
INSTITUTO POLITÉCNICO DE LA SALUD
Dr. LUIS FELIPE MONCADA
UNAN-MANAGUA



**UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
NICARAGUA,
MANAGUA**
UNAN - MANAGUA

Monografía para optar al título de licenciatura en microbiología

Tema:

Prevalencia de Staphylococcus aureus aislado del ganado vacuno con mastitis procedente de la Universidad Nacional Agraria (UNA), durante el período de marzo-mayo del 2022.

AUTORES:

- ❖ Astorga Chacón Junielky Katherine.
- ❖ Orozco Meza Antonio Eiler.
- ❖ Siles Maradiaga Staylor Jeltsin.

TUTOR:

MSc. Daniela Magaly Ruiz Saldívar
Docente del Dpto. Bioanálisis clínico POLISAL UNAN-MANAGUA.

ASESOR METODOLÓGICO:

Dr. Oscar Arbizú Medína PhD
Profesor Titular, UNAN-Managua
Dpto. Bioanálisis y Microbiología.

Managua, Nicaragua, Marzo del 2023

VALORACION DEL TUTOR

La mastitis bovina, es una reacción inflamatoria de la glándula mamaria, y produce alteraciones físicas y químicas en la leche, aumento del número de células somáticas por la presencia de microorganismos patógenos y finalmente cambios como es la pérdida de la funcionalidad.

Uno de los microorganismos importantes, en la mastitis infecciosa es el *Staphylococcus aureus* y su importancia radica en que no es un patógeno obligado de la ubre, ya que se puede encontrar también en lesiones de la piel de los pezones, en las manos de los ordeñadores, en las camas, en los equipos de ordeño y en muchas ocasiones, las prácticas de manejo pueden hacer que este agente etiológico alcance el conducto del pezón y de ahí desencadenar una reacción inflamatoria.

En la actualidad resistencia a los antimicrobianos constituye uno de los principales desafíos sanitarios de nuestro tiempo, siendo una causa de decesos a nivel mundial. Representa una amenaza creciente para la sanidad animal y la salud de las personas, al igual que para la subsistencia de los hogares y la seguridad alimentaria global.

Doy fe como tutora, que el informe final cumple con todos los requisitos científicos y académicos establecidos en la Normativa de Modalidad de Graduación de la Universidad, cuyo tema será de mucha utilidad para contribuir a la realización de futuras investigaciones, al desarrollo científico de los profesionales en nuestra especialidad y todas aquellas afines a nuestro perfil.

Tutora: MSc. Magaly Ruiz Saldívar.

Docente Dpto. Bioanálisis Clínico.

VALORACION DEL ASESOR METODOLÓGICO

La resistencia bacteriana ha evolucionado en gran medida durante los últimos años debido al uso indiscriminado de los antibióticos, la capacidad que tienen los microorganismos de desarrollar múltiples mecanismos de resistencia, debe preocupar a la comunidad científica, por la reducción drástica de las opciones terapéuticas que tenemos a nuestro alcance para combatir los distintos tipos de procesos infecciosos. La producción de enzimas que hidrolizan los antibióticos más importantes debido que estas han agotado la última línea de antibiótico aumentando las problemáticas intrahospitalarias y comunitarias, ya que estas cepas son muy difíciles de tratar.

Considero que este trabajo de monografía con la temática prevalencia de *Staphylococcus aureus* aislado del ganado vacuno con mastitis procedentes de la universidad nacional agraria (una), durante el período de marzo – mayo del 2022. Es de gran importancia por la situación actual, agravando la calidad de vida de los pacientes, se estima que en un futuro cercano sea imposible poder usar los antibióticos para contrarrestar las infecciones bacterianas, algunos autores citan que se debe hablar de pan resistencia, porque existen microorganismos sin alternativa antibiótica, por lo tanto, intratable.

Considero que este trabajo monográfico cumple con los requisitos para ser dictaminado por el jurado calificador.

Dr. Oscar Arbizu Medina PhD
Profesor Titular, UNAN-Managua
Dpto. Bioanálisis y Microbiología.

DEDICATORIAS

En primer lugar, a Dios por darme salud y vida, por guiarme con sabiduría, iluminar mis pensamientos e ideas para culminar esta investigación. Dedico este trabajo monográfico a toda mi familia, especialmente a mis padres: Salomón Madariaga Lanza y Máxima Siles Giménez porque son mi motor e inspiración para cumplir mis metas, por siempre apoyarme incondicionalmente e inculcar valores de vida, para llegar a ser un buen profesional. A mi novia Ashely Idiaquez Velásquez por darme ánimos para poder salir adelante y de una u otra forma brindarme apoyo. Además, quiero compartir este trabajo con mis compañeros que han sido parte de esta investigación y fueron constante durante mi carrera.

Jeltsin Staylor Madariaga siles

Agradezco a Dios por haberme permitido llegar hasta este punto, por haberme dado salud y darme lo necesario para salir adelante día a día para lograr mis objetivos. Además, agradezco infinitamente a mis padres: María Ester Astorga Gonzáles y José Luis Chacón Astorga por ser parte esencial en mi vida, motores de mis proyectos, guías y ayudas presentes en el momento de los problemas que se me presentaron, por darme las bases necesarias para culminar con éxito la investigación monográfica, finalmente quiero dedicar y agradecer a mis compañeros cuya dedicación y paciencia sirvieron como pilares de apoyo para la realización y culminación de este trabajo.

Katherine Junielky Chacón Astorga

Primeramente, agradezco a Dios por permitirme la vida, darme sabiduría, entendimiento, paciencia, ánimos y siempre ser un apoyo a pesar las circunstancias, dedico este trabajo monográfico a mi madre, Fátima del Socorro Orozco Sobalvarro y a mi tía Flor de María Orozco Sobalvarro por ser un pilar y estar presente en todas las etapas de mi vida y agradecer a mis compañeros de monografía, por este arduo trabajo para lograr nuestra titulación.

Eiler Antonio Meza Orozco

AGRADECIMIENTOS

A Dios por fortalecernos con sabiduría paciencia y profesionalismo para seguir adelante y lograr atravesar los obstáculos durante este estudio y de esta manera alcanzar y culminar nuestras metas propuestas.

A nuestra tutora Msc. Daniela Magaly Ruiz Saldívar (Docente del dpto. de bioanálisis clínico, POLISAL UNAN-Managua) y asesor metodológico PhD Oscar Arbizu Medina (Docente del dpto. de bioanálisis clínico, POLISAL UNAN-Managua) por dedicarnos su tiempo y compartir sus conocimientos.

A la facultad ciencia animal (FACA) del departamento medicina veterinaria de la universidad Nacional Agraria (UNA), especialmente al ingeniero Bryan Mendieta PhD (decano de la facultad de ciencia animal). Msc. Wendel Mejía (responsable de CAFop Bovino) e ingeniero Omar Navarro (docente investigador) por su apoyo incondicional en la realización de la investigación y prestación de sus servicios.

A unidad de salud privada y laboratorio del POLISAL, UNAN-Managua por permitir realizar el procesamiento de las muestras en sus instalaciones.

Al personal del laboratorio del POLISAL, UNAN-Managua, especialmente al Lic. Godofredo Sobalvarro por su apoyo y conocimiento.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ATCC: Microorganismos certificados para el control de calidad

AST: Análisis de la susceptibilidad antibiótica

CMT: Mastitis test california

CS: Células somáticas

CIM: Concentración mínima inhibitoria

CO₂: Dióxido de carbono

CC: Clindamicina

CEL: Célula

CFT: Ceftarolina

CIP: Ciprofloxacina

DNA: Ácido desoxirribonucleico

D-NASA: Desoxirribonucleasa

DAP: Daptomicina

ERY: Eritromicina

FACA: Facultad de Ciencia Animal

FOX: Cefoxitina

GP: Gram positivo

H₂O₂: Peróxido de hidrogeno

I: Intermedio

ID: Identificación microbiana

LVX: Levofloxacina

LZD: Linezolid

MLS: Macrólido, lincosamidas y estreptogramina

MC: Mastitis clínica

MSC: Mastitis sub clínica

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

MI: Mililitro

MM: Milimetro

NIT: Nitrofurantoina

OXA: Oxacilina

PBPs: Proteína fijadora de penicilina

PEN: Penicilina G

R: Resistente

RIF: Rifampicina

Rrna: Ácido ribonucleico ribosomal

SAS: *Staphylococcus aureus*

S: Sensible

TYC: Tetraciclina

SXT: Trimetoprima/sulfametoxazol

UFC: Unidades formadoras de colonias

UNA: Universidad Nacional Agraria

VISA: *Staphylococcus aureus* resistencia intermedia a vancomicina

VRSA: *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina

VAN: Vancomicina

RESUMEN

El presente estudio descriptivo de corte transversal, se realizó con el propósito de determinar la prevalencia de *Staphylococcus aureus*, con el fin de explicar la problemática clínica de dicho patógeno, por tal razón se clasificaron 100 cuartos mamarios de 25 vacas del ganado vacuno procedentes de la Universidad Nacional Agraria (UNA), durante el período de marzo-mayo del 2022.

Para poder identificar *Staphylococcus aureus*, causante de mastitis, se realizó una clasificación de la mastitis a través de California Mastitis Test (CMT) por medio del rango de células somáticas, para posteriormente realizar pruebas convencionales como: identificación macroscópica de colonias bacterianas, tinción de Gram, catalasa, coagulasa y DNAsa; así mismo mediante el sistema automatizado Vitek 2 Compact.

Se clasificaron 25 vacas por medio de California Mastitis Test (CMT), resultando positivo a mastitis sub clínica 19 vacas equivalente al 76%, posteriormente, se obtuvo un total de 21 aislamientos correspondientes a los cuartos mamarios positivos a mastitis, estas fueron procesadas mediante pruebas convencionales, obteniendo 8 cepas *Staphylococcus aureus* correspondiente a un 38% de las 21 muestras procesadas, se procedió a estudiar las mismas, mediante el sistema automatizado VITEK 2 compact; confirmando así una frecuencia de 8 cepas de *Staphylococcus aureus*, correspondiente a un 100% en este análisis.

Se analizaron 8 cepas de *Staphylococcus aureus*, para determinar el perfil de susceptibilidad antimicrobiana y detectar mecanismo de resistencia mediante el sistema automatizado Vitek 2 compact, dando como resultado 100% de sensibilidad hacia los antimicrobianos que fueron expuesto y encontrándose la ausencia de mecanismo de resistencia.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1. ANTECEDENTES	2
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	4
3. JUSTIFICACIÓN	6
4. OBJETIVOS	7
5. MARCO TEÓRICO	8
6.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	8
6.3. Patogenia.....	9
6.4. El genoma de <i>Staphylococcus aureus</i>	10
6.5. Susceptibilidad antimicrobiana	11
6.6. Mecanismos de resistencia	12
6.7. Manifestaciones clínicas	19
6.8. Mastitis clínica por <i>Staphylococcus aureus</i>	19
6.9. Mastitis subclínica por <i>Staphylococcus aureus</i>	20
6.10. Epidemiología.....	21
6.11. Tratamiento	22
6.12. Prevención.....	23
6.13. Prueba para la clasificación del tipo de mastitis	23
6.14. Pruebas presuntivas, confirmativas y sistema automatizado VITEK 2 Compact, para la identificación de <i>Staphylococcus aureus</i>	26
7. DISEÑO METODOLÓGICO.....	31
8 ANÁLISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS	47
9 CONCLUSIONES.....	57
10 RECOMENDACIONES	58
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
12. ANEXOS	66

1. INTRODUCCIÓN

El género *Staphylococcus*, está formado por cocos Gram positivos, con un diámetro de 0.5 a 1.5 μm , agrupados como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas, es un patógeno bacteriano de importancia médica y de los principales agentes por producir una amplia gama de infecciones causantes de enfermedades en el ser humano, tanto a nivel comunitario como en el ambiente hospitalario (González, 2014). *Staphylococcus aureus* es considerado una bacteria con gran potencial para causar múltiples infecciones en el humano y en los animales, es considerada la especie más virulenta, responsable de un amplio espectro de enfermedades, que van desde infecciones de la piel y tejidos blandos hasta infecciones graves que amenazan con la vida.

La importancia de *Staphylococcus aureus* como el principal causante de mastitis en el ganado vacuno, radica en el desafío que puede llegar a ser su tratamiento para la eliminación de la enfermedad, así como también; puede adquirir resistencia a las principales familias de antibióticos como los betalactámicos; por ende, la importancia de medir la resistencia antimicrobiana consiste en monitorear los cambios microbianos de los hatos y detectar tempranamente las cepas resistentes.

Debido a la producción de toxinas, *Staphylococcus aureus*, puede causar problemas de mastitis que van desde infecciones sin manifestaciones clínicas a infecciones clínicas o gangrenosas que pueden matar a la vaca. Una vez que la bacteria alcanza la glándula mamaria, invadirá profundamente los tejidos celulares y conductos secretores de la misma. Las infecciones por *Staphylococcus aureus* producen cicatrices y pueden producir pequeños abscesos en la ubre, estos abscesos pueden abrirse en cualquier momento provocando una reaparición de los síntomas clínicos o una elevación del recuento de células somáticas (Mellenberger y Kirk, 2016).

El propósito de abordar este tema, es determinar la prevalencia de *Staphylococcus aureus* como el principal patógeno presente en el ganado vacuno con mastitis procedente de la universidad nacional agraria, durante el período de marzo- mayo del 2022.

1. ANTECEDENTES

En investigaciones internacionales se encontró un estudio realizado por Maldonado et al, (2022), en la Estación Experimental Tunchi – Facultad de Ciencias Pecuarias, realizaron un estudio para diagnosticar la mastitis subclínica mediante tres métodos (Milk Checker, Draminski y California Mastitis Test (CMT) para el control y tratamiento en vacas Holstein, se utilizaron 16 vacas en producción dando como resultado una incidencia de mastitis subclínica de acuerdo a CMT de 87,5%, el método más eficaz fue CMT con 92,19% de datos correctos, se obtuvo un 100% de Bacterias Gram + siendo estas sospechosamente en su mayoría *Staphylococcus aureus* con 51,4% y el 48,6% corresponde a Bacilos siendo estas B hemolíticas y no hemolíticas respectivamente, en el antibiograma realizado se tiene una sensibilidad a Tetraciclina, Penicilina. (Maldonado, 2022).

Otro estudio realizado por Pinzón et al, (2009), en el departamento de Boyacá, realizaron un estudio de los efectos de la mastitis subclínica en las vacas de 34 hatos ubicados en la región del alto Chicamocha con el fin de conocer el estado de infección de los animales y establecer los agentes patógenos causantes de la enfermedad, se sometieron al diagnóstico de la Prueba California para Mastitis California (CMT) 6616 cuartos en dos repeticiones con diferente estación climática, pero no se encontraron diferencias significativas entre las épocas de muestreo. Las muestras positivas a la prueba de CMT (CMT-2 y CMT-3) fueron sometidas a análisis microbiológicos que evidenciaron, en la mayoría de los casos de mastitis, la presencia de *Staphylococcus aureus*, principal agente infeccioso causante de la enfermedad en los cuartos analizados. Los resultados indican la estrecha relación que existe entre la rutina de ordeño y la presentación de mastitis. (Pinzón, 2009).

En investigaciones realizadas a nivel nacional como el de Rivera (2014) en Nandaime, Granada estudio un total de 65 vacas en ordeño durante un período de 3 meses, demostrando que existe una prevalencia en el hato que oscila del 13-35% para los diferentes muestreos, también, los mayores valores de la prevalencia por niveles de infestación fueron de 19 y 15% para los niveles leve y severo, respectivamente, siendo el leve el más predominante. Existe un alto porcentaje de reincidencia de mastitis subclínica de hasta 25%, lo que significa que la enfermedad se ha vuelto endémica, es necesario realizar al menos dos pruebas consecutivas

(muestreros generales y específicos) para realizar un buen diagnóstico de mastitis subclínica y desarrollar medidas de control una vez que se encuentran identificados los factores medioambientales, del manejo higiénico-sanitario y aquellos asociados al animal. (Rivera, 2014).

Así mismo Aguirre y Zeledón, (2007), en un estudio realizado en 6 fincas del municipio de León, mediante la técnica de fingerprinting a partir de la leche bovina encontraron una prevalencia de 52.1% de mastitis y el microorganismo mayormente encontrado fue el *Staphylococcus aureus*, además este resultado con un alto porcentaje de resistencia a antibióticos a los que se sometió. (Aguirre y Zeledón, 2007).

Por consiguiente, un estudio realizado por Salinas y Rivera en agosto (2006) en la finca San Emilio Comarca la Escoba, Municipio de Diriomo en el Departamento de Granada, realizaron un trabajo experimental donde los análisis de varianza, así como las estimaciones de los parámetros de cada factor fueron realizados con el Statical Análisis System (SAS) tomando en cuenta que toda la población está en producción lechera en ese momento. El tratamiento I: Solución de Anamú al 40%. Tratamiento II: Solución de Anamú al 20%. Tratamiento III: tratamiento testigo (Oxitetraciclina 200 mg, Bacitracina 250 mg, Neomicina 2 000 UI, y Prednisolona 10 mg). Existe una prevalencia del 39% con 43 vacas infectadas con el 61 % resultado negativo a la prueba de CMT. Los tratamientos 1 y 2 obtuvieron mejores resultados en el control y tratamiento de esta enfermedad que el tratamiento químico y a través del análisis de costos determinaron que es económicamente factible la utilización de la solución de Petiveria Alliaceae en el tratamiento de esta enfermedad. (Salinas y Rivera, 2006).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Caracterización.

Staphylococcus aureus es un patógeno causante de diversas infecciones en el ganado bovino ocasionan grandes pérdidas económicas a los ganaderos. La Mastitis bovina es un complejo singular de enfermedades, que causa una gran cantidad de pérdidas a nivel mundial y en especial en las regiones con una producción lechera intensiva, el 26.5% de las vacas lecheras sacrificadas en el continente americano es debido a trastornos ocasionados por la mastitis. Comúnmente es una enfermedad infecciosa causada por más de 137 especies bacterianas, siendo el *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* los principales microorganismos responsables de la misma. Según Aguirre y Zeledón (2007). En Nicaragua se encontró una prevalencia de 52.1% de mastitis y el microorganismo mayormente encontrado fue el *S. aureus*, además este resultó con un alto porcentaje de resistencia a los antibióticos a los que se sometió. La gran problemática se basa en la resistencia que *Staphylococcus aureus* a las principales familias de antibióticos causando un difícil tratamiento para la enfermedad.

Delimitación.

El siguiente estudio se realizó en la universidad nacional agraria, donde se clasificó el tipo de mastitis que presento el ganado vacuno y así se determinó el principal agente causal de dicha enfermedad, por medio de pruebas convencionales y el sistema automatizado VITEK 2 compact para identificar el género y especie de la cepa en estudio, en el período de marzo-mayo del año 2022.

Formulación.

¿Cuál es la prevalencia de *Staphylococcus aureus*, aislado del ganado vacuno con mastitis procedente de la universidad nacional agraria (UNA) de la ciudad de Managua - Nicaragua en el período de marzo-mayo del año 2022?

Sistematización.

¿Cuál es el tipo de mastitis que presenta el ganado vacuno procedente de la universidad nacional agraria (UNA) de la ciudad de Managua - Nicaragua en el período de marzo-mayo del año 2022?

¿Cuál es el perfil de susceptibilidad antimicrobiana que presentaron las cepas en estudio aisladas del ganado vacuno procedente de la Universidad Nacional Agraria (UNA) de la ciudad de Managua - Nicaragua en el período de marzo-mayo del año 2022?

¿Qué mecanismos de resistencia presentan las cepas en estudio por medio del sistema automatizado VITEK 2 compact aislado del ganado vacuno con mastitis procedente de la universidad nacional agraria (UNA) de la ciudad de Managua - Nicaragua en el periodo de marzo-mayo del año 2022?

3. JUSTIFICACIÓN

Staphylococcus aureus es una de las principales bacterias asociadas a causar mastitis al ganado vacuno, logrando así perjudicar al productor con altos costos económicos por el tratamiento y cuidado del ganado y así reduciendo la producción láctea, alterando la calidad de esta. En Nicaragua, existen datos estadísticos que evidencien la prevalencia del patógeno como causante de mastitis, por lo tanto, de manera de seguimiento, se realizó el trabajo titulado: prevalencia de *Staphylococcus aureus* aislado de la leche del ganado vacuno con mastitis procedente de la Universidad Nacional Agraria (UNA), durante el período de marzo-mayo del 2022.

La mastitis es una inflamación de la glándula mamaria que por lo general es de fácil erradicación, siendo los betalactámicos como la penicilina G, los macrólidos o tetraciclinas uno de los pilares más importante para el control y eliminación de la enfermedad, pero en ocasiones, esta puede llegar a complicarse, debido a que *Staphylococcus aureus*, es un patógeno que puede llegar a adquirir resistencia a las principales familias de antibióticos, acarreado así, los fracasos terapéuticos y una difícil erradicación de la infección.

Teniendo como finalidad, que este estudio pueda ser de mucha utilidad para zootecnista, médicos veterinarios y público lector, ya que la resistencia antimicrobiana, no solo abarca al ser humano, sino también a los animales y medio ambiente, habiendo interdependencia puesto que la sanidad animal y la del medio ambiente dependen en gran medida de las actividades humanas y de nuestra relación con la naturaleza, siendo esta una problemática global, enfocándonos como una sola salud, y así abriendo camino a realizar futuras investigaciones, para conocer aspectos clave del comportamiento de *Staphylococcus aureus*, como el principal agente causal de la mastitis bovina, y así tomar medidas preventivas ante dicha situación.

4. OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar la prevalencia de *Staphylococcus aureus* aislado de la leche del ganado vacuno procedente de la universidad nacional agraria (UNA) de la ciudad de Managua - Nicaragua en el período de marzo-mayo del año 2022.

Objetivos específicos:

- ❖ Clasificar el tipo de mastitis que presenta el ganado vacuno mediante el rango de células somáticas.
- ❖ Identificar el género y especie de *Staphylococcus aureus* mediante pruebas convencionales y el sistema automatizado VITEK 2 compact.
- ❖ Comprobar el perfil de susceptibilidad antimicrobiano mediante el sistema automatizado VITEK 2 compact en las cepas en estudio.
- ❖ Detectar los mecanismos de resistencia que presentan las cepas en estudio por medio del sistema automatizado VITEK 2 Compact.

5. MARCO TEÓRICO

6.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es un microorganismo que se encuentra ampliamente diseminado en el ambiente ya que posee características particulares de virulencia y resistencia contra antibióticos, lo cual representa un grave problema de salud, esto es, gracias a que su distribución se extiende a nivel mundial y el impacto en la morbimortalidad es considerable a nivel comunitario e intrahospitalario. En los humanos, causa una amplia variedad de enfermedades infecciosas y su principal impacto es ocasionado por las cepas de *S. aureus*, que son sumamente resistentes a la meticilina (MRSA), y otros antibióticos que antes eran eficaces contra el tratamiento de las infecciones. Desde el punto de vista genómico, la resistencia se produce por selección natural a través de mutaciones producidas al azar; sin embargo, también se pueden inducir artificialmente mediante la aplicación de una presión selectiva a una población, como sería el abuso o la utilización de antibióticos; asimismo, *S. aureus* tiene características genéticas que le han permitido convertirse en una de las bacterias más importantes en la clínica y en las enfermedades transmitidas por alimentos. (Manzo et al, 2014).

6.2. Características de *Staphylococcus aureus*

El género *Staphylococcus*, está formado por cocos Gram positivos, con un diámetro de 0.5 a 1.5 μm , agrupados como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas. Ogston introdujo el nombre de *Staphylococcus*, del griego *staphyle* que significa racimo de uvas, para describir a los cocos responsables de inflamación y supuración. Son bacterias no móviles, no esporuladas, no poseen cápsula, aunque existen algunas cepas que desarrollan una cápsula de limo, son anaerobias facultativas. La mayoría de los *Staphylococcus* producen catalasa (enzima capaz de desdoblar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre).

Los *Staphylococcus* fueron clasificados inicialmente en un género común en la familia *Micrococacea* además de los géneros *Micrococcus*, *Stomacoccus* y *Planococcus*. Sin

embargo, en estudios recientes se observaron diferencias con estos géneros, una de las principales es la cantidad de guanina-citocina (G+C de 30 a 39%), mientras que los *Micrococcus* tienen un contenido mayor de G+C de 63 a 73%. Los estudios de homología genética, secuenciación del DNA, hibridación DNA-rRNA, y la secuenciación comparativa del RNAr 16S, han permitido demostrar que los géneros *Staphylococcus* y *Micrococcus* están poco relacionados. Por otro lado, la pared celular de los estafilococos tiene unidos los ácidos teicoicos, los cuales no existen en los micrococcos; otra diferencia es la composición del citocromo y menaquinona de la cadena respiratoria presentes en los estafilococos. (Cervantes et al, 2014).

Staphylococcus aureus se trata de cocos Gram positivos que poseen tendencia a agruparse en racimos. Tienen una forma esférica y un diámetro de alrededor de una micra. Para apreciarla debemos contar con un aislamiento de la cepa a estudiar en una placa de Petri. El aislamiento nos permitirá observar las características de las colonias. En medios no selectivos, *S. aureus* presenta colonias de 1 a 3 mm de diámetro, lisas, levemente elevadas, de bordes enteros, levemente convexas y generalmente pigmentadas con un color que puede ir desde crema al amarillo. La producción de pigmento se ve favorecida si se incuban los cultivos por 24 a 48 horas adicionales a temperatura ambiente. Cuando crecen en agar sangre ovina se puede observar una zona de β -hemólisis alrededor de las colonias. (Sejia. 2011. P.258).

6.3.Patogenia

La infección por estafilococos por lo general se transmite de una vaca infectada a una no infectada durante el ordeño a través de pezoneras contaminadas, de las manos de los ordeñadores o de toallas o trapos de lavado usados en forma no individual. Las moscas han sido implicadas en la transferencia de *Staphylococcus aureus* de un animal a otro. (Mellenberger y Kirk, 2016).

La forma más habitual de la introducción de *Staphylococcus aureus* en una explotación es la compra de vacas nuevas (incluso si una ganadería ya está infectada, debemos tener cuidado con la incorporación de nuevos animales porque éstos pueden introducir nuevas cepas del patógeno que originarán nuevos brotes de mastitis). También se ha demostrado que las

moscas juegan un papel importante como vectores en la transmisión y propagación de la enfermedad.

La mayoría de las infecciones se producen durante los 3 primeros meses de lactación, son muy persistentes, en comparación con las infecciones provocadas por otros patógenos, y presentan un bajo porcentaje de curación bacteriológica durante la lactación. La infección latente por *Staphylococcus aureus* es muy común. Los animales positivos deben segregarse y ordeñarse en último lugar. Se recomienda la eliminación del animal del rebaño cuando el rango de células somáticas del portador asciende a 500.000 células/ml. En este momento la infección pasaría a ser crónica, sin posibilidad de curación. (Del cura, A. 2014).

6.4.El genoma de *Staphylococcus aureus*

El genoma de *S. aureus* es circular, compuesto de aproximadamente 2.8 kb, con un contenido bajo de G-C (33%), además su genoma contiene 2,600 marcos de lectura abierta representando un 84.5% de su genoma.

La comparación del genoma indica que 50% de las proteínas codificadas en el cromosoma de *S. aureus* presentan gran homología con *B. subtilis*, lo que sugiere que ambos organismos tuvieron un ancestro común y divergieron más tarde. La mayoría de los genes homólogos son un grupo de genes conocidos como housekeeping que son necesarios para el crecimiento y división de la bacteria.

El poder de adaptación de *S. aureus* a los antibióticos condujo, a principios de la década de 1960, a la aparición de *S. aureus* resistente a la metilina (MRSA). La causa de la resistencia a la metilina y a todos los demás antibióticos betalactámicos es el gen *mecA*, que se encuentra en un elemento genético móvil, el casete cromosómico estafilocócico *mec* (SCC*mec*). Se distinguen siete variantes principales de SCC*mec*, tipo I a VII. Las técnicas más importantes utilizadas para investigar la epidemiología molecular de *S. aureus* son la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), la tipificación de secuencias multilocus (MLST), la tipificación de proteína A (*spa*) de *S. aureus* y la tipificación SCC*mec* (solo para MRSA). Estas técnicas se han utilizado para estudiar la evolución de los clones de MRSA que han surgido desde principios de la década de 1960 y para estudiar su posterior diseminación mundial. (CDC, 2009).

6.4.1. Estructura y elementos que lo conforman

Una característica sobresaliente del genoma de *S. aureus* es la presencia de gran número de elementos móviles (plásmidos, secuencias de inserción y transposones), que contienen factores de virulencia y resistencia a diversos antimicrobianos. El estudio de estos elementos ha permitido explicar los mecanismos de conjugación, transformación y transducción del material genético a través de plásmidos móviles.

Los transposones pueden transportar uno o más marcadores de resistencia antibiótica. Se conocen varios tipos de transposones como el de la resistencia a eritromicina Tn551 codificado por el gen *ermB*. El transposón Tn 4001 codifica para la resistencia a kanamicina, tobromicina y gentamicina. El transposón Tn 4003 codifica para la resistencia a trimetoprim. El transposón Tn 552 contiene el operon *bla* que le confiere resistencia a la penicilina, a través de la producción de penicilinasas. El transposón Tn 554 se encuentra en el cromosoma de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA), el cual se ha utilizado para el seguimiento de clonas epidémicas de MRSA.

El análisis del genoma de *S. aureus* confirmó que contiene varias islas de patogenicidad (SaPIs), las cuales varían en tamaño; además, reveló características adicionales como es el contenido de genes de virulencia y de resistencia. (Cervantes y García, 2014).

6.5. Susceptibilidad antimicrobiana

El conocimiento de los patrones de susceptibilidad puede ser usado para orientar la elección de la terapia empírica mientras los resultados del cultivo y evaluación de la susceptibilidad están pendientes. Estos datos no reemplazan a los estudios de susceptibilidad de patógenos individuales. El siguiente informe entrega resultados de evaluación *in vitro* por método de difusión con disco (Kirby Bauer) y/o dilución/difusión (epsilometría-E-test®) que permite conocer la concentración inhibitoria mínima (CIM). Para cada antimicrobiano y microorganismo se han establecido las categorías de susceptible, intermedio o resistente según halos de inhibición, de acuerdo con criterios internacionales.

Se considera susceptible (S) a una cepa si puede ser tratada exitosamente con las dosis recomendadas del antimicrobiano para la especie bacteriana y sitio de infección.

La categoría intermedia (I) incluye cepas cuyas CIM pueden ser alcanzadas en sangre o tejidos con porcentajes de respuesta menor que las cepas susceptibles. El antimicrobiano se podrá usar en sitios donde alcance alta concentración o se pueda utilizar a mayor dosis.

Una cepa es resistente (R) si las concentraciones séricas del antimicrobiano con dosis indicadas para esa patología no inhiben su multiplicación (Camponovo, 2008).

6.5.1. Susceptibilidad antimicrobiana mediante el sistema automatizado VITEK®2 Compact

Los retos globales actuales de la atención sanitaria tales como los organismos multirresistentes (MDRO) implican que los laboratorios de microbiología precisen ser flexibles y sensibles para ofrecer la información adecuada en el momento adecuado. La eficiencia del equipo VITEK®2 Compact ofrece la capacidad para mejorar el éxito terapéutico y los resultados del paciente a través de una identificación microbiana fiable (ID) y de un análisis de la susceptibilidad antibiótica (AST). (Sanders, 2001).

Tarjeta de identificación Vitek GP, tarjeta para la identificación de Gram positivos, identificación rápida y precisa a nivel de especie de cocos Gram positivos clínicamente significativo.

Tarjeta Vitek AST- P663 está diseñada para el tamizaje de rutina de bacterias Gram positivas (*Staphylococcus spp*, *Enterococcus spp* y *Streptococcus agalactiae*) en estas tarjetas se incluyó Ceftarolina: cefalosporina de quinta generación con actividad in vitro en aislamientos de *Staphylococcus aureus* sensibles y resistentes a la meticilina también a la daptomicina: es un lipopéptido de acción bactericida en aislamientos de *Staphylococcus spp* resistentes a la meticilina. (Biomérieux, 2022).

6.6.Mecanismos de resistencia

Hay una serie de formas en que los microorganismos son resistentes a los agentes antimicrobianos. Estos incluyen:

-
- A. La bacteria produce enzimas (β -lactamasa) que destruyen el agente antimicrobiano antes que este alcance su blanco o modifica el agente antimicrobiano de tal forma que ya no puede ser reconocido por su blanco.
 - B. La pared celular se vuelve impermeable al agente antimicrobiano.
 - C. El sitio de ataque es alterado por mutación de tal manera que ya no permite la unión del agente antimicrobiano.
 - D. La bacteria posee una bomba de eflujo que expelle al agente antimicrobiano de la célula antes que este alcance su blanco. (Lacueva, 2017).

6.6.1. Mecanismos de resistencia presentes en *Staphylococcus aureus*

6.6.1.1. Mecanismos de resistencia a betalactámicos:

Producción de betalactamasas: Las betalactamasas son enzimas que hidrolizan el anillo betalactámico responsable de la actividad, por lo que inutilizan su actividad antimicrobiana. En condiciones normales, el gen blaZ está inhibido por el represor BlaI, pero la presencia de penicilina y sus análogos favorecen la producción de una proteína antirrepresora, BlaR1, la cual al autofragmentarse degrada secuencialmente el represor BlaI, permitiendo la expresión del gen blaZ, el cual codifica la betalactamasa que hidroliza e inactiva la penicilina G, las carboxipenicilinas, y las ureidopenicilinas aunque no hidroliza las cefalosporinas, y es posible inhibir su acción por inhibidores de las betalactamasas como el ácido clavulánico o el tazobactam.

Modificación de la diana: Síntesis de PBPs modificadas, es debido a alteraciones en la afinidad de las proteínas que se unen a penicilinas (PBPs), localizadas en la membrana bacteriana y que catalizan las reacciones de transpeptidación.

Los estafilococos producen al menos 4 PBPs (PBP1, PBP2, PBP3, PBP4), las cuales son inhibidas en presencia de betalactámicos. Sin embargo, los SARM (*Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina) se caracterizan por presentar una PBP modificada denominada PBP 2a, la cual, mientras las otras PBPs están inhibidas (PBP1, PBP2, PBP3, PBP4), sigue manteniendo la síntesis de peptidoglicano.

Esta PBP2a está codificada por el gen *mecA*, que se encuentra en el casete cromosómico SCCmec, lo cual permite la diseminación de este tipo de resistencia. Cuenta con dos genes reguladores, el gen *mecR1* y el gen *mecI*.

Cuando el betalactámico llega a la célula y se une a sus receptores de unión a penicilina de la membrana citoplasmática (codificado por el gen *mecR1*), desencadena una cascada que induce una proteasa autocatalítica a unirse al *mecI*, que básicamente bloquea el operón de la *mecA*, lo que activa dicho operón y produce la síntesis de PBP2a. El gen *mecA* se encuentra ampliamente distribuido en todo el género estafilococo coagulasa-negativo resistentes a meticilina. Este gen, a la vez confiere resistencia a la mayoría de los antibióticos betalactámicos, y a menudo, se asocia con fenotipos de multirresistencia a otras familias de antibióticos. (Lacueva, 2017).

6.6.1.2.Gen *mecA*

El gen *MecA*, responsable de la resistencia a la meticilina en *S. aureus*, no es endógeno y se encuentra integrado al cromosoma bacteriano, pudiendo ser detectado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El producto de expresión de este gen es una proteína de unión a la penicilina de 78 kDa, con baja afinidad por los antibióticos beta-lactámicos, llamada PBP2' o PBP2a. Este gen se encuentra dentro de un elemento cromosomal móvil heterogéneo conocido como " Staphylococcal cassette chromosome mec " (SSCmec). Los aislamientos que poseen este elemento genético presentan una disminución en la afinidad a meticilina, lo cual genera la resistencia bacteriana, por lo cual han sido utilizados en diversos estudios para caracterizar la resistencia a B-lactámicos.

Este elemento genético también ha sido encontrado en otras especies de *Staphylococcus* y se cree que las especies coagulasa negativas constituyen un reservorio para la adquisición de SSCmec. Diferentes tipos de SSCmec han sido reconocidos y mediante el uso de técnicas de tipificación molecular se ha logrado su caracterización, lo cual ha facilitado los análisis epidemiológicos de la distribución de *S. aureus* resistente a meticilina (Sánchez, 2013).

El SCCmec es un elemento genético móvil, insertado en el cromosoma de SARM en una localización específica en el extremo 3' del fragmento de lectura abierta OrfX (Open Reading frame) y su función es desconocida por el momento. Se han descrito elementos SCCmec estructuralmente diferentes, pero estos elementos comparten las siguientes características: son portadores del complejo génico mec y del complejo génico ccr, que codifica recombinasas específicas de sitio responsables de la movilidad del SCCmec. Estos elementos se integran en lugares específicos en el cromosoma de la bacteria denominados secuencias de inserción (IS431 y IS1272), que sirven de diana para las recombinasas ccr y en los extremos presentan secuencias repetidas que contienen las secuencias de inserción (Katayama Y, 2001).

Se han descritos tipos de SCCmec en función de las características de los genes ccr y secuencias adyacentes, así como de la secuencia de la zona mec y sus genes reguladores. También se diferencian según los determinantes genéticos adquiridos como resultado de la integración de plásmidos y transposones. Hasta el momento, se han descrito cinco tipos de SCCmec (I-V) y un determinado número de variantes o subtipos (IA, IIIA, IIIB, IVA, IVB, IVC) clasificados en base a la secuencia de la región J (junkyard), siendo siete las últimas variantes descritas (IIA, IIB, IIC, IID, IIE, IVE y IVF) (Ma XX, 2002).

Los primeros clones de MRSA estaban asociados al hospital (HA-MRSA). Sin embargo, desde finales de la década de 1990, surgieron en todo el mundo clones de MRSA asociados a la comunidad (CA-MRSA). CA-MRSA alberga SCCmec tipo IV, V o VII, la mayoría pertenece a otros linajes de *S. aureus* en comparación con HA-MRSA, y CA-MRSA a menudo se asocia con la presencia de la toxina Pantón-Valentine leukocidina (PVL). Sin embargo, durante los últimos años, la distinción entre HA-MRSA y CA-MRSA ha comenzado a desaparecer, y CA-MRSA ahora es endémico en muchos hospitales de EE. UU. MRSA probablemente se originó a través de la transferencia de SCCmec a un número limitado de linajes de *S. aureus* sensibles a la meticilina (MSSA). Esta revisión describe las últimas observaciones sobre la estructura de SCCmec, las técnicas utilizadas para estudiar la epidemiología molecular y la evolución de *S. aureus*, así como algunos desafíos a los que se enfrentan los investigadores en el futuro. (CDC, 2009).

La estructura genética de un *cassette* cromosomal de un *Staphylococcus* clásicamente hospitalario cuenta con determinantes adicionales de resistencia a otras familias de antibacterianos, configurando un clásico fenotipo de multi-resistencia. Es así como el SCC*mec* II es un *cassette* más grande que posee el transposón Tn554 en la región J2, el que es responsable de la resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas del grupo B, y, además, contiene el plásmido pUB110 integrado en la región J3, que determina resistencia a tobramicina.

Por otro lado, la estructura genética de un *cassette* cromosomal *Staphylococcus* comunitario cuenta con el *cassette* SCC*mec* IV de una estructura más simple y que sólo porta el gen resistencia *mecA*, por lo que habitualmente las cepas que tienen este *cassette* sólo son resistentes a β -lactámicos.

Es importante mencionar, que la separación entre SARM hospitalarios y comunitarios está poco a poco perdiendo validez, al menos en países con alta prevalencia de ambos patógenos. Debido a la creciente descripción de cepas de SARM clásicamente comunitarias en los hospitales, desplazando a otros clones nosocomiales menos exitosos. No obstante, en países con baja prevalencia de SARM de la comunidad la distinción aún podría ser útil. Cabe destacar, que la determinación del SCC*mec* como único blanco para la detección de resistencia a meticilina no se recomienda, ya que se han descrito elementos que no portan el gen *mecA*, pero contiene otros genes que codifican factores de virulencia o resistencia a otros antimicrobianos y metales pesados. (Aguayo et al, 2018).

6.6.1.2.1. Regulación de la expresión gen *mecA* en los Betalactámicos

En el caso de la Meticilina y Oxacilina, está determinado por la presencia del gen *mecA*, la cual codifica para una PBP alternativa, la PBP2a de baja afinidad por este antibiótico. La regulación del gen *mecA* viene de la codificación de la proteína MecR1 y el codificante de la proteína represora Mecl, que forman operón. Así mismo, participan otros genes reguladores como lo son las proteínas Blal y BlaRI, que controla la expresión de la Betalactamasa. (Obando et al., 2017).

Las proteínas de la pared son reguladas por los represores Mecl y Blal que están unidas en forma de dímero a las dos regiones operadoras situadas entre los genes *mecA* y *mecR1* y

entre los genes *blaZ* y *blaR1*. Sin embargo, el enlace reprime la transcripción a ARN de todos los genes, por lo que el gen *mecA* se reprime forzosamente. Cada uno de los dos monómeros de la proteína MecI está constituida por un dominio N-terminal que se une al ADN cromosómico (DBD: DNA-binding domain o dominio de unión) y un dominio C-terminal de dimerización (DD: Dominio de dimerización). Cuando se administra un betalactámico, podría ser Meticilina y Oxacilina, se genera la unión del dominio sensorial extracelular (PBP-domain) de la proteína de transmembrana MecR1. Al mismo tiempo, se desencadena la activación autolítica del dominio intracelular de MecR1 (MEP-domain) con la actividad metaloproteasa, lo que ocasiona la lisis del enlace de dimerización de la proteína MecI, donde se encuentra enlazado el gen *mecA*. Al desprenderse esa región, tanto como el gen *mecA* como la del operon *mecI-mecR1*, origina la producción de la PBP2a. (Bordes, 2015).

6.6.1.3. Resistencia a macrólidos-lincosamidas-estreptograminas (MLS)

Estos tres grupos, aunque presentan diferencias en su estructura química, comparten mecanismo de acción y resistencia. Su mecanismo consiste en interferir en la síntesis proteica en diferentes niveles de la traslocación peptídica, al inhibir la subunidad 50S del ribosoma, sobre todo en bacterias Gram positivas. (Lacueva, 2017).

La resistencia a todos estos antibióticos se desarrolla de 4 maneras.

Modificación de la diana (ARNr 23S) por la acción de metilasas codificadas por los genes *erm*, y en raras ocasiones por el gen *cfr*, o por mutaciones en el ARNr 23s o en las proteínas ribosomales L3, L4 y L22. Este gen confiere resistencia cruzada a macrolidos, lincosamidas y estreptograminas).

Expulsión activa del antimicrobiano por bombas de flujo, codificada por los genes *msrA* (resistencia a macrolidos y estreptograminas), *msrA*, *msrB*, *mefA/E*, *erpA*, *erpB*, *vgaA*, *vgaB*, *vgaC*, *vgaD*, *vgaE* e *isaA*, *isaB*, *isaC*, *isaE*, de origen plasmídico.

Inactivación enzimática del antibiótico, codificado por los genes: *inuA*, *inuB*, *inuC* *vatA*, *vatB*, *vatC*, *vgbA*, *vgbB* y *mphC*. El gen *inuA* confiere resistencia a lincosamidas y los genes *vat* y *vgb* a estreptograminas.

Modificación de la diana por mutación del RNAr 23S y proteínas ribosomales.

6.6.1.4. Resistencia a Glucopéptidos

En este grupo resaltamos la vancomicina.

Su mecanismo de acción, al igual que los betalactámicos, también consiste en la inhibición de la síntesis de la pared bacteriana, pero estos actúan inhibiendo la polimerización del peptidoglicano. Secundariamente también alteran la permeabilidad celular y la síntesis de RNA. Ejercen una rápida acción bactericida, pero solo en bacterias con crecimiento activo. Su mecanismo de acción es debido a la inhibición del proceso de transglicosilación en la formación de la pared celular bacteriana uniéndose a las moléculas precursoras (N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina).

La vancomicina se ha considerado el principal soporte de tratamiento para cepas de *S.aureus* resistente a meticilina, ya han aparecido cepas resistentes debido a otros mecanismos, al engrosamiento de la pared celular y un aumento de la expresión de PBP2a, o de una manera más específica, por la adquisición del gen vanA, que confiere mayor nivel de resistencia dando lugar a las denominadas cepas SARM medio resistentes a vancomicina (VISA) y resistentes (VRSA). (Lacueva, 2017).

Cepas VISA y VRSA

Dependiendo de si la resistencia es intermedia o total, poseen diferente mecanismo. Las cepas VISA no poseen genes vanA, vanB, vanC, los cuales producen resistencia a glucopeptidos en *enterococos*, Las cepas VISA sintetizan grandes cantidades de peptidoglicano aumentando la cantidad de residuos de D-alanil-Dalanina que se unen a las moléculas de vancomicina y las capturan impidiendo así que estas moléculas alcancen su diana en la membrana citoplasmática. El elemento regulador *tcaA* que codifica una proteína transmembrana, y el gen regulador accesoria *agr* se asocian con una disminución en la sensibilidad de *S. aureus* a los glucopéptidos. Los cambios estructurales en los ácidos teicoicos de la pared celular pueden ser también un mecanismo complementario de resistencia, al reducir la velocidad de degradación de la pared celular, en vez de aumentar la velocidad de síntesis de esta.

Las cepas VRSA, sin embargo, sí que poseen el gen vanA, probablemente transferido por conjugación por el *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina. Esto causa una alteración

en el péptido terminal D-alanil-D-alanina a D-alanil-D-lactato, lo que impide el correcto funcionamiento de la vancomicina. (Lacueva, 2017).

6.7. Manifestaciones clínicas

Zoetis (2007) afirma que según el tipo de patógeno implicado, la fiebre y el letargo pueden estar asociados a signos claros de inflamación de la glándula mamaria (enrojecimiento, calor, hinchazón, dolor) que provocan cambios químicos, físicos y habitualmente bacteriológicos en la leche (desde ligeros grumos hasta coágulos de fibrina en una leche de consistencia acuosa).

6.8. Mastitis clínica por *Staphylococcus aureus*

Según Fernández et al. (2012). La mastitis clínica es definida como una anomalía en la glándula mamaria, enrojecimiento de la misma, la leche puede presentar una apariencia anormal y, en algunos casos, hay aumento de la temperatura rectal, letargo, anorexia e incluso la muerte. Además, las bacterias como el *Staphylococcus aureus* están presentes en la leche, lo que reduce el rendimiento y la calidad de la leche considerablemente. En los casos en que la inflamación de la ubre es acompañada de signos clínicos, es diagnosticada entonces como mastitis clínica, la mastitis clínica puede presentarse de forma aguda y se caracteriza por su aparición súbita. En la forma crónica, se presenta una infección de larga duración, con leche de apariencia anormal o cambios al realizar la palpación del tejido de la ubre. (pág. 2).

La mastitis clínica es una anomalía fácilmente observada por los granjeros en cualquiera de los dos casos: la leche o la ubre. En los casos de mastitis clínica, el cuarto infectado en general se inflama y en algunas vacas se encuentra adolorido al tocarlo, la leche se encuentra visiblemente alterada por la presencia de coágulos, descamaciones, o suero descolorido y algunas veces sangre. (Rivera, 2014).

Los leucocitos polimorfonucleares desempeñan un papel central en la patogénesis de la mastitis bovina. Se demostró que la provocación intramamaria con *Staphylococcus aureus* induce cambios cuantitativos y cualitativos en los leucocitos polimorfonucleares de las glándulas mamarias. La infusión intramamaria de interleucina-1 beta e interleucina-2 bovinas

recombinantes provocó una respuesta celular similar. *Staphylococcus aureus*, interleucina-1 beta e interleucina-2 aumentaron el número de células somáticas después de la infusión intramamaria y activaron la producción inducible de superóxido en leucocitos polimorfonucleares de leche. (Daley, 1991).

Andresen (2001). Afirma que “La mastitis clínica causa pérdidas económicas evidentes para el ganadero, lo que concita su preocupación para resolver el problema.” (pág. 55).

6.9. Mastitis subclínica por *Staphylococcus aureus*

La mastitis subclínica se caracteriza por la presencia de un microorganismo en combinación con un conteo elevado de células somáticas en leche, esta puede desarrollar fácilmente una inflamación y no tener tratamiento, este tipo de mastitis no presenta cambios visibles en la leche o ubre. Apenas se percibe una reducción en el rendimiento de la leche, siendo alterada su composición por la presencia de componentes inflamatorios y bacterias. En la práctica, los casos de mastitis subclínica con frecuencia no son detectados rápidamente, o pueden incluso no ser reconocidas por el ordeñador. Para identificar estos casos de mastitis se hace necesario las técnicas de laboratorio como la medición del conteo de células somáticas y el cultivo bacteriológico. (Fernández et al, 2012).

La denominación mastitis subclínica hace referencia a que, a pesar de la existencia de infección en la ubre, no existen cambios externos visibles que manifiesten la condición patológica en el animal.

La mastitis subclínica evoluciona sin signos inflamatorios externos; los signos más importantes son el aumento del contenido celular de la leche y la presencia de los microorganismos causales en la ubre.

Ocurre cuando un patógeno infecta uno o más cuartos, pero no causa suficiente daño a los alvéolos, no es fácilmente visible por el operario, pues todos los cuartos de la vaca se ven normales y la leche tiene apariencia normal, con aproximadamente 500.000 unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml) pero hay cambios importantes en la composición de la leche.

En las mastitis subclínicas, una gran proporción de las glándulas afectadas no se identifican fácilmente por palpación manual de la ubre ni por el examen visual con la copa de fondo oscuro. Debido a estas circunstancias, el diagnóstico de este tipo de mastitis depende de pruebas como el CMT (California Mastitis Test), que permiten identificar el grado de infección subclínica.

En la actualidad, la mastitis subclínica es la forma predominante. Al no ser detectada constituye un auténtico peligro para el estado sanitario de las vacas ya que por la leche se eliminan gérmenes que serán transmitidos a otras vacas a través de los utensilios de ordeño.

La mastitis subclínica puede convertirse en mastitis clínica; en esto estriba su importancia, junto al peligro que representa para la vacada y la pérdida de la producción lechera. Es posible que la mastitis subclínica se cure espontáneamente, pero no siempre es previsible tal eventualidad.

La mastitis subclínica, causada frecuentemente por bacterias de los géneros *Staphylococcus*, tiene mayor importancia económica que la forma clínica, pues es 25 a 40 veces más frecuente y se presenta antes de la condición clínica. La inflamación subclínica es, en la mayoría de los casos, de larga duración, difícil de diagnosticar e influye en la calidad de la leche, disminuyendo sensiblemente la producción.

El efecto de esta enfermedad en la productividad del hato es subestimado debido a que el número de animales subclínicamente enfermos usualmente es mayor que el número de animales clínicamente enfermos. La incapacidad para identificar enfermedad subclínica y la larga duración de estos síndromes permiten que estas enfermedades tengan un impacto considerable en la productividad del hato. (Pinzón et al, 2009).

Según Zoetis (2007) “La leche tiene apariencia normal y no hay signos visibles de inflamación en la glándula mamaria y el recuento de células somáticas de la leche del animal es elevado.”

6.10. Epidemiología

La mastitis es una infección en la glándula mamaria que se produce a través del conducto del pezón, a partir de dos fuentes principales de contaminación: la ubre infectada y el medio, por

lo tanto, su epidemiología principalmente se basa por el agente infeccioso *Staphylococcus aureus*.

La mastitis por *Staphylococcus aureus* está distribuida a nivel mundial principalmente en América latina y países africanos predominando en un 57%; y en menor proporción en Europa, siendo la infección más común presente en el ganado vacuno.

Aunque no es frecuente, en algunos casos se puede dar la muerte del animal afectados por determinados tipos de mastitis sobreaguda, se sugiere que la mastitis por *Staphylococcus aureus*, puede influir en la reproducción al provocar ciclos estrales anormales, niveles séricos bajos de progesterona y abortos durante la primera semana de gestación. Económicamente la mastitis sub clínica por *Staphylococcus aureus* son más importantes que las clínicas ya que su prevalencia es más alta, la respuesta inflamatoria de los cuarterones afectados provoca un aumento del recuento de células somáticas (RCS) en la leche, lo que penaliza su precio e incluso puede imposibilitar la comercialización de esta. (López, 2014).

6.11. Tratamiento

Aunque la prevención es la mejor forma de tratar la mastitis, todo ganadero debe estar preparado para saber qué hacer si una o varias de sus vacas enferman.

Antes que nada, debes saber que el tratamiento variará en dependencia del microorganismo causante de la enfermedad:

Mastitis causada por *Staphylococcus aureus*: Para tratar este tipo de mastitis, se debe hacer un cultivo de la bacteria y prescribir tratamiento con antibióticos. Es importante tratarla a tiempo, porque puede causar mastitis crónica. (Enciso, 2022)

Entre los principales tratamientos antimicrobianos intramamarios empleados con diferentes tasas de éxito para el control de la mastitis bovina se pueden citar:

- Betalactámicos de la familia de las Penicilinas como: Penicilinas G naturales (sódica, potásica, procaínica y benzatínica), sintéticas como ampicilina, amoxicilina y Penicilinas antiestafilocócicas (cloxacilina, oxacilina, nafcilina, meticilina);
- Betalactámicos de la familia de las cefalosporinas (cefapirina, cefalonium, cefalotina, cefoperazona, ceftiofur, cefquinoma).

-
- Fluoroquinolonas como la norfloxacin.
 - Tetraciclinas como la Oxitetraciclina.
 - Macrólidos como la Eritromicina.
 - Lincosamidas como la lincomicina y pirlimicina.

Adicionalmente, los tratamientos antiinflamatorios en casos de mastitis bovina son comunes y a la vez necesarios, antiinflamatorios no esteroideos como el carprofeno pueden ser utilizados para acelerar la recuperación de la glándula mamaria en terapias concomitantes con antibióticos. (Genética bovina, 2022).

6.12. Prevención

La mastitis es un problema poblacional multifactorial imposible de erradicar; por consiguiente, su control depende de la aplicación de un sistema integral de medidas cuyos objetivos son: reducir la tasa de nuevas infecciones y reducir el tiempo de infección de cada caso de mastitis.

Reducción de la tasa de nuevas infecciones

Factores que intervienen

- Confort de la vaca, limpieza del medio ambiente; sobre todo de los corrales
- Nutrición: basadas en vitaminas A y E, Beta-caroteno, Selenio, zinc y cromo
- Procedimientos de ordeño: higiénicos y correctos.
- Mantenimiento de la máquina de ordeño.
- Sellados pre y post-ordeño.
- Vacunaciones.

Todos estos factores en conjunto hacen que el ganado evite contraer patógenos que pueden causar los diferentes tipos de mastitis y así no provocar daños económicos y a la salud de la población. (Andresen, 2001).

6.13. Prueba para la clasificación del tipo de mastitis

6.13.1. Mastitis test california (CMT)

La prueba de California de mastitis conocida como California Mastitis Test (CMT) es un examen sencillo que con exactitud predice el conteo de células somáticas ya sea, a partir de cada cuarto o en muestras de leche.

La exactitud del CMT se fundamenta en tres principios:

1. El número de leucocitos (células blancas) incrementa enormemente en número cuando una lesión o una infección afectan el tejido mamario.
2. Los leucocitos, especialmente los polimorfonucleares tienen un núcleo extenso con material nuclear (ADN) comparadas con otras células o bacterias de la leche.
3. Las paredes de los leucocitos son principalmente lípidos (grasa).

El reactivo CMT es un detergente con un indicador de pH añadido, razón del color púrpura, cuando la leche y el reactivo se mezclan en igual cantidad, el reactivo de CMT, disuelve o rompe las paredes celulares externas y las nucleares de cualquier leucocito, constituidas principalmente de grasa (el detergente disuelve la grasa), el ADN ahora se libera desde el núcleo.

El ADN se gelifica formando una masa fibrosa; debido a que el número de leucocitos se incrementa en los cuartos afectados, la cantidad de gel formado se incrementará en una forma lineal, además, la formación puede ser clasificada en función al resultado del conteo de células somáticas. (Hernández et al, 2008).

El test california para la detección de mastitis es un método indirecto que permite estimar la cantidad de ácido desoxirribonucleico (ADN) de las células nucleadas en la leche. Se considera un método fiable para determinar la mastitis subclínica de una forma rápida durante el ordeño, tiene una alta correlación con el recuento de células somáticas en la ubre, siendo un excelente indicador de los cuartos sospechosos de la ubre en las vacas con descargas celulares. (Aida, 2017).

Según Echeverri, et al (2010) la Prueba de California para Mastitis (CMT) ha sido empleada durante muchas décadas, y sigue siendo la prueba más utilizada a nivel de campo para el diagnóstico de mastitis clínica y subclínica en el ganado bovino lechero. Es una prueba sencilla que es útil para detectar la mastitis subclínica por valoración aproximada del recuento

de células somáticas de la leche. No proporciona un resultado numérico, sino más bien un resultado categórico.

Consiste en el agregado de un detergente a la leche, el alquilauril sulfonato de sodio, causando la liberación del ADN de los leucocitos presentes en la ubre, y éste se convierte, en combinación con agentes proteicos de la leche, en un complejo gelatinoso. Los resultados pueden ser interpretados en cinco clases: desde el resultado negativo en el que la leche y el reactivo siguen siendo acuosos, hasta el recuento de células más elevado, en el que la mezcla de la leche y el reactivo casi se solidifican.

El reactivo de California para la prueba de mastitis posee entre sus componentes un tensoactivo que disminuye la tensión superficial de los leucocitos presentes en la leche de la vaca con mastitis, por lo que al disminuir la tensión superficial se produce el estallido de los leucocitos y su contenido, al ponerse en contacto con el producto, forma el complejo gelatinoso en la raqueta.

El test de California provee una predicción confiable del recuento de células somáticas y permite confiable advertencia en sistemas de detección temprana de nuevos casos de mastitis subclínica y medidas correctivas que pueden ser iniciadas antes de que la enfermedad llegue a ser crónica. El desarrollo regular del CMT es, por consiguiente, un método económico y efectivo para reducir el riesgo de mastitis subclínica en los hatos lecheros.

Los resultados pueden ser interpretados en cinco clases desde el resultado negativo en el que la leche y el reactivo siguen siendo acuosos, hasta el recuento de células más elevado en el que la mezcla de la leche y el reactivo casi se solidifica. Esto se determina en relación a la reacción de gelificación.

Resultados.

N = Negativo (No Infectado). No hay espesamiento de la mezcla.

T= Trazas (Posible Infección). Ligero espesamiento de la mezcla. La reacción “Trazas” parece desvanecerse con la rotación continua de la raqueta. Ejemplo: Si en los 4 cuartos se leen “trazas”, no hay infección. Si en uno-dos cuartos se leen “trazas”, hay posible infección.

(+) = Positivo Débil (Infectado). Definido espesamiento de la mezcla, pero sin tendencia a formar gel. Si la raqueta se rota por más de 20 segundos, el espesamiento puede desaparecer.

(++) = Positivo Evidente (Infectado). Inmediato espesamiento de la mezcla con ligera formación de gel. Mientras la mezcla se agita, esta se mueve hacia el centro de la copa, exponiendo el fondo del borde externo. Cuando el movimiento se detiene, la mezcla se nivela y cubre todo el fondo de la copa.

(+++)= Positivo Fuerte (Infectado). Hay formación de gel y la superficie de la mezcla se eleva (como un huevo frito). Esta elevación central permanece aún después de detener el movimiento de rotación de la raqueta de CMT.

Interpretación de los grados del CMT

El grado de CMT está directamente relacionado con el promedio del conteo de células somáticas.

En esta tabla 1 se muestra como están relacionados. Una reacción de T (trazas) o más indica que hay mastitis subclínica en el cuarto.

Tabla 1. Interpretación de california mastitis test

Grado de CMT	Rango de células somáticas	Interpretación
Negativo	0-200,000	Cuarto sano
Traza	200,000-400,000	Mastitis subclínica
1	400,000-1,200,000	Mastitis clínicas
2	1,200,000-5,000,000	Infección seria
3	Más de 5,000,000	Infección severa

Fuente: (Hernández et al, 2008).

6.14. Pruebas presuntivas, confirmativas y sistema automatizado VITEK 2 Compact, para la identificación de *Staphylococcus aureus*

6.14.1. Tinción de Gram

La tinción de Gram es un tipo de tinción que se realiza sobre las bacterias para observarlas mejor bajo el microscopio. Según la distribución del peptidoglicano de la pared celular que las envuelve, se tiñen de una forma u otra.

Así, las bacterias que no se tiñen mediante esta técnica se denominan **Gram negativas**, están formadas por una pared más fina formada por menos capas de peptidoglicano y una segunda membrana rica en lípidos (que repele la tinción Gram), al microscopio aparecen incoloras.

Las **Gram positivas** tienen una pared celular mucho más gruesa, formada por un gran número de capas de peptidoglicanos entre las que se inserta la tinción Gram, dando un color violeta intenso al microscopio y se clasifican como Gram + (Ormaechea, 2021).

Es definida como una tinción diferencial, ya que utiliza dos colorantes y clasifica a las bacterias en dos grandes grupos: bacterias Gram negativas y bacterias Gram positivas. En microbiología clínica resulta de gran utilidad, ya que a partir de muestras clínicas directas provenientes de sitios estériles se puede saber de manera rápida las características de la muestra y hacer una diferencia de los potenciales microorganismos causantes de una infección.

Los principios de la tinción de Gram están basados en las características de la pared celular de las bacterias, la cual le confiere propiedades determinantes a cada microorganismo. Así pues, la composición química y el contenido de peptidoglicano en la pared celular de las bacterias Gram negativas y Gram positivas explica y determina las características tintoriales.

La tinción de Gram se basa en colocar como colorante primario cristal violeta, el cual tiene afinidad con el peptidoglicano de la pared bacteriana. Posteriormente, se coloca lugol, el cual sirve como mordiente e impide la salida del cristal violeta por la formación de un complejo cristal violeta - yodo que satura los espacios del peptidoglicano de la pared bacteriana. En seguida, se coloca una mezcla de alcohol-acetona, la cual deshidrata la pared bacteriana y cierra los poros de la misma, también destruye la membrana externa de las bacterias Gram negativas debido a que ésta es soluble a la acción de solventes orgánicos, como la mezcla de alcohol- acetona, las bacterias Gram positivas, al contener una gran cantidad de peptidoglicano, retienen con mayor fuerza este complejo, mientras que las Gram negativas no lo pueden retener por tener menos cantidad de peptidoglicano. Por último, se coloca

safranina, la cual funciona como un colorante secundario o de contra tinción y sirve para teñir las bacterias que no pudieron retener el complejo cristal violeta-yodo. (López et al, 2014).

6.14.2. Catalasa

Es un enzima presente en la mayoría de los microorganismos que poseen citocromos. Las bacterias que sintetizan catalasa hidrolizan el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso que se libera en forma de burbujas.

El principal objetivo de esta prueba es separar *Micrococacceae* (positiva) de *Streptococcus spp.* y *Enterococcus spp.* (negativa).

Se utiliza en un procedimiento cualitativo para determinar la actividad de catalasa de las bacterias. La enzima catalasa está presente en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas, con la excepción importante de los *estreptococos* y *enterococos*. La enzima catalasa descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno.

El peróxido de hidrógeno, producto final del metabolismo aerobio de los hidratos de carbono, es muy tóxico para las bacterias. Las bacterias que contienen la enzima catalasa descomponen el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. Los organismos que poseen catalasa evidencian la reacción en 3% de peróxido de hidrógeno por la generación rápida de burbujas de gas. (Fernández et al, 2010).

6.14.3. Coagulasa

Es una enzima que coagula el plasma oxalatado o citratado en presencia de un factor contenido en muchos sueros, este factor sérico reacciona con la coagulasa para generar esterasa como actividades de coagulación de una manera semejante a la activación de la protrombina hasta trombina.

Se realiza para comprobar la facultad de la bacteria de coagular el plasma como acción de la enzima coagulasa, la cual aumenta la velocidad de coagulación del plasma. El resultado final es la formación de un coagulo de fibrina. (Torrico, 2018).

Es una técnica de laboratorio que se utiliza para poner en evidencia la presencia de la enzima coagulasa. Esta enzima tiene la propiedad de coagular el plasma. Esta prueba se realiza a los

cocos Gram positivos, catalasa positivos, permitiendo distinguir las cepas de *Staphylococcus aureus* del resto de los estafilococos, ya que él es el único microorganismo de importancia clínica que la produce. los miembros de la Familia *Staphylococaceae* que dan esta prueba negativa son a menudo denominados *Staphylococcus* coagulasa negativos.

La enzima coagulasa debe su nombre a la acción que produce. Esta tiene la capacidad de transformar el fibrinógeno en fibrina, creando un coágulo evidente cuando se halla en el plasma, es decir, esta enzima simula la actividad de la trombina de la cascada de la coagulación.

Para realizar la prueba de la coagulasa basta con enfrentar un cultivo fresco de *Staphylococcus* con un plasma preferiblemente de conejo y así observar la formación o no del coágulo. (Gill, 2019).

6.14.4. DNAsa

Utilizada para identificar los *estafilococos* potencialmente patógenos

DNasa Test Agar, contiene nutrientes como la triptona que le proporciona nutrientes para el crecimiento, el cloruro sódico mantiene el equilibrio osmótico, el alto nivel de ácido desoxirribonucleico molecular hace posible la detección de la desoxirribonucleasa (DNasa) que despolimeriza el ADN.

Después de la incubación del medio con la cepa de prueba, la placa se inunda con ácido clorhídrico, que causa la precipitación del ADN polimerizado y hace al medio opaco. Los organismos que degradan el ADN producen una zona transparente alrededor del área de crecimiento. Este medio se utiliza principalmente en la identificación de los *estafilococos*, pero también puede usarse para la detección de la actividad de la DNasa en otros microorganismos. (Becton Dickinson, 2003).

Este medio de cultivo, permite diferenciar bacterias que poseen la enzima desoxirribonucleasa de aquellas que no la poseen, la presencia de la enzima, se puede detectar mediante el agregado de ácido clorhídrico.

El ácido desoxirribonucleico hidrolizado presenta transparencia, mientras que el ácido desoxirribonucleico polimerizado, precipita y torna opacidad al medio de cultivo. (Britania, 2009).

6.14.5. VITEK 2 Compact.

Es perfecto para la identificación microbiana de rutina en las compañías Biofarmacéuticas, el sistema automático que garantiza la excelencia y optimiza su flujo de trabajo.

La eficiencia del sistema VITEK[®] 2 Compact se debe a su tecnología colorimétrica avanzada: el sistema lee las tarjetas analíticas VITEK de nueva generación —que contienen 64 pocillos para asegurar la precisión— cada 15 minutos utilizando tres longitudes de onda diferentes. Con esta técnica se analizan más datos, lo que aumenta la precisión de los resultados.

Ventajas básicas de VITEK[®] 2 Compact para la identificación microbiana:

- Aumento de la productividad y la seguridad gracias a la automatización.
- Resultados en el mismo día o al día siguiente.
- Máxima precisión, que se traduce en una mayor confianza en los resultados.
- Incluido en el BAM (Manual de análisis bacteriológico) y conforme con la norma ISO 7218.
- Conforme con la norma 21 CFR, parte 11.
- Con validación AOAC OMA (tarjetas BCL, GP y GN).
- Menú de análisis completo.
- Posibilidad de introducir nuevas entradas de microorganismos en la base de datos, con la aplicación SRF (Supplemental React File).
- Sistema y software de manejo intuitivo.
- Trazabilidad con las tarjetas analíticas con códigos de barras. (Biomérieux, 2022)

7. DISEÑO METODOLÓGICO.

7.1. Tipo de estudio.

El tipo de investigación es de carácter **descriptivo**, de corte **transversal**; debido a que la presente investigación se desarrolló en un espacio de tiempo determinado, y se utilizaron instrumentos en donde se midió y verificó las variables a estudiar, el enfoque de la investigación es de tipo **cuantitativo** ya que el estudio del análisis de datos numéricos da la solución del problema planteado.

7.2 Área de estudio.

Esta investigación se realizó en la facultad de ciencia animal (FACA) perteneciente a la Universidad Nacional Agraria en el año 2022, donde se encuentra el ganado vacuno.

7.3 Universo.

El universo está conformado por 100 cuartos mamarios de 25 vacas analizadas con el test de mastitis california para clasificar el grado de mastitis que poseen los bovinos.

7.4 Muestra.

La muestra está comprendida por 21 cuartos mamarios de 19 vacas con diagnóstico subjetivo a mastitis sub clínica.

7.5 Tipo de Muestreo.

Se realizó un muestreo no Probabilístico por conveniencia, este tipo de estudio permite seleccionar aquellos casos accesibles que acepten ser incluidos.

7.6 Criterios de inclusión.

- Piel de la ubre y pezones asépticos
- Cuartos mamarios con diagnóstico subjetivo a mastitis por el test california.

7.7 Criterios de exclusión.

- Cuartos mamarios con resultado negativo a mastitis

7.8 Operacionalización de variables.

Variable	Subvariable	Indicador	Valor	Criterio	Instrumento de recolección de la información.
Grado de mastitis presente en el ganado bovino	Test mastitis california	Conteo de células somáticas	0-200,000 cél/ml	Vaca sana	Informe de laboratorio
			200,000 – 400,000 células/ml	Mastitis subclínica	
			400,000- 1,200,000 cél/ml	Mastitis clínica	
			1,200.000- 5,000,000 cél/ml	Infección seria	
			Más de 5,000,000 cél/ml	Infección severa	
Agar sangre de carnero al 5%		Colonias grises, amarillo dorado de 1-2mm, beta- hemolíticas		Presencia	Informe de laboratorio
		Otras características		Ausencia	

Identificación de <i>Staphylococcus aureus</i>	Catalasa	Producción inmediata e intensa de burbujas.		Positivo	Informe de laboratorio
		No hay producción de burbujas.		Negativo	
	Gram	Cocos Gram positivos en forma de racismo de uvas		Positivo	Informe de laboratorio
		Otro tipo de morfología		Negativo	
	Coagulasa	Formación de coágulo		positivo	Informe de laboratorio
		No hay formación de coágulo		Negativo	
	D-NASA	Zona clara rodeando las colonias		Positivo	

		Sin producción de zona clara que rodea las colonias		Negativo	Informe de laboratorio
Identificación microbiana	Vitek 2 compact (GP)	Organismo (<i>Staphylococcus aureus</i>)		Presencia Ausencia	Informe de laboratorio
		Cefoxitina (FOX)	$\leq 4 \mu\text{g/mL}$	Sensible	Base de datos y hoja de resultado
				Intermedio	
			$\geq 8 \mu\text{g/mL}$	Resistente	
		Levofloxacin (LVX)	$\leq 1 \mu\text{g/mL}$	Sensible	Base de datos y hoja de resultado
			$2 \mu\text{g/mL}$	Intermedio	
			$\leq 4 \mu\text{g/mL}$	Resistente	
		Nitrofurantoina (NIT)	$\leq 32 \mu\text{g/mL}$	Sensible	Base de datos y hoja de resultado
			$64 \mu\text{g/mL}$	Intermedio	
			$\geq 128 \mu\text{g/mL}$	Resistente	

Perfil de susceptibilidad antimicrobiana presente en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> , según CLSI-2022	Vitek 2 compact (AST-P663)	Penicilina G (PEN)	$\leq 0.12 \mu\text{g/mL}$	Sensible	Base de datos y hoja de resultado
			-	Intermedio	
			$\geq 0.25 \mu\text{g/mL}$	Resistente	
		Eritromicina (ERY)	$\leq 0.5 \mu\text{g/mL}$	Sensible	Base de datos y hoja de resultado
			1-4 $\mu\text{g/mL}$	Intermedio	
			$\geq 8 \mu\text{g/mL}$	Resistente	
		Linezolid (LZD)	$\leq 4 \mu\text{g/mL}$	Sensible	Base de datos y hoja de resultado
			$\leq 4 \mu\text{g/mL}$	Intermedio	
			$\geq 8 \mu\text{g/mL}$	Resistente	
		Rifampicina (RIF)	$\leq 1 \mu\text{g/mL}$	Sensible	Base de datos y hoja de resultado
			-	Intermedio	
			$\geq 4 \mu\text{g/mL}$	Resistente	
		Daptomicina (DAP)	$\leq 1 \mu\text{g/mL}$	Sensible	Base de datos y hoja de resultado
			-	Intermedio	
			-	Resistente	
		Ciprofloxacina (CIP)	$\leq 1 \mu\text{g/mL}$	Sensible	Base de datos y hoja de resultado
			-	Intermedio	
			$\geq 4 \mu\text{g/mL}$	Resistente	
		Tetraciclina (TYC)	$\leq 4 \mu\text{g/mL}$	Sensible	Base de datos y hoja de resultado
			8 $\mu\text{g/mL}$	Intermedio	
			$\geq 16 \mu\text{g/mL}$	Resistente	

		Trimetoprima/ sulfametoxazol (SXT)	$\leq 2/38 \mu\text{g/mL}$	Sensible	Base de datos y hoja de resultado
			-	Intermedio	
			$\geq 4/76 \mu\text{g/mL}$	Resistente	
		Oxacilina (OXA)	$\leq 2 \mu\text{g/mL}$	Sensible	Base de datos y hoja de resultado
			-	Intermedio	
			$\geq 14 \mu\text{g/mL}$	Resistente	
		Clindamicina (C)	$\leq 0.5\mu\text{g/mL}$	Sensible	Base de datos y hoja de resultado
			1-2 $\mu\text{g/mL}$	Intermedio	
			$\geq 4 \mu\text{g/mL}$	Resistente	
		Vancomicina (VAN)	$\leq 2\mu\text{g/mL}$	Sensible	Base de datos y hoja de resultado
			4-8 $\mu\text{g/mL}$	Intermedio	
			$\geq 16 \mu\text{g/mL}$	Resistente	
		Ceftarolina (CFT)	$\leq 1\mu\text{g/mL}$	Sensible	Base de datos y hoja de resultado
			-	Intermedio	
			$\geq 8 \mu\text{g/mL}$	Resistente	
Actividad enzimática	P: ≤ 0.12 $\mu\text{g/mL}$	Sensible			
	P: ≥ 0.25 $\mu\text{g/mL}$	Resistente			

Mecanismo de resistencia presente en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	Vitek 2 compact (AST-P663) y técnica de D-Test	Modificación del sitio blanco	Oxa: ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$ Fox: ≤ 4 $\mu\text{g/mL}$	Sensible	Base de datos y hoja de resultado
			Fox: $\geq 8\mu\text{g/mL}$ Oxa: $\geq 14\mu\text{g/mL}$	Resistente	
		Metilasa inducible	E: $\geq 8 \mu\text{g/MI}$ C: $\leq 0.5\mu\text{g/mL}$	E: resistente C: sensible	
			E: $\leq 0.5\mu\text{g/mL}$ C: $\leq 0.5\mu\text{g/mL}$	E. sensible C: sensible	
		Metilasa Constitutable	E: $\leq 0.5\mu\text{g/mL}$ CC: $\leq 0.5\mu\text{g/mL}$	Sensible	
			E: $\geq 8 \mu\text{g/mL}$ CC: $\geq 4 \mu\text{g/mL}$	Resistente	
		Bombas de E-flujo	E: ≤ 0.25 $\mu\text{g/mL}$ CC: $\leq 0.5\mu\text{g/mL}$	Sensible	
			E: $> 4 \mu\text{g/mL}$ CC: $> 1 \mu\text{g/mL}$	Resistente	

7.9. Métodos, técnicas e instrumentos de recolección de la información.

Procedimientos para el procesamiento de la muestra

Clasificación del grado de mastitis mediante el test california

Para el CMT, se realizó un procedimiento de antisepsia en la preparación de la piel de la ubre y pezones para una mejor obtención de las muestras, se lavó la ubre y los pezones con agua y una toalla de papel descartable, eventualmente con una solución de alcohol al 70%, luego se secó con otra toalla desechable; se sumergieron los pezones en alcohol 70% dejando actuar por 20 a 30 segundos. La punta de cada pezón se frotó vigorosamente con gasas estériles humedecidas en alcohol al 70%. Este procedimiento se realizó hasta notar que la punta del pezón esté visiblemente limpia. (Calvinho, 2010).

Procedimientos del (CTM)

1. Una vez limpia la ubre y pezones
2. Se desechó la leche del preordeño (primero 2 chorros).
3. Se inclinó la paleta de modo que se desechara la mayor parte de esta leche.
4. Se recolectó aproximadamente (2cc) de leche a cada cuarto, agregando la misma cantidad de solución CMT a cada compartimiento.
5. Se rotó en movimientos circulares hasta mezclar el contenido por al menos 15 segundos.
6. Se interpretaron los resultados.

Nota: Se lavó la raqueta al terminar el procedimiento

Obtención de la muestra biológica para el análisis de laboratorio

La muestra biológica se obtuvo de aquellos cuartos que resultaron positivos a mastitis subclínica mediante el test california, para la recolección de la muestra y disminuir la contaminación involuntaria de los pezones durante la toma, se comenzó a muestrear el cuarto más cercano al operador, finalizando con el más alejado, se volvió a limpiar la glándula mamaria con alcohol al 70% y se procedió a recolectar 5ml de leche de cada cuarto en tubos cónicos descartando los 2 primeros chorros de leche, se llevó así mismo el pezón a una

posición oblicua y dirigiendo el chorro de leche dentro del tubo. Al ubicar tubos y pezones en esta posición se minimizó la posibilidad de contaminación por partículas que se desprendieran de la piel de la ubre para su posterior almacenamiento y traslado. (Calvinho, 2010).

Transporte

El traslado de la leche obtenida de los cuartos con mastitis procedentes de la Universidad Nacional Agraria, se trasportó en un termo con refrigerantes a una unidad de salud privada con sus respectivos códigos y ficha de recolección de datos.

Aislamiento e identificación de *Staphylococcus aureus*

Para estimular el crecimiento de la cepa en estudio, se inoculó 2 ml de leche en una base de caldo Mueller Hinton para el enriquecimiento de esta, dejando incubando 24 horas, con el fin de recuperar células bacterianas dañadas del ordeño, bacterias que se concentran en la capa de grasa de la leche, y mayor recuperación en los cuartos mamarios. (Protocolo interno, FACA.UNA 2022),

Aislamiento en agar sangre al 5%

Materiales y equipos

1. Incubadora con CO₂
2. Agar sangre de carnero al 5%
3. Asa redonda bacteriológica

Procedimiento

1. Se rotuló el plato que contiene el medio de cultivo.
2. Con un asa redonda estéril se inocularon 2 gotas de la leche con caldo Mueller Hinton en un extremo del plato con Agar sangre de carnero al 5%.
3. Se dejó secar el inóculo hasta que desapareciera la humedad.
4. Se utilizó un asa redonda estéril para dispersar la muestra en el primer cuadrante del plato. Se realizaron 2 o 3 estrías de profundidad.

-
5. Se esterilizó nuevamente el asa, se dejó enfriar y se estrió los 3 cuadrantes del medio en forma convencional, con el objetivo de tener colonias aisladas y evitar contaminación
 6. Se incubó a 37° por 24 horas en una incubadora con CO₂.

Resultado

Colonias de color grisáceas o amarillo oro de aproximadamente 1 a 2 mm de diámetro con β-hemolisis.

Informe

Colonias características de *Staphylococcus aureus*.

Identificación de *Staphylococcus aureus*, mediante pruebas presuntivas y confirmativas

Para la identificación de *Staphylococcus aureus*, se limpió el área de trabajo con cloro puro y utilizando el mechero, guantes y mascarillas para las diversas pruebas como: gram, catalasa, coagulasa y DNAasa para evitar las contaminaciones cruzadas.

Primeramente, se realizó una caracterización de las colonias que crecieron en agar sangre al 5%, se tomaron aquellas colonias de color grisáceas o amarillo oro de aproximadamente 1 a 2 mm de diámetro con zonas de β-hemolisis alrededor de estas, una vez identificadas las colonias características de los *Staphylococcus spp* se procedió a realizar las diferentes pruebas para su identificación.

Catalasa

1. Materiales y reactivos
2. Asa bacteriológica recta
3. Portaobjeto
4. Peróxido de hidrógeno

Procedimiento

1. Se recogió con un asa varias colonias de 18-24 horas de crecimiento.

-
2. Se colocaron sobre la superficie de un portaobjeto de vidrio limpio.
 3. Se agregó una gota de H₂O₂ al 3%.

Resultado

Positivo: La formación inmediata de burbujas procedentes de oxígeno puede ser leve, moderada o intensa.

Negativo: No hay producción de burbujas

Informe

Staphylococcus aureus posee la enzima catalasa, por lo tanto, se evidencia mediante un desprendimiento de burbujas de forma inmediata.

Tinción de Gram

Materiales y reactivos

1. Láminas porta objeto
2. Mechero
3. Palillos de madera
4. Bandeja de tinción
5. Cristal violeta
6. Lugol
7. Alcohol al 70%
8. Safranina
9. H₂O
10. Aceite de inmersión solución salina al 0.85% estéril

Se colocó una gota de solución salina en el centro de la lámina, con un asa recta, tomamos una UFC, se mezcló dispersando en un área de 1cm por lado, dejando que se seque a

temperatura ambiente. Se rotulo mediante códigos asignados de cada muestra. Una vez el frotis seco, se fijó, pasándolo rápidamente 2 veces por encima de la flama del mechero.

Tinción

1. Se cubrió el frotis ya fijado y frio con cristal violeta, reposándolo por 1 minuto
2. Se enjuago, dejando resbalar el agua con un chorro suave, se escurrió muy bien
3. Se cubrió con Lugol y se dejó por un minuto
4. Repetimos el numeral 2
5. Se aplicó 2 o 3 gotas de alcohol acetona o alcohol al 70% por aproximadamente 30 segundos
6. Se repitió el numeral 2
7. Se cubrió el frotis con safranina durante 30 segundos
8. Se repitió el numeral 2
9. Dejamos secar a temperatura ambiente
10. Examinamos al microscopio

Resultado

Positivo: cocos Gram positivos en racimos predominantemente, diplococos, tétrada y cadenas cortas.

Negativo: diferente morfología.

Informe

Staphylococcus aureus se observa como cocos Gram positivos en racismo predominantemente, diplococos, tétradas y cadenas cortas

Coagulasa

Staphylococcus aureus produce coagulasa, proteína de tipo enzimático que coagula el plasma oxalatoado o citratoado en presencia de un factor contenido en muchos sueros.

Procedimiento

Materiales y equipo

1. Tubos de ensayos
2. Plasma oxalatado o citratado
3. Incubadora a 37° c

Procedimiento

1. Se colocó varias colonias en un tubo con 0.5ml de plasma oxalatado o citratado diluido
2. Se incubó a 37° c y monitoreó la formación del coágulo a las 4 horas.
3. Si resulta negativo se re incubó toda la noche y se procedió la lectura a las 18 horas.

Resultado

Positivo: Cualquier grado de coagulación

Negativo: Sin formación de coágulo

Informe

Formación de coagulo *Staphylococcus aureus*

Presencia de desoxirribonucleasa (DNAsa)

Materiales y equipos

1. Incubadora a 37°
2. Agar DNAsa
3. Asa recta bacteriológica

Procedimientos

1. Se sembró una colonia de *estafilococo* en forma de moneda o línea en una placa de 100*15mm de medio sólido que contiene DNA y verde de metilo

-
2. Se incubó 18 horas a 37°

Resultado

Positivo: halo claro, transparente alrededor del crecimiento bacteriano.

Negativo: el medio se observa opaco

Informe

La formación de un halo transparente alrededor de la siembra indica presencia de la enzima DNAsa. Características de *Staphylococcus aureus*.

Vitek 2 compact

Equipos y materiales

1. Vitek 2 compact
2. Tarjeta de identificación GP
3. Tarjeta de susceptibilidad AST-P663
4. Densitómetro DensiChek™,
5. Hisopos estériles
6. Pipetas
7. Puntas
8. Agar Mueller Hinton
9. Tubos de ensayo de poliestireno claro de 12 x 75 mm
10. Solución salina estéril
11. Cassettes

Procedimiento

1. Una vez habiendo identificado mediante pruebas presuntivas y confirmativas las cepas sospechosas de *Staphylococcus aureus*. Se procedió a reaislar esta misma en agra Mueller Hinton para la identificación de la cepa, determinación del perfil de

susceptibilidad antimicrobiana y detección de mecanismo de resistencia presentes en las cepas en estudio.

2. Se preparó 2 suspensiones con 2 tubos de ensayo de poliestireno claro de 12 x 75 mm con 3 ml de solución salina estéril cada uno
3. Se transfirió con un hisopo estéril a partir del cultivo puro en Mueller Hinton, una cantidad suficiente de inóculo en uno de los tubos de ensayo de modo que se ajuste la turbidez a 0.50 - 0.63 unidades de la escala McFarland con el densitómetro DensiChek™,
4. De la suspensión primaria transferimos 280 ul al 2do tubo con solución salina estéril, colocando ambos tubos con las suspensiones bacterianas dentro de un cassette para insertarlas con las tarjetas correspondiente, para la suspensión primaria la tarjeta de identificación antimicrobiana GP y para la suspensión secundaria la tarjeta de susceptibilidad AST-P663, colocando las tarjetas en la ranura cercana.
5. Se insertaron los tubos con sus correspondientes tarjetas dentro de los cassettes y se introdujeron al equipo con los datos de las muestras.

Resultado e informe

Positivo: *Staphylococcus aureus*.

Negativo: Otro microorganismo.

El control de calidad de los métodos utilizados se realizó utilizando la siguiente cepa control:

- ATCC 25923 *S. aureus*.

7.10 Procedimientos para la recolección de datos e información.

Para la recolección de datos e información se necesitó fichas de recolección de datos basados en los métodos a utilizar para la selección de la muestra y así valorar los resultados que se obtuvieron.

7.11 Ética de la investigación.

La ética en la investigación exige que la práctica de la ciencia se realice conforme a principios éticos que aseguren el avance del conocimiento, la comprensión y mejora de las condiciones. Se focaliza el interés en la consideración de los aspectos éticos de la investigación, en su naturaleza y fines (respeto a la dignidad del ser humano, a la autonomía de su voluntad, protección de sus datos privacidad, confidencialidad, **bienestar animal** y preservación del medio ambiente). (CSIC, 2016).

Las investigaciones deben de tener siempre valor social y científico, si un estudio no tiene el potencial de generar conocimiento que permita mejorar la salud y el bienestar entonces no es ético. (OPS, 2018).

Para realizar esta investigación en la Universidad Nacional Agraria, se solicitó un permiso para aprobación del estudio mediante una carta dirigida al director de la UNA y al jefe del área, a su vez constar con el permiso del jefe de laboratorio, para el procesamiento de las muestras en una unidad de salud privada y llevar a cabo dicho estudio.

Los datos y resultados obtenidos se utilizarán con fines científicos, por lo que, los autores de esta investigación declaramos no tener un conflicto o desconformidad de importancia con la elaboración de esta investigación.

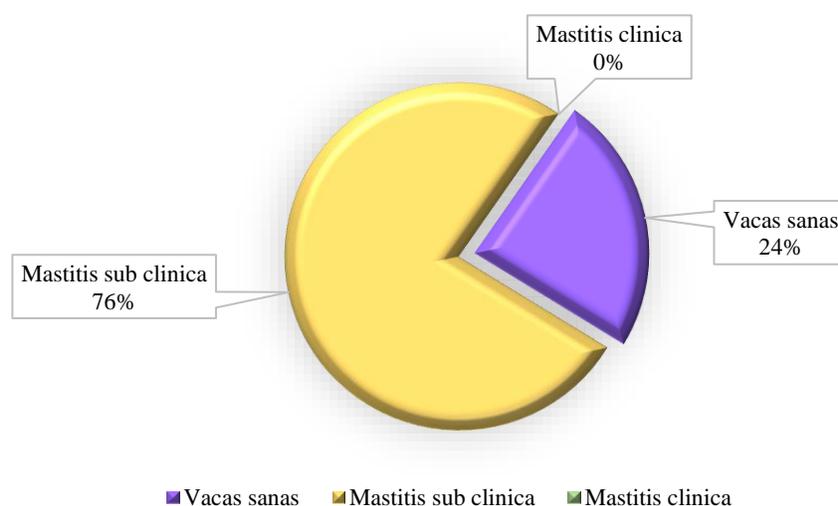
7.12 Plan de tabulación y análisis de la información.

Para realizar el documento y presentación, se utilizaron programas computarizados como Word y Power point, igualmente se emplearon gráficas y tablas para la tabulación de los datos mediante Excel 2013.

8 ANÁLISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos de los análisis de las muestras del ganado vacuno sugestivo a mastitis causada por *Staphylococcus aureus*, procedente de la universidad nacional agraria (UNA), durante el período de marzo-mayo del 2022, se detalla a continuación los siguientes resultados:

Figura 1: Clasificación del tipo de mastitis que presenta el ganado vacuno mediante el test california



Fuente: Registro de datos de la tabla #1

Se analizaron 25 vacas aptas para el ordeño, para posteriormente clasificar el tipo de mastitis mediante el california mastitis test, el cual, de las 25 vacas, 19 vacas resultaron con mastitis sub clínica equivalente al 76% del total de vacas muestreadas y 6 de estas resultaron como vaca sanas equivalente al 24%

Es considerada una enfermedad altamente prevaleciente en el ganado lechero, y es una de las más importantes que afecta mundialmente la industria lechera; pues ocasiona pérdidas económicas muy fuertes a todos los productores de leche en el mundo debido a la disminución de la calidad y cantidad de leche producida y un aumento en los costos de tratamiento y servicios veterinarios, y pérdida de animales. Esta enfermedad, es reconocida

comúnmente por signos clínicos elementalmente por las anomalías en la leche y la ubre. Sin embargo, las vacas con mastitis subclínica no muestran ninguna señal obvia de la enfermedad (Bolaños y Salcedo, 2012).

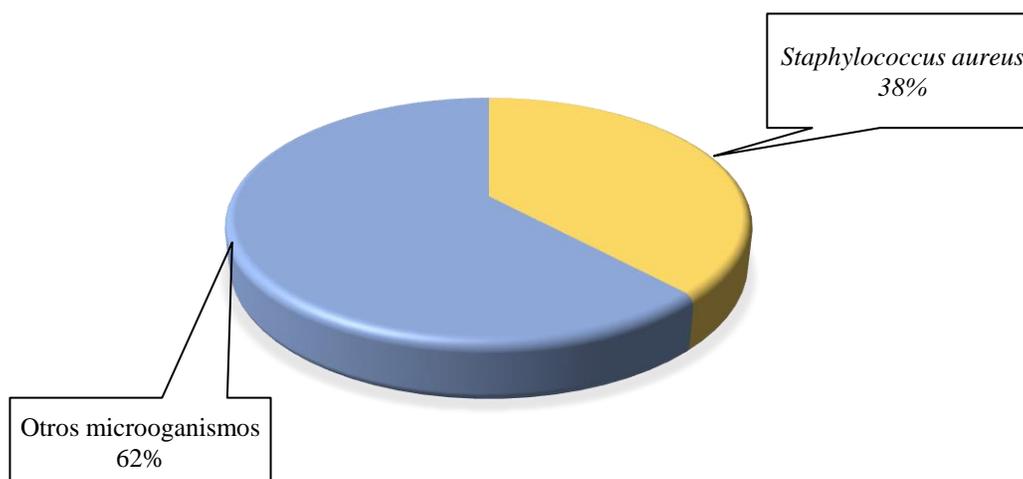
En nuestro estudio hemos obtenido resultados variados, respecto a otras investigaciones nacionales o internacionales, en donde se puede mostrar la frecuencia en que el ganado vacuno puede desarrollar las mastitis. En un estudio realizado por Bermeo en soldados de la parroquia San Joaquín (Cuenca-Ecuador) en donde se estudiaron 100 vacas encontrando que el 85% de estas resultaron negativas a mastitis subclínica, y el 15% con resultado sospechoso a mastitis subclínica. (Bermeo, 2014). Mostrando que en diferentes países existe una variabilidad de incidencia en que el ganado vacuno sufra de mastitis, ya que este tipo de infección depende mucho del manejo, alojamiento de estas, así también la viabilidad, virulencia y perfil de susceptibilidad de los diversos agentes que pueden causar la mastitis.

Un estudio realizado por Solís en la finca Guadalupana del municipio de Nagarote, departamento de León, se obtuvieron resultados similares correspondiente a nuestro estudio, en donde se analizaron 198 pruebas de CMT, correspondiente al número de vacas, 139 muestras resultaron positivas, al menos con una cruz en uno de sus cuartos mamarios, correspondiendo a un 70% de prevalencia respecto al total de muestras y 59 muestras resultaron negativas (30%), del total de muestras positivas, 38% correspondió a mastitis subclínica y 34% a mastitis clínica (Solís, 2007). De esta manera dando evidencia que el ganado vacuno es más propenso a adquirir la infección, haciendo énfasis a los factores que pueden favorecer a la aparición de la infección esencialmente al alojamiento, cuidado, alimentación del ganado vacuno.

De esta manera aclarando que los resultados obtenidos en nuestro estudio se puede evidenciar la gran variabilidad que existe para que el ganado vacuno pueda desarrollar la mastitis, ya que el 76% del ganado vacuno de la facultad de ciencia animal en la UNA, resultaron con mastitis subclínica, clasificándose como trazas en 1 o 2 de los cuartos, equivalente en un rango de células somáticas de 200,000 a 400,000 entendiendo que estas vacas están en la etapa primaria de la infección, siendo una información útil, ya que se puede llegar a evitar que estas vacas lleguen a desarrollar la etapa clínica y así causar un mayor impacto negativo

a la salud del ganado, a la calidad de la leche y principalmente a la FACA por pérdidas económicas.

figura 2: Identificación de *Staphylococcus aureus* mediante pruebas convencionales y sistema automatizado VITEK 2 compact.



- **Fuente: Registro de datos de la tabla #2**

Se analizaron un total de 21 cuartos mamarios de 19 vacas con resultado positivo, equivalente al 76% de mastitis subclínica, las cuales fueron sometidas a procesar mediante pruebas convencionales y confirmativas, así mismo se obtuvieron resultados de coagulasa con 8 cepas positivas equivalente a un 38% y 13 negativas correspondiente a un 62%, por consiguiente se procesaron las mismas 21 cepas para ver los resultados de DNASA en donde 8 cepas resultaron positivas equivalente a un 38% y 13 de estas con resultados negativos que equivalen al 62%. Correspondiendo así *Staphylococcus aureus* a un 38% de 21 muestras por medio de estas pruebas convencionales se procedió a estudiar las mismas mediante el sistema automatizado VITEK 2 compact; confirmando así una frecuencia de 8 cepas de *Staphylococcus aureus* correspondiente a un 100% en este análisis.

Autores de países internacionales han realizado estudios en donde se ha utilizado una metodología similar a la nuestra, sin embargo, se han encontrado tasas más bajas de prevalencia en mastitis por *Staphylococcus aureus*; tal es el caso de un estudio realizado por Hernández J, et al. En fincas lecheras de Cundinamarca en donde se analizaron un total de

249 cepas provenientes de 17 hatos lecheros, muestras que fueron obtenidas durante el ordeño de bovinos con manifestaciones clínicas de mastitis o que presentaron una reacción de tres cruces en la prueba de California Mastitis Test (CMT), *Staphylococcus aureus* se aisló en 33% en un total de 82 muestras, identificados mediante métodos manuales convencionales y mediante el sistema automatizado VITEK 2 Compact. La semejanza de este estudio evidencia que *Staphylococcus aureus* como el principal agente etiológico de la mastitis en nuestro país, puede adicionalmente representar altos riesgos para la salud del ganado vacuno (Hernández, et al. 2015).

Por otra parte, un estudio realizado por Mendoza y Vera en la Provincia de Pamplona (Norte de Santander, Colombia) explica que se realizó la prueba de California Mastitis Test (CMT) a 1.208 cuartos provenientes de 302 vacas ubicados en 108 predios. Para determinar la prevalencia de mastitis, los microorganismos asociados y los factores de riesgo relacionados en explotaciones lecheras, de los cuartos positivos (de trazas a 3+), se obtuvo una muestra de leche y se realizó aislamiento microbiológico. Se determinó una prevalencia individual de 54,6% animales positivos al CMT. En 67,6% de los predios se presentó al menos un animal positivo, mientras que un total de 21,6% de los cuartos presentaron reactividad al CMT. De las muestras en las cuales se pudo realizar aislamiento y caracterización microbiológica, en 74,4% se aisló *Staphylococcus aureus* perteneciente al 31.3% de mastitis subclínica y así mismo el 12,3% *Streptococcus agalactiae* y 13,3% Coliformes, los microorganismos que se aislaron en este estudio se identificaron de acuerdo a la morfología de las colonias y la tinción de Gram entre otros análisis convencionales que se asociaron a la presencia de mastitis, y lo relacionan la mastitis con la ausencia de buenas prácticas de ordeño.

La presencia principalmente de microorganismo asociados a mastitis contagiosas, evidencian las necesidades de capacitación y asesoramiento para implementar buenas prácticas de ordeño y mejorar la competitividad del sector de producción láctea, lo que redundará en un aumento en la producción. (Mendoza y Vera, 2017).

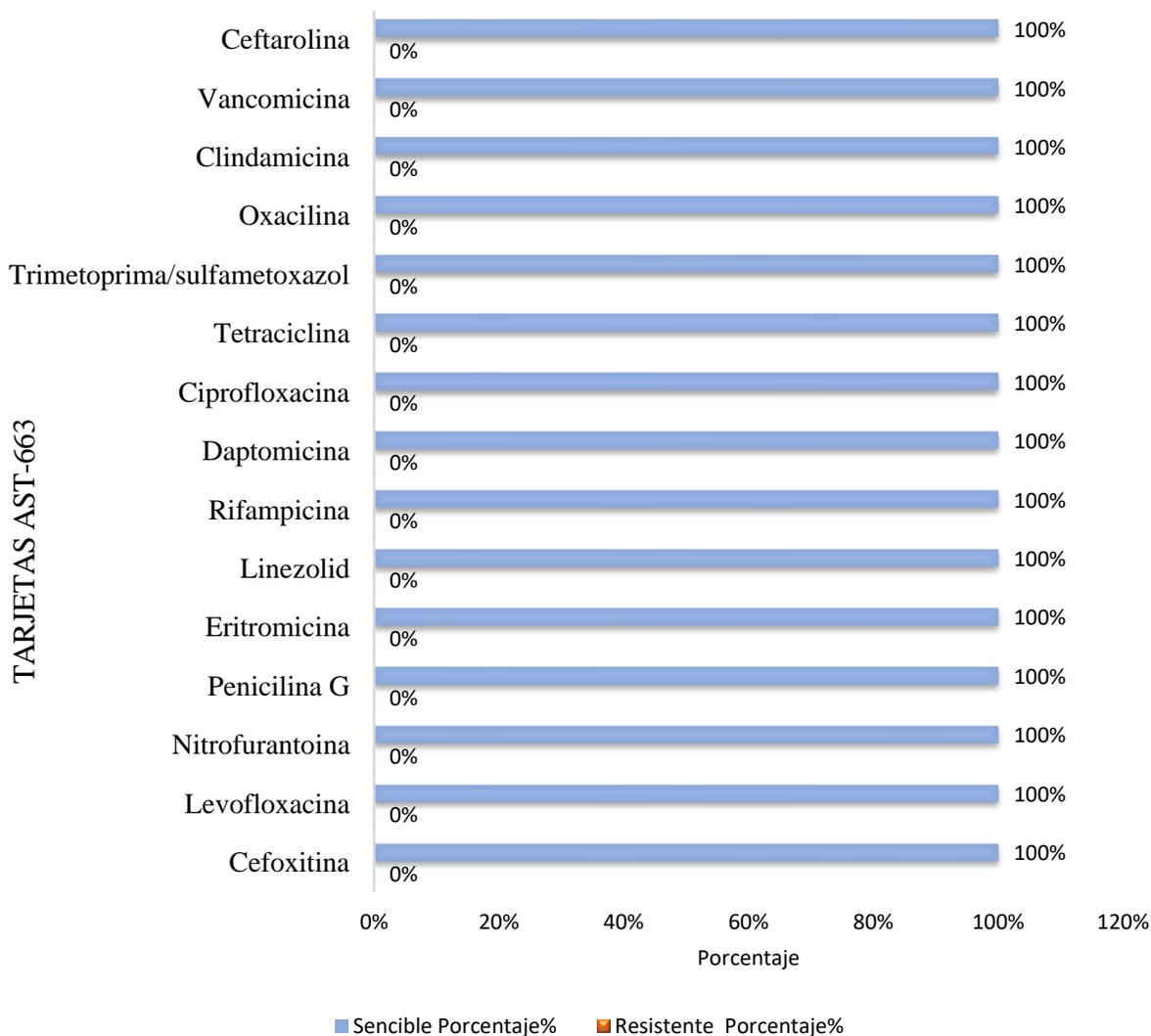
En un estudio realizado por Calderón y Rodríguez en la universidad de Córdoba, Colombia, menciona que se tomó una muestra de leche para aislar los microorganismos involucrados en la mastitis bovina, escogidas mediante un muestreo no probabilístico de los cuartos positivos mediante la prueba del California Mastitis Test (CMT) se tomó una muestra de leche para

aislar los microorganismos involucrados en la mastitis bovina pertenecientes a 2,854 vacas de 40 fincas especializadas en la producción de leche en el altiplano cundiboyacense. *Staphylococcus aureus* fue aislado por pruebas convencionales dando como resultados positivos en un 29.09% y se convirtió en el principal patógeno encontrado. *Streptococcus agalactiae* aislado en el 6.84% de las muestras y las infecciones mixtas representaron el 1.2%; por ende, la asociación infecciosa más frecuente fue la de *S. aureus*.

Uno de los microorganismos importantes en la mastitis infecciosa es el *Staphylococcus aureus* y su importancia radica en que no es un patógeno obligado de la ubre, ya que se puede encontrar también en lesiones de la piel de los pezones, en las manos de los ordeñadores, en las camas, en los equipos de ordeño y en muchas ocasiones, las prácticas de manejo pueden hacer que este agente etiológico alcance el conducto del pezón y de ahí desencadenar una reacción inflamatoria. Su transmisión puede ocurrir en el momento del ordeño por prácticas como el uso compartido de toallas para lavar y secar las ubres o por medio de las manos contaminadas de los ordeñadores o por el uso de pezoneras no desinfectadas entre vacas en los ordeños mecánicos, es por esto que la propagación va más allá de las malas prácticas higiénicas ganaderas en la implementación de programas de prevención y control de agentes infecciosos y por presentar múltiples factores de virulencia. (Calderón y Rodríguez, 2008).

Cabe mencionar que fue de gran importancia realizar este estudio bajo un protocolo de buenas prácticas de toma de muestra ya que básicamente la prevención de esta enfermedad se efectúa mediante medidas de higiene.

Figura 3: Determinación del perfil de susceptibilidad antimicrobiana mediante el sistema el sistema automatizado VITEK 2 Compact.



Fuente: Registro de datos de la tabla #3

Se analizaron 8 cepas de *Staphylococcus aureus*, para determinar el perfil de susceptibilidad antimicrobiana mediante el sistema automatizado Vitek 2 compact, dando como resultado 100% de sensibilidad para Cefoxitina, Levofloxacina, Nitrofurantoina, Penicilina G, Eritromicina, Linezolid, Rifampicina, Daptomicina, Ciprofloxacina, Tetraciclina, Trimetoprima/ sulfametoxazol, Oxacilina, Clindamicina, Vancomicina, Ceftarolina, es importante aclarar que para la determinación del perfil de susceptibilidad no se utilizaron

todos los antibióticos específicos para la mastitis bovina, como la Enrofloxacinina u oxitetraciclina, esto debido a que no fue posible conseguir estos fármacos, pero se utilizaron familias de estos ya que poseen el mismo sitio de acción a la hora de interactuar con el microorganismo.

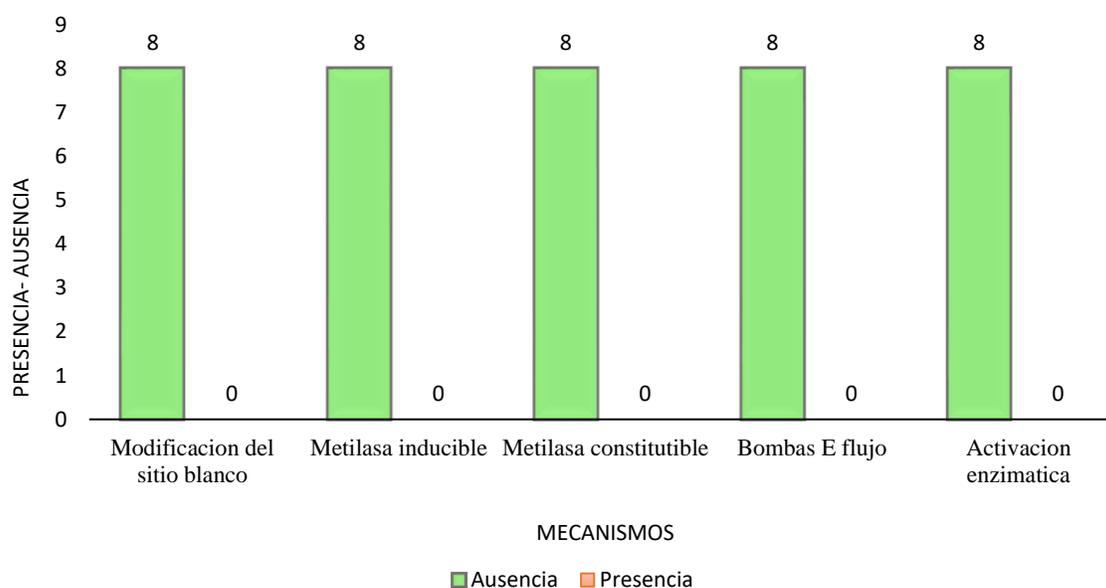
Staphylococcus aureus es uno de los patógenos mayores de mastitis más prevalente en los rebaños bovinos lecheros a nivel mundial. La terapia antimicrobiana es una de las bases de los programas de control de mastitis bovina causada por este organismo. La respuesta a la terapia antibiótica está influenciada por factores del microorganismo, del hospedador y de la disponibilidad de las drogas en el sitio de infección, lo cual resulta en tasas de curación bacteriológica variables. En consecuencia, las pruebas para determinar la susceptibilidad de *S. aureus* frente a los antibióticos no siempre predicen con eficacia el resultado de la terapia. Sin embargo, existe consenso sobre la utilidad de las mismas para seleccionar los antimicrobianos en forma racional (Neder y Araujo, 2017).

Un estudio realizado por Neder y Araujo, donde determinaron el perfil de susceptibilidad de *Staphylococcus aureus* aislado de mastitis bovina en lecherías de la cuenca central de Argentina, Se evaluaron 96 cepas de *S.aureus* aislados a partir de muestras obtenidas en forma aséptica, dando como resultado que la penicilina con 71,88%, cefalexina con 98,96%, ceftiofur con 94,79%, cefquinoma con 77,08%, oxacilina con 100%, amox + ac. Clavulánico con 96,88%, cefalexina + kanamicina con 71,88%, framycetin + penicilina con 80,21% y eritromicina con 20,84% resultaron sensibles. La ceftiofur con 4,17%, cefquinoma con 21,88%, cefalexina + kanamicina con 13,54%, framycetin + penicilina con 1,04% y eritromicina con 76,04% resultaron intermedio. la penicilina con 28,12%, cefalexina con 1,04%, ceftiofur con 1,04%, cefquinoma con 1,04%, amox + ac. Clavulánico con 3,12%, cefalexina + kanamicina con 14,58%, framycetin + penicilina con 18,75% y eritromicina con 3,12% resultaron resistentes. (Neder y Araujo, 2017).

En comparación con el estudio de Neder y Araujo, en donde se muestra que *Staphylococcus aureus* tiene una baja resistencia a los diferentes antimicrobianos como por ejemplo a la penicilina que con un 71.88% de las 96 cepas estudiadas resultaron sensibles y en ocasiones llegando a tener un 100% de sensibilidad a algunos fármacos como la oxacilina, datos que tienen relación con nuestro estudio, esto debido a que las 8 cepas de *Staphylococcus aureus*

presentaron un 100% de sensibilidad a todos los antimicrobianos que fueron usados, y así evidenciando que *Staphylococcus aureus* como principal agente causal de la mastitis bovina, se puede considerar como una cepa salvaje, ya que no ha llegado a presentar resistencia a los diferentes antimicrobianos, esto puede ser debido a que en el habitat que estás están expuestas, no es un lugar propenso a una constante interacción con antibióticos.

Figura 4: Detección de mecanismos de resistencia de *Staphylococcus aureus* mediante sistema automatizado VITEK 2 Compact.



Fuente: Registro de datos de la tabla #4

Se analizaron 8 cepas de *Staphylococcus aureus* mediante el sistema automatizado VITEK 2 Compact para detectar los mecanismos de resistencia presentes en estas cepas, confirmándose la ausencia de estos en un 100%.

En los sistemas de producción de leche bovina, uno de los problemas que más afecta la cantidad y la calidad de la leche producida, es la mastitis, que en la mayoría de los casos es de origen bacteriano, fuera de una correcta rutina de ordeño, se utilizan diversos antibacterianos, que por razones farmacocinéticas y farmacodinámicas sean de primera elección para dicha enfermedad. Es así como el uso de antibacterianos para el tratamiento de mastitis, en algunos casos es eficaz, pero en otros no, generalmente debido al desarrollo de

resistencia por parte de las bacterias. Existen algunos patógenos que generan mayor impacto en cuanto a la resistencia se refiere, debido a la capacidad de desarrollarla en corto tiempo mediante diferentes mecanismos y contra gran cantidad de agentes y fármacos. Identificando así dentro de los que se destacan: inactivación del fármaco, bombas de eflujo y modificación del sitio blanco. (Pacheco et al, 2013).

Sánchez determinó resistencia antibiótica de bacterias causantes de mastitis en bovinos del establo lechero de Callqui -Huancavelica, Perú, entre diciembre del 2017 y abril de 2018. Se recolectaron muestras de leche de 16 vacas en producción, en la sensibilidad de *Staphylococcus aureus* frente a los antibióticos se encontraron cepas resistentes a la penicilina por una activación enzimática equivalente al 75%. (Sánchez, 2018).

En un estudio realizado por Valero et al. en Zulia - Venezuela se analizaron 81 cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de ganado vacuno obteniendo como resultado a un 12,4 % con Activación enzimática presentando resistencia a Penicilina y Metilasa constituyente con resistencia a Eritromicina y Clindamicina en un 3.7% por medio del método difusión del disco en agar. Debido a que la penicilina ha sido el tratamiento de elección para la mastitis bovina desde los años 1940, las investigaciones realizadas a nivel mundial reportan este fenotipo de resistencia como el más comúnmente observado en cepas de origen bovino. Previamente, en la región se ha reportado Activación enzimática en un 13,63%, en otras latitudes el porcentaje es mayor oscilando entre un 30 y 89%, con la excepción de los resultados obtenidos en cepas procedentes de Noruega y Canadá, donde la activación enzimática es menor de 2 a 11%. (Várelo, 2010). De esta manera se evidencia que nuestros resultados obtenidos concuerdan con estudios extranjeros, demostrando que *Staphylococcus aureus* aislado del ganado vacuno con mastitis no son cepas altamente resistentes por que la prevalencia de mecanismos de resistencia en su mayoría es baja, viendo de esta manera que este estudio realizado por Valero obtuvo una resistencia a las penicilinas por una activación enzimática en un 12,4% y una resistencia a Eritromicina y Clindamicina por una metilasa constituyente en un 3.7%; mientras que en nuestro estudio no hubo presencia de mecanismos de resistencia.

Demostrando así que los resultados obtenidos en nuestro estudio evidencian la gran variabilidad que existe para que *Staphylococcus aureus* aislado de ganado vacuno desarrolle

mecanismos de resistencia ya que de las 8 cepas aisladas y analizadas por medio del sistema automatizado Vitek 2 compact resultaron ser en su 100% sensibles, también conocidas como cepas salvajes; sin embargo los estudios anteriormente citados presentan un porcentaje de mecanismos de resistencia muy bajos como la activación enzimática y la metilasa constituyente.

9 CONCLUSIONES

1. Se clasificó el tipo de mastitis mediante la mastitis test california (CMT), de 25 vacas resultando 19 vacas con mastitis subclínica equivalente a un 76% y 6 vacas sanas correspondiente al 24%.
2. Se identificó 8 cepas de *Staphylococcus aureus*, mediante pruebas convencionales, así mismo, confirmadas por el sistema automatizado Vitek 2 compact resultando el 100% de *Staphylococcus aureus* correspondiente a los 8 aislamientos.
3. Se comprobó el perfil de susceptibilidad antimicrobiana mediante el sistema automatizado Vitek 2 compact para 8 cepas de *Staphylococcus aureus*, dando como resultado 100% de sensibilidad para Cefoxitina, Levofloxacin, Nitrofurantoina, Penicilina G, Eritromicina, Linezolid, Rifampicina, Daptomicina, Ciprofloxacina, Tetraciclina, Trimetoprima/ sulfametoxazol, Oxacilina, Clindamicina, Vancomicina, Ceftarolina; estas, son consideradas cepas salvajes, ya que no han llegado a presentar resistencia a los diferentes antimicrobianos.
4. Se analizaron 8 cepas de *Staphylococcus aureus* para la detección de mecanismos de resistencia mediante el sistema automatizado VITEK 2 Compact presentando la ausencia de estos en un 100% de las cepas estudiadas.

10 RECOMENDACIONES

Habiendo realizado este estudio y a su vez presentado conclusiones acerca del comportamiento de *Staphylococcus aureus* en mastitis subclínica, se definen a continuación las siguientes recomendaciones:

Universidad Nacional Agraria, Facultad de Ciencia Animal (FACA)

- Realizar programas de monitoreo del estatus sanitario del hato (eliminación de heces fecales en el entorno), proporcionando educación continua a los productores (control higiénico aplicado en las buenas prácticas de ordeño).
- Realizar un diagnóstico de laboratorio al menos cada tres meses a las vacas positivas con mastitis, (elegir el antibiótico más conveniente para el tratamiento) para así controlar los distintos niveles de infestación de mastitis subclínica.
- Ordeñar de forma separada las vacas sanas de las afectadas por mastitis subclínica para evitar su transmisión y su reincidencia y así mismo llevar un control de registro clínico.

UNAN-Managua (POLISAL)

- Incentivar a los estudiantes del POLISAL, UNAN- Managua a hacer estudios continuos del comportamiento de *Staphylococcus aureus* como principal agente causal de mastitis bovina.

11.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Libros:

Cervantes García, E. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. Rev Latinoam Patol Clin Med Lab

Seija, V. (2006) Bacteriología y virología médica. Universidad de la República: Facultad de Medicina Departamento de Bacteriología y Virología Instituto de Higiene

Webgrafia:

Aguirre y Zeledón (2007). Aislamiento e identificación fenotípica de *Staphylococcus aureus* mediante la técnica de fingerprinter (PHP) a partir de leche bovina afectada con mastitis subclínica en seis fincas del municipio de León, durante el periodo de mayo 2005 – 2006.
<http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/bitstream/123456789/1042/1/203954.pdf>

Aida (2017), Test de california para mastitis y microbiología de la glándula mamaria en explotaciones de vacas lecheras. <https://citarea.cita-aragon.es/bitstream/10532/3829/1/VAC0028.pdf>

Andresen (2001). Mastitis: control y prevención. Rev Inv Vet Perú 2001; 12(2): 55- 64.
<http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v12n2/a10v12n2.pdf>

Andresen (2001). Prevención y control mastitis.
https://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/veterinaria/v12_n2/mastitis.htm#:~:text=Para%20el%20mejor%20control%20de,y%203%20cruces%20al%20CMT

Arbizú O (2008-2009). Detección molecular del gen mecA y caracterización de fenotipos de resistencia de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina aislados de pacientes y personal de salud HEODRA 2008 – 2009.
<http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/bitstream/123456789/5535/1/219548.pdf>

Becton Dickinson (2003), BD DNase Test Agar.
<https://legacy.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/HB/CE/PA/ES-PA-255506.pdf>

-
- Bedolla (2007). Pruebas y Métodos para el Diagnóstico de Mastitis. <https://repositorio.una.edu.ni/4234/1/tnl73d542.pdf>
- Biomérieux (2022). VITEK® 2 Compact. <https://www.biomerieux.es/microbiologia-industrial/vitekr-2-compact>
- Biomérieux (2022) Nuevas tarjetas Vitek 2 AST microbiología de confianza. <https://www.bmxclinicaldiagnostics.com/nuevas-tarjetas-vitek>
- Biomérieux (2022) Tarjeta de identificación Vitek 2 GP <https://www.biomerieux.es/diagnostico-clinico/productos/tarjeta-de-identificacion-vitekr-2-gp>
- Bolaños et al. (2012). Mastitis bovina: generalidades y métodos de diagnóstico. https://www.produccionanimal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infeciosas/bovinos_leche/78-mastitis.pdf
- Bordes, E. R. (2015). Epidemiología molecular y resistencia a los antimicrobianos en *Staphylococcus* spp. En centros sanitarios de Mallorca durante los últimos 15 años (1999-2013). Islas Baleares, España: Universidad de las Islas Baleares. <https://www.tdx.cat/handle/10803/384005#page=1>
- Británica (2007), DNAsa agar. https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_607067e62ab29.pdf
- Bermeo (2014). Incidencia de la mastitis subclínica bovina, en el sector Soldados de la parroquia San Joaquín. Universidad del Azuay. [10272.pdf \(uazuay.edu.ec\)](https://repositorio.uazuay.edu.ec/handle/document/10272)
- Camponovo (2008). Susceptibilidad bacteriana a antimicrobianos. Especies aisladas en pacientes ambulatorios de la Región Metropolitana. Laboratorio de Microbiología INTEGRAMÉDICA, Santiago, Chile. <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v26n1/art02.pdf>

-
- Cavaleri (2005). Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2005/susceptibilidad-antimicrobiana-manual-pruebas-2005.pdf>
- Cervantes y García (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. <https://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2014/pt141e.pdf>
- Del cura, A. (s.f) http://axonveterinaria.net/web_axoncomunicacion/criaysalud/35/cys_35_50-52_Mamitis_staphylococcus_ganado_bovino.pdf
- Echeverri, Jaramillo y Restrepo. Evaluación comparativa de dos metodologías de diagnóstico de mastitis en un hato lechero del Departamento de Antioquia. Revista la Sallista de investigación vol.7. no.1 (2010). http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-44492010000100007
- Enciso, (2022). Mastitis bovina. Causas, signos y prevención. Agro blogger [Mastitis bovina. Causas, signos y prevención - Blog Agrocampo Colombia](#)
- Fernández (2008). Importancia del conteo de células somáticas en la calidad de la leche. REDVET: 2008, Vol. IX, N° 9. https://www.produccionanimal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_leche/18-conteo_celulas.pdf
- Fernández et al. (2010), Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>
- Fernández et al. (2012). Mastitis bovina: generalidades y diagnóstico. https://www.produccionanimal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_leche/78-mastitis.pdf
- Gil (2019). Prueba de la coagulasa: fundamento, procedimiento y usos. Lifeder. <https://www.lifeder.com/prueba-de-la-coagulasa/>

Genética bovina, (2022). Mastitis bovina principales tratamientos, genética bovina colombiana.

Mastitis bovina: principales tratamientos - Revista Genética Bovina Colombiana (revistageneticabovina.com)

Hernández, et al (2008), Taller para la producción del reactivo de california.
<https://www.uv.mx/veracruz/cienciaanimal/files/2013/11/Taller-para-la-produccion-del-reactivo-de-California.pdf>

Katayama Y, I. T. (2001). Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* in clinical staphylococcal strains: role of IS431-mediated *mecI* deletion in expression of resistance in *mecA*-carrying, low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 45(7), 1955-1963 p.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11408208/>

Lacueva (2017). Resistencia a antibióticos en *Staphylococcus aureus*. Evolución y perspectiva actual.
<http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/MANUEL%20LACUEVA%20ARNEDEO.pdf>

López et al. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Medigraphic*, vol. 3. N°1. <https://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2014/ir141b.pdf>

López (2014). Mastitis bovina: Definición, etiología y epidemiología de las enfermedades.
<https://cienciaveterinaria.com/mamitis-definicion-etilogia-y-epidemiologia>

Ma XX, I. T. (2002). Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother*.(46), 1147-1152 p.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC127097/>

Manzo et al (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación.
<https://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2014/bio143d.pdf>

-
- Maldonado et al, (2022). Diagnóstico de Mastitis Subclínica Mediante Tres Métodos para el Control y Tratamiento en Bovinos de Leche Holstein Vol. 8, núm. 1: <file:///C:/Users/Equipo/Downloads/Dialnet-DiagnosticoDeMastitisSubclinicaMedianteTresMetodos-8383375.pdf>
- Mellemberger (2000). Hoja de Información de la Prueba de Mastitis California (CMT). https://milkquality.wisc.edu/wpcontent/uploads/sites/212/2011/09/hoja-de-informacion-de-la-prueba-de-mastitis-california_spanish.pdf
- Mellenberger R. y Kirk J (2016). https://www.produccionanimal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciones/bovinos_leche/123-Staphilococcus_aureus.pdf
- Obando, Medrano y Solis (2017). Detección molecular del gen mecA y las subunidades Luk-S y Luk-F que codifican Pantón Valentine Leukocidina (PVL), en *Staphylococcus aureus* resistente a Oxacilina (ORSA) en pacientes del Hospital Solidaridad de la Ciudad de Managua, Enero – Octubre 2017. <https://repositorio.unan.edu.ni/12421/1/100293.pdf>
- Ormaechea (2021). ¿En qué consiste la tinción de Gram? <https://www.salud.mapfre.es/pruebas-diagnosticas/otras-pruebas-diagnosticas/tincion-de-gram/>
- Otzen y Manterola (2011). Técnicas de Muestreo sobre una Población a Estudio. <https://scielo.conicyt.cl/pdf/ijmorphol/v35n1/art37.pdf>
- Pacheco et al, (2013) Resistencia de las bacterias causantes de mastitis bovina frente a los antimicrobianos más frecuentes, facultad de ciencias agrarias. Vol. 3, N° 1. <https://revista.jdc.edu.co/index.php/conexagro/article/download/330/351>
- Pinzón et al. (2019), Efectos de la mastitis subclínica en algunos hatos de la cuenca lechera del alto Chicamocha (departamento de Boyacá). Revista de medicina veterinaria N° 17. <http://www.scielo.org.co/pdf/rmv/n17/n17a03.pdf>
- Reyes y Argüello (2015). Determinación de la Prevalencia de Mastitis Subclínica en ganado Reyna, Rancho Los Peiranos, Nandaime, Granada.

<https://1library.co/document/qokkxx5y-estudio-comparativo-diagnosticos-subclinicas-california-draminski-diriamba-octubre.html>

Reyes y Arguello (2015). Estudio comparativo entre los métodos diagnósticos para mastitis subclínicas, California Test y DRAMINSKI 4Q en vacas Jersey, Diriamba - Carazo, agosto-octubre, 2015.

<file:///C:/Users/Heysell%20Chacon/Downloads/SALE%20DISE%C3%91O%20PARA%20MASTITIS.pdf>

Rivera A. (2014). Determinación de la Prevalencia de Mastitis Subclínica en ganado Reyna, Rancho Los Peiranos, Nandaime, Granada.

<https://core.ac.uk/download/pdf/35166537.pdf>

Rodríguez y Mendivelso (2018). Diseño de investigación de corte transversal. https://www.unisanitas.edu.co/Revista/68/07Rev%20Medica%20Sanitas%2021-3_MRodriguez_et_al.pdf

Salazar de Vegas E, et al (2017). Detección del gen *mecA* en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de pacientes atendidos en el Servicio Autónomo Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá.

http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562017000200003

Salinas y Rivera (2006). Utilización del Anamú (*Petiveria alliacea*) en el control de la Mastitis bovina en la finca San Emilio, en el municipio de Diriomo, departamento de Granada.

<https://xdoc.mx/documents/repositorio-institucional-de-la-universidad-5c18029fba7fa>

Sánchez (2018) Resistencia a los agentes causales de mastitis en vacas.

<https://repositorio.unh.edu.pe/items/619a9762-2dd7-4f23-aea3-8a9c1f3a6c17>

Sanders (2001). VITEK®2 Compact. Biomérieux.

<https://www.biomerieuxchile.cl/diagnostico-clinico/productos/vitekr-2-compact#top>

Torrico (2018), Prueba de coagulasa. <http://identificacionbacterias.web16.top/pruebas-cocos-g/prueba-de-coagulasa>

Trujillo A. et al (2009). Efectos de la mastitis subclínica en algunos hatos de la cuenca lechera del Alto Chicamocha departamento de Boyacá.
<http://www.scielo.org.co/pdf/rmv/n17/n17a03.pdf>

Valero et al, (2010) Susceptibilidad a los agentes antimicrobianos en cepas de *Staphylococcus aureus* aislados en leche de bovinos con mastitis subclínica y leche de tanque. ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592010000400006

Zoetis (2007). Mastitis, inflamación de la glándula mamaria o ubre.
[https://www.zoetis.mx/conditions/bovinos/mastitis.aspx#:~:text=%2D%20Los%20signos%20cl%C3%ADnicos%20\(fiebre%2C,ser%20acuosas%2C%20serosas%20o%20purulentas.](https://www.zoetis.mx/conditions/bovinos/mastitis.aspx#:~:text=%2D%20Los%20signos%20cl%C3%ADnicos%20(fiebre%2C,ser%20acuosas%2C%20serosas%20o%20purulentas.)

12. ANEXOS

12.1.FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA

UNAN-MANAGUA

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LA SALUD

“LUIS FELIPE MONCADA”

DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS CLÍNICO

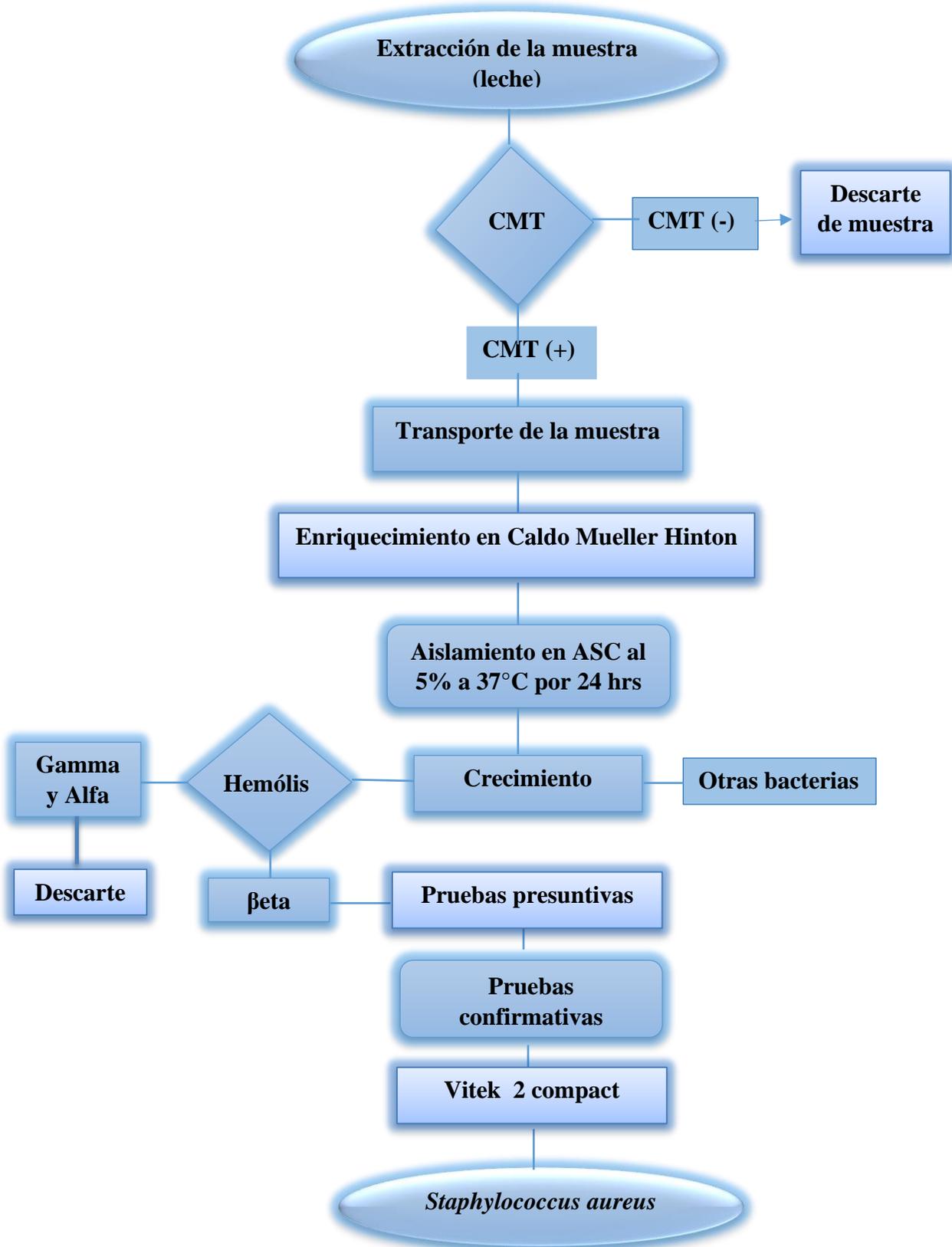


Ficha de recolección de datos

La presente ficha tiene como finalidad recolectar información útil para el estudio: prevalencia de *Staphylococcus aureus* aislado del ganado vacuno con mastitis procedente de la Universidad Nacional Agraria (UNA), durante el periodo de Marzo -Mayo del 2022

1.Datos					
Código de la vaca					
Muestra					
Fecha en que se recolecto la muestra					
Fecha del aislamiento					
Observaciones					
2. Clasificación de la mastitis					
Mastitis tes california (CMT)					
	C1:	C2:			
	C3:	C4:			
3. Identificación de <i>Staphylococcus aureus</i>					
Características en agar sangre					
Gram					
Catalasa					
Coagulasa					
DN-asa					
Micorganismo (Vitek 2 compact)					
4.Susceptibilidad antimicrobiana (Vitek 2 compact)					
Cefoxitina			Ciprofloxacina		
Levofloxacina			Tetraciclina		
Nitrofurantoina			Trimetoprima/sulfametoxazol		
Penicilina G			Oxacilina		
Eritromicina			Clindamicina		
Linezolid			Vancomicina		
Rifampicina			Ceftarolina		
Daptomicina					

12.2. FIGURA N°1: Flujograma para la detección de *Staphylococcus aureus*



12.3.ILUSTRACIONES



Fig. N°1. Toma de muestra



Fig. N°2. California Mastitis Test



Fig. N°3. Reactivo California Mastitis Test Concentrado



Fig. N°4. Pase de las muestras a Caldo Mueller Hinton



Fig. N°5. Características de Staphylococcus aureus en ASC.

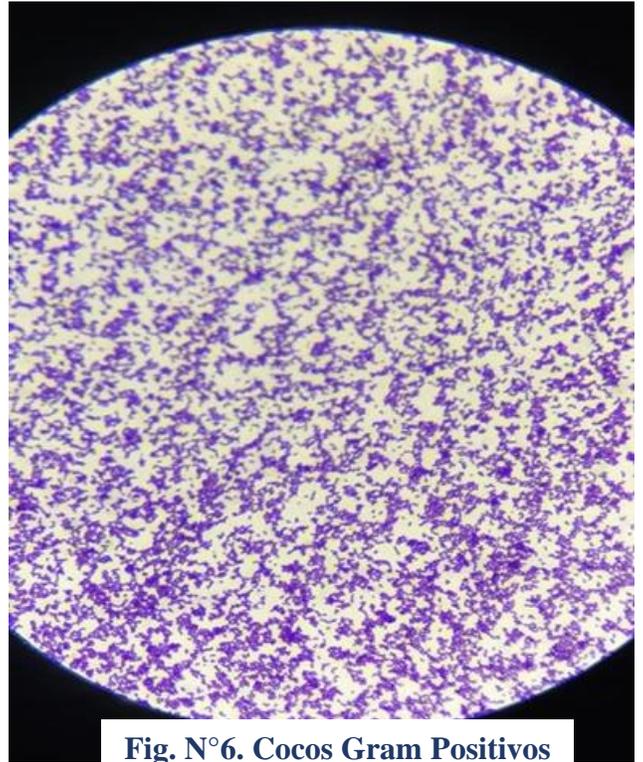


Fig. N°6. Cocos Gram Positivos en racimos de uva.



Fig. N°7. Prueba de Catalasa Positiva

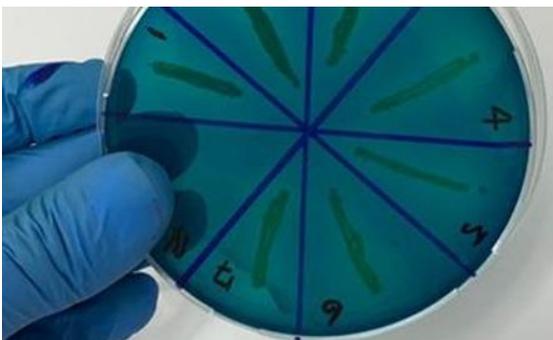


Fig. N°8. Prueba de DNAsa Positiva

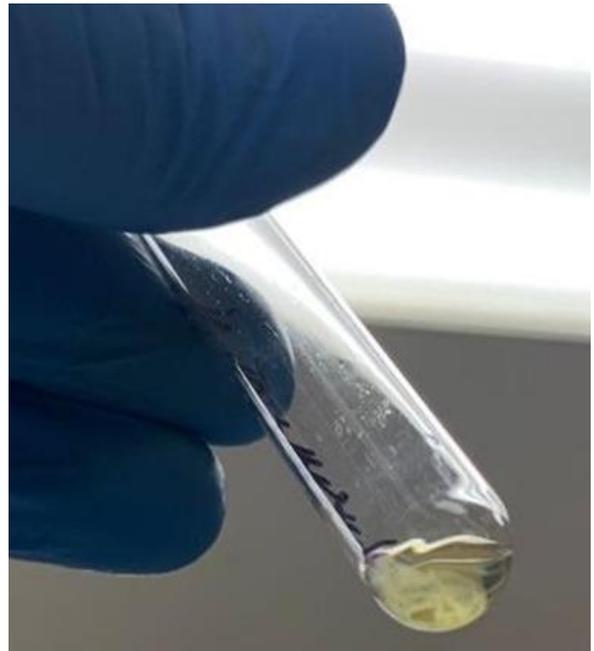


Fig. N°9. Prueba de Coagulasa Positiva



Fig. N°10. Incubación de ASC al 5% a 37°C de 18-24 H con CO₂

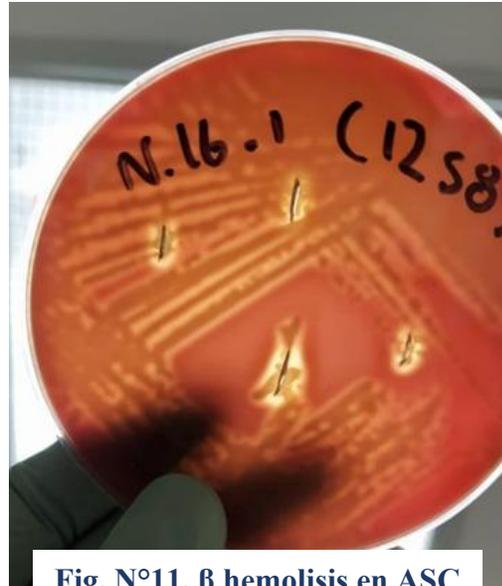


Fig. N°11. β hemolisis en ASC



Fig. N°12. Procesamiento previo al montaje de Vitek 2 Compact



Fig. N°13. Tarjeta Vitek 2 Compact



Fig. N°14. Vitek 2 Compact

12.4. CARTA DE AUTORIZACIÓN DE MUESTREO



20 de abril del 2022

Sus manos

Por la presente autorizo la realización del muestreo al ganado de la FACA, para que logren desarrollar la investigación con el tema **prevalencia de *Staphylococcus aureus* aislado del ganado vacuno con mastitis procedente de la universidad nacional agraria (UNA), durante el periodo de marzo-mayo del 2022**, desarrollada por estudiantes de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (UNAN- Managua), tutoriados por Msc. Daniela Magaly Ruiz Saldivar, docente del departamento de Bioanálisis clínico POLISAL.

Atentamente

Mv. Esp. Omar Navarro
Docente Investigador FACA-UNA
Resp. Extensión FACA-UNA
+505 85882339
onavarro@ci.una.edu.ni

12.5.CARTA DE ALOJAMIENTO



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
FACULTAD DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINARIA
"Campus Universitario Ing. Tania Beteta Herrera MSc."



Managua, 19 de agosto de 2021

Ing. Bryan Mendieta PhD.
Decano Facultad de Ciencia Animal
Sus manos

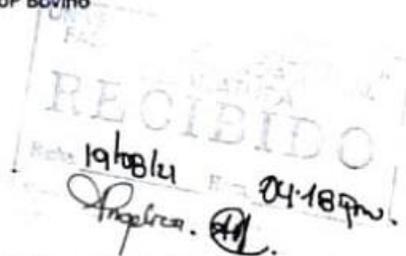
Estimado Decano por medio de la presente solicito amablemente apoyo de su gestión para la aprobación del hospedaje de 3 estudiantes de la UNAN Managua quienes estarán realizando un estudio en colaboración de nuestra facultad en identificación de mecanismos de resistencias en vacas diagnosticadas con mastitis por *Staphylococcus aureus*.

Este hospedaje será por una noche el día 25 de agosto del presente año ya que el muestreo se llevara en la CAFoP bovina a las 5:00 am el día 26 de agosto.

Sin más que agregar y agradeciendo de antemano.

Saludos
Omar Navarro MV.
Resp. Extensión/ Docente Investigador

c. Wendel Mejía –Resp. CAFoP Bovino/ Dr. William Oporta Resp. Salud CAFoP Bovino
Archivo.



Dirección: Fábrica de Cereales El Mejor 1 km al norte, 300 m al oeste, municipio de Sabana Grande.
Campus Universitario "Ing. Tania Beteta" Finca Santa Rosa. Teléfonos: 22331999/22331501 Ext. 5303.



12.6.PRESUPUESTO

Articulo	Unidad de medida	Cantidad	Costo unitario \$	Total \$
Guantes estériles	Caja	1	-	6
Portaobjetos	Caja	1	-	8
Placas Petri	Paquete (20 unidades)	10	-	30
Tubos cónicos	Paquete (22 unidades)	2	-	12.60
Asa bacteriológica estéril desechable	Paquete (10 unidades)	10	-	40
Agar Mueller Hinton	Gramos	500	-	120
Agar DNAsa	Gramos	300	-	100
Agar TSA	Gramos	300	-	70
Tarjetas Vitek GP	Unidad	8	20	160
Tarjetas Vitek AST-P663	Unidad	8	20	160
Caldo leche	Gramos	100	-	145
Total	-----	-----	-----	851.33