



UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLÍVAR

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS RECURSOS
NATURALES Y DEL AMBIENTE**

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TEMA:

**EFFECTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LA METICILINA,
AMOXICILINA, Y AMPICILINA PARA LA DETECCIÓN DE CEPAS DE
Staphylococcus aureus METICILINO RESISTENTES (SAMR) AISLADAS
DE MASTITIS BOVINA.**

Proyecto de Investigación previo a la obtención del título de Médico Veterinario
Zootecnista otorgado por la Universidad Estatal de Bolívar, a través de la
Facultad de Ciencias Agropecuarias Recursos Naturales y del Ambiente, Carrera
de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

AUTORES:

DARWIN OMAR ROBALINO SALAS

NELLY CONCEPCIÓN TACLE GARCÍA

DIRECTOR:

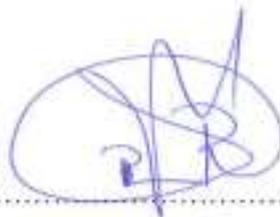
Dr. EDISON RIVELIÑO RAMÓN C. M.Sc.

Guaranda – Ecuador

2023

**EFFECTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LA METICILINA,
AMOXICILINA, Y AMPICILINA PARA LA DETECCIÓN DE CEPAS DE
Staphylococcus aureus METICILINO RESISTENTES (SAMR) AISLADAS
DE MASTITIS BOVINA**

REVISADO Y APROBADO POR LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL.



Dr. EDISON RIVELIÑO RAMÓN. M.Sc.
DIRECTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN



Ing. FAVIÁN BAYAS MOREJÓN PhD.
ÁREA DE BIOMETRÍA



Dra. JENNY MARTÍNEZ MOREIRA. M.Sc.
ÁREA DE REDACCIÓN TÉCNICA

CERTIFICACIÓN DE AUTORÍA.

Yo, Darwin Omar Robalino Salas con C.I. 0202174710 y Nelly Concepción Tacle García con C.I. 0250126836 autores, declaro que el trabajo aquí escrito es de mi autoría, este documento no ha sido previamente presentado por ningún grado o calificación profesional; que las referencias bibliográficas que se incluyen han sido consultadas con sus respectivos autores.

La Universidad Estatal de Bolívar puede hacer uso de los derechos de publicación correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedades Intelectual, por su Reglamento y Normativa Institucional Vigente.



.....
DARWIN OMAR ROBALINO SALAS
C.I. 0202174710
AUTOR



.....
NELLY CONCEPCIÓN TACLE GARCÍA
C.I.0250126836
AUTORA



.....
Dr. EDISON RIVELINO RAMÓN C. M.Sc.
DIRECTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN



.....
Ing. FAVIAN BAYAS MOREJÓN Ph.D.
ÁREA DE BIOMETRÍA



.....
Dra. JENNY MARTÍNEZ MOREIRA M.Sc.
ÁREA DE REDACCIÓN TÉCNICA

Di 2 COPIAS

**ESCRITURA PÚBLICA
DECLARACION JURADA
SEÑOR DARWIN OMAR ROBALINO SALAS Y SEÑORITA NELLY
CONCEPCION TACLE GARCIA**

En la ciudad de Guaranda, Capital de la Provincia de Bolívar, República del Ecuador, hoy día VIERNES TRES DE MARZO DE DOS MIL VEINTE Y TRES, ante mí, Doctor GUIDO FABIAN FIERRO BARRAGAN, NOTARIO PÚBLICO PRIMERO DEL CANTÓN GUARANDA, comparecen el señor **DARWIN OMAR ROBALINO SALAS**, portador de la cédula de ciudadanía número cero dos cero dos uno siete cuatro siete uno guion cero y **NELLY CONCEPCION TACLE GARCIA**, portadora de la cédula de ciudadanía número cero dos cinco cero uno dos seis ocho tres guion seis. Los comparecientes son de nacionalidad ecuatoriana, mayores de edad, de estado civil solteros, capaces de contraer obligaciones, domiciliados en los cantones Guaranda y Chimbo, provincia Bolívar, a quienes de conocerles doy fe en virtud de haberme exhibido sus cédulas de ciudadanía y papeletas de votación cuyas copias adjunto a esta escritura. Advertidos por mí el Notario de los efectos y resultados de esta escritura, así como examinadas en forma separada, de que comparecen al otorgamiento de la misma sin coacción, amenazas, temor reverencial, ni promesa o seducción, juramentados en debida forma, prevenidos de la gravedad del juramento, de las penas del perjurio y de la obligación que tienen de decir la verdad con claridad y exactitud, bajo juramento declaran lo siguiente: " Previo a la obtención del Título de Médico Veterinario Zootecnista: Que los criterios e ideas emitidas en el presente trabajo de investigación titulado "EFECTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LA METICILINA, AMOXICILINA, Y AMPICILINA PARA LA DETECCIÓN DE CEPAS DE *Staphylococcus aureus* METICILINO RESISTENTES (SAMR) AISLADAS DE MASTITIS BOVINA", es de nuestra exclusiva responsabilidad en calidad de autores. Es todo cuanto podemos decir en honor a la verdad." (Hasta aquí la declaración juramentada rendida por los comparecientes, la misma que queda elevada a escritura pública con todo el valor legal). Para el otorgamiento de esta escritura pública se observaron todos los preceptos legales del caso; y leída que les fue a los comparecientes íntegramente por mí el Notario, se ratifican en todo su contenido y firman conmigo en unidad de acto. Incorporo esta escritura pública al protocolo de instrumentos públicos, a mi cargo. De todo lo cual doy fe.-


SR. DARWIN OMAR ROBALINO SALAS


SRTA. NELLY CONCEPCIÓN TACLE GARCIA


Doctor Guido Fabián Fierro-Barragán
NOTARIO PÚBLICO PRIMERO DEL CANTÓN GUARANDA.



DEDICATORIA

La presente investigación la dedicamos principalmente a Dios, por permitirnos el don de la vida y proveernos de fortaleza para continuar en el desarrollo de alcanzar una de nuestras aspiraciones más anheladas.

A nuestros padres, por su esfuerzo, trabajo y sacrificio durante todos estos largos años, por su amor, comprensión y consejos hemos logrado llegar hasta esta etapa y convertirnos en las personas que somos. Es un orgullo y privilegio ser parte de su vida son los mejores padres.

A nuestra querida hija Adaliah por darnos la motivación y el empuje en lograr cumplir nuestras metas quizás en estos momentos no logres entender nuestras palabras, pero cuando seas capaz queremos que te des cuenta de lo que significas para nosotros, eres la razón de levantarnos cada día y esforzarnos por el presente y por el mañana eres nuestra principal motivación y espero que como estas presente en este pequeño paso nos acompañes a sembrar y cosechar futuros logros.

A aquellas personas que nos brindaron su apoyo, abriéndonos las puertas y compartiendo sus conocimientos lo cual permitió que el trabajo se realice con éxito.

AGRADECIMIENTO

Durante este periodo largo de estudios he tenido momentos simplemente únicos por la oportunidad de corregir errores, pues los retos de la vida no están presentes para bloquear el camino, más sino para permitirnos descubrir quiénes somos y de que estamos hechos esto nos otorga la sabiduría para poder vencer los obstáculos y convertirlos en enseñanzas.

Gracias a mi madre Marlene Salas y mi abuelita Zoila Borja por estar siempre en el momento exacto para extenderme su mano, por el apoyo ilimitado e incondicional que siempre me han dado, por tener la fortaleza de salir adelante sin importar los obstáculos presentes en el camino, por escucharme y constantemente tener algo constructivo que aportar, por haberme formado como un hombre de bien con valores y principios, y por ser la mujer que me dio la vida y me enseñó a vivirla.

A mi pequeña hija por ser mi fortaleza para continuar a pesar de las dificultades que se me han presentado simplemente gracias por llegar a llenar de luz mi vida, a mi pareja por la comprensión brindada y por apoyarme siempre en mis proyectos de vida por ser ese ingrediente especial para encaminarme a la dicha del triunfo y poder culminar este trabajo de investigación con éxito

A mi tío Freddy Salas por ser mi figura paterna y brindarme su apoyo moral y económico durante mis estudios primarios y universitarios gracias por su afecto y por brindarme sus sabios consejos de un padre para poder encaminarme a conseguir lo planteado en mi infancia este logro se lo dedico a usted por siempre estar en los momentos indicados de forma incondicional.

DARWIN OMAR ROBALINO SALAS

AGRADECIMIENTO

Desde niña me enseñaron a dar gracias por las cosas buenas y malas de la vida. Por lo cual, en esta tesis voy agradecer a las personas que nos aprecian, nos dan la fuerza y energía para crecer como personas y como profesionales.

Gracias a mi familia, a mis padres Cruz y José y a mis hermanos, por apoyarme en los momentos difíciles, por brindarme palabras de apoyo y un abrazo reconfortante para levantar mis ánimos, a mi pareja a quien amo tanto, agradezco por llegar a mi vida y empezar juntos este camino y por ser la motivación de salir adelante día a día, y por supuesto a ti Adaliah, te agradezco por todo el amor que me brindas y la inspiración que me generas para convertirme en la mujer que quiero ser.

Agradecemos a todas las autoridades de nuestro tribunal por confiar en nosotros, abriarnos las puertas y permitirnos realizar nuestro proceso investigativo, De manera especial a nuestro tutor del proyecto de investigación quien nos ha guiado con su paciencia, y su rectitud como docente.

NELLY CONCEPCIÓN TACLE GARCÍA

ÍNDICE DE CONTENIDO

CONTENIDO	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. PROBLEMA.....	3
III. MARCO TEÓRICO.....	4
3.1. Anatomía de la glándula mamaria.....	4
3.1.1. Aporte sanguíneo	6
3.1.2. Inervación.....	6
3.1.3. Histología	6
3.1.4. Pezón.....	7
3.2. Fisiología de la glándula mamaria	7
3.2.1. Mamogénesis	8
3.2.2. Lactogénesis.....	9
3.2.3. Generalidades defensivas de la glándula mamaria.....	12
3.3. Mastitis.....	13
3.3.1. Etiología de la mastitis	13
3.3.2. Dinámica de la infección.....	14
3.3.3. Patogenicidad	15
3.3.4. Diagnóstico de mastitis clínica	16
3.4. Higiene del ordeño	18
3.5. Staphylococcus aureus	19
3.5.1. Aislamiento	20
3.5.2. Identificación.....	21
3.6. Antibióticos betalactámicos	22
3.6.1. Farmacocinética y Farmacodinamia	22

3.6.2. Espectro Antibacteriano	23
3.6.3. Mecanismo de acción.....	23
3.6.4. Mecanismos de Resistencia.....	23
3.6.5. Clasificación de los Betalactámicos.....	24
3.6.6. Efectos Adversos de los Betalactámicos.....	27
3.6.7. Meticilina	28
3.6.8. Ampicilina.....	29
3.6.9. Amoxicilina.....	30
3.6.10. Oxacilina... ..	30
3.6.11. Antibiograma.....	30
3.6.12. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).....	31
IV. MARCO METODOLÓGICO	34
4.1. Materiales	34
4.1.1. Lugar de investigación	34
4.1.2. Zona de vida.....	35
4.1.3. Material Experimental.....	35
4.2. Métodos.....	38
4.2.1. Factores en estudio.....	38
4.2.2. Tratamientos.....	39
4.2.2.1. Especificaciones del experimento	39
4.2.3. Métodos de evaluación y datos a tomarse	40
4.2.3.1. Variables de aislamiento.....	40
4.2.3.2. Variables de antibiograma.....	40
4.2.4. Procedimiento.....	41
4.2.4.1. Obtención de las cepas bacterias	41

4.2.4.2. Reanimación del <i>Staphylococcus aureus</i>	42
4.2.5. Actividad antimicrobiana.....	46
5.1. Cultivo y reconfirmación bacteriana.....	48
5.2. Análisis de varianza de la concentración de 2µg de Ampicilina y Amoxicilina frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	49
5.2.1. Prueba de Tukey al 5% de las concentraciones de 2µg de amoxicilina y ampicilina frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	50
5.3. Análisis de varianza de la concentración de 10µg de amoxicilina y ampicilina frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	52
5.3.1. Prueba de Tukey al 5% de las concentraciones de 10µg de amoxicilina y ampicilina frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	53
5.4. Análisis de la actividad antimicrobiana de los tratamientos propuestos.....	54
5.4.1 Análisis de la actividad antimicrobiana de ampicilina frente a <i>Staphylococcus aureus</i> causante de mastitis bovina.....	54
5.4.2. Análisis de la actividad antimicrobiana de amoxicilina frente a <i>Staphylococcus aureus</i> causante de mastitis bovina.....	57
5.4.3. Análisis de la actividad antimicrobiana de oxacilina frente a <i>Staphylococcus aureus</i> causante de mastitis bovina.....	59
5.5. Prevalencia del <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente (SAMR).....	62
5.5.1. Relación de los métodos utilizados para la detección de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistentes (SAMR).....	66
5.6. Patrones de resistencia encontrados mediante el análisis del antibiograma por el método difusión de disco de los fármacos en estudio.....	67
VI. COMPROBACIÓN DE HIPÓTESIS.....	70
VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	71
Bibliografía.....	73

ÍNDICE DE TABLAS

# Tabla	Pág.
1. Especies de microorganismos bacterianos frecuentemente aislados de mastitis bovina clínica.	14
2. Especies de microorganismos variados aislados de mastitis bovina.....	14
3. criterios de interpretación para difusión de discos de oxacilina (mm).....	33
4. Especificaciones del lugar donde se realizará la investigación.....	34
5. Situación Geográfica del lugar de investigación.....	34
6. Distribución de factores en estudio y su interacción (tratamientos).	38
7. Tratamiento.	39
8. En la siguiente tabla se detallan las características del experimento:	40
9. Análisis de varianza (ADEVA).....	40
10. <i>Staphylococcus aureus</i> obtenidos de mastitis bovina.	41
11. Perfiles de identificación utilizados en la presente investigación.....	45
12. Resultado del aislamiento e identificación.....	48
13. Análisis de varianza (DBCA) de los tratamientos propuestos.	49
14. Promedios obtenidos de los tratamientos analizados.	50
15. Análisis de varianza de los tratamientos propuestos.....	52
16. Promedios obtenidos de los tratamientos analizados.	53
17. Pruebas de normalidad del halo de inhibición obtenidas de las concentraciones de 2µg y 10 µg de ampicilina frente a <i>Staphylococcus aureus</i> causante de mastitis bovina.....	54
18. Interpretación y puntos de corte de la zona de inhibición (mm) de las penicilinas frente a <i>Staphylococcus aureus</i> causante de mastitis bovina.	55
19. Susceptibilidad antimicrobiana de la ampicilina frente a <i>Staphylococcus aureus</i> causante de mastitis bovina.....	55
20. Prueba de normalidad de los halos de inhibición del <i>Staphylococcus aureus</i> frente a amoxicilina.....	57

21. Interpretación y puntos de corte de la zona de inhibición (mm) de las penicilinas frente a <i>Staphylococcus aureus</i> causante de mastitis bovina.	57
22. Susceptibilidad antimicrobiana de la amoxicilina frente a <i>Staphylococcus aureus</i> causante de mastitis bovina.	58
23. Prueba de normalidad de los resultados obtenidos del antibiograma de oxacilina a 1 µg frente a <i>Staphylococcus aureus</i> causante de mastitis bovina.	59
24. Punto de corte del <i>Staphylococcus aureus</i> frente a oxacilina.	60
25. Susceptibilidad antimicrobiana de la oxacilina frente a <i>Staphylococcus aureus</i> causante de mastitis bovina.	60
26. Pruebas de normalidad para la detección del <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente (SAMR) causante de mastitis bovina.	62
27. Puntos de corte establecidos para el análisis de la susceptibilidad antimicrobiana de cefoxitin (30µg) frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	62
28. Análisis de la susceptibilidad del <i>Staphylococcus aureus</i> causante de mastitis bovina en estudio.	63
29. Prevalencia de la susceptibilidad antimicrobiana del <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente.	64
30. Correlación de Rho de Spearman entre los métodos utilizados.	66
31. Resultados obtenidos del antibiograma de los fármacos en estudio.	67
32. Patrones de resistencias encontrados en al antibiograma.	69
33. Frecuencias obtenidas de los análisis de susceptibilidad antimicrobiana del <i>Staphylococcus aureus</i> causante mastitis bovina.	70
34. Resultados de la prueba de Chi-cuadrado.	70

ÍNDICE DE FIGURAS

# Fig.	Pág.
1. Secuencia de oligonucleótidos del gen nuc/ referencia para la identificación del <i>Staphylococcus aureus</i>	28
2. Secuenciación de aminoácidos del gen mecA de <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente (SAMR)	29
3. Prevalencia del <i>Staphylococcus aureus</i> causante de mastitis.	48
4. Diagrama de caja y bigotes de la distribución de los halos de inhibición de los tratamientos propuestos.....	50
5. Diagrama de caja y bigotes de la distribución de los halos de inhibición de los tratamientos propuestos.....	52
6. Susceptibilidad antimicrobiana de la ampicilina frente a <i>Staphylococcus aureus</i> causante de mastitis bovina.	56
7. Susceptibilidad antimicrobiana de la amoxicilina frente a <i>Staphylococcus aureus</i> causante de mastitis bovina.	59
8. Porcentaje de susceptibilidad de la oxacilina frente a <i>Staphylococcus aureus</i> causante de mastitis bovina.	61
9. Porcentaje de susceptibilidad antimicrobiana del <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente (SAMR).	65
10. Frecuencia de los patrones de resistencia antimicrobiana encontradas por parte del <i>Staphylococcus aureus</i> causante de mastitis bovina.	69

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo.

1. Lugar de investigación.....
2. Base de datos.....
3. Fotografías de la investigación.....
4. Glosario de términos.

RESUMEN

El *Staphylococcus aureus* es un patógeno asociado a una de las causas infecciosas más común de mastitis bovina, este coco Gram positivo posee numerosos factores de virulencia que provocan la cronicidad de esta patología. La presente investigación tiene como objetivo la determinación de la efectividad antimicrobiana de la meticilina, amoxicilina, y ampicilina para la detección de cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes (SAMR) aisladas de mastitis bovina. Metodológicamente se estableció realizar la actividad antimicrobiana por medio del método difusión de discos (Kirby-Bauer) con la utilización de amoxicilina y ampicilina a 2µg y 10µg, además siguiendo las recomendaciones del CLSI, (2020) para el hallazgo de cepas meticilino resistente se utilizó oxacilina a 1µg y cefoxitin de 30µg, frente a 50 cepas de la bacteria en estudio la cual fue aislada e identificada en investigaciones previamente realizadas de mastitis bovina. El nivel de significancia de los tratamientos aplicados mediante el análisis de varianza pudo expresar un efecto altamente significativo ($p < 0,05$), adicionalmente se pudo observar que la susceptibilidad de esta bacteria a los betalactámicos se expresó con una resistencia del 50% y 60% a las concentraciones de 2µg de amoxicilina y ampicilina respectivamente, mientras que la susceptibilidad del *Staphylococcus aureus* a 10µg de amoxicilina y ampicilina se evidenció una resistencia del 60% y 68% respectivamente, con este antecedente se asume que este microorganismo se encuentra generando mecanismos que le confieren resistencia antimicrobiana, por esta razón se realizó el antibiograma mediante Kirby Bauer con la utilización de discos de oxacilina de 1µg y cefoxitin de 30µ observándose de tal modo que los aislados se comportaron como resistentes a estos fármacos en una proporción del 36% y 32% respectivamente, este criterio interpretativo expresa que fenotípicamente el 32% (n=16) de los aislados son *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (SAMR) los cuales presentaron resistencia en todos los betalactámicos en estudio.

Palabras claves: *Staphylococcus aureus*, Mastitis bovina, Betalactámicos, Kirby-Bauer.

SUMMARY

Staphylococcus aureus is a pathogen associated with one of the most common infectious causes of bovine mastitis, this Gram-positive coccus has numerous virulence factors that cause the chronicity of this pathology. The objective of this research was to determine the antimicrobial effectiveness of methicillin, amoxicillin, and ampicillin for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from bovine mastitis. Methodologically, it was established to perform the antimicrobial activity by means of the disc diffusion method (Kirby-Bauer) with the use of amoxicillin and ampicillin at 2µg and 10µg, also following the recommendations of the CLSI, (2020) for the finding of methicillin resistant strains, oxacillin at 1µg and cefoxitin at 30µg were used against 50 strains of the bacteria under study, which were isolated and identified in previously conducted research on bovine mastitis. The level of significance of the treatments applied through the analysis of variance could express a highly significant effect ($p < 0,05$), additionally it could be observed that the susceptibility of this bacterium to beta-lactams was expressed with a resistance of 50% and 60% at concentrations of 2µg of amoxicillin and ampicillin respectively, while the susceptibility of *Staphylococcus aureus* to 10µg of amoxicillin and ampicillin showed a resistance of 60% and 68% respectively, with this background it is assumed that this microorganism is generating mechanisms that confer antimicrobial resistance, For this reason, the Kirby Bauer antibiogram was performed with the use of 1µg oxacillin and 30µ cefoxitin discs, showing that the isolates behaved as resistant to these drugs in a proportion of 36% and 32% respectively. This interpretative criterion expresses that phenotypically 32% (n=16) of the isolates are methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), which showed resistance to all beta-lactams under study.

Key words: *Staphylococcus aureus*, Bovine mastitis, Betalactams, Kirby-Bauer.

CAPÍTULO I

I. INTRODUCCIÓN

Mundialmente las pérdidas económicas por mastitis en los sistemas lecheros representan aproximadamente el 26% de los costos totales, siendo estos originados por la enfermedad, retóricamente pueden ser directos o indirectos a la patología de base, la principal repercusión se evidencia en la baja productividad y deterioro de la calidad de leche afectando negativamente a las explotaciones lecheras en todo el mundo (Sanchez *et al.*, 2018).

Existe un amplio abanico de agentes infeccioso de origen biológico causantes de mastitis bovina los que pueden ser de carácter contagiosos o nosocomiales y de transmisión de origen ambiental, *Staphylococcus aureus* es la bacteria etiológicamente más prevalente tanto en los hatos lecheros de Ecuador como en otros países de gran desarrollo. La mastitis causada por *S. aureus* comienza con un episodio subclínico o clínico agudo que generalmente evoluciona hacia la cronicidad y puede persistir a lo largo de toda la vida productiva del animal (Capurro, 2017).

Staphylococcus aureus es una de las bacterias que más reconocimiento tiene como un importante microorganismo patogénico tanto en la medicina animal como humana. Se sabe que *Staphylococcus aureus* puede causar una amplia gama de enfermedades en humanos y animales, desde infecciones cutáneas leves hasta bacteriemia potencialmente mortal. Más del 80% de las cepas de *S. aureus* producen penicilinasas y, por lo tanto, los antibióticos betalactámicos como la meticilina, que son resistentes a las penicilinasas se utilizaron ampliamente para tratar las infecciones por *S. aureus* (Torres, 2020).

La meticilina se introdujo por primera vez en la medicina en fines de la década de 1950, cuando se usaba para tratar infecciones estafilocócicas resistentes a la penicilina. La generación de resistencia a los antimicrobianos por parte del *S. aureus* demostró que la exposición repetida a la meticilina resultó en el desarrollo de mecanismos y alteraciones genéticas que le confieren la resistencia a los betalactámicos (Paterson *et al.*, 2014).

Dentro de la presente investigación se desarrollarán los siguientes objetivos; Evaluar la efectividad antimicrobiana de la meticilina, amoxicilina, y ampicilina para la detección de cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes (SAMR) aisladas de mastitis bovina, para el desarrollo de dicho objetivo se discernió; Reanimar y reidentificar cepas de *Staphylococcus aureus* a partir de leche de vacas con mastitis. Identificar cepas de *Staphylococcus aureus* mediante pruebas bioquímicas. Determinar la resistencia y susceptibilidad antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* a la meticilina, amoxicilina y ampicilina. Establecer la prevalencia de cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SAMR).

CAPÍTULO II

II. PROBLEMA

Staphylococcus aureus puede causar una amplia gama de enfermedades que van desde infecciones cutáneas relativamente menores hasta infecciones graves y potencialmente mortales dentro de los hatos lecheros como endocarditis, onfaloflebitis en terneras, neumonía, sepsis, abscesos multiorgánicos y mastitis clínica severas, adicionalmente su impacto se ve reforzado por el desarrollo de resistencia a los antibióticos, sobre todo *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) que prácticamente resiste a todos los antibióticos β -lactámicos (Vargas *et al.*, 2018).

La resistencia antimicrobiana es un acontecimiento continuo, en donde se inició con la resistencia a la penicilina por parte de *S. aureus*. Los animales domésticos pueden actuar como reservorios de *Staphylococcus aureus* resistente a un sinnúmero de antimicrobianos de distintas familias y clasificaciones farmacológicas. La principal problemática dentro de los hatos lecheros es el desarrollo epidemiológico de cepas resistente a la terapia antibiótica, y su impacto sobre la salud de la glándula mamaria y por ende a la calidad y cantidad de leche producida, debido a la patogenicidad de la cepa y al uso indiscriminado de antimicrobianos no específicos para tratar la infección (Gentilini *et al.*, 2016).

Staphylococcus aureus resistente a la meticilina (MRSA) surgió como un problema grave en diferentes países del mundo y Latinoamérica, este causó problemas esporádicos en hospitales y lugares de interés clínico, MRSA se ha convertido en un grave problema de infección nosocomial en todo el mundo. Las cepas de MRSA son resistentes a los antibióticos betalactámicos, conferida por el gen plasmídico *mecA*. Este gen codifica una proteína de unión a penicilina, es expresada en la pared celular bacteriana y le confiere baja afinidad por los antibióticos b-lactámicos, este grupo de antibióticos es ineficaz contra las bacterias que expresan este gen. Además, la mayoría de los aislados de MRSA son resistentes a muchas otras clases de antimicrobianos (Da Silva *et al.*, 2022).

CAPÍTULO III

III. MARCO TEÓRICO

3.1. Anatomía de la glándula mamaria

Se conserva la teoría donde se menciona que la glándula mamaria ha evolucionado mediante la modificación de una glándula sudorípara por sus estructuras y funcionalidad, compartiendo dos peculiaridades en común: desarrollo por crecimiento interno del ectodermo; un epitelio de dos capas de células secretoras internas y células mioepiteliales externas, que al contraerse promueven el flujo de leche desde los alvéolos periféricos hacia los conductos principales y por ende al exterior (Cheng *et al.*, 2020).

Asumiendo la nueva función de atender el bienestar inmunológico y la nutrición del recién nacido, la glándula mamaria se ha convertido en una estructura compuesta altamente ramificada con una enorme cantidad de alvéolos dilatados. Este patrón permite tanto la síntesis como el almacenamiento de leche a gran escala. Sin embargo, ninguna función es posible hasta que la vaca queda preñada, cuando la glándula rudimentaria e inactiva experimenta un crecimiento masivo hasta una estructura definitiva y solo entonces comienza a sintetizar la secreción láctea (Pedroza, 2018).

Embriológicamente se asume que el desenvolvimiento mamario primordialmente está presente en embriones bovinos de 1.5 cm de longitud como dos líneas cortas en el ectodermo que van desde el ombligo caudalmente hasta la ingle. Cada línea tiene un grosor de varios surcos celulares, pero la intensa proliferación de células en la capa basal en los puntos focales produce un crecimiento hacia el interior, el montículo mamario, la cual pronto se agranda hasta convertirse en una yema mamaria ovoide revestida por una condensación de células madre mesenquimales inductivas o precursoras (Oyola & Urrea, 2021).

Alrededor de la séptima semana gestacional tras la implantación embrionaria los fetos de unos 9 cm de longitud presentan cuatro brotes germinativos mamaros, dos en una disposición latera del plano longitudinal del mismo, estos diferenciarán los cuartos mamaros futuros de la ubre. En la mayoría de los casos se forman yemas adicionales los cuales se expresan como pezones supernumerarios. La proliferación

activa de células madre mesenquimales en torno a de la ampolla germinativa mamaria proyecta la epidermis en una teta rudimentaria. Paralelamente, la proliferación vigorosa de células cerca del extremo interno transforma la yema mamaria en una columna celular sólida, que se alarga verticalmente hacia el mesénquima como rudimento del sistema de conductos, el futuro galactóforo único. Mientras tanto, la división entre las células epidérmicas debajo de la yema original produce un cono epidérmico en la base del conducto primordial (Oyola & Urrea, 2021).

En la etapa de 19 cm, el primordio del conducto de crecimiento es más largo que el pezón y está ligeramente hinchado en el extremo interno. Aquí aparece una cavidad o lumen y pronto se extiende proximalmente hacia el ápice del pezón. Al llegar al cono epidérmico, la hendidura permanece estrecha como el lumen del futuro canal del pezón. Más tarde, se abrirá en el ápice del pezón y tanto el canal del pezón como la epidermis superficial estarán revestidos por un epitelio común, grueso, estratificado, escamoso y queratinizante (Morales, 2022).

En la etapa de 35 cm, el rudimento del conducto de crecimiento se ha diferenciado en tres regiones distintas:

- Una cámara esferoide superior distendida con líquido representa el futuro seno de la glándula o depósito de leche.
- Una porción media ligeramente más larga forma más seno del pezón delgado.
- Un canal del pezón estrecho dentro del cono epidérmico, pero aún cerrado desde el exterior por un tapón de queratina.

La ubre de la vaca consta de cuatro cuartos, cada uno de los cuales es una glándula individual drenada por un pezón. Las cuatro glándulas secretoras están estructuralmente separadas y funcionan de manera independiente, sin flujo de leche entre ellas. Recibiendo un gran flujo de sangre y cargada de leche almacenada, la ubre lactante suele pesar entre 50 y 60 kg. El soporte para este enorme peso lo proporcionan los densos ligamentos suspensorios fibrosos que se insertan en la pelvis y los tendones de la pared abdominal. Los ligamentos se extienden lateral y ventralmente sobre la ubre, luego se cubren hacia adentro para unirse a los

ligamentos medianos emparejados. Estos forman una doble partición vertical que separa los casquillos de la izquierda de los de la derecha. Los tabiques de tejido conjuntivo interlobulillar se extienden entre los ligamentos lateral y medial y sostienen los pesados lóbulos del parénquima. Como los ligamentos mediales contienen relativamente más elastina que los ligamentos laterales predominantemente colágenos, la ubre completa cae en la línea media y los pezones se abren hacia afuera (Santana *et al.*, 2021).

3.1.1. Aporte sanguíneo

Durante la producción de 20 kg de leche al día circulan 9000 kg de sangre por la ubre de la vaca. La mayor parte de este rico suministro llega a través del canal inguinal en las arterias pudendo externas derivadas de los troncos ilíacos externos. La ubre también recibe una irrigación subsidiaria, cranealmente a través de la arteria abdominal subcutánea y caudalmente a través de la arteria perineal. Numerosas venas pequeñas que salen del parénquima se anastomosan y convergen alrededor de la base de la ubre en un vaso circular que es drenado por tres troncos: la gran vena subcutánea abdominal, que pasa cranealmente y penetra en la pared abdominal cerca del cartílago xifoides; la vena pudendo-externa, que sale por el canal inguinal; y la vena perineal (Torres, 2020).

3.1.2. Inervación

La inervación principal proviene de las ramas del tercer y cuarto nervios lumbares, que atraviesan el canal inguinal. Las contribuciones del primer y segundo nervios lumbares inervan las regiones craneales y perineales las caudales, respectivamente. Se trata principalmente de nervios sensoriales, pero transportan desde el plexo mesentérico caudal fibras simpáticas, que modulan el flujo sanguíneo por acción directa sobre las arteriolas. Mientras que la piel y, en particular, los pezones reciben una abundante inervación sensorial, los nervios son más escasos en el parénquima glandular y principalmente, si no del todo, vasomotores: los alvéolos secretores carecen de inervación (Saldivia, 2019).

3.1.3. Histología

Histológicamente clasificada, la ubre lactante es una glándula exocrina compuesta grande, lobulada, con alvéolos dilatados que almacenan leche. Cada alvéolo es un

saco único o bífido, ligeramente más largo que ancho y distendido hasta un diámetro interno de 120-150 mm por la leche (García *et al.*, 2019).

El epitelio de revestimiento tiene dos capas. Las células secretoras o alveolares internas varían desde un cuboide alto (8 mm) en la glándula parcialmente vacía hasta un escamoso estirado (3 mm) en estado de distensión total. La síntesis y liberación de los componentes de la leche (líquido, caseína, lactosa y lípidos) es continua, hasta que se detiene temporalmente por retroalimentación negativa. Hacia el término y durante la lactancia, los alvéolos grandes tienen un abundante suministro de capilares y están muy juntos en lóbulos poliédricos de unos 2 mm de diámetro (García *et al.*, 2019).

3.1.4. Pezón

Es la parte apendicular de la glándula mamaria, básicamente e histológicamente es una hendidura estrellada, con el revestimiento de epitelio escamoso estratificado, queratinizante y grueso, formado en varios pliegues longitudinales que casi se unen en el centro hendidura estrellada, con el revestimiento de epitelio escamoso estratificado, queratinizante y grueso, formado en varios pliegues longitudinales que casi se unen en el centro. La teta tiene una construcción robusta y está bien adaptada para tolerar las tensiones de cizallamiento generadas por un ternero lactante o una máquina de ordeño (Oyola & Urrea, 2021).

la epidermis del pezón destaca por tres características.

- Con un grosor de aproximadamente 1 mm, es comparable con la epidermis del hocico y unas 12 veces más profunda que la epidermis de la piel del cabello (75 mm en secciones, que conservan las 30 capas de escamas córneas de solo 1 mm de grosor).
- El estrato córneo protector es una capa compacta, de 100 mm de profundidad y que comprende tantas capas superpuestas de escamas córneas muertas.
- La parte inferior está profundamente papilada.

3.2. Fisiología de la glándula mamaria

La secreción de leche por glándulas mamarias especializadas en la hembra para la alimentación del recién nacido es la característica esencial que distingue a los

mamíferos de otros animales. Esta característica se resume en la vaca lechera que, como resultado de una selección intensiva, tiene una producción desproporcionadamente alta de energía en la leche en relación con el tamaño corporal. Las continuas mejoras en la producción de leche y la eficiencia alimenticia son el resultado del refinamiento de la composición genética del ganado y de las mejoras en las prácticas de manejo y nutrición. Este enfoque del esfuerzo en aumentar la producción de leche ha provocado el comentario jocoso de que la vaca lechera moderna tal vez debería ser considerada como un apéndice de la ubre y no al revés. De hecho, el reajuste de los procesos fisiológicos que se produce para satisfacer las demandas metabólicas adicionales de la lactancia implica no solo la diferenciación y activación del tejido mamario, sino que se extiende a cambios en todo el cuerpo. No es el menor de ellos la regulación hormonal de la utilización de nutrientes y la división entre la glándula mamaria y otros órganos (Finot *et al.*, 2021).

3.2.1. Mamogénesis

La mamogénesis puede definirse como el crecimiento y diferenciación de la glándula mamaria hasta la etapa anterior a la secreción activa. Dado que la producción de leche depende en última instancia del número de células secretoras y de su actividad, los factores que influyen en las primeras durante la mamogénesis pueden tener implicaciones duraderas para la producción de leche posterior (Gugjoo *et al.*, 2022).

Desde el nacimiento hasta la pubertad, el crecimiento mamario es isométrico, es decir, en equilibrio con la tasa de crecimiento de todo el cuerpo, pero justo antes del inicio de la actividad ovárica, el crecimiento mamario se vuelve alométrico (es decir, supera el de la superficie (Gross, 2022).

Sólo durante el primer embarazo se produce una marcada ramificación del sistema de conductos y un desarrollo lobulillo alveolar, con un parénquima en expansión que desplaza el tejido adiposo dentro de la almohadilla de grasa mamaria. La proliferación lóbulo-alveolar se acelera a medida que avanza el embarazo y la división de las células secretoras continúa al menos hasta el inicio de la lactancia. El desarrollo mamario equilibrado muestra una dependencia crucial de la

estimulación hormonal. Las hormonas implicadas principalmente incluyen esteroides (estrógenos, progesterona y corticoides suprarrenales) y hormonas proteicas (prolactina, somatotropina y lactógeno placentario). Posiblemente también estén implicadas las hormonas tiroideas. Muchas de estas hormonas interactúan sinérgicamente para promover las diferentes etapas de la mamogénesis. Los estrógenos y la somatotropina son responsables del desarrollo ductal, mientras que la progesterona y la prolactina parecen regular la proliferación lóbulo-alveolar. La presencia adicional de corticoides suprarrenales maximiza este crecimiento. En algunas especies, el lactógeno placentario también puede estimular la formación alveolar, pero en la vaca entra relativamente poco a la circulación materna (Pedroza, 2018).

El desarrollo mamario se invierte parcialmente durante el avance de la lactancia cuando ocurre la involución gradual. Estos efectos se vuelven más pronunciados durante el período seco. Un período de no lactancia entre lactancias sucesivas es un requisito previo esencial para la producción máxima de leche. La producción de leche en la próxima lactancia definitivamente se ve afectada si las vacas están secas por menos de seis semanas. Por otro lado, se puede obtener poca o ninguna ventaja en términos de un aumento en el rendimiento de la lactancia posterior al extender el período seco a más de ocho semanas (Kaskous, 2021).

3.2.2. Lactogénesis

El inicio de la secreción de leche (lactogénesis) en todos los mamíferos está estrechamente coordinado con el parto. La partición en sí misma implica una interacción compleja de controles endocrinos. Hay dos conceptos generales sobre lo que constituye el principal desencadenante lactogénico, el estímulo positivo de las hormonas promotoras de la lactancia y la liberación de los efectos inhibidores de la progesterona. Un pico en los niveles de prolactina en sangre coincide con el parto, pero no es esencial para el parto. La supresión de la liberación de prolactina en las vacas inhibe las etapas finales de la diferenciación de las células secretoras y reduce la producción de leche. Por tanto, la elevación de la prolactina (junto con cantidades adecuadas de corticoides suprarrenales) y el efecto permisivo de la abstinencia de progesterona parecen proporcionar el principal estímulo lactogénico

en la vaca. Una característica adicional puede ser la eliminación a corto plazo de un factor inhibidor producido localmente, posiblemente prostaglandina F2a (Haga *et al.*, 2021).

La lactogénesis requiere el suministro y la absorción preferenciales de nutrientes por el tejido mamario. La disponibilidad de nutrientes se ve reforzada por la desconexión del suministro fetal en el parto y se hacen evidentes los aumentos en el flujo sanguíneo mamario y la absorción local selectiva de nutrientes (Cohick, 2022).

La lactosa (azúcar de la leche) es un disacárido compuesto por una molécula de glucosa y una de galactosa. En la leche de bovinos, su concentración, de aproximadamente el 4,8 por ciento, es la más constante de todos los componentes debido en gran parte a su influencia en el mantenimiento de la osmolalidad de la leche. La glucosa en sangre es el principal precursor de la lactosa, pero también se pueden formar pequeñas cantidades a partir de aminoácidos, glicerol y acetato. El paso final catalizado por enzimas en la síntesis de lactosa a partir de glucosa implica una enzima, llamada lactosa sintetasa, que es exclusiva del tejido mamario. Este se compone de dos componentes proteicos y la disponibilidad del segundo componente, la alfa-lactoalbúmina (una proteína de la leche), determina la tasa de síntesis de lactosa, que se produce en las membranas del aparato de Golgi de las células secretoras (Capuco & Choudhary, 2019).

La síntesis de proteínas de la leche implica el ensamblaje de diferentes aminoácidos en un orden específico a lo largo de una cadena. Tiene lugar en los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso de las células secretoras, y las proteínas destinadas a la secreción se liberan en la luz del retículo endoplásmico. La absorción total de aminoácido por el tejido mamario explica por completo la producción de nitrógeno en la proteína de la leche. Sin embargo, las proporciones de diferentes aminoácidos absorbidos por las glándulas varían con su aparición de proteína en la leche, lo que indica que algunas se metabolizan mientras que otras son sintetizadas por el tejido mamario. La mayoría de las proteínas de la leche se sintetizan localmente y son exclusivas de la leche (por ejemplo, caseínas). Sin embargo, ciertas proteínas sanguíneas y proteínas similares sintetizadas por las células plasmáticas adyacentes

al epitelio secretor también se transfieren a las secreciones lácteas, en grandes cantidades en el calostro (Xu *et al.*, 2021).

El contenido de grasa de la leche de bovino varía mucho entre y dentro de las razas y está influenciado por la dieta y factores ambientales. La mayor parte de la grasa de la leche se encuentra en forma de triglicéridos, que se ensamblan en o cerca del retículo endoplásmico de las células secretoras utilizando ácidos grasos y glicerol sintetizados en el citosol. Aproximadamente la mitad de los ácidos grasos de la leche se derivan directamente de la sangre, principalmente los de más de 14 carbonos de longitud (Pedroza, 2018).

La síntesis de ácidos grasos, procede de la utilización de ácidos grasos volátiles que surgen de la fermentación del rumen, siendo la síntesis de ácidos grasos a partir de glucosa insignificante en los rumiantes. El acetato y el beta-hidroxibutirato son precursores importantes y contribuyen principalmente a la síntesis de ácidos grasos de cadena más corta. El glicerol necesario para los triglicéridos de la leche se deriva en parte de la hidrólisis de los lípidos sanguíneos y en parte de la síntesis a partir de la glucosa. La esterificación de ácidos grasos con glicerol va seguida de la agregación de triglicéridos para formar las características gotitas de grasa de las células secretoras. Los mecanismos de liberación celular de la secreción difieren para los diversos componentes de la leche. En lugar de combinarse en un gran gránulo exocrino típico de las células zimógenas y serosas, la proteína de la leche permanece separada como múltiples gránulos pequeños. Estos son visibles solo ultra estructuralmente y presentan una gran superficie, lo que facilita una rápida digestión (García *et al.*, 2019).

La proteína no inmunitaria, como la caseína, se entrega desde el retículo endoplásmico rugoso al complejo de Golgi, donde a través de la acción de la lactosa sintetasa, se agrega lactosa. Esto hace que las vesículas que salen del aparato de Golgi se hinchen osmóticamente. A medida que ascienden a través del citoplasma supranuclear, las vesículas se agrupan estrechamente alrededor de los lados de las gotitas de lípidos, que se encuentran libres en el citoplasma y pueden tener hasta 5 μm de diámetro. Posteriormente, las membranas de las vesículas más superficiales se fusionan con la membrana plasmática apical y su contenido de proteínas, lactosa,

calcio y líquido se vacía en la luz alveolar mediante exocitosis convencional. A medida que las vesículas se descargan sucesivamente, sus paredes internas permanecen sobre la superficie del lípido que sobresale como la membrana de la gota de grasa de la leche. En última instancia, socavada por la fusión de las membranas entre las vesículas inferiores, la gota de grasa de la leche se libera en el lumen sin dañar la célula y de una manera que recuerda al desprendimiento de un eritroblasto de un núcleo picnotico de tamaño comparable (Garcia *et al.*, 2019).

3.2.3. Generalidades defensivas de la glándula mamaria

La inmunidad de la glándula mamaria se puede dividir en dos sistemas. En primer lugar, un sistema no específico que ofrece una primera línea de defensa cuando un patógeno invade y, con frecuencia, es capaz de resistir la invasión de varios agentes potencialmente infecciosos. En segundo lugar, si falla el sistema inespecífico, los tejidos de la glándula mamaria pueden adaptarse y producir una defensa específica contra cada agente infeccioso. Con frecuencia este sistema, una vez desarrollado, recuerda al patógeno invasor, que puede ser resistido por el sistema de defensa específico en una ocasión posterior (Gómez *et al.*, 2020).

3.2.3.1. Inmunidad de la ubre

La glándula mamaria tiene una variedad de mecanismos de defensa, de los cuales la fagocitosis de organismos invasores por leucocitos polimorfonucleares es probablemente el más importante (García *et al.*, 2019).

La mayoría de las infecciones de la glándula mamaria de la vaca lechera ingresan a través del canal del pezón, por lo que el pezón proporciona una barrera muy importante contra la infección, particularmente porque su superficie exterior está frecuentemente expuesta a un ambiente sumamente contaminado (Donoso, 2018).

Se podría esperar que las diferencias en la permeabilidad del conducto del pezón se correlacionen positivamente con la facilidad de ordeño, pero la relación entre las características del ordeño y la incidencia de infección intramamaria no se acepta universalmente. Los conductos de los pezones con una permeabilidad temporal, de modo que se mantenga una columna de leche durante algún tiempo después del ordeño, pueden ofrecer un medio de entrada para los microorganismos y una forma de transportarlos hacia arriba a través del conducto (Shokouhi, 2021).

La queratina del canal del pezón es un material ceroso blanco derivado de las células superficiales del epitelio escamoso estratificado y que forma una red en la luz del canal, atrapando así las bacterias invasoras e interrumpiendo la columna de leche (Pedroza, 2018).

3.3. Mastitis

La mastitis es la enfermedad infecciosa más prevalente del ganado lechero adulto. Varias especies de bacterias, hongos, micoplasmas y algas se han aislado de la enfermedad, o se ha demostrado que la reproducen experimentalmente (Filor *et al.*, 2022).

La inflamación, característica de la mastitis, puede ser indetectable sin el uso de pruebas de diagnóstico aplicadas a la leche o secreción. Esto se denomina mastitis subclínica. La mastitis subclínica da como resultado un aumento recuentos de células somáticas en animales afectados. Es esencial mantener un recuento de células bajo para cumplir con los requisitos legales de calidad de la leche, US exige que toda la leche esté por debajo de las 400 000 células / ml y garantizar que no se imponga ninguna penalización al precio de la leche. En el Reino Unido, se penaliza a muchos agricultores con recuentos de células superiores a 150000 / ml.

La etapa subclínica puede prolongarse o avanzar rápidamente a mastitis clínica en la que están presentes signos externos de enfermedad como hinchazón y dureza de las glándulas afectadas o coágulos o decoloración de la secreción. Sin embargo, la cuarta parte infectada sub clínicamente tiene una producción láctea reducida, una composición de la leche alterada y excreta el organismo infectante. La mastitis subclínica es un elemento importante en la pérdida económica mundial asociada con la mastitis, que supera los 1/2 mil millones al año (Torres, 2020).

3.3.1. Etiología de la mastitis

Primordialmente debemos saber que la mastitis es una consecuencia de la infección intramamaria y los factores de virulencia de uno o más microorganismos de muchos géneros diferentes que encuentran en ella un sustrato nutritivo que favorece su crecimiento y multiplicación (Aguilar & Álvarez, 2019).

Tabla 1. Especies de microorganismos bacterianos frecuentemente aislados de mastitis bovina clínica

Bacterias:	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>Streptococcus uberis</i> <i>Arcanobacterium</i> (<i>Actinomyces</i> ; <i>Corynebacterium</i>) <i>pyogenes</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Mycoplasma bovis</i> <i>Mycoplasma californicum</i> <i>Mycoplasma canadense</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Enterobacter</i> sp. <i>Proteus</i> sp. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Citrobacter</i> sp.
-------------------	--

Fuente: (Suarez *et al.*, 2019).

Tabla 2. Especies de microorganismos variados aislados de mastitis bovina.

Algas:	<i>Prototheca softy</i>
Hongos:	<i>Aspergillus</i> sp.

Fuente: (Suarez *et al.*, 2019).

3.3.2. Dinámica de la infección

Las glándulas mamarias pueden clasificarse en una de tres categorías: no infectadas, subclínicamente infectadas o clínicamente infectadas. Las proporciones relativas de animales en estas categorías varían entre rebaños. El tipo de patógeno también influye en la dinámica (Aguilar & Álvarez, 2019).

Las infecciones por coliformes tienden a volverse clínicas rápidamente, mientras que las infecciones por *Staphylococcus aureus* a menudo persisten como infecciones subclínicas durante semanas o meses. La mastitis clínica generalmente se tratará con terapia con antibióticos y las tasas de curación clínica son variables y dependerán del patógeno. Las tasas de curación bacteriológica varían desde el 90 por ciento para la mayoría de las infecciones por coliformes hasta el 25 por ciento con *Staphylococcus aureus* en vacas más viejas (Pedroza, 2018).

Las tasas de eliminación espontánea son bajas para las infecciones estafilocócicas (<20%), altas para *Escherichia coli* (> 70%) e intermedias para las infecciones estreptocócicas (Roodenburg *et al.*, 2021).

3.3.3. Patogenicidad

En términos generales, los microorganismos que causan la mastitis bovina pueden clasificarse parcialmente en dos grupos: contagiosos y ambientales (medio ambiente) (García *et al.*, 2019).

3.3.3.1. Mastitis contagiosa

La ubre y los pezones son el reservorio de la infección. La transmisión ocurre durante el proceso de ordeño o preparación de la ubre por manos, paños de ubre y pezoneras contaminados. La infección se establece en la superficie del pezón y el canal del pezón. Entonces, las bacterias pueden penetrar en la glándula mamaria. La mayoría de las infecciones son subclínicas y provocan un aumento del recuento de células. Las medidas de control incluyen la desinfección de los pezones después del ordeño, la terapia de vacas secas y el sacrificio (Gussmann *et al.*, 2019).

Las bacterias contagiosas incluyen *Staphylococcus aureus*, *Staphs coagulasa negativos*, *Streptococcus agalactiae* y *Strep. dysgalactiae*. Si el recuento de células somáticas de la manada es superior a 200 000 / ml, esto indica que existe un problema de mastitis contagiosa. La aplicación cuidadosa de medidas de control basadas en la desinfección de los pezones y la terapia con antibióticos para vacas secas erradicará el estreptococo. *agalactiae* durante uno o dos años, siempre que no se introduzcan animales infectados en el rebaño. *Strep. agalactiae* también se puede eliminar mediante el uso de un tratamiento intramamario "blitz" durante la lactancia y estas bacterias son muy sensibles a cualquiera de los antibióticos de penicilina. Niveles de *Staph. aureus* y *Strep. dysgalactiae* también caerá a niveles bajos. En algunos rebaños, las bajas tasas de eliminación de la infección estafilocócica por terapia requerirán el sacrificio intensivo de animales infectados crónicamente para lograr un progreso rápido (García *et al.*, 2019).

3.3.3.2. Mastitis ambiental

El medio ambiente es un reservorio de infecciones. Las infecciones se transmiten a los pezones entre ordeños o durante la preparación de las ubres. Los organismos son forzados a subir a través del canal del pezón durante el proceso de ordeño o después del ordeño si se permite que las vacas se acuesten inmediatamente después del ordeño (Jamali *et al.*, 2018).

La mayoría de las infecciones provocan mastitis clínica. Las infecciones subclínicas son menos comunes con *E. coli*, pero ocurren con frecuencia con *Streptococcus uberis*. La mastitis ambiental se controla proporcionando un ambiente limpio, alojamiento adecuado para las vacas, ordeño a través de una máquina que funcione correctamente, una buena preparación de las ubres y desinfección de los pezones antes del ordeño. Los organismos ambientales incluyen *E. coli*, *Streptococcus uberis* (ropa de cama de paja), *Klebsiella spp.* (aserrín y virutas) y *Bacillus spp.* Aunque existe la posibilidad de una transferencia entre cuartos en el momento del ordeño, no parece ser el mecanismo de infección predominante (Massé *et al.*, 2020).

La desinfección de los pezones después del ordeño no previene la infección. La terapia con antibióticos tiene algunos beneficios especiales sobre la prevención de la mastitis coliforme, pero reduce la tasa de nuevas infecciones por estreptococos durante el período seco. *uberis* (Torres, 2020).

La mastitis ambiental se controla mediante una buena gestión ambiental, una buena rutina de ordeño, una máquina de ordeño eficiente, la vacunación contra la mastitis coliforme y la desinfección de los pezones antes del ordeño (Aguilar & Álvarez, 2019).

3.3.4. Diagnóstico de mastitis clínica

Se pueden aplicar diversas pruebas a la leche para detectar mastitis. La detección de mastitis clínica depende del examen de la glándula mamaria y su secreción. La glándula afectada puede mostrar hinchazón, calor, dolor y / o dureza. La secreción puede estar coagulada, serosa o, en ocasiones, manchada de sangre (Suarez *et al.*, 2019).

En casos agudos, también pueden presentarse signos sistémicos de enfermedad, como pirexia, anorexia y ocasionalmente recumbencia en infecciones por *E. coli* y *Staph aureus*. *Tóxicos* (Iraguha *et al.*, 2017).

La enfermedad clínica se observa con mayor frecuencia en animales lactantes, particularmente al principio de la lactancia, pero también puede desarrollarse en la glándula no lactante. Debido a que el animal seco rara vez se examina de cerca, algunos de estos casos permanecen sin ser detectados hasta el parto. La "mastitis de verano" es una enfermedad aguda de la glándula mamaria no lactante y puede

afectar a vacas, vaquillas o terneros jóvenes. De manera característica, es causada por una infección mixta con *Arcanobacterium pyogenes* y bacterias anaerobias, comúnmente *Peptococcus indolicus* (Guan *et al.*, 2020).

Es importante (y en muchos países legal) que las vacas lecheras sean examinadas antes de cada ordeño para detectar signos de mastitis clínica. Esto permite que se descarte la leche anormal y que el animal afectado reciba la terapia lo más rápidamente posible, reduciendo así el daño tisular y dando mayores tasas de curación, y minimizando los riesgos de transferencia de infecciones (García *et al.*, 2019).

Una alternativa es el examen de la primera leche en busca de anomalías físicas cualitativas durante la preparación para el ordeño. Estas pruebas generalmente miden el recuento de células somáticas o detectan la presencia de organismos infecciosos. Estos cambios son tanto citológicos como bioquímicos (Martins *et al.*, 2019).

La mayoría de las pruebas diagnósticas se realizan en laboratorio, aunque la prueba de mastitis de California (CMT) y las medidas de conductividad eléctrica se pueden utilizar en el lado de la vaca. Las pruebas pueden clasificarse en tres categorías y aplicarse solas o en combinación (Naqvi *et al.*, 2022).

3.3.4.1. Conteo de células somáticas

La mayoría de las células somáticas que se encuentran en la leche son glóbulos blancos, y el resto son principalmente células epiteliales eliminadas por el tejido secretor de la ubre. Los glóbulos blancos se encuentran en todo el cuerpo y su función principal es proteger contra las enfermedades. Cuando se acumulan grandes cantidades, son visibles como pus. La medición del número de células somáticas en la leche se conoce como recuento de células somáticas (Valle, 2021).

Los recuentos de células somáticas se pueden realizar tanto en la leche a granel del rebaño como en la leche de vaca individual. Leche a granel de rebaño Se ha demostrado que el conteo mensual de células proporciona una estimación justa del estado de mastitis subclínica de un rebaño; además, la media anual puede actualizarse de forma continua (Antanaitis *et al.*, 2021).

Un rebaño de vacas con cuartos fisiológicamente normales podría esperar un recuento de células de leche a granel (BMCC) de <200000 mil células/ml. Existen rebaños con recuentos de células por debajo de esta cifra. Un recuento de 200000 células/ml se considera un límite superior realista para rebaños con mastitis bajo control (Carvalho *et al.*, 2021).

3.4. Higiene del ordeño

La leche secretada por las vacas infectadas contiene un número variable de microorganismos patógenos. El ordeño del hato brinda oportunidades para la transmisión de estas bacterias entre los cuartos de las ubres y las vacas a través de la propia máquina de ordeño, las manos o los paños del ordeñador.

Se pueden emplear varias técnicas en el momento del ordeño para reducir la transmisión, entre ellas (Aguilar & Álvarez, 2019).

- Usar agua desinfectada para lavar los pezones.
- Emplear toallas de papel o paños individuales para secado de pezones.
- Usar guantes de goma limpios.
- Aplicar un desinfectante adecuado a la superficie del pezón después del ordeño.
- Desinfección o tratamiento térmico del racimo entre vacas lecheras.
- Desinfección de pezones antes del ordeño.

Además, se puede usar la separación de los animales infectados del rebaño sano, aunque no es práctico en la mayoría de los rebaños y requiere el uso de recuentos de células de vaca individuales o una prueba similar. El uso de medidas como las descritas anteriormente puede reducir las tasas de infección en aproximadamente un 50 por ciento, siendo los efectos mayores contra *Staph. aureus*, *estreptococo. agalactiae* y *Strep. Dysgalactiae*. Las medidas son menos efectivas contra coliformes y *Strep. uberis* debido a su distribución más amplia en el medio ambiente (Torres L. , 2020).

De las diversas medidas para prevenir nuevas infecciones intramamarias entre las vacas lecheras, la desinfección de los pezones después del ordeño es la más valiosa. Se utilizan varios desinfectantes, más comúnmente yodóforos, clorhexidina e

hipoclorito. A menudo se agregan emolientes para promover el buen estado de la piel y la curación rápida de las lesiones.

Estos desinfectantes destruirán rápidamente las bacterias que alcanzan la superficie del pezón durante el ordeño y evitarán la colonización del conducto del pezón y la infección de las lesiones del pezón. La velocidad de eliminación del desinfectante de pezones después del ordeño no es importante siempre que sea eficaz. Esto es contrario a la acción de los desinfectantes previos al ordeño que deben tener una rápida velocidad de destrucción. Esta acción rápida es necesaria para evitar ralentizar el procedimiento de ordeño (Robles *et al.*, 2021).

Se debe enfatizar la importancia de la higiene previa al ordeño en la producción de leche de alta calidad bacteriológica. Los datos muestran que el lavado efectivo del pezón seguido del secado reduce significativamente el contenido bacteriano de la leche a granel. Lavar sin secar dará como resultado que las bacterias se pongan en suspensión. Esta solución se aspirará con la leche (Shokouhi, 2021).

3.5. *Staphylococcus aureus*

Este organismo es la causa predominante de mastitis subclínica, indudablemente también se aísla de la enfermedad clínica. Las fuentes importantes de infección son las ubres infectadas, los conductos de los pezones o las lesiones en los pezones. Existen fuentes extramamarias, en particular la vagina y las amígdalas, pero no parecen importantes en la patogenia de infección (Kim *et al.*, 2010).

Se ha demostrado que es posible erradicar al *Staphylococcus aureus* de casos individuales mediante la aplicación de medidas higiénicas en el momento del ordeño y descarte de vacas crónicas. La principal limitación para un control más efectivo de *Staphylococcus aureus* sigue siendo su mala respuesta a la terapia con antibióticos (Lee *et al.*, 2018).

Las tasas de curación son más altas en animales de primera y segunda lactancia. En vacas mayores o que tienen más de 3 o 4 partos en su vida productiva, las tasas de curación durante la lactancia pueden ser tan bajas como el 25% después de la terapia con antibióticos intramamarios. Incluso después del uso de la terapia de vacas secas, son comunes las tasas de curación del 33% (Guzmán , et al., 2021).

Hay una variedad de razones para esto, de las cuales la resistencia a los antibióticos juega solo un papel menor, experimentalmente la demostración in vitro de la sensibilidad de *Staphylococcus aureus* a un antibiótico no es garantía de éxito terapéutico (Guzmán *et al.*, 2021).

La capacidad de las bacterias para sobrevivir dentro de células inmunitarias o polimorfonucleocitos, tales como macrófagos y células epiteliales, le confiere protección ante la acción de los antibióticos, es punto de partida para creer que puede contribuir significativamente a su resistencia a la terapia. Además, los cambios patológicos, en particular granulomas y fibrosis, inducidos en *Staph. aureus* hace que las vacas crónicamente infectadas sean esencialmente incurables (Jiménez *et al.*, 2020).

Más comúnmente *Staphylococcus. aureus* la infección de la ubre es crónica, siendo la mastitis aguda menos común que con otras bacterias. Sin embargo, *S. aureus* pueden surgir infecciones gangrenosas agudas en las que se produce un crecimiento descontrolado del microorganismo que produce grandes cantidades de una toxina. Tales infecciones probablemente no se deban a cepas de mayor virulencia, sino más bien a la incapacidad del huésped para montar una defensa eficaz (Ritika *et al.*, 2018).

3.5.1. Aislamiento

El medio habitual para la inoculación de muestras presumibles de *Staphylococcus aureus* es agar sangre al cual se le ha añade el 5% (sangre de ovino). Para la mayoría de las especies de estafilococos, las placas inoculadas se incuban aeróbicamente a 37 °C durante 24 a 48 horas, aunque es una bacteria de carácter aeróbico facultativo, es decir puede vivir en ambientes cuya atmosfera carece de O₂.

Las muestras de fuentes contaminadas también se pueden sembrar en un medio selectivo, que inhibirá el crecimiento de microorganismos gramnegativos, pero permitirá el crecimiento de estafilococos y algunos otros cocos Grampositivos, como el agar sal manitol (Peton & Loir, 2014).

3.5.2. Identificación

Las colonias suelen aparecer en un periodo de 24 a 48 horas de incubación. Son redondos, lisos y brillantes, y en agar sangre tienden a aparecer sustanciales y opacos (blancos) en comparación con las colonias más pequeñas y translúcidas de otras especies bacterianas. (Thomas *et al.*, 2021).

3.5.2.1. Coloración

Las cepas de *Staphylococcus aureus* de animales casi siempre no están pigmentadas, generalmente son de color blanco, mientras que los aislamientos humanos suelen estar pigmentados, y van del amarillo crema al naranja. Algunos de coagulasa negativos los estafilococos producen pigmento, especialmente las cepas de *S. chromogenes* cuyas colonias son de color amarillo anaranjado. Se dice que el aumento de la pigmentación en los estafilococos es inducido por la adición de leche, grasa o monoacetato de glicerol al medio (Aguilar & Álvarez, 2019).

3.5.2.2. Hemolisis

Los *Staphylococcus aureus* pueden presentar hemolisinas; alfa, beta, delta y gamma, estas pueden encontrarse en los aislados solas, combinadas o no pueden encontrarse presentes. Las hemolisinas difieren antigénica y bioquímicamente por su efecto sobre los glóbulos rojos de varias especies animales (Middleton *et al.*, 2017).

El agar sangre preparado con eritrocitos de ovinos o bovinos es el medio predilecto para el diagnóstico veterinario, ya que los glóbulos rojos de estas dos especies animales son susceptibles a las hemolisinas alfa y beta que comúnmente producen los estafilococos aislados de animales (Thomas *et al.*, 2021).

3.5.2.3. Apariencia microscópica

La tinción para poder revelar una imagen microscópica es de mucha ayuda, en donde generalmente suele observarse formas de cocos, de una coloración purpura azulada, agrupadas en forma de racimos de uvas (Suarez *et al.*, 2019).

3.5.2.4. Prueba de coagulasa

El plasma de conejo contiene fibrinógeno que se convierte en fibrina por las enzimas coagulasa estafilocócicas. La prueba de coagulasa generalmente se correlaciona bien con la patogenicidad de la bacteria, como reactivo se utiliza plasma de conejo liofilizado comercial fresco o reconstituido (Middleton *et al.*, 2017).

3.6. Antibióticos betalactámicos

Los antimicrobianos son una sustancia química que matan o que tiene el efecto de impedir el crecimiento de ciertas clases de microorganismos que son afectados por dicho fármaco, por lo cual permite un tratamiento etiológico por excelencia en aquellos casos de infecciones. Como es el caso de los antimicrobianos betalactámicos que son aquellos que tiene el anillo betalactámico que forma parte de la estructura, que se define químicamente a esta familia de antibióticos y que determina el mecanismo de acción que es la inhibición de la síntesis de la pared celular, en esta familia de los antibióticos el principal mecanismo de resistencia es la producción de betalactamasas por parte de los microorganismos causantes de una infección clínica (Duse *et al.*, 2021).

3.6.1. Farmacocinética y Farmacodinamia

Las propiedades de los betalactámicos tras su administración intravenosa alcanzan con rapidez concentraciones plasmáticas elevadas teniendo una semivida de eliminación renal muy baja por que se deben administrar varias veces al día. Los betalactámicos son bactericidas parciales ya que sólo actúan en fase de crecimiento celular y su eficacia es tiempo dependiente ya que ocurre en dependencia de la concentración mínima inhibitoria provocando la liberación de endotoxinas debido a su rápida capacidad bactericida y con consecuencia provoca una mayor reacción de respuesta de inflamación. El metabolismo de la mayoría de los betalactámicos es casi nulo manteniéndose activa hasta su eliminación que es vía renal mediante filtrado glomerular y secreción tubular, por lo cual en pacientes con afecciones renal se ajustan las dosis para prevenir efectos de nefrotoxicidad, pero ya algunos preparados o principios activos tiene la excreción por vía biliar (Rosales & Granja, 2017).

3.6.2. Espectro Antibacteriano

El espectro de los antibióticos betalactámicos incluye bacterias grampositivas y gramnegativas y algunas espiroquetas, no tiene efectividad con el micoplasmas ya que este carece de pared celular, tampoco tiene actividad con bacterias intracelulares como las clamidias o la rickettsias ya que tiene escasa capacidad de penetración dentro de las células, algunas bacterias ya tienen resistencia natural como son las micobacterias se debe por la producción de betalactamasa que está unida a una penetración lenta del antibióticos por características de la especie bacteriana que presenta en la pared del microorganismos, ya que la pared bacteriana es una estructura que envuelve las bacterias y esta se sitúa por fuera de la membrana citoplasmática y está compuesta por proteínas llamadas peptidoglucanos (Rojas *et al.*, 2021).

3.6.3. Mecanismo de acción

Esta familia de antibióticos son de acción bactericida por su modo de acción que son dos mecanismos: inhibición de la síntesis de la pared bacteriana e inducción de la autólisis del microorganismos, en las bacterias grampositivas la pared celular es gruesa y su componente principal es el peptidoglucano, las bacterias gramnegativas tienen una pared más fina y compleja que consta de una membrana externa formada por lípidos y proteínas un poco más delgada, ya que en esta pared los antibióticos van a formar unas enzimas llamadas *penicillin binding protein* (proteínas ligas a la penicilina) que provocan el cambio en la estructura de la misma y la muerte de la bacteria (Plumb, 2017).

3.6.4. Mecanismos de Resistencia

Los microorganismos pueden desarrollar resistencia a los antibióticos en especial a los betalactámicos que se puede dar por tres mecanismos diferentes que en ocasiones pueden ir asociados a otras causas, a continuación, se describen los principales (Boireau *et al.*, 2018).

- Producción de enzimas (Betalactamasa), esto es el principal mecanismo de resistencia a los betalactámicos especialmente en gramnegativos, aunque en grampositivas también se puede producir, las enzimas betalactamasas son aquellas encargadas de hidrolizar el anillo betalactámico y por lo tanto esto inactiva al

antibiótico de que se unan a las PBP, esto también su producción puede estar mediado por plásmidos o cromosómicamente codificados. Hay muchos tipos de betalactamasas en función de los betalactámicos que hidrolizan, el uso de estos antibióticos durante décadas ha favorecido a la evolución de estas enzimas hacia una nueva generación que son llamadas BLEE y que estas son encargadas de inactivar las cefalosporinas de tercera generación (Sharun *et al.*, 2021).

- **Modificación de la diana en las PBP.** En los últimos años se presentaron diferentes alteraciones en las PBP como son mutaciones, hiperexpresión y modificación de la afinidad y esto puede dificultar la unión del betalactámico a la proteína lo que causa que se disminuya su actividad, siendo uno de los principales mecanismos de resistencia de los microorganismos grampositivos como el *S. aureus* resistente a la meticilina (Algharib *et al.*, 2020).

- **Alteraciones en la permeabilidad y bombas de expulsión,** las sustancias que son poco lipofílicas como los betalactámicos precisan proteínas que facilitan la entrada al espacio periplásmicos para poder unirse a las PBP, siendo este uno de los motivos por lo cual algunos microorganismos son más resistentes en especial las bacterias gramnegativas, y algunos presentan un sistema de bombeo de antibióticos muy eficaces que determinan su resistencia intrínseca a muchos antibióticos. (Duse *et al.*, 2021).

3.6.5. Clasificación de los Betalactámicos

El conocimiento y la sistematización de todos estos aspectos se llegará a la elaboración de protocolos terapéuticos consensuados que sustenten las bases fundamentales del uso racional de los antibióticos por lo cual en la familia de los antibióticos betalactámicos encontramos desde naturales hasta sintéticos y con diferentes usos en tratamientos en las infecciones provocadas por microorganismos (Radzikowski *et al.*, 2020).

3.6.5.1. Penicilinas

Se pueden dividir según su actividad antibacteriana en las siguientes clases:

- **Penicilinas naturales:** Son las Penicilinas-G, es el representante principal del grupo y como se menciona que se comercializo en la década de 1940,

manteniendo una buena actividad de forma uniforme frente algunos microorganismos, presentando una vida media muy corta y requiere la administración cada cuatro horas, se les puede añadir moléculas procaína o benzatina y algunas penicilinas V que son de administración oral (Rosales & Granja, 2017).

- **Penicilinas semisintéticas:** aparecen en la década de 1960 las aminopenicilinas en la cual incluye a la ampicilina que es bactericida tanto para bacterias grampositivas como para bacterias gramnegativas, también en 1972 se comercializó la amoxicilina y estas indicado para el uso en tratamientos empíricos de neumonías y se recomienda usar con un macrólido (Plumb, 2017).

- **Penicilinas resistente a penicilinasas:** En 1959 se desarrolló y comercializó por primera vez una penicilina semisintética con resistencia a las penicilinasas como la meticilina, con el objetivo era de poder tratar infecciones causadas por bacterias del género *Staphylococcus aureus*, siendo ampliamente reemplazadas por penicilinas más estables por lo cual los microorganismos como es el *Staphylococcus aureus* resistente a la Meticilina (SARM) son considerados ya resistente a la familia de los betalactámicos (Plumb, 2017).

3.6.5.2. Inhibidores de Betalactamasas

El primer inhibidor de betalactamasas fue en 1980 que es el ácido clavulánico, cuyo nombre deriva de *Streptomyces clavuligerus* que produce estas sustancias, tiene una actividad antimicrobiana intrínseca insignificantes a pesar de compartir el anillo betalactámico que es característico de los dichos antibióticos, gracias a la similitud en la estructura química permite a la molécula interactuar con la enzima betalactamasa secretada por ciertas bacterias por conferir resistencia contra los antibióticos, el ácido clavulánico es un inhibidor suicida se une covalentemente al sitio activo de un residuo de serina de la betalactamasa. Esta inhibición restablece la actividad antimicrobiana de los antibióticos betalactámicos, esta inhibición restablece la actividad antimicrobiana por producción de betalactamasa plasmídicas y algunos cromosómicas (Rosales & Granja, 2017).

Todos estos inhibidores asociados con penicilinas tienen una alta eliminación biliar y se propone el uso con algunos medicamentos de nueva generación como

es el Avibaztam que es un inhibidor de betalactamasas no betalactámico que podría ampliar el espectro de las cefalosporinas en bacterias productoras de carbapenemasas (Rojas *et al.*, 2021).

3.6.5.3. Cefalosporinas

Son el segundo grupo de derivados betalactámicos descubiertos y probablemente es el más amplio en cuanto a su moléculas desarrolladas y comercializadas, este grupo de antibióticos comenzó en 1948 en Cerdeña con Giuseppe Brotzu al observar este como una cepa de *Cephalosporium acremonium* que es procedente de una alcantarilla de la isla, producía una sustancia que tenía actividad frente a bacterias grampositivas y gramnegativas. Y clásicamente se agrupan en generaciones, hasta cuatro en el momento actual y se ha asociado a un incremento de su espectro y de su actividad intrínseca frente a un gran número de bacterias. Su mecanismo de acción es el mismo que el de las penicilinas y su eficacia clínica se correlaciona con la obtención de una concentración de antibiótico libre de 4-5 veces superior a la CMI y la persistencia por encima de éstas durante el 60 a 70 % de intervalo entre dosis consecutivas (Rosales & Granja, 2017).

- **Cefalosporinas de primera generación:** Las cefalosporinas de primera generación tienen actividad con cocos grampositivos (SASM) y muy limitada con bacilos gramnegativos. Algunos ejemplos son cefazolina y cefadroxilo (Plumb, 2017).
- **Cefalosporinas de segunda generación:** está integrada por diversas clases con diferencias antibacterianas y farmacológicas significativas y en general son moléculas con una mayor resistencia frente a las betalactamasas lo que les confiere actividad frente a algunas enterobacterias, algunos ejemplos son: cefuroxima, cefonicid, cefoxitina, algunas de estas tienen la presencia de metoxi en el anillo betalactámico lo que les confiere una mayor resistencia frente a las betalactamasas pero tiene menor actividad para cocos grampositivos (Plumb, 2017).
- **Cefalosporinas de tercera generación:** agrupan a diversas moléculas con propiedades diferentes, siendo el primero los denominados aminotiazólicos iminometoxicefalosporinas que incluye a la cefotaxima y ceftriaxona, hay

moléculas que permiten la administración oral como es la cefixima, ceftibuteno, cefpodoxima (Plumb, 2017).

- **Cefalosporina de cuarta generación:** se trata de moléculas estructuralmente similares a las de tercera generación, pero con una estructura altamente hidrófila que mejora su penetración a través de la pared bacteriana sobre todo en gramnegativos, y tiene actividad frente a las betalactamasas (Plumb, 2017).

3.6.5.4. Monobactámicos

Son betalactámicos monocíclicos su principal aportación reside en poder administrarse en pacientes con hipersensibilidad de tipo dos a penicilina o cefalosporinas, no tiene actividad contra cocos grampositivos siendo solo para bacterias grampositivas (Tomazi *et al.*, 2020).

3.6.5.5. Carbapenemes

Son los antimicrobianos betalactámicos de más amplio espectro, actividad y resistencia a las betalactamasas e incluidas BLEE, derivan del anillo carbapenem y se dividen en dos grupos según tenga o no actividad frente a bacterias Gramnegativos, algunos ejemplos son imipenem, meropenem, doripenem, ertapenem (Rojas *et al.*, 2021).

3.6.6. Efectos Adversos de los Betalactámicos

Los efectos adversos de los betalactámicos se relacionan con hipersensibilidad, esta clase de antibióticos son bien tolerados ya que ejercen su acción sobre un sustrato que no comparte con las células eucariotas, por lo general poca toxicidad directa, tiene un acción irritativa sobre el lugar de administración y puede causar gastritis si se administran por vía digestiva, dolor con la inyección intramuscular o flebitis, otro efecto es la disbacteriosis, consistente en la colonización y superinfección por parte de bacterias endógenas resistentes u hongos que se puede manifestar en forma de trastornos digestivos o convulsiones y crisis mioclónicas si se utilizan dosis elevadas. (Morales *et al.*, 2020).

La penicilina es el antibiótico que más frecuentemente se usa y causa fenómenos de hipersensibilidad, y este antecedente está presente en el 10% de los pacientes, y que son reacciones mediadas por la inmunoglobulina E (IgE), que suele ser

inmediatas pero que hasta el 5% de los casos pueden presentar tras la administración. Reacciones mediado por otros mecanismos se presentan a partir de las 72 horas de la administración del fármaco y pueden estar mediadas por anticuerpos (hemólisis, citopenias, nefritis intersticial), inmunocomplejos, reacciones de sensibilidad mediada por linfocitos T (Garzón *et al.*, 2022).

3.6.7. Meticilina

Es un antibiótico betalactámico de espectro reducido del grupo de las penicilinas, los desarrollos del antibiótico fue por la compañía beecham en 1959, fue usado para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias grampositivas productoras de betalactamasa como el *Staphylococcus aureus* pero actualmente no es usado clínicamente, en la actualidad es reemplazado por otros antibióticos, su mecanismo de acción es como los otros antibióticos betalactámicos que actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana, evitando la formación de enlaces cruzados entre las cadenas poliméricas de péptidoglicanos lineal, las cuales son como componentes importantes de la pared celular y de las bacterias grampositivas. La meticilina es resistente a la enzima betalactamasa (Penicilinas), secretada por muchas bacterias resistentes, tiene en su estructura química la presencia del grupo orto-dimetoxifenil directamente unidos a la cadena lateral carbonilo del núcleo de la penicilina, facilita la resistencia a betalactamasas debido a que estas enzimas son relativamente intolerantes a la resistencia estérica por ella es capaz de unirse a las proteínas ligadas a las penicilinas (Espínola *et al.*, 2020).

```

Query 1          GCGATTGATGGTGATACGGT 20
          |||
Sbjct 1085212    GCGATTGATGGTGATACGGT 1085193
  
```

Figura 1. Secuencia de oligonucleótidos del gen *nuc*/ referencia para la identificación del *Staphylococcus aureus*; Localización (1085193 a 1085212)

Fuente: Brakstad *et al.*, (1992).

Query	1006749	ATGAGAATAGAACGAGTAGATGATACAACGTGTAATAATGTTTATAACATATAGCGATATC	1006808
Sbjct	1006749	ATGAGAATAGAACGAGTAGATGATACAACGTGTAATAATGTTTATAACATATAGCGATATC	1006808
Query	1006809	GAGGCCCGTGGATTTAGTCGTGAAGATTTATGGACAAATCGCAAACGTGGCGAAGAATTC	1006868
Sbjct	1006809	GAGGCCCGTGGATTTAGTCGTGAAGATTTATGGACAAATCGCAAACGTGGCGAAGAATTC	1006868
Query	1006869	TTTTGGTCAATGATGGATGAAATTAACGAAGAAGAAGATTTTGTGTAGAAAGGTCCATTA	1006928
Sbjct	1006869	TTTTGGTCAATGATGGATGAAATTAACGAAGAAGAAGATTTTGTGTAGAAAGGTCCATTA	1006928
Query	1006929	TGGATTCAAGTACATGCCTTTGAAAAAGGTGTCGAAGTCACAATTTCTAAATCTAAAAAT	1006988
Sbjct	1006929	TGGATTCAAGTACATGCCTTTGAAAAAGGTGTCGAAGTCACAATTTCTAAATCTAAAAAT	1006988
Query	1006989	GAAGATATGATGAATATGCTGTGATGATGCAACTGATCAATTTGATGAACAAGTTCAA	1007048
Sbjct	1006989	GAAGATATGATGAATATGCTGTGATGATGCAACTGATCAATTTGATGAACAAGTTCAA	1007048
Query	1007049	GAATTGTTAGCTCAAACATTAGAAGTGAAGATCAATTAGAAGAATTATTCGAGCAACGA	1007108
Sbjct	1007049	GAATTGTTAGCTCAAACATTAGAAGTGAAGATCAATTAGAAGAATTATTCGAGCAACGA	1007108
Query	1007109	ACAAAAGAAAAAGAAGCTCAAGGTTCTAAACGTCAAAAGTCTTCAGCACGTAAAAATACA	1007168
Sbjct	1007109	ACAAAAGAAAAAGAAGCTCAAGGTTCTAAACGTCAAAAGTCTTCAGCACGTAAAAATACA	1007168
Query	1007169	AGAACAATCATTTGTGAAATTTAACGATTTAGAAGATGTTATTAATTATGCATATCATAGC	1007228
Sbjct	1007169	AGAACAATCATTTGTGAAATTTAACGATTTAGAAGATGTTATTAATTATGCATATCATAGC	1007228
Query	1007229	AATCCAATAACTACAGAGTTTGAAGATTTGTTATATATGGTTGATGGTACTTATTATTAT	1007288
Sbjct	1007229	AATCCAATAACTACAGAGTTTGAAGATTTGTTATATATGGTTGATGGTACTTATTATTAT	1007288
Query	1007289	GCTGTATATTTTGATAGTCATGTTGATCAAGAAGTCATTAATGATAGTTACAGTCAATTG	1007348
Sbjct	1007289	GCTGTATATTTTGATAGTCATGTTGATCAAGAAGTCATTAATGATAGTTACAGTCAATTG	1007348
Query	1007349	CTTGAATTTGCTTATCCAACGACAGACAAGAGTTTATTTAAATGACTATGCTAAAATA	1007408
Sbjct	1007349	CTTGAATTTGCTTATCCAACGACAGACAAGAGTTTATTTAAATGACTATGCTAAAATA	1007408
Query	1007409	ATTATGAGTCATAACGTAACAGCTCAAGTTCGACGTTATTTTCCAGAGACAACCTGAATAA	1007468
Sbjct	1007409	ATTATGAGTCATAACGTAACAGCTCAAGTTCGACGTTATTTTCCAGAGACAACCTGAATAA	1007468

Figura 2 Secuenciación de aminoácidos del gen *mecA* de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (SAMR); Localización: (100674...1007468)

Fuente: (National Library of Medicine, 2022).

3.6.8. Ampicilina

Igual que otras penicilinas es un agente bactericida dependiente del tiempo que actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular, tiene actividad contra muchas cepas de bacterias aeróbicas gramnegativas y algunos anaerobios, en microorganismo no tiene actividad la ampicilina como son las rickettsias, micobacterias, hongos, micoplasmas y virus. Tiene una absorbida de un 30 a 55% aproximadamente, el volumen de distribución para la ampicilina es de aproximadamente 0,3l/kg en las personas y en bovinos de 0,16-0,5 l/kg, se distribuye en muchos tejidos incluyendo hígado, pulmones, próstata, músculo, bilis y liquido ascíticos, pleura y sinovial, cruza la placenta pero se piensa que es relativamente segura para el uso durante la preñez, los niveles en leche son considerados bajos, en vacas en lactancia, la

relación leche: plasma es alrededor de 0,3. Es eliminada principalmente a través de mecanismo renales, sobre todo por secreción tubular per en algunos caso por hidrólisis a ácidos peniciloico y luego excretada en la orina (Plumb, 2017).

3.6.9. Amoxicilina

Es una amino-penicilina de espectro reducido del grupo de las penicilinas, por lo que está indicado para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias grampositivas, en particular por las estafilococos que suelen ser resistente a otras penicilinas, es considerada equivalente a la oxacilina aunque difiere en su seguridad farmacológica, su distribución se da en tejidos y cavidades, en algunos casos está indicada para el tratamiento de mastitis bovina, después de la administración intramamaria tiene una absorción sistémica limitada permaneciendo por 4 semanas la amoxicilina en la secreción de la ubre (Ngssam *et al.*, 2020).

3.6.10. Oxacilina

Dentro del campo veterinario este agente farmacológico es empleado para tratar numerosas infecciones, generalmente de tejidos blandos, incluyendo tejido óseo y cutáneo, adicionalmente, es un fármaco referente cuando se aislados *Staphylococcus* productores de penicilinasas. Su uso es más específico que el de otras penicilinas, de ahí el nombre de penicilinas antiestafilocóccicas, ya que actúa sobre ciertas cepas de estafilococos a excepción de los *Staphylococcus aureus* metilino resistentes.

Farmacocinéticamente la oxacilina es en parte metabolizada en componentes activos como e inactivos, los cuales se distribuyen en los riñones, pulmones, liquido pleural, sinovial y liquido ascítico, esta se elimina con rapidez a través de la orina por filtración glomerular y secreción tubular, aunque se ha detallado que se elimina en mínima cantidad atreves de las heces por vía biliar (Plumb, 2017).

3.6.11. Antibiograma

3.6.11.1. Suspensión Del Inoculo

Existen dos métodos para la preparación de inóculo: suspensión directa de colonias y fase logarítmica de crecimiento, sólo el método de suspensión directa de colonia proveerá resultados precisos para ciertos organismos, en los dos métodos la turbidez

de la suspensión debe ser estándar. La suspensión de las colonias en solución salina o caldo, luego se ajuste el inóculo una turbidez equivalente al estándar de 0,5 de McFarland (Montero *et al.*, 2018).

3.6.11.2. Inoculación De La Placa

El inóculo será sembrado en la placa con agar específico como es el Mueller-Hinton, agite la suspensión del organismo para asegurarse que está bien mezclada, luego, sumerja un hisopo de algodón estéril en la suspensión, remueva el exceso de líquido del hisopo presionándolo contra la pared del tubo, empezando en la parte superior de la placa inocule la superficie con el hisopo, cubra todas las placas frotando de ida y vuelta de un borde a otro. Incube la placa dentro de los 15 minutos siguientes después de haber estandarizado el inóculo (Montero *et al.*, 2018).

3.6.11.3. Aplicar Los Discos De Antimicrobiano

Coloque los discos con los agentes antimicrobianos dentro de los 15 minutos siguientes a la inoculación, los discos pueden ser colocados uno a uno o con un dispensador de discos, típicamente se puede aplicar hasta 12 discos en una placa de 150 mm de diámetro o hasta 5 discos en una placa de 100mm, presione cada disco firmemente para asegurar el contacto completo con la superficie de agar (González & Vidal, 2021).

3.6.11.4. Medición De La Zona De Inhibición

Después de retirar la placa de la incubadora se examina detenidamente la placa para verificar que el crecimiento sea uniforme y confluyente de tal modo que pueda identificar zonas sin crecimiento bacteriano. Para medir las zonas de inhibición desde la parte posterior de la placa usando luz reflejada, sostenga la placa con unos pocos centímetros sobre una superficie de color negro que no refleje la luz, mide redondeando al milímetro más cercano con una regla o un calibrador (Montero *et al.*, 2018).

3.6.12. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

La concentración inhibitoria mínima de un agente antimicrobiano es la mínima concentración del agente antimicrobiano que inhibe la multiplicación y producción de un crecimiento visible de una cepa bacteriana dada en el sistema de prueba.

Utilizando los criterios de interpretación del NCCLS, los resultados son interpretados como susceptibles, intermedio o resistente. Se puede realizar usando como medios de cultivos en agar, en este método de dilución en agar el agente antimicrobiano es incorporado en el medio con cada placa que contenga una concentración diferente del agente antimicrobiano, los inóculos pueden ser aplicados rápida y simultáneamente a las superficies disponibles. (Martínez & Porras , 2019).

3.6.13. Antibiograma en *Estafilococcus*

El *S. aureus* es un patógeno importante para el ser humano ya que puede causar una gran variedad de infecciones tanto en individuos sanos como en inmunodeficientes, la resistencia a los antibióticos comúnmente usados está aumentando a nivel mundial, más del 90% de *S. aureus* presentan resistencia a las penicilinas. En forma creciente también se ha observado resistencia a oxacilina en dicho patógeno en comunidades, sin embargo, se han reportado casos de disminución de la susceptibilidad a vancomicina en varios países, en el 2002 se aisló la primera cepa totalmente resistente a vancomicina (Montero *et al.*, 2018).

En 1944 dos años después de la introducción de los antibióticos penicilina se reportó el primer *S. aureus* resistente a la penicilina, dando como resultado que este patógeno producía una enzima penicilinas que hidrolizó el anillo betalactámico de la penicilina. la oxacilina y la meticilina son penicilinas semisintéticas que son estables a las betalactamasas estafilocócica gracias a la ubicación estratégica de ciertas cadenas laterales en la molécula, los cuales fueron desarrollados específicamente para el tratamiento de infecciones causadas por el *S. aureus*. Sin embargo, la resistencia a antibióticos de tipo meticilina pronto apareció por la emergencia del gen *mecA*. Este gen codifica para una nueva proteína PBP2a que se une a la penicilina. Esta proteína participa en la síntesis de la pared celular a pesar de la presencia de antibióticos tipo meticilina (Montero *et al.*, 2018).

Los primeros aislados se denominaron *S. aureus* resistentes a la oxaciclina o ORSA puesto que es la oxaciclina el antibiótico que generalmente se usa en las pruebas de laboratorio. Los ORSA usualmente son resistente a todos los demás agentes betalactámicos, y puede presentar un resistencia homogénea o heterogénea a la

oxacilina en las que presentan resistencia homogéneamente todas las cepas hijas tienen *mecA* y son resistente a la oxacilina y las cepas heterogéneamente resistente dice que toda la población tiene *mecA* pero muchas células no expresan resistencia a la oxaciclina (Koba *et al.*, 2018).

En estudios se encontraron con poca frecuencia que el *S. aureus* que tiene CIMs de oxacilina que se encuentran cerca a el límite de interpretación de resistencia se conocen como BORSA, al contrario de las ORSA estas cepas pueden ser tratadas mediante combinaciones de betalactámicos e inhibidores de betalactamasa, ya que estos no aportan el gen *mecA*, usualmente no tienen resistencia múltiple, ni tampoco crecen en oxacilina agar salino. La BORSA puede ocurrir por uno de varios mecanismos, algunas cepas son hiperproductoras de betalactamasas que inactiva parcialmente a la oxacilina y otros betalactámicos, y en algunas otras cepas raras hay una modificación de PBP 1,2 y 4 que no ligan a la oxacilina de manera eficiente. Por último, algunas cepas de MICS cercanos al límite de susceptibilidad en realidad son productoras de *mecA* heteroresistente y generalmente no se les denomina BORSA (Martínez & Porras , 2019).

3.6.14. Prueba De Difusión Por Disco (Kirby Bauer)

El método de difusión por disco puede ser utilizado para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de estafilococos con ciertas modificaciones, el inóculo debe prepararse usando el método de suspensión directa de colonias. A continuación, se presenta los criterios o puntos de cortes del *S. aureus* frente a la oxacilina que es representación de la meticilina.

Tabla 3. criterios de interpretación para difusión de discos de oxacilina (mm)

Organismos	susceptible	Intermedia	Resistencia
<i>S. aureus</i>	13	11-12	10

Fuente: Torres & Cercenado, (2010).

CAPÍTULO IV

IV. MARCO METODOLÓGICO

4.1. MATERIALES

4.1.1. Lugar de investigación

La presente investigación se desarrolló en la Universidad Estatal de Bolívar, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente, en el Laboratorio General de la Facultad.

Tabla 4 Especificaciones del lugar donde se realizará la investigación

País	Ecuador
Provincia	Bolívar
Cantón	Guaranda
Parroquia	Gabriel Ignacio Veintimilla
Sector	Laguacoto, Vía Guaranda – San Simón Km 1 ½

Fuente: Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología, (2021).

Tabla 5 Situación Geográfica del lugar de investigación

Parámetros Geográficos de Guaranda	
Altitud	2608.00 metros
Latitud	-1.614378°
Longitud	-78.998339°
Temperatura máxima	19 °C
Temperatura mínima	10 °C
Temperatura media anual	14°C
Precipitación media anual	1619 mm cúbicos
Humedad relativa (%)	72%

Fuente: Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología, (2021).

4.1.2. Zona de vida

De acuerdo con el sistema de clasificación de zonas de vida por Leslie Holdridge, el cantón Guaranda corresponde a la formación Bosque Húmedo Montano Bajo (B.h.m.b). Se encuentra localizada entre 2000 y 3000 metros sobre el nivel del mar, con variaciones micro climáticas de acuerdo con los pisos altitudinales de las cordilleras (Holdridge, 1971).

4.1.3. Material Experimental

- 50 cepas de *Staphylococcus aureus*.
- Discos antibióticos

4.1.3.1. Ropaje de seguridad

- Guantes quirúrgicos
- Cofia desechable
- Guantes de manejo
- Mandil
- Cubre suelas desechables.
- Mascarillas
- Gafas de protección

4.1.3.2. Equipos de laboratorio

- Cámara de flujo laminar (Biobase, BBS-H1800, China)
- Incubadora (Memmert, Alemania)
- Autoclave
- Estufa (Biobase, BOV-V30F, China)
- Microondas (Indurama, MWI-28VI, Ecuador)
- Cuenta Colonias (Amscope, USA).
- Agitador vórtex (DLAB, MX-S, China)
- Balanza analítica (OHAUS, Scout Pro Sp 2001, China)

- Microscopio electrónico convencional (Amscope, USA)
- Centrifuga (BEILE CENTRIFUGA, DT5-6^a, China)
- Tubos Vacutainer (Vacutech, Lot. 01610049, Ecuador)
- Refrigerador (Biobase, China)
- Estereoscopio (Amscope, USA)

4.1.3.3. Materiales de laboratorio

- Pipetas
- Micropipetas
- Puntas de micropipetas
- Tubos de ensayo
- Tubos Eppendorf
- Gradillas para tubos.
- Cajas Petri
- Cajas Bi-Petri
- Mechero de Bunsen
- Calibrador de Vernier
- Hojas de registro
- Vórtex
- Hisopos estériles
- Discos de papel filtro de celulosa.
- Asas de platino para siembra.
- Toallas estériles
- Cinta testigo de esterilidad
- Empaques para autoclave

- Papel de autoclave
- Cinta testigo de autoclave
- Matraz Erlenmeyer
- Vaso de precipitación

4.1.3.4. Reactivos

- Agar Salt Manitol (CM0085, Lot. 3289843)
- Agar Sangre (Difco, Lot. 0237250)
- Agar Mueller Hinton (Difco, Lot. 0294294, USA)
- Peróxido de hidrogeno (Iira, Ecuador)
- Tiras de oxidasa (OxiStrips, Lot. 485435, USA)
- Discos de Antibiótico de Oxacilina 1µg (Oxoid, Lot. 3315569)
- Discos de Antibiótico de Amoxicilina 10µg (Oxoid, Lot. 2942671)
- Discos de Antibiótico de Ampicilina 10µg (Oxoid, Lot. 3428273)
- Disco de Antibiótico Cefoxcitina 30µg (Oxoid, Lot. 3458723)
- Alcohol 70 y 90 vol.
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Caldo MR-vP (Broth) 500g (Difco, Lot. 0286583, USA)
- Plasma sanguíneo

4.1.3.5. Materiales de oficina

- Hojas de papel Bond
- Impresora
- Esferográficos
- Cuaderno de apuntes
- Calculadora

- Calibrador de vernier
- Libreta de apuntes

4.2. Métodos

4.2.1. Factores en estudio

Factor A

- a1: Cepa de *Staphylococcus aureus*.

Factor B

- b0 Disco de inhibición impregnado cloruro de sodio.
- b1 Disco de inhibición de Oxacilina 1 μg
- b2 Disco de inhibición de Amoxicilina 2 μg
- b3 Disco de inhibición de Amoxicilina 10 μg
- b4 Disco de inhibición de Ampicilina 2 μg
- b5 Disco de inhibición de Ampicilina 10 μg

Tabla 6 Distribución de factores en estudio y su interacción (tratamientos)

TRATAMIENTO	CÓDIGO	DESCRIPCIÓN
1	a1b1	Cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> + Disco de inhibición de Oxacilina 1 μg
2	a1b2	Cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> + Disco de inhibición de Amoxicilina 2 μg
3	a1b3	Cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> + Disco de inhibición de Amoxicilina 10 μg
4	a1b4	Cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> + Disco de inhibición de Ampicilina 2 μg
5	a1b5	Cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> + Disco de inhibición de Ampicilina 10 μg
6	a1b0	Cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> + Disco de inhibición impregnados de cloruro de sodio.

Experimental: Robalino & Tacle, (2023).

4.2.2. Tratamientos

Tabla 7 Tratamiento

Tratamientos	Descripción
T1	Cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> + Disco de inhibición de Oxacilina 1µg
T2	Cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> + Disco de inhibición de Amoxicilina 2 µg
T3	Cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> + Disco de inhibición de Amoxicilina 10 µg
T4	Cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> + Disco de inhibición de Ampicilina 2 µg
T5	Cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> + Disco de inhibición de Ampicilina 10 µg
T6	Cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> + Disco de inhibición impregnados de cloruro de sodio.

Experimental: Robalino & Tacle, (2023).

4.2.2.1. Especificaciones del experimento

4.2.2.2. Análisis estadístico y diseño experimental

Para la siguiente investigación se aplicará el siguiente método y diseño experimental:

- Diseño de bloques completamente al azar (DBCA), con arreglo factorial A*B, conforme se establece en el siguiente modelo matemático; $Y_{ij} = \mu + Y_{BLOQUES} + t_i + t_j + \epsilon_{ij}$
- Prueba de Tukey 5%, como comparativa entre las medias de los tratamientos
- Prueba de normalidad, para observar la distribución de los halos de inhibición de las 50 cepas de *Staphylococcus aureus*.
- Chi-cuadrado; para ver el efecto de la susceptibilidad antimicrobiana de los 50 aislados frente a los fármacos en estudio.

Tabla 8 En la siguiente tabla se detallan las características del experimento:

Tratamientos (con 1 testigo)	6
Repeticiones	50
Tamaño de la unidad experimental	100 gr
Aislados totales	50
Número total de análisis	300

Experimental: Robalino & Tacle, (2023).

4.2.2.3. Análisis de varianza ADEVA.

Tabla 9 Análisis de varianza (ADEVA)

Fuentes de variación	Grados de libertad
Total (t*r)-1	299
Tratamientos (Tto – 1)	5
Bloques (Repeticiones - 1)	49
Error Experimental (Gl total- Gl tto)	294

Experimental: Robalino & Tacle, (2023).

4.2.3. Métodos de evaluación y datos a tomarse

4.2.3.1. Variables de aislamiento

- **Pruebas Bioquímicas:** es una variable de tipo independiente, donde se consideró la expresión de una ruta metabólica de una bacteria en cuestión, en este caso para el *Staphylococcus aureus*; Tinción de Gram (+), Catalasa, patrón de Hemólisis, crecimiento en medio salino y fermentación del Manitol, Oxidasa y Coagulasa (Aguilar & Álvarez, 2019).

4.2.3.2. Variables de antibiograma

- **Sensibilidad:** Es la incapacidad de un agente patógeno de no poder resistir al mecanismo de acción de un fármaco en cuestión a una concentración determinada. Es de tipo independiente y se mide en base los halos de inhibición, mediante los puntos de corte establecido por el CLSI y EUCAST.

- **Resistencia:** Es una herramienta facultativa que tienen ciertos patógenos de soportar el mecanismo de acción farmacológica de un fármaco para así evitar que este pueda inhibir su crecimiento o multiplicación o a su vez eliminarlo y se mide en base los halos de inhibición, mediante los puntos de corte establecido por el CLSI y EUCAST.
- **Concentración del fármaco:** Es la cantidad requerida del fármaco en estudio, impregnada en un disco de papel filtro de celulosa. Es de tipo dependiente y esta dependerá del tipo de disco de antimicrobiano que vaya a ser utilizado o a su vez las concentraciones mínimas requeridas para inhibir el crecimiento de una cepa bacteriana.

4.2.3.3. Variable de prevalencia

Para estimar la ocurrencia de que existió de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina previamente obtenido datos de resistencia y susceptibilidad se determina mediante el cálculo de la tasa de prevalencia (TP). Mediante el siguiente modelo de ecuación donde se determinará el resultado en porcentaje (Cuenca *et al.*, 2021).

$$TP = \frac{\text{Total de casos en una población y en un momento dado}}{\text{Total de la población en ese lugar y momento dado}} \times 100$$

Elaborado por: Robalino & Tacle, (2023).

4.2.4. Procedimiento

4.2.4.1. Obtención de las cepas bacterias

La presente investigación se realizó con cepas de *Staphylococcus aureus* previamente aisladas y preservadas en caldo MR-vP más 10% de glicerol de investigaciones posteriores, las cuales fueron reanimadas para su estudio.

Tabla 10. *Staphylococcus aureus* obtenidos de leche positivos a mastitis bovina

Numero de aislados	Lugar de muestreo
25	San Miguel de los bancos / Pichincha.
25	La Candelaria / Chimborazo.

Elaborado por: Robalino & Tacle, (2023).

4.2.4.2. Reanimación del *Staphylococcus aureus*

Se eligieron 50 cepas de *Staphylococcus aureus* procedentes de leche positiva a mastitis bovina, para lo cual se preparó caldo MR-vP siendo un medio nutritivo que le permitió cubrir las necesidades nutricionales a la bacteria para su multiplicación y crecimiento, la reanimación se estableció de la siguiente manera;

- Acondicionamiento; las cepas de *Staphylococcus aureus* que se encontraban en condiciones de congelación por cual se efectuó la bajada de temperatura colocándola a temperatura ambiente por un tiempo de 20 minutos, posteriormente se introdujeron en la incubadora por el lapso de tiempo de 1 hora.
- Preparación del Broth; se pesaron 17 gramos del producto para disolver en un litro de agua en un matraz Erlenmeyer homogenizando el contenido y posteriormente sometiéndolo a esterilizado a 121°C por un periodo mínimo de 15 minutos.
- Dosificación del Broth; una vez listo el caldo MR-vP se repartió una cantidad de 5 mL en tubos de ensayo de tapa rosca.
- Inoculación del Broth; las cepas de *Staphylococcus aureus* encontradas en los crioviales se homogenizo con la ayuda del vórtex, posteriormente con la ayuda de una micropipeta se tomó 100 µL del inóculo o criovial de preservación en el caldo MR-vP, finalmente se vertió en el tubo de ensayo con la finalidad de inocularlo.
- Sellado: se etiquetó el tubo con el código único de la cepa, posteriormente se realizó el sellado con papel film y se introdujo en la incubadora por un tiempo de 24 horas a 37°C.

Una vez obtenido la cepa bacteriana reanimada en el Broth se procedió a la inoculación o siembre en el agar Sal Manitol, en duplicados para la obtención de un cultivo puro y homogéneo se realizó de la siguiente manera;

- Preparación del medio; se suspendió 111 gramos de agar Salt Manitol en un litro de agua destilada, se homogenizó y se esterilizo a 121 °C por 15 minutos.
- Llenado de las cajas Petri; se vertieron 15 – 20 mL de agar en cada caja Petri, se dejó reposar por 30 minutos hasta su solidificación.

- Inoculación; con la ayuda de un hisopo estéril se distribuyó sobre toda la superficie del agar, para la obtención de colonia de *Staphylococcus aureus* jóvenes sobre toda la superficie del medio de cultivo.
- Incubación: se realizó el sellado de la caja Petri con papel Film y se introdujo en la incubadora por 24 horas a 37°C.
- Interpretación; Una vez obtenido un cultivo puro y homogéneo, con características presuntivas de crecimiento de *Staphylococcus aureus* se realizó el análisis antimicrobiano. Como parte diagnóstica y de verificación del presente trabajo se repitió el procedimiento de identificación de la bacteria en estudio, para evitar posibles falso positivos.

4.2.4.3. Identificación de cepas de *Staphylococcus aureus*

La identificación se desarrolló mediante descripción de las características fenotípicas macroscópicamente y microscópicamente, morfología de las colonias, la fermentación del manitol y las rutas metabólicas que posee el *Staphylococcus aureus*, como parte metodológica se estableció las siguientes pruebas;

La morfología de crecimiento del *Staphylococcus aureus* se evidencian como colonias lisas, brillantes y convexas, las cuales poseen un endopigmento (Beta-carotenoide) de color naranja o blanco porcelana e incluso un color dorado en un medio de cultivo en cuestión, es una bacteria Gram-positiva con un tamaño de 0.5 a 1.5 micras, una agrupación en células únicas, pares, tétradas o agrupamientos más grandes con la forma de racimos de uvas (Montero *et al.*, 2018).

La fermentación del manitol: el *Staphylococcus aureus* crece en un medio con alta concentración de sal, tiene la capacidad de fermentar el manitol lo que produce ácidos provocando un cambio en el pH y consecuentemente un viraje en la coloración del medio de cultivo de rosa a amarillo pálido en el lugar en donde se ha establecido una colonia de dicho microorganismo.

Continuamente se procedió con la observación de las características microscópicas de su membrana mediante la tinción de Gram, protocolariamente se inició con;

- Suspensión de una proporción (asada) bacteriana en una gota de agua destilada colocada en un porta objeto.

- Fijación de la gota de agua con la suspensión bacteriana con la ayuda de un mechero de bunsen sometiéndola a calor.
- Colocación de una gota de cristales de violeta por un minuto. Continuando con la retirada del exceso sobrenadante de dicho colorante.
- Posteriormente se aplicó una gota de Lugol por un lapso de un minuto.
- Consecuentemente se realizó el lavado del porta objeto con agua destilada después del periodo de tiempo transcurrido.
- Continuando con la aplicación de unas gotas de alcohol cetona por un tiempo de 30 segundos y un lavado con agua destilada para evitar artefactos debido al exceso de colorante (fallas en la visualización).
- Siguiendo con la aplicación de una gota de safranina por un tiempo de 3 minutos.
- Finalizando con el lavado del portaobjetos con agua destilada, secado y colocación de una gota de aceite de inmersión para su respectiva visualización en el microscopio con el objetivo 100 X.

Prueba de Catalasa: la enzima catalasa descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno (Tomazi *et al.*, 2020), dicho procedimiento se realizó de la siguiente manera;

- Se colocó una asada bacteriana en un porta objeto.
- Posteriormente se colocó una gota de peróxido de hidrogeno al 3 % sobre un portaobjetos.
- finalizando con la interpretación de resultados visualizando el desprendimiento de burbujas lo que se considera como positivos (+), sin ningún cambio es negativo (-).

La prueba de Coagulasa: El *Staphylococcus aureus* posee dos tipos de coagulasa una que es endocoagulasa o coagulasa ligada (*Clumping factor*) que está unida a la pared celular que actúa sobre el fibrinógeno provocando la formación de un coagulo o grumos en el plasma sanguíneo. También tiene una exocoagulasa o coagulasa libre que actúa mediante la activación de un complejo CRF que producirá un

coagulo de fibrina (Garcia *et al.*, 2019). Dicha prueba se realizó de la siguiente forma;

- Inicialmente se obtuvo 10 mL de sangre en tubos Vacutainer con EDTA (Tapa lila).
- Se realizó la separación del paquete celular, placa leucocitaria y plasma mediante centrifugación a 3000 rpm por un lapso de 5 minutos.
- Continuamente se colocó 1 mL de plasma en tubos eppendorf.
- Consecuentemente se inoculo con la toma de una proporción de una colonia o asada de bacterias y se inocularon en el plasma, posteriormente se introdujo en la incubadora por un tiempo de 4 a 6 horas, para la observación del coagulo.

Prueba de oxidasa; es una prueba colorimétrica que permite determinar la presencia de la enzima oxidasa, la cual reacciona en presencia del citocromooxidasa presente en las tiras reactivas y se realizó de la siguiente manera;

- Se tomó una colonia bacteria con la ayuda de un asa de siembra estéril.
- Se colocó en la tira reactiva para la observación de la reacción; es considera como positiva cuando en la tira reactiva se observa una coloración azul o purpura.

Tabla 11. Perfiles de identificación utilizados en la presente investigación

Criterio	Positiva (+)	Negativa (-)
Catalasa	+	
Oxidasa		-
Fermentación del manitol	+	
Crecimiento en medio salino	+	
Coagulasa	+	
Patrón de Hemolisis	Beta hemolisis.	
Tinción de Gram	Cocos Gram-positivos en forma de racimos de uvas	
Morfología	Endopigmento “ <i>Staphylococcus aureus</i> ” Dorado	

Elaborado por: Robalino & Tacle, (2023).

4.2.5. Actividad antimicrobiana

El antibiograma (método de difusión en disco) determina la susceptibilidad de un microorganismo frente a un fármaco a partir de la exposición de una concentración estandarizada (Dueñas *et al.*, 2021). Para dicho procedimiento se realizó de la siguiente manera;

- Se disolvió 37 gramos de agar Müeller-Hinton en 1000 mL de agua destilada, para homogenizar los dos reactivos se mandó a ebullición en el microondas, posteriormente se esterilizó a 121 °C por 15 minutos.
- Trascurrido este periodo de tiempo se procedió a colocar de 15 a 20 ml en las cajas Petri previamente esterilizadas.
- Se dejó reposar por un tiempo de 20 minutos hasta su solidificación en las cajas Petri.
- Se tomó un asa bacteriana de un cultivo previamente incubado por 24 horas a 37 °C, el cual fue suspendido en 5 mL de agua destilada estéril que contenía un tubo de tapa rosca para ser ajustada la escala McFarland 0.5.
- Con la ayuda de un hisopo estéril se suspendió la muestra por toda la superficie del agar.
- Finalmente se procedió con la colocación de los discos de papel filtro de celulosa impregnado de los antibióticos en estudio, posteriormente se selló la caja Petri y se incubó por 24 horas a 37°C, el cual se tomó la media del halo de inhibición con la ayuda del calibrador de vernier, donde de dicha media se restaron los 6 mm contemplados del disco y se registró el valor en la hoja de seguimiento.

Dentro del proceso metodológico se estableció media la susceptibilidad antimicrobiana de la Ampicilina y Amoxicilina a la concentración de 2µg según las recomendaciones del EUCAST, (2022) para organismos tipo silvestre, para el cumplimiento se realizó las diluciones de los antibióticos comerciales de la siguiente manera;

- Con la ayuda de la siguiente fórmula se estimó matemáticamente la cantidad requerida de los antibióticos en estudio;

$$V1 = \frac{C2 * V2}{C1}$$

Donde:

C1: Es la concentración molar total de la disolución.

C2: Es la concentración del fármaco requerida para el estudio.

V2: Es el volumen del fármaco requerido para realizar la dilución.

V1: Es el volumen final del fármaco con el que espera tener determinada concentración.

- La cápsula fue diluida en 50 mL de solución salina, posteriormente se realizó un baño de maría por 40 minutos y consiguiente la homogenización con la ayuda del vortex hasta obtener una solución sin gránulos.
- Para ello se rotulo tubos eppendorff para seguir realizando las diluciones seriadas hasta la obtención de 2 µg del antibiótico en estudio.
- Se introdujeron los discos de papel filtro en blanco por un tiempo de 10 minutos.
- Finalmente fueron sembrados en la superficie del agar inoculado. De igual manera se incubaron a 37°C por 24 horas para su posterior medición del diámetro del halo de inhibición.

4.2.5.1. Estimación de la prevalencia de cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SAMR)

Para la estimación de la ocurrencia de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina previamente obtenido los datos de resistencia y susceptibilidad se determinó mediante el cálculo de la tasa de prevalencia (TP). Indiscutiblemente esta indica el número de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina que existe en el número de aislados totales en cuestión (Cuenca *et al.*, 2021).

$$TP = \frac{\text{Total de casos en una población y en un momento dado}}{\text{Total de la población en ese lugar y momento dado}} \times 100$$

Elaborado por: Robalino & Tacle, (2023).

- **Análisis de los datos:** Los resultados de los halos de inhibición obtenidos fueron analizados mediante el paquete estadísticos SAS 9.4 y SPSS versión 25.

CAPÍTULO V

V. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1. Cultivo y reconfirmación bacteriana

Los *Staphylococcus aureus* fueron tomados del cepario del laboratorio general de la facultad de ciencias agropecuarias y recursos naturales perteneciente a la Universidad Estatal de Bolívar dichas aislamientos fueron reanimadas para su cultivo en Agar Salt Manitol, los agentes fueron aislados de dos provincias del Ecuador en distintas proporciones de dos diferentes investigaciones previas como se detalla en la tabla 12.

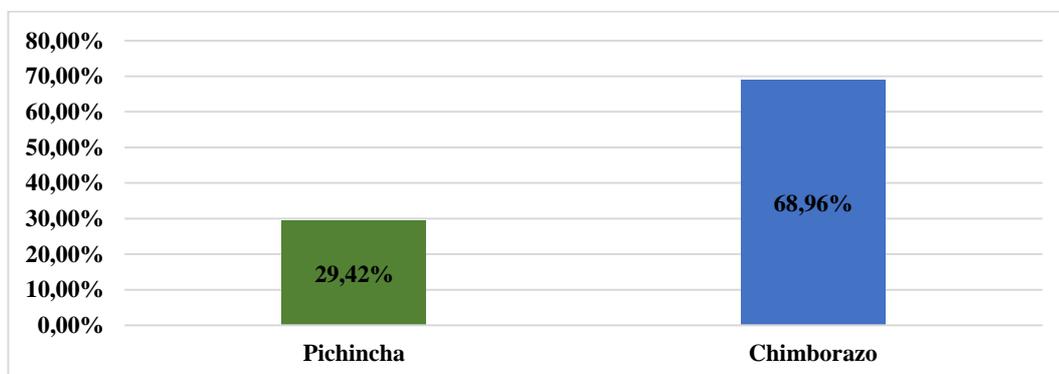
Tabla 12. Resultado del aislamiento e identificación

Prevalencia	<i>Staphylococcus aureus</i>
Pichincha, Mazón & Mazón (2022)	29.42%
Chimborazo, Chávez (2022)	68.96%

Elaborado por: Robalino & Tacle, (2023)

Metodológicamente de manera práctica se realizó la identificación bacteriana mediante el uso de pruebas como; Fermentación del manitol, crecimiento en medio salino, reacción de catalasa (+), reacción de oxidasa (-), coagulación del plasma sanguíneo en tubo y tinción de Gram (coco Gram-positivo forma de racimos de uvas), obteniéndose que el 100 % de los aislados se reconfirmaron como *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo.

Figura 3. Prevalencia del *Staphylococcus aures* causante de mastitis



Elaborado por: Robalino & Tacle, (2023)

Análisis: El *Staphylococcus aureus* causante de mastitis es uno de los géneros bacterianos de mayor prevalencia en los cuadros mastíticos en una explotación lechera considerándose responsable de la mayoría de cuadros patognomónicos de la patología mencionada. Para el desarrollo de la presente investigación se utilizó cepas aisladas en la investigación de Mazón & Mazón (2022), quienes aislaron a la bacteria mencionada en una proporción de 29.42% del número total de agentes bacterianos aislados que se encontraban causando cuadros mastíticos en vacas de la zona subtropical de San Miguel de los Bancos perteneciente a la provincia de Pichincha, así mismo Chávez (2022), quien aisló e identificó al *Staphylococcus aureus* en una proporción de 68.96% en el cantón Penipe perteneciente a la provincia de Chimborazo, haciendo mención a las publicaciones citadas ya que fueron los responsables de la obtención de las cepas.

Discusión: Según Falla *et al.* (2020), en su investigación de la prevalencia del *Staphylococcus aureus* causante de mastitis bovina obtuvo que de 150 vacas muestreadas se obtuvieron 129 aislamientos con una prevalencia del 80%, difiriendo de lo encontrado de las investigaciones mencionadas de donde se obtuvieron las cepas los cuales encontraron a la bacteria mencionada en menor proporción como causante de mastitis bovina.

5.2. Análisis de varianza de la concentración de 2µg de Ampicilina y Amoxicilina frente a *Staphylococcus aureus*

Análisis de varianza del diseño de bloque completamente al azar (DBCA) de las concentraciones de 2 µg de ampicilina y amoxicilina, 1 µg de oxacilina (testigo positivo) y discos impregnados de cloruro de sodio 0,9% (testigo negativo).

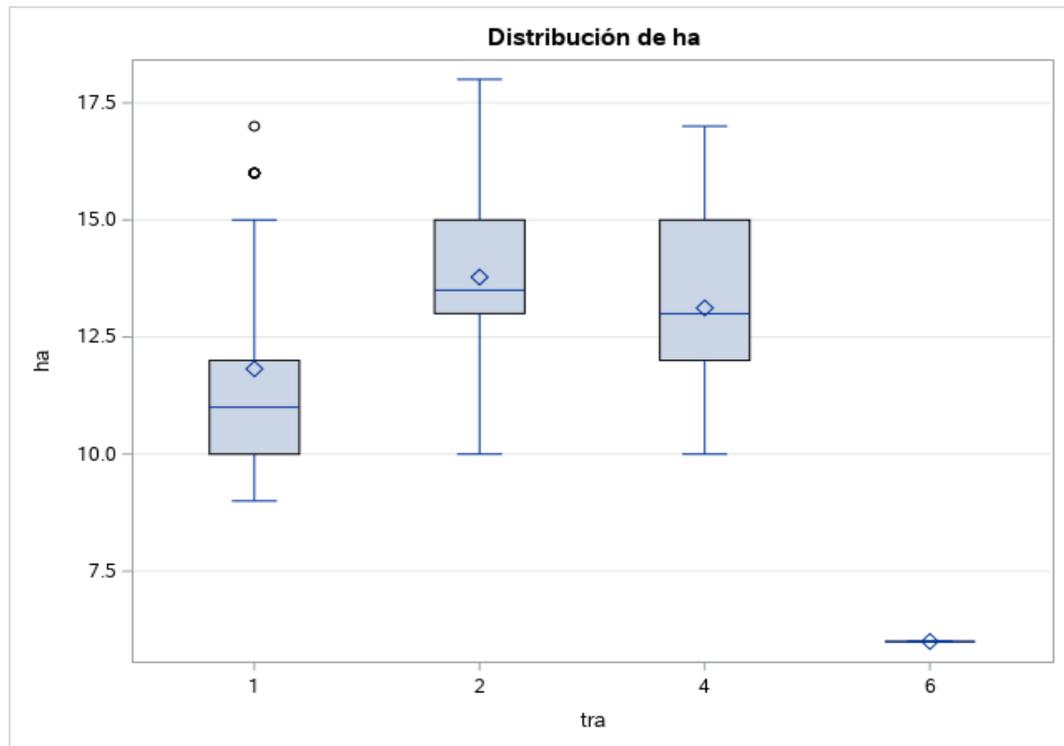
Tabla 13. Análisis de varianza (DBCA) de los tratamientos propuestos

Fuente de V.	G. L	S. C.	C. M.	F. V	Pr. F.
Tratamientos	3	1888.280	629.426	393.36	<.0001**
Repeticiones	49	326.020	6.653	4.16	<.0001**
Error	147	235.220	1.600	CV: 11.31%	
Total	199	2449.520			

** : Diferencias estadísticas altamente significativa, CV: coeficiente de variación.

Análisis: De acuerdo con el análisis de varianza de la tabla 13 la prueba de Fisher nos indica que por parte de los tratamientos y repeticiones existió diferencias estadísticas altamente significativas, es decir que tanto los tratamientos como las repeticiones tiene un comportamiento distinto, con un coeficiente de variación de 11.31% expresándonos veracidad y aceptabilidad en los datos obtenidos.

Figura 4. Diagrama de caja y bigotes de la distribución de los halos de inhibición de los tratamientos propuestos



Tra: tratamientos, ha: halo de inhibición.

5.2.1. Prueba de Tukey al 5% de las concentraciones de 2µg de amoxicilina y ampicilina frente a *Staphylococcus aureus*

Tabla 14. Promedios obtenidos de los tratamientos analizados

Tratamientos	Media	N	Tukey Agrupamiento
2 (Amo 2µg)	13.78	50	A
4 (Amp 2µg)	13.12	50	B
1 (OX 1µg)	11.82	50	C
6 (Testigo)	6.00	50	D

Amo: amoxicilina, Amp: ampicilina, Ox: oxacilina.

Análisis: Mediante la comparación de medias determinada por la prueba de Tukey al 5% se observó que el T2 (2µg de amoxicilina) fue el que obtuvo el mayor promedio en la medida de la zona de inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* con 13.78 mm de diámetro, destacándose sobre el T4 (2µg de ampicilina) el cual exhibió una media en la medida de la zona de inhibición de 13.12 mm, de manera estadística se observa que son diferentes según la agrupación de esta prueba comparativa, siguiéndole el T1 (1µg de oxacilina) quien presentó una media de halo de inhibición de 11.82 mm siendo este el tratamiento testigo positivo, el cual se destaca del testigo negativo (Disco impregnado con ClNa 0,9%) ya que no se observó inhibición en el crecimiento de la bacteria mencionada por parte de este tratamiento, infiriendo de tal modo que los promedios de los tratamientos son estadísticamente diferentes.

Discusión: Damasceno, (2020) en su investigación aisló 79 cepas de *Staphylococcus aureus* siendo estas el 36.9% de los aislados totales, en dicha investigación evidenció que el 63,3% (n=50) fueron sensibles y el 36.7% (n=29) se presentaron como resistentes a la oxacilina de 1µg, mientras que a amoxicilina de 10µg obtuvo un 65.8% (n=52) de sensibilidad y un 34.2% (n=27) de resistencia. Así mismo Calderón *et al.* (2011) en su investigación de prevalencia de mastitis bovina donde analizó la susceptibilidad antimicrobiana mediante el método de difusión de disco (Kirby-Bauer) logró aislar 289 (87.84%) cepas de *Staphylococcus aureus*, evidenciando que el 100% fueron sensibles a oxacilina de 1µg y ampicilina de 2µg.

Difiriendo de las publicaciones antes mencionadas, ya que según las recomendaciones del EUCAST, (2022) para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de ampicilina y amoxicilina a 2 µg son consideradas como sensibles los aislados que en el antibiograma presenten halos ≥ 15 mm, por lo tanto, se discrepa de lo hallado en la presente investigación ya que las 50 cepas de *Staphylococcus aureus* presentaron halos de inhibición con una medida promedio de 13.78 mm y 13.12 mm en amoxicilina y ampicilina respectivamente, sin embargo la distribución de los datos nos permite apreciar que hubieron aislados con una medida de halo mayores a los establecido por el ente regulador antes mencionado interpretando de tal modo la existencia de bacterias sensibles, con halos con medidas superiores a los promedios establecidos.

5.3. Análisis de varianza de la concentración de 10µg de amoxicilina y ampicilina frente a *Staphylococcus aureus*.

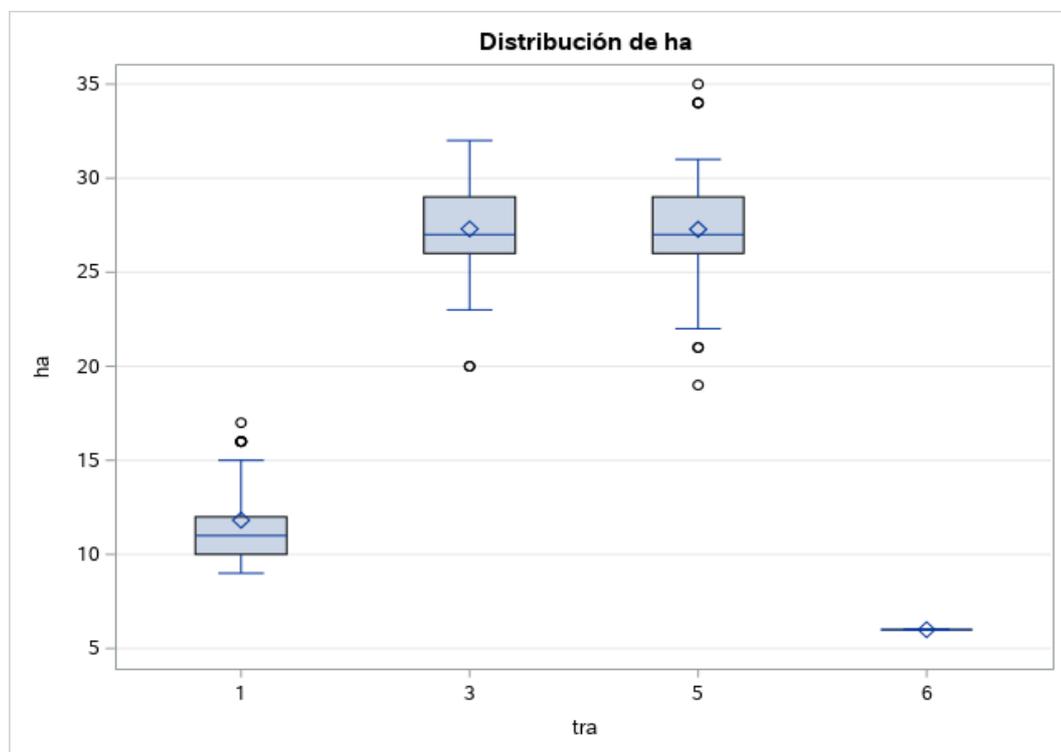
Tabla 15. Análisis de varianza de los tratamientos propuestos.

Fuente de V.	G. L	S. C.	C. M.	F. V	Pr. F.
Tratamientos	3	17738.040	5912.68	1599.32	<.0001**
Repeticiones	49	576.500	11.765	3.18	<.0001**
Error	147	543.460	3.697	CV: 10.62%	
Total	199	18858.00			

** : Diferencias estadísticas altamente significativa, CV: coeficiente de variación.

Análisis: De acuerdo con el análisis de varianza de la tabla 15, la prueba de Fisher nos indica que por parte de los tratamientos y repeticiones existió diferencias estadísticas altamente significativas, es decir que tanto los tratamientos como las repeticiones tiene un comportamiento distinto, con un coeficiente de variación de 10.62% expresándonos veracidad y aceptabilidad en los datos obtenidos.

Figura 5. Diagrama de caja y bigotes de la distribución de los halos de inhibición de los tratamientos propuestos.



Tra: tratamientos, ha: halo de inhibición.

5.3.1. Prueba de Tukey al 5% de las concentraciones de 10µg de amoxicilina y ampicilina frente a *Staphylococcus aureus*

Tabla 16. Promedios obtenidos de los tratamientos analizados.

Tratamientos	Media	N	Tukey Agrupamiento
3 (Amo 10µg)	27.30	50	A
5 (Amp 10µg)	27.28	50	A
1 (OX 1µg)	11.82	50	B
6 (Testigo)	6.00	50	C

Amo: amoxicilina, Amp: ampicilina, Ox: oxacilina.

Análisis: Mediante la comparación de medias determinada por la prueba de Tukey al 5% se observó que el T3 (10µg de amoxicilina) y el T5 (10µg de ampicilina) no expresaron diferencias estadísticas significativas, los cuales exhibieron una media de 27.30 mm y 27.28 mm en diámetro del halo de inhibición respectivamente, siguiéndole el T1 (1µg de oxacilina) quien presentó una media de halo de inhibición de 11.82 mm siendo este el tratamiento testigo positivo, el cual se destaca del testigo negativo (disco impregnado con ClNa 0,9%) ya que no se observó inhibición en el crecimiento de la bacteria mencionada por parte de este tratamiento.

Discusión: Khan *et al.* en su investigación de susceptibilidad antimicrobiana del *Staphylococcus aureus* productores de betalactamasa aislado de leche positiva a mastitis bovina reportó que el 53.3% (n=8/15) de los aislados presentaron resistencia fenotípica a la ampicilina 10µg con halos ≤ 28 mm según lo recomendado por CLSI, (2020). Así mismo Mesquita *et al.* (2022) obtuvo una media de 18.53 mm del diámetro del halo de inhibición por parte de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) frente a amoxicilina de 10 µg. Discrepando de las investigaciones citadas ya que el valor de la medida de los halos de inhibición se encuentra sujeta a variabilidad ya que está en dependencia a las condiciones de manejo de los antimicrobianos usados en la mastitis bovina, los factores etiológicos que predispongan a la colonización intramamaria y la trasmisión cruzada de patógenos nosocomiales de los humanos hacia los animales, como es el caso de SAMR.

5.4. Análisis de la actividad antimicrobiana de los tratamientos propuestos.

El análisis de la actividad antimicrobianas de cada uno de los fármacos en estudio se analizó la susceptibilidad obtenida de cada uno de los tratamientos propuestos.

5.4.1. Análisis de la actividad antimicrobiana de ampicilina frente a *Staphylococcus aureus* causante de mastitis bovina.

Las 50 cepas de *Staphylococcus aureus* se sometieron a la actividad antimicrobiana mediante la técnica de difusión de disco en placa (Kirby Bauer) frente a las concentraciones de 2 µg y 10 µg de ampicilina, los resultados obtenidos del diámetro del halo de inhibición se realizó pruebas de normalidad que se detallan en la siguiente tabla.

Tabla 17. Pruebas de normalidad del halo de inhibición obtenidas de las concentraciones de 2µg y 10 µg de ampicilina frente a *Staphylococcus aureus* causante de mastitis bovina.

Pruebas de normalidad							
Concent.	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk			
Amp	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.	*
2µg	.149	50	.007	.944	50	.020	NS
10 µg	.128	50	.040	.960	50	.093	NS

Concent Amp: concentración de ampicilina, gl: grados de libertad / a: Corrección de significación de Lilliefors / NS: efecto no significativo.

Análisis: De acuerdo con la prueba de normalidad de las concentraciones de 2µg y 10µg de ampicilina sobre 50 (grados de libertad) cepas de *Staphylococcus aureus* el test de Shapiro-Wilk nos expresa que los halos de inhibición tienen una distribución normal, observando un efecto no significativo entre las repeticiones.

5.4.1.1. Susceptibilidad antimicrobiana de ampicilina frente a *Staphylococcus aureus* causante de mastitis bovina.

La interpretación se realizó mediante las recomendaciones del comité Europeo de Pruebas de susceptibilidad (EUCAST, 2022) y el Clinical Laboratory Estándar Institute (CLSI, 2020), según los puntos de corte para *Staphylococcus aureus*.

Tabla 18. Interpretación y puntos de corte de la zona de inhibición (mm) de las penicilinas frente a *Staphylococcus aureus* causante de mastitis bovina.

Guía	Diámetro del halo de inhibición (mm)		
	R	I	S
CLSI (10µg)	28	-	29
EUCAST (2µg)	13	14	15

R: resistente, I: intermedio, S: sensible.

Análisis: Según el CLSI, (2020) considera como sensibles halos de inhibición ≥ 29 mm y resistente halos de inhibición ≤ 28 mm estipulado en el documento VET01S como referencia dichos puntos de corte para todas la penicilinas frente a *Staphylococcus aureus*, así mismo el EUCAST, (2022) recomienda para estudios in vitro la aplicación de 2 µg de ampicilinas mediante el método difusión en disco donde es considerado como resistente halos de inhibición de ≤ 13 mm y sensible halos de inhibición ≥ 15 mm.

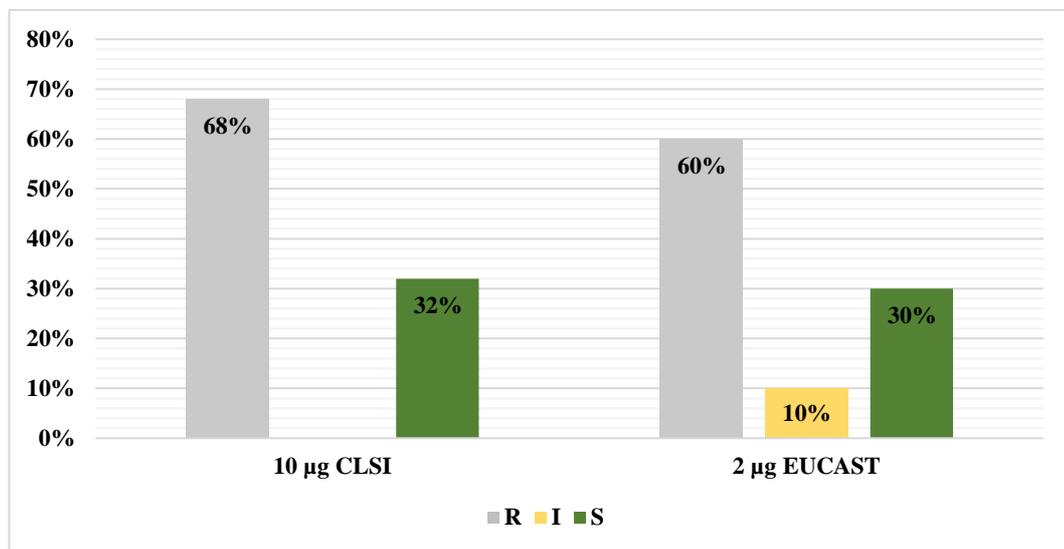
Tabla 19. Susceptibilidad antimicrobiana de la ampicilina frente a *Staphylococcus aureus* causante de mastitis bovina.

Concentración	Resistente		Intermedio		Sensible	
	Fr.	%	Fr.	%	Fr	%
10 µg	34	68	-		16	32
2 µg	30	60	5	10	15	30

Fr: frecuencia, %: porcentaje.

Análisis: La susceptibilidad antimicrobiana del *Staphylococcus aureus* en la interacción con la ampicilina a una concentración de 10 µg manifestó que tan solo el 32% de las cepas aisladas (n= 16) fueron sensibles, sin embargo, el 68% restante (n=34) se manifestaron como resistentes según las recomendaciones establecidas por el CLSI (2020), así mismo al analizar la interacción del agente bacteriano en estudio a una concentración de 2µ de ampicilina se pudo evidenciar que del total de aislamientos analizados el 30% (n=15) fueron resistentes en dicho estudio, sin embargo el 60% (n=30) se manifestaron como resistentes a dicha concentración, adicionalmente se observó que el 10% (n=5) presentaron resistencia intermedia.

Figura 6. Susceptibilidad antimicrobiana de la ampicilina frente a *Staphylococcus aureus* causante de mastitis bovina.



R: resistente, I: intermedio, S: sensible

Discusión: Jiménez *et al.* (2020) en su investigación de perfiles de resistencias por parte del *Staphylococcus aureus* frente a ampicilina a 10µg obtuvo un 81.5% de sensibilidad y un 18.5% de resistencia, Sánchez *et al.* (2018) de un total de 53 aislados el 60.3% (n=32) presentaron resistencia a la ampicilina de 10 µg, siendo esta interacción una de las que presentaron mayores índices de resistencia, Guzmán *et al.* (2021) de 32 aislados observó que presentaron resistencia a la ampicilina de 10µg un 86.6%, observando que al analizar molecularmente dichos aislados el 100% presentaron el gen *blaZ* y un 36.6% resultado positivo para el gen *mecA*, dicho hallazgo se encuentra fuertemente ligado a la presentación fenotípica y genotípica de resistencia a las penicilinas y betalactámicos por parte de la bacteria en estudio, ya que le confiere la capacidad de generar Betalactamasas que inhiben el mecanismo de acción de los fármacos betalactámicos.

Coincidiendo con lo antes mencionado ya que en la presente investigación se pudo observar que fenotípicamente los aislados se observaron en mayor medida como resistentes en una proporción del 68%, sin embargo, la presentación de resistencias es variable de una investigación a otra presumiblemente debido a las condiciones de exposición a los antibióticos por parte de la bacteria y a la generación de mecanismos de resistencia originados por adaptabilidad genética.

5.4.2. Análisis de la actividad antimicrobiana de amoxicilina frente a *Staphylococcus aureus* causante de mastitis bovina

Se analizó la distribución de los halos de inhibición obtenida del antibiograma de amoxicilina a las concentraciones de 2µg y 10µg frente a las 50 cepas de *Staphylococcus aureus* causante de mastitis bovina.

Tabla 20. Prueba de normalidad de los halos de inhibición del *Staphylococcus aureus* frente a amoxicilina.

Pruebas de normalidad							*
Amo.	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk			
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.	
2 µg	.169	50	.001	.958	50	.070	NS
10 µg	.136	50	.022	.954	50	.049	NS

NS: efecto no significativo, Amo: Amoxicilina, gl: grados de libertad

Análisis: De acuerdo con la prueba de normalidad de las concentraciones de 2µg y 10µg de amoxicilina frente a 50 (grados de libertad) cepas de *Staphylococcus aureus* causante de mastitis bovina, el test de Shapiro-Wilk nos expresa que los halos de inhibición tienen una distribución normal, observando un efecto no significativo ($p > 0,05$) por parte de las repeticiones en estudio.

5.4.2.1. Susceptibilidad antimicrobiana de amoxicilina frente a *Staphylococcus aureus* causante de mastitis bovina

Los resultados obtenidos son comparados con los puntos de corte establecidos;

Tabla 21. Interpretación y puntos de corte de la zona de inhibición (mm) de las penicilinas frente a *Staphylococcus aureus* causante de mastitis bovina.

Guía	Diámetro del halo de inhibición (mm)		
	R	I	S
CLSI (10µg)	28	-	29
EUCAST (2µg)	13	14	15

R: resistente, I: intermedio, S: sensible

Análisis: Según el CLSI, (2020) considera como sensibles halos de inhibición ≥ 29 mm y resistente halos de inhibición ≤ 28 mm estipulado en el documento VET01S como referencia dichos puntos de corte para todas la penicilinas frente a *Staphylococcus aureus*, así mismo el EUCAST, (2022) recomienda para estudios in vitro la aplicación de 2 μ g de amoxicilina mediante el método difusión en disco donde es considerado como resistente halos de inhibición de ≤ 13 mm y sensible halos de inhibición ≥ 15 mm.

Tabla 22. Susceptibilidad antimicrobiana de la amoxicilina frente a *Staphylococcus aureus* causante de mastitis bovina.

Concentración	Resistente		Intermedio		Sensible	
	Fr.	%	Fr.	%	Fr	%
10 μ g	30	60	-		20	40
2 μ g	25	50	9	18	16	32

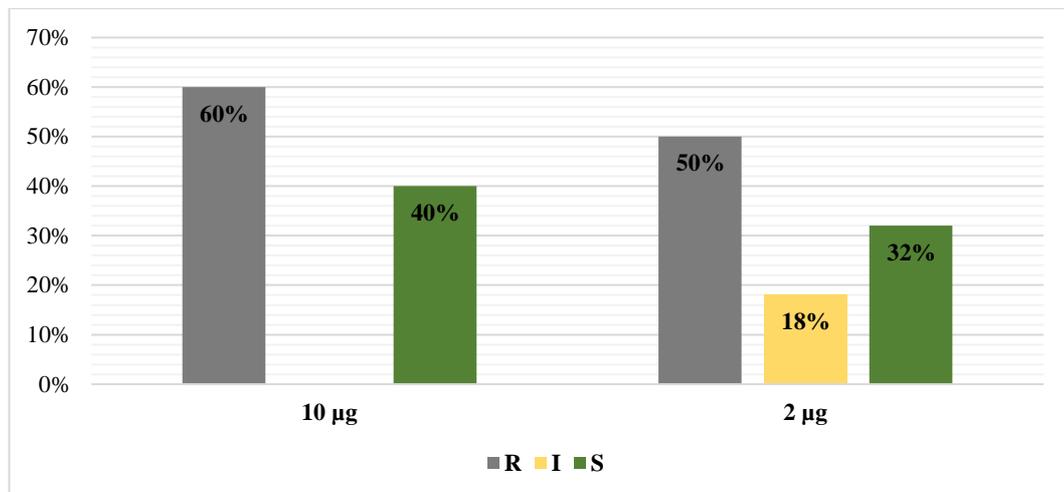
Fr: frecuencia, %: porcentaje.

Análisis: La susceptibilidad antimicrobiana del *Staphylococcus aureus* en la interacción con la amoxicilina una concentración de 10 μ g manifestó que tan solo el 40% de las cepas aisladas (n= 20) fueron sensibles, sin embargo, el 60% restante (n=30) se manifestaron como resistentes según las recomendaciones establecidas por el CLSI (2020).

Al analizar la interacción del agente bacteriano en estudio con amoxicilina a una concentración de 2 μ se pudo evidenciar que del total de aislamientos analizados el 32% (n=16) fueron resistentes en dicho estudio, sin embargo el 50% (n=25) se manifestaron como resistentes a dicha concentración, adicionalmente se observó que el 18% (n=9) de los aislados presentaron resistencia intermedia, estos criterios interpretativos fueron referenciados a lo estipulado por las guías establecidas.

Plumb (2017), cita que la amoxicilina en los rumiantes se puede lograr concentraciones séricas más elevadas que la ampicilina, generalmente debido a que se absorbe mejor, este tipo de betalactámico se une a la carboxipeptidasa transpeptidasas y endopeptidasas, las cuales están involucradas en la síntesis de la pared bacteriana, actuando mejor en fases activas de crecimiento bacteriano.

Figura 7. Susceptibilidad antimicrobiana de la amoxicilina frente a *Staphylococcus aureus* causante de mastitis bovina.



R: resistente, I: intermedio, S: sensible

Discusión: Turutoglu *et al.* (2006) en su investigación de la resistencia a los antibióticos por parte de *Staphylococcus aureus* causante de mastitis bovina, aisló un total de 103 cepas de dicha bacteria, donde observó que la amoxicilina a 10µg mostró un 54,4% (n=56) de sensibilidad y un 45,6% (n=47) de resistencia, difiriendo de lo antes citado ya que en la presente investigación a dicha concentración tan solo el 40% de los aislados se manifestaron como sensibles, siendo menor a lo encontrado en la investigación citada.

5.4.3. Análisis de la actividad antimicrobiana de oxacilina frente a *Staphylococcus aureus* causante de mastitis bovina.

Se analizó la distribución de los halos de inhibición obtenidos del antibiograma de oxacilina a la concentración de 1µg frente a las 50 cepas de *Staphylococcus aureus* causante de mastitis bovina.

Tabla 23. Prueba de normalidad de los resultados obtenidos del antibiograma de oxacilina a 1 µg frente a *Staphylococcus aureus* causante de mastitis bovina.

Pruebas de normalidad							
T1: OX1	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk			*
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.	
	.228	50	.000	.855	50	.000	**

a: Corrección de significación de Lilliefors / OX1: oxacilina 1µg / **: efecto altamente significativo.

Análisis: De acuerdo con la prueba de normalidad del test de Shapiro-Wilk sobre 50 cepas de *Staphylococcus aureus* (grados de libertad) frente a oxacilina de 1µg nos expresa que la distribución de las medidas de los halos de inhibición es heterogénea, donde se observó un efecto altamente significativo ($p < 0,05$), es decir que las unidades experimentales no se comportaron similarmente ante el efecto inhibitorio del fármaco en estudio.

5.4.3.1. Susceptibilidad antimicrobiana de oxacilina frente a *Staphylococcus aureus* causante de mastitis bovina.

Los resultados obtenidos del diámetro del halo de inhibición fueron comparados con los puntos de corte utilizados en la investigación de Torres & Cercenado, (2010) para *Staphylococcus aureus* causante de mastitis bovina.

Tabla 24. Punto de corte del *Staphylococcus aureus* frente a oxacilina.

Organismos	Diámetro del halo de inhibición (mm)		
	Sensible	Intermedia	Resistencia
<i>S. aureus</i>	13	11-12	10

Fuente: Torres & Cercenado, (2010).

Análisis: Para el análisis de la susceptibilidad antimicrobiana de la oxacilina a la concentración de 1µg frente a *Staphylococcus aureus* se establece como resistente cuando existe evidencia de halos de inhibición ≤ 10 mm, resistencia intermedia con evidencia de medidas de halos comprendidos entre 11 – 12 mm, y finalmente son considerado como sensibles cuando los halos de inhibición expresan medidas ≥ 13 mm.

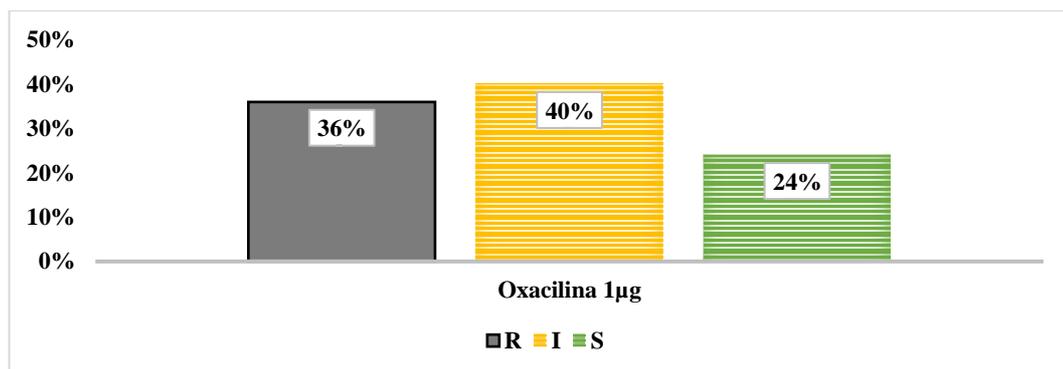
Tabla 25. Susceptibilidad antimicrobiana de la oxacilina frente a *Staphylococcus aureus* causante de mastitis bovina

Concentración	Resistente		Intermedio		Sensible	
	Fr.	%	Fr.	%	Fr	%
1 µg	18	36	20	40	12	24

Fr: frecuencia, %: porcentaje.

Análisis: En la tabla 25 se observa la susceptibilidad del *Staphylococcus aureus* a la oxacilina de 1 µg, en donde el 36% (n=18) de los aislados presentaron resistencia, así mismo el 40% (n=20) de los aislamientos en estudio expresaron resistencia intermedia y el restante 24% (n=12) de los aislados se exhibieron como sensibles a dicho fármaco.

Figura 8. Porcentaje de susceptibilidad de la oxacilina frente a *Staphylococcus aureus* causante de mastitis bovina.



R: resistente, I: intermedio, S: sensible

Discusión: Gómez *et al.* (2016), menciona que la aparición de *Staphylococcus aureus* resistente a la oxacilina se dio en 1960, sin embargo, la resistencia es conferida por una proteína ligadora de penicilina (PBP2a) las cuales pueden ser modificadas, básicamente es reconocido como un agente nosocomial presente en los humanos y encontrado principalmente en condiciones hospitalarias, así también Hryniewicz & Garbaz (2017), mencionan que dentro de la resistencia a la oxacilina puede expresarse una resistencia fenotípica homogénea o heterogénea la cual puede ser expresada por toda la población bacteriana o por una parte, siendo estos considerados como *Staphylococcus aureus* Bordeline (BROSA).

Mediante la revisión bibliográfica antes citada ponemos en manifiesto que en la presente investigación se observó patrones de heteroresistencia por parte de la bacteria en estudio, la cual fue comparada con el manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (Stephen, 2005) para corroborar este tipo de resistencia, además de observarse perfiles de multi-resistencia, ya que el *Staphylococcus aureus* estudiado se presentó como resistente a la oxacilina y otros betalactámicos, asumiendo de tal modo que los aislamientos se caracterizaron fenotípicamente como *S. aureus* Meticilino resistente (SAMR).

5.5. Prevalencia del *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (SAMR).

Para la detección del *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes (SAMR) se consideró la susceptibilidad a los beta-lactámicos según las recomendaciones impartidas por el CLSI, (2020) utilizándose el método de difusión de disco en placa con discos de oxacilina de 1µg y cefoxitin de 30 µg, de igual forma se analizó la distribución de los halos de inhibición de las 50 cepas en estudio frente a los fármacos antes mencionados.

Tabla 26. Pruebas de normalidad para la detección del *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (SAMR) causante de mastitis bovina.

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk			*
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.	
Oxa1	.228	50	.000	.855	50	.000	**
Cefox30	.167	50	.001	.965	50	.139	NS

a: Corrección de significación de Lilliefors

Análisis: De acuerdo con las pruebas de normalidad mediante el test de Shapiro-Wilk se evidenció que la distribución de las medidas de los halos inhibición del antibiograma con la utilización de oxacilina de 1µg es heterogénea, es decir que las 50 cepas en estudio se comportaron diferentemente frente al efecto inhibitorio de los fármacos utilizados para este ensayo, mientras que la distribución de las medidas de los halos de inhibición del antibiograma con la utilización de discos de cefoxitin de 30µg se observó de una forma homogénea, es decir que los 50 *Staphylococcus aureus* sometidos a dichos análisis se comportaron de manera similar el uno con el otro frente al efecto inhibitorio de dicho fármaco.

Tabla 27. Puntos de corte establecidos para el análisis de la susceptibilidad antimicrobiana de cefoxitin (30µg) frente a *Staphylococcus aureus*.

Organismos	Diámetro de la zona de inhibición (mm)	
	S	R
<i>S. aureus</i>	22	21

S: sensible, R: resistente.

Análisis: Para la estimación de la prevalencia de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, se tomó en cuenta las recomendaciones impartidas por el CLSI (2020),

quien recomienda la utilización de un disco de oxacilina de 1µg y cefoxitin de 30µg, detallándose en la tabla 24 y 27 los puntos de corte establecidos.

Tabla 28. Análisis de la susceptibilidad del *Staphylococcus aureus* causante de mastitis bovina en estudio.

#	Código	OX 1	P.C	CFOX 30	P.C
1	D001AI	14	S	25	S
2	D004AI	15	S	25	S
3	D004AD	14	S	25	S
4	EA001AI	10	R	23	S
5	EA002PI	9	R	22	S
6	EA003PD	12	I	22	S
7	EA004AI	12	I	23	S
8	EA004AD	11	I	22	S
9	EA005PI	12	I	22	S
10	EA009AI	11	I	24	S
11	EA010PI	10	R	19	R
12	AR010PI	11	I	24	S
13	AR018PI	10	R	21	R
14	ACH001AD	12	I	22	S
15	ACH002PD	10	R	20	R
16	RT001PD	12	I	22	S
17	RT002PA	16	S	24	S
18	RT002AD	11	I	22	S
19	RT003PD	15	S	26	S
20	RT003AD	14	S	22	S
21	RT004PI	16	S	24	S
22	RT004PD	16	S	25	S
23	RT005PI	15	S	24	S
24	RT006AD	16	S	22	S
25	RT006PD	17	S	23	S
26	SA001PI	10	R	20	R
27	SA004PI	10	R	28	S
28	SA004PD	9	R	21	R
29	SAR001PI	12	I	23	S
30	SAR002AD	16	S	22	S
31	SAR003AI	12	I	22	S
32	SAR004PI	11	I	22	S
33	SAR004PD	10	R	20	R
34	SAR005AD	11	I	22	S
35	SAZ009PI	12	I	20	R
36	SAZ010AD	10	R	17	R
37	SAZ011PD	11	I	23	S
38	SAZ018AD	10	R	21	R

39	AT001PD	11	I	22	S
40	AT001AD	12	I	22	S
41	AT002AI	10	R	20	R
42	AT002PD	10	R	21	R
43	AT003AI	9	R	19	R
44	AT004PD	10	R	20	R
45	AT005PI	11	I	23	S
46	JM001AD	12	I	22	S
47	JM002PD	11	I	24	S
48	JM003PD	10	R	20	R
49	JM004PD	10	R	21	R
50	JM004PI	10	R	19	R

P.C: punto de corte, S: sensible, R: resistente, I: intermedio

Tabla 29. Prevalencia de la susceptibilidad antimicrobiana del *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.

Prueba	Resistente		Intermedio		Sensible	
	Fr.	%	Fr.	%	Fr.	%
Oxacilina	18	36	20	40	12	24
Cefoxitin	16	32	-		34	68

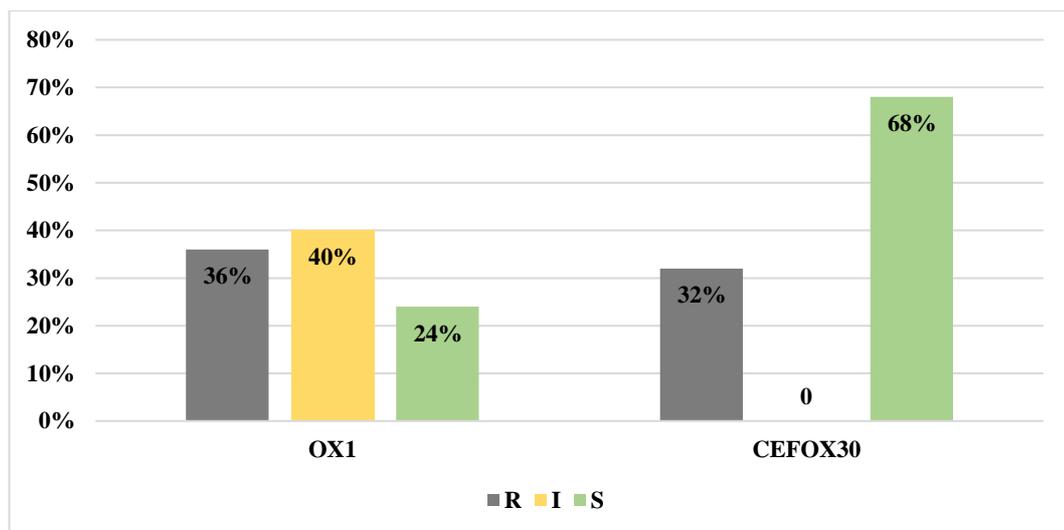
Fr: frecuencia, %: porcentaje.

Análisis: al analizar la prevalencia de los *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (SARM) mediante el análisis fenotípico de la resistencia exhibida en el antibiograma al interactuar con la oxacilina de 1µg y cefoxitin de 30µg, fundamentándose con las recomendaciones del CLSI como la primera referencia para considerar la expresión del gen *mecA*, el cual le confiere la capacidad de resistir al mecanismo de acción de los beta-lactámicos en su mayoría.

En el presente estudio se pudo evidenciar que de un total de 50 cepas de *Staphylococcus aureus* el 36% de los aislados son resistente a la oxacilina de 1µg, el 40% se exhibieron con resistencia intermedia, y 24% restante fueron sensibles. La susceptibilidad mediada por cefoxitin de 30µg frente a 50 cepas de *Staphylococcus aureus* se pudo observar que el 32% de los aislados son resistentes y finalmente el 68% de los aislados son sensibles.

Ardanuy *et al.* (2011), menciona que el cefoxitin es un potente inductor del sistema regulatorio del gen *mecA*, este fármaco permite poner en manifiesto su expresión, además la aplicación de cefoxitin mediante el método de Kirby Bauer permite confirmar la resistencia a los betalactámicos por parte de las cepas que conjuntamente presenten heteroresistencia a la oxacilina.

Figura 9. Porcentaje de susceptibilidad antimicrobiana del *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (SAMR).



R: resistente, I: intermediario, S: sensible.

Discusión: Tesfaye *et al.* (2021) en su estudio menciona que de 121 muestras de leche con mastitis se identificó a *Staphylococcus aureus* en 37 de ellas correspondiendo proporcionalmente al 30.6% de los aislados totales, de dicho aislados 12 que corresponde proporcionalmente al 32.4% fueron identificado como cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes (SAMR), de este antecedente encontraron que 5 cepas fueron resistentes a dos o más betalactámicos. Así mismo Jiménez *et al.* (2020), en su investigación de perfiles de resistencia del *Staphylococcus aureus* donde aisló 36 cepas de las cuales el 92.3% fueron sensibles y 7.7% resistentes a la oxacilina de 1µg, evidenció que a cefoxitina obtuvo un 95.4% de sensibilidad y un 4.6 % de resistencia, difiriendo de las publicaciones citadas ya que en la presente se obtuvo una prevalencia del 32% de *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes.

López *et al.* (2015) en su investigación donde propuso la detección de cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes de leche bovina, observó que el 73%

(n=63) de los aislados fueron sensibles, el 7% (n=6) presentaron resistencia intermedia y el 20% (n=17) restantes presentaron resistencia a la oxacilina de 1µg, en el caso de cefoxitin se pudo observar que 95.3% (n=81) de los aislados fueron sensibles y el 4.7% (n=4) resistentes. Mediante la revisión bibliográfica de las diferentes publicaciones antes citadas se observó variación en la susceptibilidad antimicrobiana evidenciándose diversidad en los patrones de resistencia del *Staphylococcus aureus* causante de mastitis, causando complicaciones en los cuadros de curación de la mastitis bovina.

5.5.1. Relación de los métodos utilizados para la detección de cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes (SAMR) causante de mastitis bovina

Mediante el análisis de normalidad observada en la presente investigación en la tabla 26 se aprecia una distribución heterogénea, es decir que no se presenta una relación proporcional entre los criterios interpretativos de susceptibilidad de la oxacilina y cefoxitin para la detección de *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes, de tal manera se realizó una correlación de Rho-Spearman para evaluar la relación (variables aleatorizadas) de los dos fármacos usados.

Tabla 30. Correlación de Rho de Spearman entre los métodos utilizados.

Correlaciones			
Rho de Spearman	Oxa1	Coefficiente de correlación	Cefox 30
			.637**
		Sig. (bilateral)	.000
		N	50

** La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral).

Análisis: En la tabla 30 podemos ver la correlación Rho de Spearman, la misma que nos expresa que existió una correlación positiva moderada (0.64), determinando que existe una asociación altamente significativa entre los resultados de oxacilina con los resultados de cefoxitin, para el establecimiento del criterio interpretativo que permite saber si las cepas resistentes a oxacilina son resistentes a cefoxitin y otros betalactámico, y si se encuentra expresándose el gen *mecA*.

5.6. Patrones de resistencia encontrados mediante el análisis del antibiograma por el método difusión de disco de los fármacos en estudio.

Tabla 31. Resultados obtenidos del antibiograma de los fármacos en estudio.

#	Código	T1	P.C	T2	P.C	T3	P.C	T4	P.C	T5	P.C		P.C
		Oxacilina 1µg		Amoxicilina 2µg		Amoxicilina 10µg		Ampicilina 2µg		Ampicilina 10µg		Cefoxitin 30µg	
1	D001AI	14	S	15	S	32	S	14	I	34	S	25	S
2	D004AI	15	S	18	S	30	S	15	S	35	S	25	S
3	D004AD	14	S	16	S	32	S	15	S	34	S	25	S
4	EA001AI	10	R	13	R	25	R	11	R	27	R	23	S
5	EA002PI	9	R	12	R	26	R	11	R	26	R	22	S
6	EA003PD	12	I	13	R	29	S	10	R	28	R	22	S
7	EA004AI	12	I	14	I	23	R	12	R	26	R	23	S
8	EA004AD	11	I	13	R	24	R	12	R	28	R	22	S
9	EA005PI	12	I	14	I	25	R	15	S	29	S	22	S
10	EA009AI	11	I	14	I	28	R	14	I	28	R	24	S
11	EA010PI	10	R	12	R	26	R	13	R	26	R	19	R
12	AR010PI	11	I	13	R	28	R	14	I	29	S	24	S
13	AR018PI	10	R	11	R	29	S	11	R	27	R	21	R
14	ACH001AD	12	I	13	R	30	S	14	I	27	R	22	S
15	ACH002PD	10	R	13	R	27	R	13	R	26	R	20	R
16	RT001PD	12	I	12	R	29	S	13	R	29	S	22	S
17	RT002PA	16	S	15	S	31	S	15	S	34	S	24	S
18	RT002AD	11	I	13	R	28	R	16	S	29	S	22	S
19	RT003PD	15	S	15	S	27	R	16	S	28	R	26	S
20	RT003AD	14	S	16	S	30	S	17	S	29	S	22	S
21	RT004PI	16	S	18	S	29	S	15	S	29	S	24	S
22	RT004PD	16	S	15	S	30	S	14	I	30	S	25	S

23	RT005PI	15	S	17	S	29	S	15	S	28	R	24	S
24	RT006AD	16	S	17	S	32	S	16	S	28	R	22	S
25	RT006PD	17	S	16	S	30	S	15	S	30	S	23	S
26	SA001PI	10	R	12	R	25	R	12	R	25	R	20	R
27	SA004PI	10	R	13	R	27	R	11	R	27	R	28	S
28	SA004PD	9	R	13	R	26	R	12	R	26	R	21	R
29	SAR001PI	12	I	14	I	29	S	12	R	27	R	23	S
30	SAR002AD	16	S	15	S	30	S	15	S	30	S	22	S
31	SAR003AI	12	I	15	S	29	S	13	R	27	R	22	S
32	SAR004PI	11	I	14	I	25	R	16	S	27	R	22	S
33	SAR004PD	10	R	12	R	24	R	11	R	23	R	20	R
34	SAR005AD	11	I	13	R	20	R	10	R	25	R	22	S
35	SAZ009PI	12	I	12	R	27	R	11	R	26	R	20	R
36	SAZ010AD	10	R	11	R	20	R	10	R	26	R	17	R
37	SAZ011PD	11	I	13	R	24	R	12	R	24	R	23	S
38	SAZ018AD	10	R	14	I	26	R	13	R	24	R	21	R
39	AT001PD	11	I	13	R	25	R	12	R	30	S	22	S
40	AT001AD	12	I	13	R	29	S	13	R	31	S	22	S
41	AT002AI	10	R	12	R	27	R	11	R	19	R	20	R
42	AT002PD	10	R	14	I	27	R	12	R	21	R	21	R
43	AT003AI	9	R	13	R	28	R	13	R	23	R	19	R
44	AT004PD	10	R	11	R	29	S	11	R	22	R	20	R
45	AT005PI	11	I	10	R	29	S	12	R	21	R	23	S
46	JM001AD	12	I	14	I	25	R	13	R	29	S	22	S
47	JM002PD	11	I	15	S	26	R	13	R	27	R	24	S
48	JM003PD	10	R	14	I	26	R	15	S	25	R	20	R
49	JM004PD	10	R	15	S	27	R	12	R	27	R	21	R
50	JM004PI	10	R	16	S	26	R	15	S	28	R	19	R

R: resistente, I: intermedio, S: sensible. Sensibilidad. Resistencia Otra resistencia

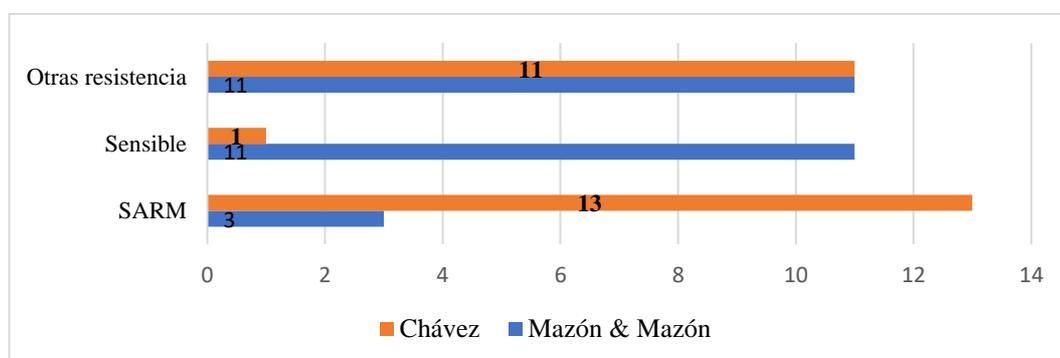
Tabla 32. Patrones de resistencias encontrados en el antibiograma

Criterios interpretativos en los puntos de corte	SAMR	Ninguna	Pecnilasa o mutación de las mismas
S		12 (24%)	
R	16 (32%)		
I/R(betalactamicos) +S(Cefox)			22 (44%)
Total	50 (100%)		

R: resistente, S: sensibles, I: intermedio.

Análisis: De acuerdo con el análisis realizado en la tabla 31 y 32, observamos que 16 cepas (32%) expresaron resistencia a todos los betalactámicos en estudio, siendo consideradas como *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes, así mismo 22 cepas (44%) expresan otro patrón de resistencia mediada por la producción de penicilinasas o modificación de las proteínas fijadores de penicilinas (PBP 1, 2 o 4) extra cromosómicamente y tan solo 12 cepas (24%) expresaron sensibilidad a la familia de los betalactámicos.

Figura 10. Frecuencia de los patrones de resistencia antimicrobiana encontradas por parte del *Staphylococcus aureus* causante de mastitis bovina.



SARM: *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.

Análisis: Infiriendo de tal modo que mediante el estudio de resistencia a los betalactámicos desarrollado en la presente investigación de los aislamientos obtenidos de la investigación de Mazón & Mazón (2022), observando que 3 de 25 cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes, 11 de 25 cepas con sensibilidad a todos los betalactámicos y finalmente 11 de 25 aislados con otros mecanismo de resistencia, así mismo de los aislados de Chávez (2022) apreciando que 13 de 25 aislados reconocidos como SARM, 1 de 25 con sensibilidad y 11 de 25 aislados con otro mecanismo de resistencia.

CAPÍTULO VI

VI. COMPROBACIÓN DE HIPÓTESIS

Por medio del análisis estadístico ejecutado en los valores obtenidos de las variables propuestas, mediante el estadístico Chi-Cuadrado de Pearson, se logró evidenciar la existencia de una interacción altamente significativa (**) con un intervalo de 95% de confianza ($P < 0.05$), por lo tanto se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna, la misma que nos expresa; Existe resistencia antimicrobiana por parte de *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina a la meticilina, amoxicilina y ampicilina.

Tabla 33. Frecuencias obtenidas de los análisis de susceptibilidad antimicrobiana del *Staphylococcus aureus* causante mastitis bovina

Criterio	Puntos de corte							
	Intermedio		Resistente		Sensible		Total	
Amoxicilina	9	9%	55	55%	38	38%	100	100%
Ampicilina	5	5%	64	65%	31	31%	100	100%
Cefoxitin	0	0%	16	32%	34	68%	50	100%
Oxacilina	20	40%	18	36%	12	24%	50	100%
Total	34	11.33%	153	51%	113	37.67%	300	100%

Tabla 34. Resultados de la prueba de Chi-cuadrado

Estadístico	G. L	Valor	Prob.
Chi-cuadrado	6	71.26	<.0001 **
Chi-cuadrado de ratio verosimilitud	6	62.04	<.0001 **
Chi-cuadrado Mantel-haenszel	1	3.40	0.0649
Coeficiente Phi		0.4874	

** : efecto estadístico altamente significativo.

CAPÍTULO VII

VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1. Conclusiones

- La activación e identificación satisfactoriamente 50 *Staphylococcus aureus* provenientes de muestras de leche clínicamente positiva a mastitis bovina, del cepario del Laboratorio General, permiten determinar la viabilidad de los procesos de conservación de microorganismos, además, las cepas coincidieron con los patrones de identificación utilizados en la presente investigación.
- En la actividad antimicrobiana se evidencia que existe diferencias estadísticas altamente significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos, tomando en cuenta las recomendaciones estipuladas por el CLSI que establece lo siguiente: para pruebas de susceptibilidad del *Staphylococcus aureus* al exponerse a la amoxicilina y ampicilina, estos fármacos deben contener una concentración de 10 μ g, ya que sus puntos de corte están calibrados a esta concentración, en la presente investigación, donde se demostró que más del 50% de los *Staphylococcus aureus* aislados se exhibieron como resistentes a la concentración considerada.
- Al evaluar los fármacos Amoxicilina y Ampicilina con una concentración de 2 μ g, recomendación tomada de la guía EUCAST, se observó resistencia a estos antibióticos en un 50% de la población de los aislados sometidos al estudio, siendo estos, más resistentes a la ampicilina ya que su proporción de cepas resistentes fue mayor (60%).
- La estimación de la prevalencia del SAMR por medio de la actividad antimicrobiana según las recomendaciones del CLSI, (2020) el *Staphylococcus aureus* meticilino resistente se evidenció en un 32%, ya que los patrones de resistencia analizados pusieron en manifiesto que esta proporción de *Staphylococcus aureus* son resistentes a los fármacos recomendados para la identificación fenotípica de SAMR (Oxacilina 1 μ g, Cefoxitin 30 μ g, Amoxicilina y Ampicilina de 2 μ g y 10 μ g).

7.2. Recomendaciones

- Identificar molecularmente mediante PCR los aislados obtenidos de las investigaciones de Chávez y Mazón & Mazón utilizados en la presente investigación, con la finalidad de descartar otras especies de *Staphylococcus* para estudios microbiológicos posteriores.
- Realizar estudios moleculares mediante PCR de los *Staphylococcus aureus* reconocidos como meticilino resistente (SAMR) para la detección de los genes *mecA*, *blaZ* que al expresarse les confieren a estas bacterias la resistencia a la mayoría de los betalactámicos incluyendo los de última generación.
- Realizar un estudio de epidemiología molecular comparativo que permita establecer las diferencias moleculares encontradas en el *Staphylococcus aureus* meticilino resistente aislado de mastitis bovina con el que numerosas investigaciones determinan como nosocomial humano.

Bibliografía.

- Aguilar, F., & Álvarez, C. (2019). Mastitis Bovina; Fisiología Y Fisiopatología De La Glándula Mamaria; Factores Determinantes; Agentes Infecciosos. Universidad Técnica De Machala.
- Algharib, S., Dawud , A., & Xie, S. (2020). Nanoparticles For Treatment Of Bovine *Staphylococcus aureus* Mastitis. *Drug Delivery*, 27(1), 292 - 308.
- Antanaitis , R., Juozaitiene, V., Jonike, V., Baumgartner, W., & Paulauskas, A. (2021). Milk Lactose As A Biomarker Of Subclinical Mastitis In Dairy Cows. *Animals*, 11(6), 1736.
- Ardanuy, C., Cercenado, E., Morosini, M., & Torres, C. (2011). Detección Fenotípica De Mecanismos De Resistencia En Grampositivos. En *Procedimientos En Microbiología Clínica* .
- Boireau, C., Cazeau, G., Jarrige, N., Calavas, D., Madec, J., Leblond , A., . . . Gay, E. (2018). Antimicrobial Resistance In Bacteria Isolated From Mastitis In Dairy Cattle In France, 2006–2016. Elsevier, 9451 - 9462.
- Brakstad, O., Aasbakk, K., & Maeland, J. (1992). Detection Of *Staphylococcus aureus* By Polymerase Chain Reaction Amplification Of The Nuc Gene. *Journal Of Clinicial Microbiology* , 1654 - 1660.
- Calderón, R., Rodríguez, V., Arrieta, G., & Mattar, V. (2011). Prevalencia De Mastitis Bovina En Sistemas Doble Propósito En Montería (Colombia): Etiología Y Susceptibilidad Antibacteriana. *Revista Colombiana De Ciencias Pecuarias*, 24(1), 19.28.
- Calvinho, & Tirante. (2005). Prevalencia De Microorganismos Patógenos De Mastitis Bovina Y Evolución Del Estado De Salud De La Glándula Mamaria En Argentina En Los Últimos 25 Años. *Fave Sección Ciencias Veterinarias*.
- Calvinho, C. M. (2013). Factores De Virulencia De *Staphylococcus aureus* Asociados Con Infecciones Mamarias En Bovinos: Relevancia Y Rol Como Agentes Inmunógenosvirulence Factors Of *Staphylococcus aureus* Associated With Intramammary Infections In Cows: Relevance And Role As Immun. Elsevier.

- Camussone, C., & Calvinho, L. (2013). Factores De Virulencia De *Staphylococcus aureus* Asociados Con Infecciones Mamarias En Bovinos: Relevancia Y Rol Como Agentes Inmunógenosfactores De Virulencia De *Staphylococcus aureus* Asociados Con Infecciones Intramamarias En Vacas: Relevancia Y Rol Como. Elsevier.
- Capuco, A., & Choudhary, R. (March De 2019). Symposium Review: Determinants Of Milk Production: Understanding Population Dynamics In The Bovine Mammary Epithelium. *Journal Of Dairy Science*, 103(3), 2928 - 2940.
- Capurro, E. (2017). Alertas A Considerar Para Proteger Los Cuartos Sanos De La Ubre Bovina. *Revista Colombiana De Ciencias Pecuarias*, 200-202.
- Carvalho, T., Fernandes, D., Bezerra, B., & Nunes, D. (March De 2021). Systemic Inflammatory Biomarkers And Somatic Cell Count In Dairy Cows Wth Subclinical Mastitis. Elsevier, 11, 100 - 165.
- Chávez, M. (2022). Evaluación In Vitro De La Actividad Antimicrobiana Del Aceite Esencial De Tomillo Rojo (*Thymus Zygis*) Mediante La Técnica De Kirby-Bauer En *Staphylococcus aureus* Aislada De Mastitis Bovina. Guaranda, Bolívar, Ecuador.
- Cheng, W., & Gu Han, S. (2020). Bovine Mastitis: Risk Factors, Therapeutic Strategies, Alternative Treatment - A Review. *Asian - Australas Jouernal Animal Science*, Xxxiii(11).
- Cohick, W. (April De 2022). The Role Of The Igf System In Mamary Physiology. Elsevier, 79.
- Cuenca, M., García , D., Reinoso , L., Gonzáles , J., & Carrasco, J. (2021). Detección De Mastitis Subclínica Bovina Y Factores Asociados En Fincas Lecheras De La Provincia Del Cañar-Biblián, Ecuador. *Rev. Científica Fcv-Luz*, Xxxi(3), 93-97.
- Da Silva, J. G., Camargo, A. C., Pimentel , R., Bezerra, B., Baltazar , J. M., De Sena, M. J., . . . Mota, R. (2022). Meca Positive *Staphylococcus* Spp. In Bovine Mastitis, Milker, Milking Enviroment, An The Circulation Of Different Mrsa

Clones Ar Dairy Cows Farms In The Northeast Region Of Brazil. *Ciência Rural*, 52(3).

- Damasceno, G. (2020). *Staphylococcus aureus* Resistente A Meticilina E Meropenem En Leite De Vacas Con Mastitis Subclinica. *Brazilian Journal Od Development*, 6(12), 98067-99081.
- Diana, L., Ciuffo, C., & Musto, H. (2019). Identificación Y Caracterización De *Staphylococcus* Resistentes A Meticilina Aislados De Perros. *Scielo Uruguay*, 55(212).
- Díaz, D., & Martínez, F. (Octubre De 2020). Determinación De La Incidencia De Mastitis Bovina En Dos Fincas De La Comarca Piedra Sembrada, Camoapa, Departamento De Boaco, En El Período Febrero - Abril 2020. Camoapa, Boaco, Nicaragua.
- Donoso, P. (2018). Determinación De Lactato Deshidrogenasa Como Indicador Inflamatorio De La Salud De La Glándula Mamaria En Vacas De Un Plantel Lechero De La Comuna De Los Ángeles. Concepción, Chile: Repositorio Universidad San Sebastian.
- Dueñas, C., Quintana, L., Quintero, I., Garcerant, I., Ramos, Y., Ramírez, M., . . . Parodi, Y. (2021). Lectura Interpretada De Antibiograma: Un Enfoque Basado En Preguntas. *Acta Colombiana De Cuidado Intensivo*, 21(3), 252-262.
- Duraffourd, C., Lapraz, J., & L., H. (1987). Cuadernos De Fitoterapia Clínica. En C. Duraffourd, J. Lapraz, & H. L., Cuadernos De Fitoterapia Clínica. Masson.
- Duse, A., Persson, K., & Pedersen, K. (July De 2021). Microbial Aetiology, Antibiotic Susceptibility And Pathogen - Specific Risk Factors For Udder Pathogens From Clinical Mastitis In Dairy Cows. (A. Zecconi, Ed.) *Animals*, 11(7).
- Espínola, S., Piraino, P., Alcaraz, P., & Mora, D. (2020). Guía Para El Diagnostico Y Tratamiento De Pacientes Que Refieren Alergia A Betalactámicos. (F. P. Chemistry, Ed.) *Archivos De Alergia E Inmunología Clínica*, 51(3), 95-116.

- Eucast. (Enero De 2022). Eucast European Committee On Antimicrobial Suscetibility Testing. Obtenido De European Society Of Clinical Microbiology And Infectious Diseases: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/Pdfs/Eucast_Files/Disk_Criteria/Validation_2022/S._Aureus_V_9.0_January_2022.Pdf
- Falla, S., Muñoz, E., Adolfo, G., & Muñoz, L. (2020). Prevalencia De *Staphylococcus aureus* En Mastitis Bovina. Municipio De Campoalegre - Huila. Revista Agropecuaria Y Agroindustrial La Angostura, 7(7), 1-5.
- Ferraro, M., Wikler, M., Craig, W., Dudley, N., Eiopoulus, W., Hecht, D., . . . Weinsten, M. (2005). Performance Standars for Antimicrobial Disk Susceptibility Test. Fifteenth Informational Supplement, 25(1).
- Filor, V., Seeger, B., De Buhr, N., Von Köckritz-Blickwede, M., Kietzmann, M., Oltmanns, H., & Meibner, J. (septiembre De 2022). Investigation Of The Pathophysiology Of Bacterial Mastitis Using Precision-Cut Bovine Udder Slices. Journal Dairy Science, 105(9), 7705 - 7718.
- Finot, L., Chanat, E., & Dessauge, F. (2021). Mammary Gland 3d Cell Culture Systems In Farm Animals. Veterinary Research, 52(1), 1 - 10.
- García, N., Acosta, J. P., Bedolla, C., Castañeda , H., Cal, L., & Velázquez , V. (2019). Mecanismos De Defensa E Inmunidad De La Glándula Mamaria En La Vaca Lechera. Uaem - Fmvz.
- García, N., Acosta, J., Bedolla, C., Castañeda , H., Calpereyra, L., & Velázquez , V. (2019). Mecanismos De Defensa E Inmunidad De La Glándula Mamaria En La Vaca Lechera. Repositorio Uaem.
- Garzón, Y., Reyes, M., Calderón , J., Ibarra, J., & Sánchez , J. (Mayo De 2022). Estudio De Farmacovigilancia A Reacciones Adversas Por Antibioticos (Amoxicilina, Azitromicina, Cefalexina, Betalactámicos, Entre Otros) Dispensados En Una Ips. Florencia, Caquetá, Colombia.
- Gentilini, Llorente, D., Godaly, Rebuelto, & Degregorio. (2016). Susceptibilidad Antimicrobiana De *Staphylococcus aureus* Aislado De Mastitis Bovina En Argentina. Elsevier.

- Giraud, J., Calzolari, A., Rampone, H., Rampone, A., Giraud, A., Bogni, C., . . . Nagel, R. (2008). Field Trials Of A Vaccine Against Bovine Mastitis. (Evaluation In Heifers). Elsevier.
- Gómez, L., Nuñez, D., Perozo, M., Bermúdez, J., & Marín , M. (2016). *Staphylococcus aureus* Con Resistencia Múltiple A Los Antibióticos (Mdr) En Un Hospital De Maracaibo- Venezuela. *Kasmera*, 44(1), 53-64.
- Gomez, L., Rodriguez, J., & Olivera, M. (2020). Respuesta Inmune Innata De La Glándula Mamaria . Antioquia : Biogénesis.
- Gonzáles, R., & Vidal, M. M. (2021). Mastitis Bovina Y Calidad De Leche, Un Desafío Para La Salud Humana. *Universidad Y Sociedad*, 13(1).
- Green, M., Bradley, A., Breen, J., Higgins, H., Hudson, C., Statham, J., & Alastair., H. (2012). *Dairy Herd Health*. Boston, Usa: Cabi.
- Gross, J. (2022). Limiting Factors For Milk Production In Dairy Cows: Perspectives From Physiology And Nutrition. *Journal Of Animal Science*, 100(3).
- Guan, R.-W., Wang, D.-M., Wang, B.-B., Jiang, L.-Y., & Liu, J.-X. (2020). Prognostic Potential Of Pre-Partum Blood Bioch. *Bmc Veterinary Research*, 16(136).
- Gugjoo, M., Farooq, F., Ahmad, S., Shah, R., Amarpal , & Parrah , J. (2022). Adult Stem Cell Research In Light Of The Bovine Mammary Gland Regenerative Medicine. Bentham Science.
- Gusmann, M., Steeneveld, W., Kirkeby, C., Hogeveen, H., Nielen, M., Farre, M., & Halasa, T. (2018). Economic And Epidemiological Impact Of Different Intervention Strategies For Clinical Contagious Mastitis. *Journal Of Dairy Science*, 102(2), 1483 - 1493.
- Guzmán , J. J., Salinas , E., Barboza, J. E., Valencia, M., Ávila, F., Hernández, J., . . . Gutiérrez, A. (2021). Relationshi Between Antibiotic Resistance Ande Biofilm Production Of Staohylococcus Aureus Isolates From Bovine Mastitis. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 12(4), 1117-1132.

- Guzmán, J., Salinas, E., León, F., Barboza, J., Valencia, M., Ávila, F., . . . Gutiérrez, A. (2021). Relación Entre La Resistencia A Antibióticos Y La Producción De Biofilm De Aislados De *Staphylococcus aureus* Proveniente De Mastitis Bovina. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 12(4), 1117-1132.
- Haga, S., Ishizaki, H., & Roh, S. (April De 2021). The Physiological Roles Of Vitamin E And Hypovitaminosis E In The Transition Period Of High-Yielding Dairy Cow. *Animals*, 11(4), 1088.
- Hernández, O., Ulloa, Y., Río, D., & Galdós, M. C. (2005). *Staphylococcus aureus* Y Su Identificación En Los Laboratorios Microbiológicos, Revisión Bibliográfica. *Archivo Médico De Cmagüey Amc*, 1x(1).
- Hernández, V., Rodríguez, C., Aponte, I., Colangelo, A., Abou-Om, S., Pérez, L., . . . Vietri, M. (2021). Identificación De *Staphylococcus aureus* Y Determinación De Su Resistencia A Antimicrobianos En Aves Psitácidas En Cautiverio Y En Sus Cuidadores (Venezuela). *Kamera*, 49(2).
- Holdridge, L. (1971). Sistema De Zonas De Vida . En L. Holdridge.
- Hryniewicz, M., & Garbacz, K. (2017). *Staphylococcus aureus* Resistente A La Oxacilina Límite (Borsa): ¿Un Problema Más Común De Lo Esperado? *Journal Of Medical Microbiolog*, 66, 1367 - 373.
- Icar. (2014). *Livestock Production And Management*. California, Usa: Agrimoon.
- Instituto Nacional De Meteorología E Hidrología. (2021). Instituto Nacional De Meteorología E Hidrología. Obtenido De Inamhi: <https://www.inamhi.gob.ec/>
- Iraguha, B., Hamudikuwanda, H., Mushonga, B., Kandiwa, E., & Mpatwenumugabo, J. P. (2017). Comparison Of Cow-Side Diagnostic Tests For Subclinical Mastitis Of Dairy Cows In Musanze District, Rwanda. *Journal Of The South African Veterinary Association*, 88(1), 1 - 6.
- Jamali, H., Barkema, H., Jacques, M., Lavallée, E. M., Malouin, F., Saini, V., . . . Dufour, S. (2018). Invited Review: Incidence, Risk, Factors, And Effects

Of Clinical Mastitis Recurrence In Dairy Cows. *Journal Of Dairy Science*, 101(6), 4729 - 4746.

- Jiménez, S., Torres, L., Parra, J., Rodríguez, J., García, F., & Patiño, R. (2020). Perfil De Resistencia Antimicrobiana N Asilamientos De Staphylococcus Spp Obtenidos De Leche Bovina En Clombia. *Revista Argentina De Microbiología.*, 52(2), 121- 130.
- Jiménez, S., Torres, L., Parra, J., Rodríguez, J., García, F., & Patiño, R. (2020). Profile Of Antimicrobial Resistance In Isolates Of Staphylococcus Spp. Obtained From Bovine Milk In Colombia. Elsevier.
- Kaskous, S. (October De 2021). Physiological Aspects Of Milk Somatic Cell Count In Dairy Cattle. *International Journal Of Livestock Research*, 11(10), 1 - 12.
- Khan, A., Firyal, S., Khan, I., Raza, A., Tayyab, M., Wasi, M., . . . Zohaib, A. (2020). Phenotypic And Genotypic Characterization Of Beta-Lactams Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates From Bovine Mastitis And Its Zoonotic Implications. *Pakistan Veterinary Journal*, 40(4), 523-526.
- Kim, S., Shin, Koo, H., & Paik, D. (2010). Efecto Antimicrobiano In Vitro Y Efectos Preventivos Y Terapéuticos In Vivo De La Lacticina Nk34 Lantibiótica Parcialmente Purificada Contra La Infección Por Staphylococcus Especies Aisladas De Mastitis Bovina. Elsevier.
- Koba, I., Lysenko, A., Koshchayev, G., Shantyz, A., Donnik, M., & Shabunin, V. (2018). Prevention Of Mastitis In Dairy Cows On Industrial Farms. *Journal Of Pharmaceutical Sciences And Research*, 10(10), 2582-2585.
- Lee, A., Lencastre, H., Garau, J., Kluytmans, J., Malhotra, S., Peschel, A., & Harbarth, S. (2018). Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(18033).
- López, M., Martínez, J., Talavera, M., Valdez, J., & Velázquez, V. (2015). Detección De Los Genes Meca, Mecr1 Y Mecí En Cepas De *Staphylococcus aureus* Resistentes A Meticilina De Origen Bovino Aisladas En Unidades De Producción Lechera Familiar, México. *Archivos De Medicina Veterinaria*, 42(2), 245-249.

- M. Gladwin, B. T. (2004). *Clinical Microbiology Made Ridiculously Simple* (Vol. 3rd Edition). Miami : Medmaster Inc.
- Martínez , L., & Porras , A. (2019). *Lectura Interpretada Del Antibiograma*. Guíaabe.
- Martins, S., Martins, V., Cardoso, F., Germano, J., Rodrigues, M., Duarte, C., . . . Freitas, P. (31 De Julio De 2019). *Biosensors For On-Farm Diagnosis Of Mastitis*. *Frontiers Bioengineering And Biotechnology*, 7(186).
- Massé, J., Dufour, S., & Archambault, M. (2020). *Characterization Of Klebsiella Isolates Obtained From Clinical Mastitis Cases In Dairy Cattle*. *Journal Of Dairy Science*, 103(4), 3392- 3400.
- Mazón , J., & Mazón , D. (Noviembre De 2022). *Análisis De Resistencia Y Susceptibilidad Antimicrobiana En Bacterias Aisladas De Mastitis Bovina En La Cooperativa Agropecuaria “La Colina”, Provincia De Pichincha (Ecuador)*. Guaranda, Bolívar , Ecuador .
- Mesquita, S., Araujo, B., Dos Santos, M., Lisboa, K. A., De Albuquerque, F., Carvalho, T., & Bossi, A. (2022). *Resistên Cia De *Staphylococcus aureus* E Escherichia Coli À Antibióticos*. *Research, Society And Development*, 11(2), 1-7.
- Middleton, J., Lawrence, F., Pighetti, G., & Petersson, C. (2017). *Laboratory Handbook On Bovine Mastitis*. Missouri, Usa: International Mastitis Council .
- Montero, M., Vayas , L., Avilés, D., Pazmiño, P., & Erazo, V. (2018). *Evaluación De Dos Métodos Para Medir La Sesibilidad De Inhibición De Crecimiento De La Cepa Certificada De *Staphylococcus aureus* Subs. Aureus*. (M. B. Coyle, Ed.) Scielo, 29(4).
- Montironi, I., Cariddi, L., & Elina., R. (2016). *Evaluation Of The Antimicrobial Efficacy Of *Minthostachys Verticillata* Essential Oil And Limonene Against *Streptococcus Uberis* Strains Isolated From Bovine Mastitis*evaluación De La Eficacia Antimicrobiana Del Aceite Esencial De *Minthostachys Verticillata*. Elsevier.

- Morales, J. (2020). Fundamentos De Embriología Veterinaria. Córdoba, España: Ediciones Don Folio.
- Morales, P., García, J., Gómez , D., Mejía , L., Holguín , A., Uribe, P., . . . Berrouet, M. (2020). Reacciones Adversas A Betalactámicos: Una Revisión Del Tema. Medicina Upb, 40(1), 55 - 64.
- Naqvi, A., King, M., Matson, R., Devries, T., Deardon, R., & Barkema, H. (28 De April De 2022). Mastitis Detection With Recurrent Neural Networks In Farms Using Automated Milking Systems. Elsevier, 192.
- National Library Of Medicine. (July De 2022). National Library Of Medicine. Obtenido De National Center For Biotechnology Information: Blast.Ncbi.Nlm.Nih.Gov/Blast.Cgi
- Ngssam, C., Duprez, J., Fergestad , M., Visscher, A., Abee-Lund, T., De Vliegher, S., . . . Thiry, D. (2020). In Vitro And In Vivo Assessment Of Phage Therapy Against *Staphylococcus aureus* Causin Bovine Mastitis. Elsevier, 22, 762 - 770.
- Nmc. (2017). Laboratory Handbook On Bovine Mastitis. New Prage, Minnesota, Usa: A Global Organization For Mastitis Control And Milk Quality.
- Oyola, L. S., & Urrea, M. C. (2021). Conceptos Generales Y Métodos Establecidos Para El Diagnóstico Y Tratamiento De La Mastitis Bovina. Ibague, Tolima, Colombia.
- Palma, K. (2020). Guía De Aprendizaje N°8 "Diluciones". Colegio Concepción "San Pedro".
- Paterson, G., Harrison, E., & Holmes, M. (2014). The Emergence Of Mecc Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus. (Elsevier, Ed.) Elsevier.
- Pech Martínez, V. C. (2007). Impacto Económico De La Mastitis Subclínica En Hatos Bovinos De Doble Propósito De La Zona Centro Del Estado De Yucatán. Tropical And Subtropical Agroecosystems, 7(2), 127 - 131.
- Pedroza, A. (2018). Manejo Técnico De Mastitis Y Calidad De Leche. Sitio Argentino De Producción Animal.

- Pereyra, E., Dallard, B., & Luis, C. (2014). Aspectos De La Respuesta Inmune Innata En Las Infecciones Intramamarias Causadas Por *Staphylococcus aureus* En Bovinos. Santa Fe, Argentina: Elsevier.
- Peton, V., & Loir, Y. (2014). *Staphylococcus aureus* In Veterinary Medicine. Elsevier.
- Plumb, D. (2017). Manual De Farmacología Veterinaria. Buenos Aires: Inter-Medica.
- Plumb, D. C. (2017). Manual De Farmacologia Veterinaria (Vol. Octava Edición). Buenos Aires, República Argentina: Inter-Medica.
- Radzikowski, D., Kalińska, A., Ostaszewska, U., & Gołębiewski, M. (2020). Alternative Solutions To Antibiotics In Mastitis Treatment For Dairy Cows - A Review*. *Animal Science Papers And Reports*, 38(2), 117 - 133.
- Reinoso, E., Lasagno, M., & Odierno, L. (2015). Genetic Patterns Of *Streptococcus uberis* Isolated From Bovine Mastitis. Elsevier.
- Ritika, Y., Kumar, A., Vinod, S., & Jayshree Sharad, Y. (2018). Prevalencia Y Antibiotipificación De *Staphylococcus aureus* Y *S. aureus* Resistente A La Meticilina (Mrsa) En Animales Domésticos En La India. India: Elsevier.
- Robles, I., Zambelis, A., Kelton, D., Barkema, H., Keefe, J., Roy, J., . . . Devries, T. (2020). Associations Of Freestall Design And Cleanliness With Cows Lying Behavior, Hygiene, Lameness And Risk Of High Somatic Cell Count. *American Dairy Science Association*, 104(2), 2231-2242.
- Roja, G., Vásquez, Y., Rodríguez, M., García, P., & Rojas, T. (2021). Mecanismos De Resistencia A Antibióticos Betalactámicos En Enterobacteriales Aislados En Hemocultivos, Maracay, Estado De Aragua, Venezuela. *Kasmera*, 49(2).
- Roodenburg, K., Huybens, L., Nielen, M., & Wever, V. (June De 2021). Dry Period Management And New High Somatic Cell Count During The Dry Period In Dutch Dairy Herds Under Selective Dry Cow Therapy. *Journal Of Dairy Science*, 104(6), 6975 - 6984.

- Rosales, R. E., & Granja, V. M. (2017). Infusión Continua De Betalactámicos Generalidades. Eipediatria.Com, 1129-1133.
- Saldivia, M. A. (2019). Evaluación De La Sensibilidad De La Pared Abdominal Y Ubre En Vacas Lecheras Poscesárea Por Laparotomía En El Flanco Izquierdo. Revista De Medicina Veterinaria(38), 73-90.
- Sánchez , M., Arceo, T., Sandoval , G., Alva, P. N., Jiménez, R., & Loeza, P. D. (2018). Uso De Nisina Y Quitosano Para La Inhibicion De Staphylococcus Aureus Resistente A Antibióticos Y Asociado A Mastitis Bovina. Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias, 9(4), 792-810.
- Sanchez, M. D., Gutiérrez, N. P., & Posada, I. J. (2018). Prevalencia De Mastitis Bovina En El Cañón De Anaime, Región Lechera De Colombia, Incluyendo Etiología Y Resistencia Antimicrobiana. Scielo Perú, 29(1).
- Santana, R., Campos, D., Fontoura, N., & De Melo, P. (2021). Manual De Prevención Y Control De Mastitis Bovina. Minas Gerais, Brasil: Rehagro.
- Sharun, K., Kuldeep, D., Tiwari , R., Gugjoo, M., & Yattoo, M. (2021). Advances Un Therapeutic And Managemental Approaches Of Bovine Mastitis: A Comprehesive Review. Veterinary Quarterly, 41(1), 107-136.
- Shokouhi, V. (2021). Mastitis Bovina En La Encrucijada De Nuevo. Bovino.
- Stephen, J. (2005). Manual De Pruebas De Susceptibilidad Antimicrobiana. Usa: American Society For Microbiology.
- Suarez, V., Martínez, G., Bertoni, E., Salatin, A., & Dib, M. (2019). Prevalencia Y Etiología De Las Mastitis Bovinas En La Cuenca Lechera Del Valle De Lerma (Salta). Revista De Medicina Veterinaria Buenos Aires.
- Tesfaye, K., Gizaw, Z., & Feleke, A. (2021). Prevalence Of Mastitis And Phenotypic Characterization Of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* In Lactating Dairy Cows Of Selected Dairy Farms In And Around Adama Town, Central Ethiopia. Environmental Health Insights, 15.

- Thomas , A., Clothe, S., Byukusenge, M., Mathews, T., & Kariyawasam, S. (2021). Revalence And Distribution Of Multilocus Sequence Types Of *Staphylococcus aureus* Isolated From Bulk Tank Milk And Cows With Mastitis In Pennsylvania. Plos One, 16(3).
- Tomazi, T., & Veiga Dos Santos, M. (2020). Antimicrobial Use For Tratment Of Clinical Mastitis In Dairy Herds From Brazil And Its Association With Herd - Level Descriptors. Elsevier, 176.
- Torres, C., & Cercenado, E. (2010). Lectura Interpretada Del Antibiograma De Cocos Gram Positivos. En Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica (Vol. 28, Págs. 541-553). España: Elsevier Doyma.
- Torres, G. (2020). Infección Y Respuesta De La Glándula Mamaria Bovina. Antioquia, Colombia: Biogénesis.
- Torres, L. (2020). Infección Y Respuesta De La Glándula Mamaria Bovina. Grupo De Investigación Biogénesis, I, 105-143.
- Turutoglu, H., Ercelk, S., & Ozturk, D. (2006). Antibiotic Resistance Of *Staphylococcus aureus* And Coagulase-Negative Staphylococci Isolated From Bovine Mastitis. Bull Vet Inst Pulawy, 50(1), 41-45.
- Valle, K. (22 De Diciembre De 2021). Mastitis Y Calidad De La Leche En Bovinos Lecheros. Riobamba, Chimborazo, Ecuador.
- Vargas , K., Arboleda, J., & Oliveira , M. (2018). Validación De Método Cualitativo Para Detección De *Staphylococcus aureus* Y *Streptococcus Agalactiae* En Muestras De Leche Para Diagnóstico De Mastitis Bovina. Scielo, 21(1).
- Xu, P., Fotina, H., & Wang, S. (2021). In Vitro Culture And Evaluation Of Bovine Mammary Epithelial Cells From Ukraine Dairy Cows. Iran Journal Of Veterinary Research, 22(1), 65 - 71.
- Zendejas, G. S., Flores, H., & Soto, M. (2014). Microbiología General Del *Staphylococcus Aureus*: Generalidades, Patogenicidad Y Métodos De Identificación. Biomed, 25, 129-143.

Anexos

Anexo 1. Lugar de investigación.

La presente investigación se realizó en el laboratorio general sección de microbiología de la Facultad de Ciencias Agropecuaria, Recursos Naturales y del Ambiente, de la Universidad Estatal de Bolívar.



Fuente: Google maps (2022).

Anexo 2. Base de datos

#	Código	T1 OX 1	T2 Amox 2	T3 Amox10	T4 Ampi2	T5 Ampi10	T6 Testigo	CFOX 30
1	D001AI	14	15	32	14	34	6	25
2	D004AI	15	18	30	15	35	6	25
3	D004AD	14	16	32	15	34	6	25
4	EA001AI	10	13	25	11	27	6	23
5	EA002PI	9	12	26	11	26	6	22
6	EA003PD	12	13	29	10	28	6	22
7	EA004AI	12	14	23	12	26	6	23
8	EA004AD	11	13	24	12	28	6	22
9	EA005PI	12	14	25	15	29	6	22
10	EA009AI	11	14	28	14	28	6	24
11	EA010PI	10	12	26	13	26	6	19
12	AR010PI	11	13	28	14	29	6	24
13	AR018PI	10	11	29	11	27	6	21
14	ACH001AD	12	13	30	14	27	6	22
15	ACH002PD	10	13	27	13	26	6	20
16	RT001PD	12	12	29	13	29	6	22
17	RT002PA	16	15	31	15	34	6	24
18	RT002AD	11	13	28	16	29	6	22
19	RT003PD	15	15	27	16	28	6	26
20	RT003AD	14	16	30	17	29	6	22
21	RT004PI	16	18	29	15	29	6	24
22	RT004PD	16	15	30	14	30	6	25
23	RT005PI	15	17	29	15	28	6	24
24	RT006AD	16	17	32	16	28	6	22
25	RT006PD	17	16	30	15	30	6	23
26	SA001PI	10	12	25	12	25	6	20
27	SA004PI	10	13	27	11	27	6	28
28	SA004PD	9	13	26	12	26	6	21
29	SAR001PI	12	14	29	12	27	6	23
30	SAR002AD	16	15	30	15	30	6	22
31	SAR003AI	12	15	29	13	27	6	22
32	SAR004PI	11	14	25	16	27	6	22
33	SAR004PD	10	12	24	11	23	6	20
34	SAR005AD	11	13	20	10	25	6	22
35	SAZ009PI	12	12	27	11	26	6	20
36	SAZ010AD	10	11	20	10	26	6	17
37	SAZ011PD	11	13	24	12	24	6	23
38	SAZ018AD	10	14	26	13	24	6	21
39	AT001PD	11	13	25	12	30	6	22
40	AT001AD	12	13	29	13	31	6	22
41	AT002AI	10	12	27	11	19	6	20
42	AT002PD	10	14	27	12	21	6	21
43	AT003AI	9	13	28	13	23	6	19
44	AT004PD	10	11	29	11	22	6	20
45	AT005PI	11	10	29	12	21	6	23
46	JM001AD	12	14	25	13	29	6	22
47	JM002PD	11	15	26	13	27	6	24
48	JM003PD	10	14	26	15	25	6	20
49	JM004PD	10	15	27	12	27	6	21
50	JM004PI	10	16	26	15	28	6	19

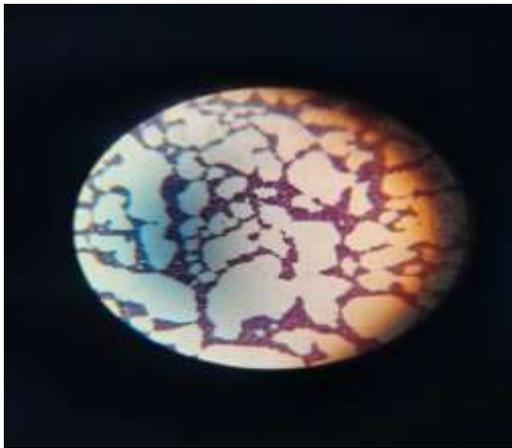
Anexo 3. Fotografías de la investigación



Fotografía 1: Proceso de tinción de gram



Fotografía 2: Proceso de tinción de gram



Fotografía 3: resultado de la tinción de gram



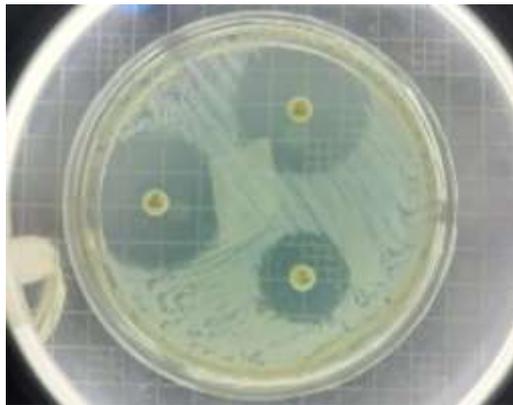
Fotografía 4: Prueba de coagulasa.



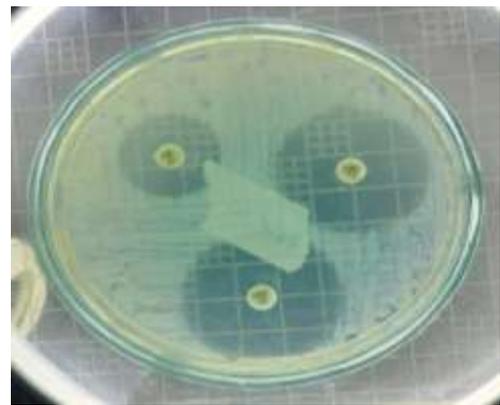
Fotografía 5: Medición de la escala MacFarland



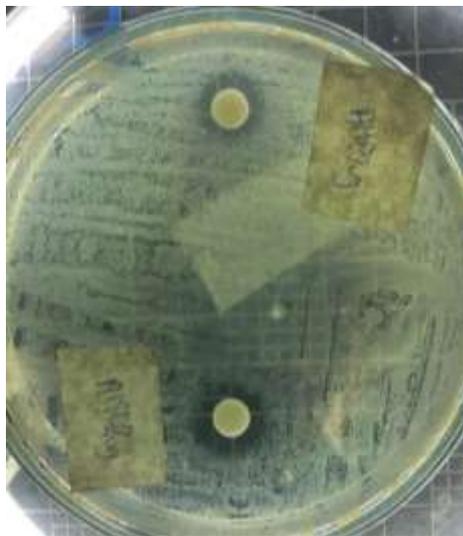
Fotografía 6: Siembra de los discos de inhibición.



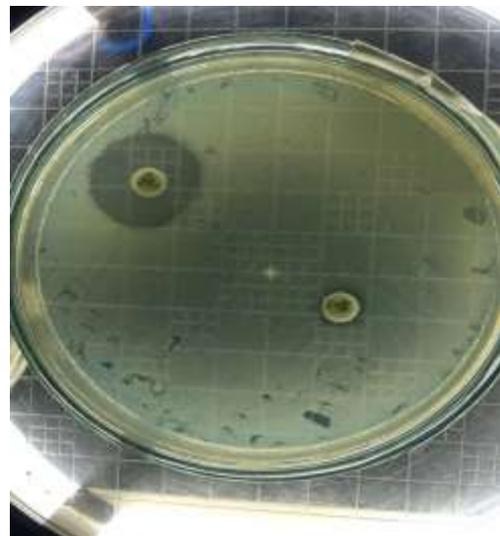
Fotografía 7: Actividad antimicrobiana, resistencia heterogénea a la oxacilina



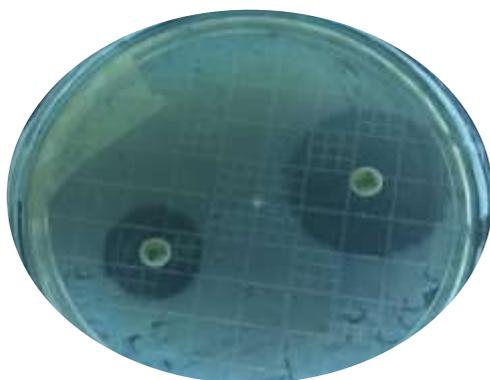
Fotografía 8: Actividad antimicrobiana



Fotografía 9: Discos de amoxicilina y ampicilina a 2µg



Fotografía 10: Discos de inhibición de Cefoxitin y oxacilina.



Fotografía 11: Discos de cefoxitin 30µg y oxacilina 1µg
Anexo 4. Glosario de términos.



Fotografía 12: Visita de campo por parte del tribunal

ACTIVACIÓN MACRÓFAGOS: Proceso de alteración de la morfología y la actividad funcional de los macrófagos para que se tornen ávidamente fagocíticos. Se inicia por las linfocinas, tales como el factor de activación macrofágica (FAM) y el factor de inhibición de la migración del macrófago (FIMM), por complejos inmunes, el C3b y varios péptidos, polisacáridos y adyuvantes inmunológicos.

ADN-A: Forma de ADN de doble hebra estable en condiciones de deshidratación, que se encuentra en cristales y soluciones que tienen concentraciones salinas altas o alcohol en el soluto. Tiene una hélice más compacta que el ADN-B, con una ranura estrecha profunda y considerable, una ranura ancha menor y superficial, y un centro vacío. Los complejos de ADN: ARN y el ARN de hebra doble también asumen esta forma.

ANTIBIOGRAMA: El antibiograma es la prueba microbiológica que se realiza para determinar la susceptibilidad (sensibilidad o resistencia) de una bacteria a un grupo de antibióticos. Las técnicas de antibiograma son las utilizadas en el laboratorio de microbiología para estudiar la actividad de los antimicrobianos frente a los microorganismos responsables de las infecciones.

BACTEREMIA: Presencia de bacterias circulando en la sangre.

BACTERIA: Las bacterias son microorganismos procariotas que presentan un tamaño de unos pocos micrómetros (por lo general entre 0,5 y 5 μm de longitud) y diversas formas, incluyendo filamentos, esferas (cocos), barras (bacilos), sacacorchos (vibrios) y hélices (espirilos).

BACTERIAS COLIFORMES: Familia de bacterias gram negativas, facultativamente anaeróbicas, con forma de varilla, que no forman endosporas. Sus organismos se distribuyen en todo el mundo; algunos son saprófitos y otros son plantas y animales parásitos. Muchas especies son de gran importancia económica debido a sus efectos patogénicos en la agricultura y el ganado.

BIOPELÍCULA: Capa delgada de células vivientes, generalmente microorganismos, que recubre una superficie.

CÉLULAS PLASMÁTICAS: Formas especializadas de linfocitos B productores de anticuerpos. Sintetizan y segregan inmunoglobulinas. Se encuentran en los órganos linfoides y en los sitios donde se produce la respuesta inmune, normalmente no circulan en la sangre o linfa.

CÉLULAS PROCARIÓTICAS: Células como las de las bacterias y algas verdes azules carentes de una membrana nuclear de manera que el material nuclear está diseminado en el citoplasma o se reúne en la región nucleoide.

CLIVAJE CELULAR: Serie de divisiones mitóticas de un cigoto de una sola célula durante las primeras etapas de la embriogénesis.

CMI: Es la menor concentración de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento de 10⁵ bacterias en 1 mL de medio de cultivo, tras 18-24 h de incubación. Se clasifica la sensibilidad de un germen frente a un antibiótico en función de sus respectivas.

COCULTIVO: Técnica de cultivo que consiste en mezclar varios tipos de células in vitro para permitir interacciones sinérgicas o antagonistas, como en la diferenciación celular o apoptosis.

DESINFECCIÓN: Proceso o tratamiento químico que destruye la mayoría de los microorganismos.

ELEMENTOS DE RESPUESTA: Secuencias de nucleótidos, generalmente al inicio de la cadena, que son reconocidas por factores de transcripción reguladores específicos, provocando la respuesta del gen a los distintos agentes reguladores. Estos elementos pueden encontrarse tanto en regiones promotoras como intensificadoras.

ENTEROTOXINAS: Sustancias que son tóxicas para el tracto intestinal y causan vómitos, diarrea, etc. Las enterotoxinas más comunes las producen bacterias.

EPIDEMIOLOGÍA: Estudio de los diversos factores que influyen en la ocurrencia, distribución, prevención y control de enfermedades, lesiones y otros eventos relacionados con la salud en una población determinada.

GRASA LÁCTEA: Componente lípido de la leche producido por la vaca, constituido mayormente por glicéridos que contienen ácidos butíricos, oleico, y palmítico.

HÁBITATS: Elementos y condiciones externos que rodean, influyen y afectan la vida y el desarrollo de un organismo o población.

LACTACIÓN: Procesos de secreción de leche por las glándulas mamarias maternas después del parto. La proliferación del tejido glandular mamario, la síntesis de leche, y la expulsión o bajada de la leche son reguladas por las interacciones de varias hormonas incluyendo estradiol, progesterona, prolactina, y oxitocina.

LECHE CRUDA: Leche fresca no procesada, tal como viene de una vaca, cabra u otro mamífero.

LECHE ESTERILIZADA: Leche que ha sido calentada a una temperatura y por un tiempo que mata todas las bacterias y esporas, dándole un tiempo de duración más extenso.

MASTITIS: La mastitis es una enfermedad multicausal, habiéndose identificado más de 80 especies de bacterias, hongos, mycoplasmas y algas capaces de causar infecciones intramamarias (IIM).

MEDIOS DE CULTIVOS: Son medios que proporciona condiciones adecuadas en base a sus nutrientes para el desarrollo y crecimientos de microorganismos.

OBTENCIÓN DE LA IMPRONTA de ADN Definición Método para determinar la secuencia de especificidad de proteínas de unión a ADN. Para la obtención de la impronta de ADN se utiliza un agente lesivo (un reactivo químico o una nucleasa) que divide el ADN en cada par de base.

PANCREATINA: Extracto pancreático de mamífero compuesto por enzimas con actividades de proteasa, amilasa y lipasa.

PASTEURIZACIÓN: Proceso en el cual se calienta la leche u otros líquidos para eliminar microorganismos que pueden causar enfermedades o deterioro, al tiempo que se minimizan los cambios químicos que afectan el sabor o el aroma.

PATÓGENOS: Son capaces de causar infecciones en un huésped susceptible

PATOTIPOS: Poblaciones de la misma especie que difieren por su capacidad patogénica.

PROTEÍNAS TRANSMEMBRANA: Proteínas de la membrana que recorre toda la membrana celular desde la superficie interna.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA: Método in vitro para producir grandes cantidades de fragmentos específicos de ADN o ARN de longitud y secuencia definidas a partir de pequeñas cantidades de secuencia flanqueantes del oligonucleótido (primers).

RESISTENCIA FARMACOLOGICA: Se produce cuando las células cancerosas o los microorganismos, como bacterias o virus, no responden a un medicamento que por lo general los debilita o destruye.

SEROTIPOS: Subdivisión de una especie o subespecie que se distingue de otra, como las cepas, basándose en la antigenicidad.

SIEMBRAS DE MICROORGANISMOS: Sembrar o inocular es introducir artificialmente una porción de muestra (inoculo) en un medio adecuado.