gram positivos como los pertenecientes a los generos *Bacillus* y *Lactobacilos*, y una solo especie de *Corynebacterium* sp. De igual manera se observa la presencia de Enterobacterias y un bacilo gram negativo no fermentador de la lactosa (*Pseudomonas* sp.) (tabla 8)

Tabla 8.

Correlación de las especies de Enterobacterias y otros microorganismos en estudio.

MES	AÑO	MUESTRA	ENTEROBACTERIAS	OTROS
MARZO	2019	731	<i>E.coli</i>	<i>Streptococcus</i> sp.
AGOSTO	2019	pool 902	*	<i>Streptococcus</i> sp.
	2019	IL818	*	<i>P.aeruginosa</i> ; <i>Streptococcus</i> sp.
ENERO	2020	904	*	<i>Staphylococcus</i> sp.
	2020	2261B	*	<i>Bacillus</i> sp.
	2020	31453	*	<i>Staphylococcus</i> sp.
	2020	2092CA	*	<i>Bacillus</i> sp.
MARZO	2020	1	*	<i>Streptococcus</i> sp.
	2020	3	*	<i>Bacillus</i> sp.
	2020	895	*	<i>Streptococcus</i> sp.
	2020	843	*	<i>Staphylococcus</i> sp.
	2020	TANQUE	<i>E.coli</i>	<i>Staphylococcus</i> sp.
JUNIO	2020	673	<i>E.coli</i>	*
	2020	4812	<i>E.coli</i>	<i>Streptococcus</i> sp.
	2020	814	<i>Proteus</i> sp.	*
MARZO	2022	41063	*	<i>P. aeruginosa</i>
	2022	3640	*	<i>Streptococcus</i> sp.
	2022	7836	*	<i>Streptococcus</i> sp.
	2022	51399	*	<i>Staphylococcus</i> sp.
	2022	8462	*	<i>Lactobacillus</i> sp.
	2022	3969	*	<i>Staphylococcus</i> sp.
JUNIO	2022	M1	*	<i>Streptococcus</i> sp.

	2022	M3	*	<i>Streptococcus</i> sp.
	2022	M5	*	<i>Streptococcus</i> sp.
	2022	M7	*	<i>Staphylococcus</i> sp.
	2022	M9	<i>E.coli</i>	*
	2022	M10	*	<i>Corynebacterium</i> sp.
SEPTIEMBRE	2022	7053	*	<i>Streptococcus</i> sp.
ENERO	2023	14404D	*	<i>Streptococcus</i> sp.
	2023	1420C	*	<i>Staphylococcus</i> sp.
	2023	19010B	*	<i>Streptococcus</i> sp.
	2023	15006C	*	<i>Streptococcus</i> sp.
	2023	15008C	*	<i>Streptococcus</i> sp.
	2023	TANQUE	<i>E.coli</i>	<i>Staphylococcus</i> sp.
JULIO	2023	1602	*	<i>Staphylococcus</i> sp.
	2023	5112	*	<i>Staphylococcus</i> sp.
	2023	TANQUE	<i>E.coli</i>	<i>Staphylococcus</i> sp.
AGOSTO	2023	407	*	<i>Staphylococcus</i> sp.
	2023	6087	<i>E.coli</i>	<i>Lactobacillus</i> sp.

Fuente: Valero y Alviárez., (2023)

www.bdigital.ula.ve

En la (tabla 9) se observa, que las Enterobacterias representan el 23,76% (9/40), de los microorganismos aislados provenientes de muestra de leche de bovinos con mastitis clínica.

Tabla 9.

Cantidad de microorganismos aislados seleccionados por especie.

Géneros aislados	Porcentaje
Enterobacterias (09)	23.76%
Otros (31)	76.23%

Fuente: Valero y Alviárez., (2023)

De las 9 enterobacterias aisladas, el mayor porcentaje estuvo representado por *E. coli* con un 88,8% (8/9), y solo se logró identificar una (1/9) cepa de *Proteus sp.* (tabla 10)

Tabla 10

Cantidad y porcentaje de las especies del género Enterobacterias.

Enterobacterias aisladas	Porcentaje %
<i>E. coli.</i> (08)	88.88
<i>Proteus sp.</i> (01)	11.10

Fuente: Valero y Alviarez (2023)

Es de suma importancia evaluar la sensibilidad de los antibióticos en las muestras en estudio es por ellos que se realiza una tabla especificando la especie en estudio, los antibióticos utilizados en cada muestra evaluada y el resultado de cada uno de ellos, mostrándose si su resultado es sensible o resistente. En la tabla 11 se observan 4 fenotipos de susceptibilidad para las cepas de *E. coli* aisladas:

Fenotipo 1: Amikacina^S, **Ampicilina**^R, Ampicilina sulbactam^S, Aztreonam^S, **Cefadroxilo**^R, Ceftazidima^S, Cefepime^S, Ciprofloxacina^S, Imipenem^S, Meropenem^S, Tetraciclina^S, Trimetropim sulfametoxasol^S. **Fenotipo 2:**

Amikacina^S, **Ampicilina**^R, Ampicilina sulbactam^S, Aztreonam^S, Cefadroxilo^S, Ceftazidima^S, Cefepime^S, Ciprofloxacina^S, Imipenem^S, Meropenem^S, Tetraciclina^S, **Trimetropim sulfametoxasol**^R.

Fenotipo 3: Amikacina^S, **Ampicilina**^R, Ampicilina sulbactam^S, Aztreonam^S, **Cefadroxilo**^R, Ceftazidima^S, Cefepime^S, Ciprofloxacina^S, Imipenem^S, Meropenem^S, Tetraciclina^S, **Trimetropim sulfametoxasol**^R.

Fenotipo 4: Amikacina^S, **Ampicilina**^R, Ampicilina sulbactam^S, Aztreonam^S, **Cefadroxilo**^R, Ceftazidima^S, Cefepime^S, Ciprofloxacina^S, Imipenem^S, Meropenem^S, Tetraciclina^R, **Trimetropim sulfametoxasol**^R, cada uno con 2 cepas que corresponden al 25% de frecuencia.

En el caso de *Proteus* spp., solo se presentó un solo fenotipo de Susceptibilidad: Amikacina^S, Ampicilina sulbactam^R, Aztreonam^S, Ceftazidima^S, Cefepime^S, Ciprofloxacina^S, Imipenem^S, Meropenem^S, Tetraciclina^R, **Trimetropim sulfametoxasol^R** cabe destacar que este microorganismo presenta una resistencia natural a las aminopenicilinas, cefalosporinas de 1 generación y segunda generación por ello no se colocaron en el antibiograma

Tabla 11.

Susceptibilidad de los antibióticos en diferentes muestras correspondientes a *E. coli* y *Proteus* sp.

<i>E. coli.</i>	FEN1	FEN2	FEN3	FEN3	FEN1	FEN4	FEN4	FEN2	<i>Proteus</i> sp.
ATB UTILIZADOS	731	TANQUE	673	4812	M9	TANQUE	TANQUE	6087	814
Amikacina	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Ampicilina	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Ampicilina Sulbactam	S	S	S	S	S	S	S	S	R
Ceftazidima	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Ciprofloxacina	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Trimetropim-sulfa	S	R	R	R	S	R	R	R	R
Cefepime	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Aztreonam	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Imipenem	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Meropenem	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Tetraciclina	S	S	R	R	S	S	S	S	R
Cefadroxilo	R	R	R	R	R	S	S	R	S

Fuente: Valero y Alviarez., (2023)

Discusión

La discusión de resultados se refiere al contraste de 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.

Relacionando los resultados obtenidos de los trabajos previos descritos anteriormente, Franco (2020), por su parte deduce que la mastitis clínica no surge de la higiene precisamente, sino que existe otro tipo de contaminación bacteriana al animal como lo es la ingesta de aguas contaminadas con diferentes microorganismos que ponen en riesgo la salud del animal y que a futuro afecta todo el sistema digestivo incluyendo los canales de la glándula mamaria y por ende afecta la leche producida por cada bovino, teniendo como consecuencia problemas de salud para toda la población que consume esta leche.

Cervantes (2017), realizó un trabajo de investigación donde el número de muestras de leche proveniente de bovinos fue de 86, todas las muestras fueron sometidas a cultivo microbiológico pero no todas tuvieron crecimiento microbiológico, solo 49 resultaron positivas y el resto que corresponde a 37 no tuvieron crecimiento. Esta investigación está ampliamente relacionada con la presente investigación, ya que de todas las muestras analizadas solo un grupo tuvo crecimiento bacteriano.

Ormaza, Rueda, Huera e Ibarra (2022), concluyeron que la mastitis clínica es una enfermedad de tipo infectocontagiosa que deriva de diferentes factores ambientales, tipo de ordeño, caminos húmedos y con respecto a los microorganismos aislados en dicha investigación tiene mayor proporción las bacterias grampositivas representando un 100.00% y las gramnegativas representan el 92.00%. En relación a la presente investigación, los resultados arrojan una significativa relación, debido a que también hay una estrecha relación con los resultados obtenidos, debido a que las bacterias

grampositivas tienen mayor porcentaje en comparación con las bacterias gramnegativas.

Mino (2018), por su parte se limitó a estudiar solo un grupo de la especie Enterobacterias como lo fue *Escherichia coli*, la cual deduce que este género no es el principal causante de la Mastitis Clínica dato de suma importancia para nuestra investigación ya que los resultados obtenidos por nuestra parte esta especie representa un gran porcentaje y también es importante señalar que las Enterobacterias también forman parte del tubo digestivo de los bovinos.

Los trabajos realizados anteriormente aportan valiosa información a los investigadores, ya que con ellos podemos comparar los resultados obtenidos y evaluar la correspondencia que existe entre los resultados obtenidos en un periodo de tiempo y los evaluados actualmente. También permite tener una idea de la progresividad de la enfermedad orientándonos hacia el tratamiento que se debe aplicar.

Realpe (2022), realizó un estudio de sensibilidad microbiana para determinar la eficacia de los antibióticos más utilizados. Los datos son provenientes de 2 fincas con diferentes condiciones climáticas, y como conclusión los bovinos de la finca 1 presentan mayor sensibilidad a la cefalexina, amikacina y penicilina. Mientras que en la finca 2 tiene mayor sensibilidad la amikacina y en menor proporción la ampicilina y amoxicilina ac clavulánico. Este trabajo tiene gran relación con la presente investigación ya que se ponen a prueba diferentes antibióticos para evaluar su sensibilidad, clasificándolos en fenotipos las especies de *E.coli*, de los cuales los fenotipos 1,2,3,4 y *Proteus* sp., fueron resistentes a la Amikacina, el fenotipo 2,3,4 y *Proteus* sp., resultaron resistentes al Trimetropim sulfametoxazol, los fenotipos 1,2,3 resistentes al cefadroxilo y *Proteus* sp., resistente a tetraciclina. Estos fenotipos que permiten conocer que cepas están circulando por la finca y la manera de combatirla es principalmente con la prevención y mantener en

estricto control al ganado bovino y seguidamente colocando el tratamiento adecuado indicado por el médico tratante.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO V

Conclusiones y recomendaciones

Conclusiones

Realizado el análisis de los resultados obtenidos durante el proceso de esta investigación y recopilación de la información tanto bibliográfica como de la muestra del objeto de estudio, se llegó a una serie de conclusiones que permiten dar respuesta a las interrogantes y a los objetivos planteados en el problema estudiado en cuanto a la prevalencia de Enterobacterias mediante el aislamiento e identificación de mastitis clínica en bovinos.

Se realizó un diagnóstico preventivo de California Mastitis Test (CMT), se procesaron 71 muestras de leche provenientes de bovinos con mastitis de las cuales 40 resultaron positivas para el cultivo microbiológico, de esas muestras en estudio se seleccionaron solo las pertenecientes a las bacterias gramnegativas siendo la especie de interés las Enterobacterias, teniendo en total (9) muestras, el género en mayor proporción corresponde a *E. coli* con (8) muestras respectivamente y solo una (1) al género *Proteus* sp en las muestras provenientes de la finca Miraflores de la Tendida estado Táchira.

Las bacterias grampositivas representaron el mayor porcentaje en los casos de mastitis clínica. *E. coli*, perteneciente a las bacterias gramnegativas ha arrojado un bajo porcentaje en relación a todo el estudio realizado pero no escapa de ser considerado uno de los patógenos causantes de mastitis clínica. Las pruebas de susceptibilidad son de gran apoyo para el tratamiento de los bovinos que tienen mastitis pero es de gran importancia señalar que no se debe aplicar antibióticos como Amikacina, Trimetropim-Sulfametoxazol y Cefadroxilo como tratamiento preventivo ya que estos antibióticos presentaron resistencia a la mayoría de los fenotipos estudiados, lo ideal es esperar los resultados de los cultivos analizados aplicar los antibióticos

indicados , ya que con la aplicación de un buen tratamiento las condiciones de salud del animal se normalizan y por ende la calidad y cantidad de la leche mejora y satisface las necesidades tanto del productor como de todos los consumidores.

Recomendaciones

Las conclusiones del presente estudio permitieron formular las siguientes recomendaciones:

- Recomendar a la Finca Miraflores ubicada en la Tendida estado Táchira realizar actividades preventivas a los bovinos en producción cada 3 meses con un médico veterinario.
- No realizar pruebas para la detección de mastitis a los bovinos que estén recibiendo antibióticos.
- Realizar procedimientos de higiene a la ubre del animal y también a los ordeñadores mecánicos, y en caso de usar ordeñadores manuales, desinfectar muy bien las manos.
- A la hora de la recolección de la muestra usar frascos estériles, taparlos bien, conservar la muestra en un recipiente apto traslado y mantener la muestra refrigerada hasta llegar al laboratorio.
- Establecer un orden al momento del ordeño de tal manera que los bovinos con mastitis, queden de último evitando la diseminación de la enfermedad.
- Realizar un registro de todo el ganado bovino para tener relación de los que presentan mastitis y el tratamiento que se debe aplicar para que su estado de salud mejore.
- Aplicar el tratamiento indicado por el Veterinario respetando el tiempo y dosis descrita.

BIBLIOHEMEROGRAFIA

- Arias, F (2006) El proyecto de investigación, introducción a la metodología científica. Caracas – Venezuela: Editorial Episteme
- Ashdown, R., Done, S. H. (2011). Atlas en color de anatomía veterinaria. Rumiantes + Evolve. España: Elsevier Health Sciences Spain.
- Bedolla C., Castañeda, V. y Wolter, W. (2007). Métodos de detección de la mastitis bovina. REDVET. Rev. Electrón. Vet. 8 (9): 17-31
- Brooks, G. (2014). Microbiología Médica. (Ed). Ciudad de México, México: Editorial: McGraw-Hill.
- Calderón, R., Rodríguez, R. V., Arrieta, B. G y Mattar, V. L. 2011. Prevalence of mastitis in dual-purpose cattle farms in Montería (Colombia): etiology and antibacterial susceptibility. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias 24:19-28.
- Carrión, G. (2011). Principios básicos para el control de la mastitis y el mejoramiento de la calidad de la leche. Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación Para el Desarrollo Integral Regional de Michoacán. pp. 22-32.
- Carvajal, C., Villarroel, W. y Ticona, M. (2021). Identificación de agentes causales de mastitis clínica y sensibilidad antibiótica en vacas lecheras de la zona de Viloma, Cochabamba. (Tesis de maestría). Universidad Mayor de San Simón. Bolivia.
- Díaz A. (2015). Teoría Microbiana de la Enfermedad. Recuperado de <https://es.shileshade.net./Altajimenez/teoria-microbiana-de-la-enfermedad-521877361>

- Fernández, O. Trujillo, J. Peña, J. Cerquera, J. Granja, Y. (2012). Mastitis bovina: generalidades y métodos de diagnóstico. *Revista Veterinaria REDVET* , 13 (11).
- Franco, F. (2020). Prevalencia y perfil de resistencia antimicrobiana de bacterias causantes de mastitis aisladas en leche cruda bovina en un establecimiento de la localidad de Shoenweide del departamento de Presidente Hayes – Paraguay. (Tesis de maestría). Universidad Nacional de la Plata. Facultad de Ciencias Veterinarias. Paraguay
- García F., Sánchez T., López O., Benítez M. (2018). Prevalencia de mastitis clínica y microorganismos asociados a esta. *Pastos y Forrajes*. 44 (1): 12-23
- García F., Sánchez T., López O., Benítez M. (2018). Blood D., (2000) *Manual de Medicina Veterinaria*. Madrid: 9ª Edición. Mc Graw Hill.
- Gobernado M. y López H., (2003). *Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica*. Identificación bacteriana. 21 (2): 9-17
- 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.
- Hernández, R., Fernández, C. y Baptista, P. (2010). *Metodología de la Investigación*. México: McGraw-Hill
- Herrera, C. (2020). Aislamiento e identificación de bacterias patógenas en leche de vacas con mastitis de las Islas Santa Cruz e Isabela, de la provincia de Galápagos – Ecuador. (Tesis de maestría). Universidad de las Fuerzas Armadas. Ecuador
- Hurtado, J. (2010). *El proyecto de Investigación*. Compresión holística de la metodología y la investigación. Caracas: FEDUPEL

- 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.
- Kerr, D. y Wellnitz, O. (2003). Mammary Expression of New Genes to Combat Mastitis. *J Anim. Sci.* 81 (suppl.3): 38-47.
- Koneman E. (2017). Diagnóstico Microbiológico. Buenos Aires Argentina: 7ma Edición Médica Panamericana.
- López, M., Ramos, A. y Muñoz, L. (2022). Diagnóstico de la mastitis bovina. *BIOCIENCIAS*; 6 (1): 93 - 115
- Lucas, M. (2021). Estudio de las bacterias patógenas presentes en la leche de vaca con mastitis. (Tesis doctoral). Universidad Estatal Península de Santa Elena. Ecuador.
- Meglia G, Mata H. (2001). Mecanismos específicos e inespecíficos de defensa, con referencia a la glándula mamaria de los bovinos productores de leche. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Córdoba. España.
- Mino, D. (2018). Prevalencia de *Escherichia coli* en mastitis clínica bovina del distrito de Chiclayo - octubre - diciembre- 2017. (Tesis de grado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Perú.
- Murray, P., Rosenthal, K., Kobayashi, G. y Pfaller, M. (2017). Microbiología médica. España: Mosby Elsevier Science
- Ormaza, D., Rueda, R., Huera, D. e Ibarra, E. (2022). Mastitis bovina en el cantón Montúfar – Carchi. Prevalencia, agente causal y factores de riesgo. *Revista Científica de Investigación, Docencia y Proyección Social*; 26 (3): 05-10.

- Philpot, W. (2011). Importancia de la cuenta de células somáticas y los factores que la afectan. III Congreso Nacional de Control de Mastitis y Calidad de la Leche. León Guanajuato. México
- Puerta, A. y Mateos, F. (2010). Enterobacterias. *Medicine*, 10 (51): 118-137
- Radostits O. (2002). Tratado de las enfermedades del ganado Bovino, ovino, porcino, caprino y equino. Madrid; Medicina veterinaria
- Ramírez A., García E., Longa A., Sánchez K., Nieves M., Velazco J., Araque M., Mosqueda N. (2010). Manual Práctico de Bacteriología General. Merida Venezuela, Colección: Textos Universitarios.
- Realpe, D. (2022). Caracterización de Patógenos Causantes de Mastitis Clínica y Subclínica y Perfil de Sensibilidad “In Vitro” en Dos Fincas con Diferentes Condiciones Climáticas. (Tesis de maestría). Universidad Antonio Nariño. Popayán-Colombia.
- Ribeiro, M. G., Motta, R. G., Paes, A. C., Allendorf, S. D., Salerno, T., Siqueira, A. K., Fernandes, M. C., & Lara, G. H. B. (2008). Peracute bovine mastitis caused by *Klebsiella pneumoniae*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, 60(2), 485–488. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352008000200031>
- Rios, C. (2020). Resistencia a antibióticos en bacterias causantes de mastitis bovina. (Tesis de grado). Universidad de Cundinamarca. Colombia
- Ruiz R. (2014). Mastitis bacteriana en ganado bovino: etiología y técnicas de diagnóstico en el laboratorio. UNAM, Medicina y Zootecnia de rumiantes. México
- Ruiz, L. Martínez, S. Gomes, C. Palma, N. Riveros, M. Ocampo, K. Durand, D. Ochoa, T. Ruiz, J. Pons, M (2018). Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica. Presencia de Enterobacterias y

Escherichia coli multiresistente a antimicrobianos en carne adquirida en mercados tradicionales en Lima. 3(8): 5-14

Sánchez, M., Gutiérrez, N., Posada, I. (2018). Prevalencia de mastitis bovina en el Cañón de Anaime, región Lehe de Colombia, incluyendo etiología y resistencia antimicrobiana. *Inv vet perU*. I(14): 58-67

Spickler. A, James. A, Roth. J, Galyon. J, Lenardon. M. Enfermedades Emergentes y Exóticas de los Animales. (2011). España: Center for Food Security & Public Health.

Valero, K., Valbuena, E., Chacón, F., Olivares, Y., Castro, G. y Briñez, W. (2010). Patógenos contagiosos y ambientales aislados de cuartos mamarios con mastitis subclínica de alto riesgo en tres fincas del estado Zulia. *Revista Científica* 20(5): 498-505.

Yera G., y Ramírez W., Prevalencia de mastitis clínica en vacas mestizas Holstein x cebu. *Revista de Electrónica Veterinaria*. 17 (3): 221-247

ANEXOS

Anexo 1: Hoja de Reporte de Resultados. Instrumento de Recolección de datos.

CULTIVO BACTERIOLÓGICO			
MUESTRAS: Leche			
FINCA:			
FECHA: 23/01/23			
RESULTADOS CULTIVO MICROBIOLÓGICO			
N de muestra	Examen directo Gram	Cultivo Bacteriano	Antibiograma
17574 A	Polimorfonucleares 12 a 14 xc, células epiteliales más de 10 xc	Negativo hasta las 72 horas de incubación	
17574 B	Polimorfonucleares 8 a 10 xc, células epiteliales más de 10 xc	Negativo hasta 72 horas de incubación	
17574 C	Polimorfonucleares 6 a 8 xc, células epiteliales 12 a 14 xc	Negativo hasta 72 horas de incubación	
14494 D	Polimorfonucleares 8 a 10 xc, células epiteliales 2 a 4 xc, cocos gram positivos escasos	Desarrollo de 25.000 ufc/mL de <i>Streptococcus</i> sp	Amikacina S Penicilina S Eritromicina S Clindamicina S Linezolid S Tetraciclina S Vancomicina S
14309 C	Polimorfonucleares 16 a 18 xc, células epiteliales más de 10xc, cocos gram positivos escasos	Desarrollo de 25.000 ufc/mL de <i>Staphylococcus aureus</i>	Amikacina S Clindamicina S Ciprofloxacina S Eritromicina S Linezolid S Oxacilina S Penicilina R Tetraciclina S Trimetoprim sulfametoxazol R
16010 B	Polimorfonucleares 8 a 10 xc, células epiteliales 2 a 4 xc, lactobacilos escasos, cocos gram positivos moderados	Desarrollo de 50.000 ufc/mL de <i>Streptococcus</i> sp	Amikacina S Penicilina S Eritromicina S Clindamicina S Linezolid S Tetraciclina S Vancomicina S
15347 B	Polimorfonucleares 3 a 5 xc, células epiteliales 0 a 2 xc, lactobacilos escasos	Desarrollo escaso de microbiana habitual	

Residencia Puerta del Sol Edif. 2. FBA. Campo Claro. Mérida. Edo. Mérida. Venezuela