

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS



Efecto de tres selladores sobre la incidencia de mastitis subclínica y evaluación de resistencia a antibióticos de tres bacterias patógenas en dos ganaderías lecheras en el Municipio de Caluco, Sonsonate, El Salvador.

POR:

BR. FABRIZIO INESTROZA OSORIO
BR. TATIANA ALEXANDRA ZEPEDA CALLES
BR. LUIS REYNALDO GALINDO GUZMAN

CIUDAD UNIVERSITARIA, FEBRERO 2020.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA



Efecto de tres selladores sobre la incidencia de mastitis subclínica y evaluación de resistencia a antibióticos de tres bacterias patógenas en dos ganaderías lecheras en el Municipio de Caluco, Sonsonate, El Salvador.

POR:

BR. FABRIZIO INESTROZA OSORIO
BR. TATIANA ALEXANDRA ZEPEDA CALLES
BR. LUIS REYNALDO GALINDO GUZMAN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE:
LICENCIADO(A) EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

CIUDAD UNIVERSITARIA, FEBRERO 2020

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR:

MSc Roger Armando Arias Alvarado.

SECRETARIO GENERAL:

ING. Francisco Antonio Alarcón Sandoval.

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

DECANO

Dr. Francisco Lara Ascencio.

SECRETARIO

ING. AGR. Balmore Martínez Sierra.

JEFA DEL DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

F. _____

Ing. Blanca Eugenia Torres de Ortiz

DOCENTES DIRECTORES:

F. _____

MSc. Elmer Edgardo Corea Guillén.

F. _____

M.V.Z. M.R.A. Carlos David López Salazar.

F. _____

MSc. Amy Elieth Morán Rodríguez.

COORDINADOR GENERAL DE PROCESOS DE GRADUACIÓN.

F. _____

Ing. Agr. Carlos Enrique Ruano Iraheta.

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestros más sinceros agradecimientos por este logro alcanzado principalmente al creador, ya que sin su ayuda no hubiera sido posible desarrollar y finalizar esta investigación.

A nuestros asesores de tesis: ING. MSc. Edgardo Corea, M.V.Z. M.R.A. Carlos D. López Salazar, MSc. Amy E. Moran Rodríguez por el interés, dedicación y apoyo incondicional proporcionado a nosotros en el trabajo de investigación.

A las autoridades del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD), por habernos permitido utilizar las instalaciones, equipo, materiales y reactivos del Laboratorio para poder realizar esta investigación.

A la Srta. Zoila Girón Hidalgo, técnico del área de microbiología del edificio de CENSALUD, por su disposición y apoyo durante el análisis microbiológico de nuestra investigación.

A los compañeros tesisistas y de Servicio social de CENSALUD quienes compartieron sus conocimientos y amistad siempre que nosotros lo necesitamos.

A los encargados de Velesa y San Ramon, por habernos permitido realizar esta investigación en sus ganaderías, muchas gracias por su solidaridad y hospitalidad.

A nuestros padres y familiares por brindarnos su apoyo incondicional en todo momento y estar pendientes de nuestro progreso en la carrera y en la etapa de investigación.

A todos y cada uno de ustedes, muchas gracias.

DEDICATORIA

Al creador ya que él se encargó de velar por nosotros en los momentos más difíciles y nos ayuda a atravesarlos para poder culminar con éxito lo que nos proponemos, en este caso mi carrera profesional.

A mi Padre Wilfredo y mi madre Silvia Margarita, porque gracias a su amor, su apoyo, sus sacrificios y sus consejos he podido llegar con éxito hasta el final de esta etapa académica lo cual estará conmigo el resto de mi vida.

A mi familia: mis hermanos, mis abuelos, primos y tíos ya que ellos siempre estuvieron a disposición cuando necesite ayuda y me brindaron consejos que me ayudaron a seguir adelante.

A mi amada Jackie porque su compañía y apoyo en esta etapa fue de gran ayuda en los momentos difíciles.

A mis futuros colegas, compañeros de tesis: Tatiana y Reynaldo, no ha sido fácil, pero logramos llegar al final, quien diría.

Al personal docente de Facultad de Ciencias Agronómicas por todo lo que aprendí durante estos años, las enseñanzas me servirán para tomar buenas decisiones a lo largo de mi vida profesional.

A todos los compañeros que he conocido en el transcurso de la carrera, y a los que son mis amigos gracias a ello, pues de una u otra manera me han brindado ayuda y solidaridad en momentos determinado.

Fabrizio Inestroza Osorio.

DEDICATORIA.

Agradezco a Dios por la vida que me ha dado y la oportunidad de estar en este momento de mi vida presentando mi tesis, y tener la oportunidad de agradecerle a mis papas Norma Calles y Alex Zepeda que gracias a sus sacrificios, consejos, apoyo y cariño incondicional pude seguir adelante con mi carrera dándome los ánimos necesarios en el momento ideal.

Agradecerle a cada uno de los miembros de mi familia mis tías-abuelas, mi madrina, mi hermana, mis primas y primos que en algún momento de mi carrera me ayudaron siempre cuando necesite de ellos y especialmente a mi tío Mario Sanchez por su amor y enseñanzas ya que siempre estuviste apoyándome desde el inicio de mi carrera mil gracias por todo tío, a mi futuro esposo Carlos por su paciencia consejos y amor incondicional.

A mis amigas y colegas que me apoyaron, mis compañeros de tesis Fabrizio y Reynaldo por fin pudimos y a todos mis maestros y asesores de la Facultad de Ciencias Agronómicas y personal del laboratorio de CENSALUD.

Tatiana Zepeda Calles.

DEDICATORIA.

Le agradezco a mi familia, mis amigos y a todos los que hicieron posible este trabajo de graduación.

Luis Reynaldo Galindo Guzmán.

RESUMEN

Este estudio se llevó a cabo en dos ganaderías lecheras en el municipio de Caluco, departamento de Sonsonate, con el objetivo de evaluar el efecto de tres selladores sobre la reducción de la incidencia de casos de mastitis subclínica y a la vez identificar la presencia de tres agentes etiológicos más comúnmente asociados a mastitis y su multirresistencia bacteriana a antibióticos de uso más frecuente en el tratamiento de esta patología.

Para el estudio, se realizó la prueba California de Mastitis (CMT) a todas las vacas en las dos ganaderías en estudio. Se seleccionaron 60 vacas negativas a CMT con 180 días de lactancia en cada una de las dos ganaderías las cuales se dividieron al azar en tres grupos de 20 para aplicarles uno de los tres selladores comerciales (A, B Y C) estudiados (con base de yodo entre 0.20-0.25%) durante 21 días consecutivos, luego se desarrolló otra prueba CMT para determinar los casos positivos a mastitis subclínica después de haber aplicado el sellador de pezón, sustituyendo las vacas que resultaron positivas a la prueba CMT por vacas sanas, luego a cada grupo se le intercambió el sellador, hasta que se completaron los 3 periodos de 21 días.

A partir de los resultados de CMT se identificaron casos positivos a mastitis subclínica en cada ganadería, Se hicieron 3 muestreos (Luego de cada periodo de 21 días) donde se tomaron 10 muestras de leche de 100 ml en cuartos positivos a CMT (uno por vaca) de 20 vacas por periodo en cada ganadería (al final se procesaron 47 muestras por limitaciones técnicas), con intervalos de tres semanas, las muestras fueron procesadas en el laboratorio de CENSALUD.

Se realizaron los procedimientos para el aislamiento de las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, posteriormente fueron realizadas pruebas de sensibilidad para seis antibióticos de uso frecuente en el tratamiento de la mastitis subclínica.

Se identificaron 50 casos de mastitis subclínica de un total de 360 vacas en cada ganadería que representa un 13.88% en general. Siendo los porcentajes de incidencia de la enfermedad del 10.84%, 17.5% y 11.67% después del uso de los selladores A, B, y C, respectivamente. En los aislamientos de laboratorio se identificaron *Staphylococcus aureus* (21.97%) y *Escherichia coli* (42.85%) y las bacterias presentaron mayor resistencia a Penicilina G (80 - 100%), ampicilina (50 - 95%), amoxicilina con ácido clavulánico (25 - 75%); y mostraron mayor sensibilidad a gentamicina (70 - 100%), enrofloxacin (80- 100%), neomicina (80%).

Los perfiles de multirresistencia más frecuentes fueron betalactámicos más quinolonas y betalactámicos más aminoglucósidos.

PALABRAS CLAVE: Mastitis subclínica, agentes etiológicos, bacterias, multirresistencia, antibióticos, selladores.

SUMMARY

This study was carried out in two dairy farms in the municipality of Caluco, Sonsonate department, with the objective of evaluating the effect of three nipple sealants on reducing the incidence of subclinical mastitis cases and at the same time identifying the presence of three etiological agents most commonly associated with mastitis and their bacterial multiresistance to antibiotics most frequently used in the treatment of this pathology.

For the study, the California Mastitis test (CMT) was performed on all the cows in the two dairy farms under study. 60 CMT-negative cows with 180 days of lactation were selected in each of the two cattle farms which were randomly divided into three groups of 20 to apply one of the three commercial sealants (A, B and C) studied (based on iodine between 0.20-0.25%) for 21 consecutive days, another CMT test was then developed to determine the positive cases of subclinical mastitis after applying the nipple sealant, replacing the cows that were positive to the CMT test with healthy cows, then at each The sealant was exchanged until the three 21-day periods were completed.

From the results of CMT, positive cases of subclinical mastitis were identified in each livestock, 3 samples were made (After each 21-day period) where 10 100 ml milk samples were taken in CMT-positive rooms (one per cow) of 20 cows per period in each livestock (in the end 47 samples were processed due to technical limitations), with intervals of three weeks, the samples were processed in the CENSALUD laboratory.

The procedures for the isolation of the bacteria *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* were performed, subsequently sensitivity tests were performed for six antibiotics often used in the treatment of subclinical mastitis.

Fifty cases of subclinical mastitis were identified from a total of 360 cows in each livestock that represents 13.88% in general. The percentages of disease incidence being 10.84%, 17.5% and 11.67% after the use of sealants A, B and C, respectively. In the laboratory isolates *Staphylococcus aureus* (21.97%) and *Escherichia coli* (42.85%) were identified and the bacteria exhibited greater resistance to Penicillin G (80-100%), ampicillin (50-95%), amoxicillin with clavulanic acid (25 - 75%); and showed greater sensitivity to gentamicin (70-100%), enrofloxacin (80-100%), neomycin (80%).

The most frequent multiresistance profiles were beta-lactams plus quinolones and beta-lactams plus aminoglycosides.

KEY WORDS: Subclinical Mastitis, etiological agents, bacteria, multiresistance, antibiotics, sealants.

CONTENIDO.

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. La ganadería en El Salvador.....	2
2.2 Principales factores predisponentes a enfermedades en las ganaderías.	2
2.3 Clasificación de las enfermedades según su etiología:	2
2.4. Mastitis bovina.....	3
2.5. La mastitis y su impacto	3
2.5.1 Efecto la producción de leche.....	3
2.5.2 Efecto en la reproducción.	4
2.6 Clasificación de la mastitis	4
2.6.1 Mastitis clínica.....	4
2.6.2 Mastitis subclínica.....	5
2.7. Etiología de la mastitis.....	5
2.7.1. Descripción de agentes infecciosos.	6
2.8. Métodos de detección de la mastitis bovina	7
2.8.1. Observación y palpación de la ubre	7
2.8.2. Pruebas físicas	8
2.8.3. Pruebas químicas	8
2.9 Tratamiento de mastitis	9
2.10. Resistencia y multiresistencia a los antibióticos	10
2.10.1. Mecanismos de resistencia.	10
➤ Modificación enzimática o destrucción del antibiótico	10
➤ Presencia de bombas de reflujo que expulsan el antibiótico.....	10
➤ Impermeabilidad al antibiótico.....	11
➤ Modificación del sitio blanco.	11
2.10.2. Medidas de prevención contra la resistencia bacteriana	11
2.11. Métodos de determinación de la sensibilidad antibiótica en bacterias aisladas.....	11
2.12. Uso de selladores de pezón y sus beneficios.	12
3. METODOLOGÍA	13

3.1 Ubicación geográfica.....	13
4. DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO.....	14
4.1. Ganaderías y vacas.....	14
4.2 PRUEBA DE EFECTIVIDAD DE SELLADORES.....	14
4.2.1 Materiales y equipo.....	14
4.2.2 Unidades experimentales.....	14
4.2.3. Aplicación de los tratamientos.....	15
4.2.4 Prueba CMT.....	15
4.3 Estudio de aislamiento de bacterias y antibiograma.....	15
4.3.1 Procedimiento general para bacterias:.....	16
4.3.2 Pruebas confirmatorias según bacterias en estudio.....	16
4.4 Evaluación de resistencia a antibióticos.....	17
4.5 Metodología estadística.....	18
4.5.1 Estudio de selladores.....	18
4.5.2 Estudio de aislamiento y antibiograma.....	19
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
5.1 Efectividad de los selladores en la prevención de la mastitis subclínica.....	19
5.1.1 Resultados generales a prueba California de mastitis (CMT).....	19
5.1.2 Efectividad de los selladores.....	20
5.2 Aislamiento de bacterias en leches de vacas positivas a CMT.....	22
5.3 Resultados de sensibilidad antimicrobiana a los antibióticos.....	24
5.3.1. Porcentaje de resistencia y sensibilidad <i>Streptococcus</i> spp.....	24
5.3.2. Porcentaje de resistencia y sensibilidad <i>Staphylococcus aureus</i>	25
5.3.3. Porcentaje de resistencia y sensibilidad de <i>Escherichia coli</i>	26
5.4. Resultados de multirresistencia antimicrobiana.....	27
6. CONCLUSIONES.....	30
7. RECOMENDACIONES.....	31
8. BIBLIOGRAFÍA.....	32
9. ANEXOS.....	40

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.Ubicación geográfica del Municipio de Caluco y las haciendas en estudio, Departamento de Sonsonate.	13
FIGURA 2.Selección de unidades experimentales en las ganaderías estudiadas.	13
FIGURA 3.Identificación y Selección de unidades experimentales en las ganaderías estudiadas.	14
FIGURA 4.Realización de prueba California para mastitis.	15
FIGURA 5.proceso de pesaje y vertido de placas para medios de cultivo selectivos e inoculación de bacterias.	16
FIGURA 6. Realización de prueba de la coagulasa para <i>Staphylococcus aureus</i>	17
FIGURA 7. Aplicación de sensidiscos e interpretación de antibiogramas.	18
FIGURA 8.Porcentaje de vacas con prueba CMT negativa después de 3 rotaciones de 21 días de uso de diferentes selladores de pezón.	21
FIGURA 9.Perfil de resistencia antibiótica de <i>Streptococcus spp</i> aislados de muestras de leches con reacción positiva a CMT.	24
FIGURA 10.Perfil de resistencia antibiótica de <i>Staphylococcus aureus</i> aislados de muestras de leches con reacción positiva a CMT.	25
FIGURA 11.Perfil de resistencia antibiótica de <i>Escherichia coli</i> aislados de muestras de leches con reacción positiva a CMT.	26
FIGURA 12.Perfil de multirresistencia antibiótica aislados de muestras de leches con reacción positiva a CMT.	27

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1 Interpretación de la Prueba de California para Mastitis	9
Cuadro 2 Resultados de prueba California mastitis Test (CMT) en vacas en ordeño en dos ganaderías lecheras de Sonsonate, El Salvador.	19
Cuadro 3 Efecto del uso de tres selladores de barrera sobre la incidencia de mastitis subclínica según la prueba CMT en la ganadería 1 Sonsonate, El Salvador.	20
Cuadro 4 Efecto del uso de tres selladores de barrera sobre la incidencia de mastitis subclínica según la prueba CMT en la ganadería 2 Sonsonate, El Salvador.	20
Cuadro 5 Efecto del uso de tres selladores de barrera sobre la incidencia de mastitis subclínica según la prueba CMT en dos ganaderías lecheras en Sonsonate, El Salvador.	21
Cuadro 6 Microorganismos aislados en muestras de leche provenientes de vacas positivas a CMT. (Total de pruebas = 360, total de muestras positivas = 47).	22
Cuadro 7 Aislados totales del estudio con multirresistencia antibiótica de muestras de leches con reacción positiva a CMT.	28

ÍNDICE DE ANEXOS

anexo. 1 Antibióticos sistémicos de elección contra mastitis.	40
anexo. 2 Procedimientos generales para siembra primaria de bacterias.....	40
anexo. 3 Programación de actividades en campo y laboratorio para el experimento	40
anexo. 4 Resultados de prueba California mastitis Test (CMT) en vacas en ordeño en dos ganaderías lecheras de Sonsonate, El Salvador.....	41
anexo. 5 Pruebas de laboratorio para <i>Staphylococcus aureus</i>	42
anexo. 6 Pruebas de resultados de las pruebas realizadas para la detección de <i>Escherichia coli</i>	43
anexo. 7 Pruebas de resultados de las pruebas realizadas para la detección de <i>Streptococcus spp.</i>	44
anexo. 8 Resultados de antibiogramas <i>Escherichia coli</i>	45
anexo. 9 Resultados de antibiograma para <i>Staphylococcus aureus</i>	46
anexo. 10 Resultados de antibiogramas <i>Streptococcus spp.</i>	47
anexo. 11 Listado de muestras y las diferentes cepas en los aislamientos.	48
anexo. 12 Listado de códigos de muestras obtenidas por ganadería; periodo, muestra; sellador.	49
anexo. 13 Muestras dentro del experimento y fuera del experimento.....	50
anexo. 14 Muestras positivas a cmt separadas por sellador	50
anexo. 15 Microorganismos encontrados por muestra.....	51
anexo. 16 Combinaciones de agente etiológico por muestra.....	52

ABREVIATURAS

ABREVIATURA	DESCRIPCIÓN UNIDADES
CMT	California Mastitis Test
T	Grado Trazas
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal
CENSALUD	Centro de Investigación y Desarrollo en Salud
NCCLS	National Committee for Clinical and Laboratory Standards
EMB	Eosina Metilo Brillante
SCN	<i>Staphylococcus coagulasa negativa</i>
CAMP	Christie- Atkins- Munch- Peterson test
AMP	Ampicilina
PEN	Penicilina G Procaínica
AMC	Amoxicilina + Ácido clavulánico
OXI	Oxitetraciclina
ENR	Enrofloxacina
CN	Gentamicina
NEO	Neomicina
S	Sensible
I	Susceptibilidad Intermedia
R	Resistente
PEN	Penicilinas
QUINO	Quinolonas
TETRA	Tetraciclinas
SULFAS	Sulfonamidas
AMINO	Aminoglucósidos
MACRO	Macrólidos
MIC	Concentración mínima inhibitoria

1. INTRODUCCIÓN.

La mastitis es una infección de la glándula mamaria que afecta a la vaca en diversos grados de intensidad, que sin importar los métodos de producción lechera siempre van a dar las condiciones favorables a la propagación de los agentes etiológicos causantes de dicha enfermedad. (Merck, 2006).

Según su severidad, la mastitis se clasifica como clínica y subclínica; la mastitis subclínica no es fácilmente visible ya que casi siempre los cuartos afectados y la leche tienen apariencia normal, siendo solo evidente mediante conteo de células somáticas. La mastitis no sólo causa disminución en la calidad y la producción láctea, también provoca el daño y en ocasiones la pérdida glandular, además implica mano de obra extra, leche de desperdicio, gastos por medicamentos e incremento de los costos por concepto de reemplazos. se reporta que el porcentaje de vacas eliminadas por causa de mastitis va de 1.3% hasta 25% anualmente (Olguín y Bernal, s.f).

La desinfección de pezones mantiene sana la piel del pezón y ayuda a cicatrizar heridas del mismo, además contribuye de forma decisiva al control de mastitis, ya que más del 50% de nuevas infecciones de la ubre se pueden prevenir desinfectando los pezones después de cada ordeño con un producto efectivo. Entre los principales componentes activos en los desinfectantes de pezones se encuentran: yodo, clorhexidina, compuestos aniónicos ácidos (ácido sulfónico de alquil benceno), cloro, amonios cuaternarios, ácidos grasos (Callejo Ramos, 2010). El sellador de pezón busca que el paso al interior de la ubre quede bloqueado a agentes patógenos causantes de la mastitis.

En esta investigación se tuvieron como objetivos evaluar el efecto de tres selladores en la incidencia de casos de mastitis subclínica en vacas lecheras, aislar tres de las bacterias más comunes causantes de mastitis a partir de muestras de leche proveniente de vacas positivas a CMT, y evaluar las resistencia o sensibilidad de estos agentes patógenos frente a seis de los antibióticos más frecuentemente usados en las ganaderías. Dichos procedimientos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Control de Calidad Microbiológico del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD)

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. La ganadería en El Salvador.

Alrededor de 150 millones de hogares en todo el mundo se dedican a la producción de leche. En la mayoría de los países en desarrollo, la leche es producida por pequeños agricultores y la producción lechera contribuye a los medios de vida, la seguridad alimentaria y la nutrición de los hogares. La leche produce ganancias relativamente rápidas para los pequeños productores y es una fuente importante de ingresos en efectivo (FAO, 2019).

La actividad ganadera constituye un componente principal dentro de la estructura económica y social del país, ya que gran parte de la población salvadoreña incluye en su dieta alimenticia, productos y subproductos lácteos y cárnicos (Escobar *et al* 2011)

La ganadería es uno de los rubros más importantes en el sector agropecuario (12% del PIB lo proporciona el sector agropecuario a nivel nacional) del país que se ha venido incrementando, durante el año 2015, el rubro ganadería aportó un 19.6% al PIB agropecuario (BCR, 2016).

Este sector ofrece alimento como carne, leche y sus derivados, también provee gran cantidad de materia prima y subproductos para las industrias del calzado, cebo para jabones, así como la elaboración del compostaje de los residuos orgánicos provenientes del sacrificio de los bovinos. La importancia del sector ganadero ha venido cambiando a través del tiempo, ya que ha pasado de ser una actividad propiamente de las familias, a convertirse en un sector fuerte de producción y actividad económica con poder de asociación, dentro de las cuales poseen capacidad de gestión y negociación en el desarrollo de sus actividades (Escobar *et al* 2011).

Los métodos tradicionales de manejo del ganado bovino en nuestro país se han sustituido poco a poco por sistemas más eficientes aprovechándose la adaptabilidad del ganado, el uso racional de su alimentación, y la mejora genética según el propósito que se persiga. (FAO, 2019). Todo esto para ir mejorando el sector agropecuario en nuestro país y así poder satisfacer las necesidades de la población salvadoreña.

2.2 Principales factores predisponentes a enfermedades en las ganaderías.

En la ganadería existen múltiples factores que intervienen en el desarrollo de enfermedades del ganado lechero, para el cual podemos mencionar algunos de los principales factores que predisponen a las enfermedades:

- a) Factores climáticos.
- b) Higiene.
- c) Instalaciones.
- d) Otros factores (FAO, 2019).

2.3 Clasificación de las enfermedades según su etiología:

- **carenciales y metabólicas.**

En muchos casos, las carencias y trastornos metabólicos tienen la causa en la alimentación diaria y la enfermedad avanza muy lento. Por lo tanto, existe la tendencia de no detectar la anomalía a tiempo.

- **Infeciosas.**

La infección se desarrolla cuando los microbios invaden el organismo del animal por una puerta de entrada y le ganan al sistema inmunológico del animal. Por lo tanto, para desarrollar la

infección son necesarios tres elementos: la presencia de microbio, la invasión por una puerta de entrada y la disminución de la inmunidad. (INATEC,2016)

En esencia, la vaca de leche es más susceptible a padecer cualquier infección, incluidas las infecciones virales debido a las altas demandas metabólicas ocasionadas por los sistemas de producción cada vez más intensivos, lo que ocasiona problemas clínicos como mastitis, laminitis, abortos, muerte embrionaria e infertilidad. No obstante, se conoce que las mayores pérdidas económicas son ocasionadas por los problemas subclínicos. (Vargas et al 2012).

a continuación, se mencionarán las principales enfermedades del ganado adulto:

- 1- mastitis.
- 2- timpanismo, meteorismo o empansamiento.
- 3- fiebre de leche.
- 4- síndrome de la vaca echada.
- 5- ántrax.
- 6- retenciones de placenta.
- 7- prolapso vaginal y del útero.
- 8- brucelosis.
- 9- estomatitis vesicular.
- 10- parásitos de la sangre en el ganado. (FAO, 2019)

Según el (INATEC, 2016) existen cuatro tipos principales de microorganismos: virus, bacterias, hongos y protozoos, que pueden ser los microorganismos causantes de las enfermedades mencionadas anteriormente y dar problemas de salud en las ganaderías creando perdidas y gastos extras para los ganaderos siendo una de las principales enfermedades y más común en la ganadería la mastitis.

2.4. Mastitis bovina.

La mastitis es un proceso inflamatorio de la glándula mamaria y es comúnmente una consecuencia de una infección microbiana causada por patógenos que penetran a la glándula a través del canal del pezón. Se caracteriza por diferentes cambios ya sea físicos o químicos de la glándula mamaria (Seegers *et al*, 2003; Zhao *et al*, 2008).

Los cambios patológicos de las células epiteliales secretoras de leche desde el proceso inflamatorio a menudo llevan consigo un descenso en la capacidad funcional. Según la patogénesis, las pérdidas funcionales pueden continuar en las siguientes lactaciones, lo que altera la productividad y el incremento potencial de peso de las crías (Merck, 2006).

2.5. La mastitis y su impacto

2.5.1 Efecto la producción de leche.

La mastitis bovina está considerada como la enfermedad que más pérdidas económicas ocasiona a los productores lecheros, pues su presencia en los establos se refleja en gastos excesivos en medicamentos para el productor y una disminución en los ingresos por decremento de la producción, que generalmente deberían percibirse dentro de la explotación (Medina, 2003).

La mastitis subclínica es la principal forma en los rodeos lecheros modernos, afectando entre el 20 a 50% de las vacas. Su costo es muy difícil de cuantificar, pero la mayoría de los expertos coinciden en que la mastitis subclínica le cuesta al productor de leche promedio más que la mastitis clínica. Asumiendo una prevalencia del 45% de mastitis subclínica con un costo estimado de 70 al 75% de reducción en la producción de leche debido a que una gran parte del

tejido mamario resultó con daño irreversible. Esto se debe a que los antibióticos son muy útiles para el tratamiento de la infección, pero no protegen directamente a la glándula del daño tisular (De Luca *et al.*, 2015).

Amplios estudios realizados en los países productores de leche como: Israel, Francia, Estados Unidos de América, entre otros, han mostrado que un 50% de todas las vacas padecen mastitis, principalmente del tipo subclínico. Las pérdidas ocasionadas por esta enfermedad pueden agruparse de la siguiente manera: disminución de la producción, descarte de leche, costo de medicamentos, honorarios veterinarios, trabajo extra, pérdida de potencial genético (Halasa *et al.*, 2007; Saran y Chaffer, 2000).

Las pérdidas mundiales, anuales debido a la mastitis, se han estimado en 35 billones de dólares americanos (Wellenberg *et al.* 2002).

El costo anual de la enfermedad se estima que es del 10% de las ventas totales de la leche del hato. (Ruiz Romero, 2016)

El costo promedio de cada caso de mastitis aguda le cuesta al productor lechero canadiense, alrededor de 150 dólares. Este número surge de las pérdidas económicas por descarte de leche, tratamiento con antibióticos, caída en la producción de leche y el tiempo empleado en el manejo de la vaca en tratamiento (Jeromy, 2001).

2.5.2 Efecto en la reproducción.

Las vacas con mastitis previo al primer servicio muestran un incremento significativo en número de días para el primer servicio, días de vacías y número de servicios por concepción, comparadas con las vacas sin mastitis o con un sólo caso de mastitis desarrollado post-servicio. Estudios sugieren que en los tejidos inflamados por la infección con bacterias Gram negativas, se liberan prostaglandinas. El incremento de prostaglandina circulante ejerce el mismo efecto farmacológico que si la inyectaran, pudiendo incrementar la duración del estro en las vacas infectadas, así como la pérdida embrionaria en una vaca servida (Jeromy 2001).

La mastitis de la vaca, junto a los trastornos de la fertilidad, constituye la causa más importante de la falta de rentabilidad de una explotación (Halasa *et al.*, 2007; Saran y Chaffer, 2000).

La importancia radica en los efectos negativos como: muertes escasas, pérdida de la producción que supone un 15% menos por lactación, y pérdida final de un cuarterón como unidad de producción supone un incremento en el índice de desvieje, y una reducción de la longevidad (Blood *et al.*, 2006).

2.6 Clasificación de la mastitis

Las infecciones intramamarias son a menudo descritas como mastitis subclínicas o clínicas (Merck, 2006).

2.6.1 Mastitis clínica

Es una respuesta inflamatoria a la infección que provoca anomalías visibles de la leche (por ejemplo, color, coágulos de fibrina). Cuando la extensión de la inflamación aumenta, los cambios en la ubre (tumefacción, calor, dolor, enrojecimiento) podrían ser también evidentes. Los casos clínicos que incluyen síntomas locales solo son conocidos como casos leves o moderados. Si la respuesta inflamatoria incluye afectación sistémica (fiebre, anorexia y shock), el caso es denominado severo. Si el comienzo es muy rápido, a menudo ocurre en casos clínicos severos, es denominada caso agudo de mastitis severa. (Merck, 2006).

Existen tres tipos de mastitis clínica:

Mastitis sobreaguda: caracterizada por inflamación severa, función alterada de la glándula (reducción en la producción de leche, cambios en la composición de la leche) y signos

sistémicos (fiebre, depresión, temblores, anorexia y pérdida de peso).

Mastitis aguda: similar a la mastitis sobreaguda pero los signos sistémicos son menos severos.

Mastitis subaguda: la inflamación de la glándula mamaria es mínima y no hay signos clínicos sistémicos (Ruiz, 2016).

2.6.2 Mastitis subclínica.

Es la presencia de una infección sin síntomas aparentes de inflamación local o afectación sistémica, estas infecciones son en su mayor parte asintomáticas; si la infección persiste durante al menos 2 meses, son denominadas crónicas. Todo el ganado lechero tiene vacas con mastitis subclínicas; no obstante, la prevalencia de vacas infectadas varía desde 15-75%, y los cuartos desde 5-40%. Muchos agentes patógenos diferentes pueden determinar una infección crónica que solo de vez en cuando manifestara síntomas clínicos de mastitis. Las vacas lecheras adultas tienen mayor riesgo de infección, tanto durante la lactación como durante el periodo seco (Merck, 2006).

Por cada caso de mastitis clínica, existen de 20 a 40 casos más de mastitis subclínica (Ruiz, 2016).

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 (Gallegos y Moncada, 2011). 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 (Gallegos y Moncada, 2011). Esta presentación de la enfermedad es la más persistente en el ganado lechero; Ocurre frecuentemente, y conduce a grandes pérdidas económicas no solo por la reducción de la producción, también por los elevados conteos de células somáticas presentes en los tanques de leche (Ariznabarreta *et al.*, 2002). En la práctica, los casos de mastitis subclínica con frecuencia no son detectados rápidamente, o pueden incluso no ser reconocidas por el ordeñador (Wellenberg *et al.*, 2002). Para identificar estos casos de mastitis se hace necesario las técnicas de identificación como la medición del conteo de células somáticas, CMT y el cultivo bacteriológico (Sixtos, 2011).

2.7. Etiología de la mastitis.

El 80% de los casos de mastitis son ocasionados por la entrada de microorganismos patógenos específicos a través de los pezones y tejidos de la ubre; los casos restantes son resultado de lesiones traumáticas, con o sin invasión de microorganismos (Olguín A. y Bernal, s.f).

Los patógenos causantes de la mastitis en ganado se dividen en mayores y menores: en el primero se encuentran los patógenos contagiosos (*Sta. aureus*, *Str. agalactiae* y *M. bovis*) y los patógenos medioambientales (*Str. Uberis* y *Str. Dysgalactiae*): en cuanto a coliformes se encuentran bacterias gram negativas (*E. coli*, *Klebsiella spp* y *Enterobacter spp*). En el segundo grupo encontramos patógenos como: *Sta. chromogenes*, *Sta. xylosus* y *Sta. sciuri*, *Sta. warneri*, *Sta. simulans* y *Sta. epidermidis* así como *Corynebacterium bovis* (Ruiz Romero, 2016).

Dentro de los agentes patógenos causantes de mastitis, los más importantes son: *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium bovis*, y especies de *Mycoplasma* (Olguín A. y Bernal, s.f).

Se han identificado 138 patógenos causantes de mastitis, esta variedad de microorganismos a la vez se clasifican en aquellos que causan mastitis contagiosa es decir, aquellos que se diseminan de los cuartos infectados a otros cuartos y a otros animales; existen aquellos que son habitantes normales de la piel normal del pezón y actúan como oportunistas en

la presentación de esta enfermedad, por último, están aquellos microorganismos que se encuentran en el medio ambiente y logran llegar a la glándula mamaria. (Ruiz Romero, 2016)

Tomando como base la epidemiología y la fisiopatología, se han clasificado estos microorganismos como causantes de la mastitis contagiosa o ambiental, con base a su asociación epidemiológica con la enfermedad y a su proclividad de causar la infección oportunista, persistente o transeúnte, respectivamente (Radostits *et al.*, 2002; Bradley y Green, 2001; Riffon *et al.*, 2001; Rossitto *et al.*, 2002).

Según Cotrino (2001) y Pagliano Falero (2016) La mastitis clínica y subclínica puede catalogarse de acuerdo con el medio donde prosperan los microorganismos y según sea el mecanismo de transmisión. Así se tiene:

Mastitis contagiosa: son aquellas infecciones intramamarias trasmisibles vaca a vaca que se producen durante el ordeño cuando se utilizan los mismos instrumentos para lavar las glándulas de los animales, así como de pezoneras y equipo de ordeño mal desinfectado. donde el agente microbiano habita el interior de las ubres de un animal hospedero y de ahí contagia a los demás animales (*Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma bovis* y *Corynebacterium bovis*). *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus Agalactiae*

Mastitis cutánea: Bacterias que habitan en la piel de los pezones (*Streptococcus dysgalactiae*, *Staphylococcus uberis*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus simulans*).

Mastitis iatrogénica: Donde el contagio se da por uso no sanitario de sondas intramamarias o medicamentos; Asociada al uso inadecuado de cánulas intramamarias con la etiología de Levaduras y Hongos filamentosos.

Mastitis ambiental: Provocada por bacterias que habitan en el ambiente de la explotación lechera (Gram negativas de los géneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Pseudomonas*). Con excepción de *Mycoplasma spp*, que puede extenderse de vaca a vaca vía aérea e invade la ubre subsecuente a una bacteriemia, los patógenos contagiosos son transmitidos durante el ordeño por las manos de los encargados del ordeño o por los revestimientos de la unidad de ordeño.

Los echaderos utilizados en el alojamiento del ganado vacuno son la principal fuente de microorganismos ambientales; las tetillas del baño desinfectante contaminadas, las infusiones intramamarias, las mangueras de agua utilizadas para la preparación de las ubres durante el ordeño, el agua de las charcas o agujeros de lodo, las lesiones cutáneas, los traumatismos en las tetillas, y las moscas han sido incriminadas como fuente de infección (Merck, 2006).

La presentación de mastitis por coliformes se da sobre todo en vacas estabuladas o recintos pequeños, la contaminación de la piel de la ubre se produce entre ordeños cuando la vaca está en contacto con el lecho contaminado. (Saran y Chaffer, 2000).

2.7.1. Descripción de agentes infecciosos.

Streptococcus spp. El término Streptococcus (Streptós, trenzado; kókkos, grano) fue utilizado por primera vez por Billroth, en 1874. Para describir unos microorganismos de forma cocácea, dispuestos en cadena. (Guizar y Bedolla, 2008)

Los estreptococos son anaerobios facultativos, aunque algunas cepas crecen mejor en condiciones anaerobias. si bien casi todas las cepas crecen en el aire, el crecimiento de la mayoría de ellas es estimulado por un aumento de CO₂. Los estreptococos son catalasa negativos y oxidasa negativos, propiedad que, junto con la tinción de Gram, diferencia los estreptococos de las demás especies. (Winn *et al*, 2008).

Streptococcus agalactiae Es considerado una de las mayores causas de infecciones intramamarias bovinas. Es un patógeno muy contagioso de la glándula mamaria, donde puede sobrevivir por largos períodos de tiempo (Martínez *et al.*, 2013).

Staphylococcus spp. Los estafilococos son cocos Gram-positivos (de 0.5 a 15 µm de diámetro) que se presentan sueltos, en parejas, en pequeñas cadenas (de 3 o 4 células) y más característicamente en grupos irregulares en forma de racimos (su denominación procede del griego staphylé, racimo de uvas). Son anaerobios facultativos, catalasa positiva, generalmente oxidasa negativos, no esporulados, inmóviles y generalmente no forman cápsula o tienen una limitada formación capsular. En la actualidad en el género *Staphylococcus* se reconocen 32 especies y varias subespecies, si bien sólo algunas de ellas tienen importancia desde el punto de vista clínico. Los estafilococos según produzcan o no la enzima coagulasa, se dividen en dos grandes grupos: Estafilococos coagulasa positivos y estafilococos coagulasa negativos (Guizar y Bedolla, 2008).

Se encuentra en el medio ambiente externo y pliegues cutáneos, el perineo, las axilas y la vagina. Aunque forma parte del microbiota normal, puede causar infecciones oportunistas importantes en condiciones apropiadas. La única característica más confiable para la identificación de *St. aureus* es la prueba de la coagulasa (Winn *et al.*, 2008).

Staphylococcus aureus, Aunque varios patógenos bacterianos pueden causar la mastitis, el *S. aureus* es el primer agente etiológico en la mayor parte del mundo (Tollersrud *et al.*, 2000).

La fuente de contagio es la misma glándula de otras vacas en el establo, sin embargo, las manos de los ordeñadores pueden actuar como una fuente de infección de *S. aureus* (Ruiz Romero, 2016).

Escherichia coli es una bacteria recuperada con mayor frecuencia en los laboratorios clínicos y, ha sido incriminada en enfermedades infecciosas que afecta casi a cualquier tejido y sistema orgánico. Es uno de los microorganismos más frecuentes involucrados en la sepsis por gramnegativos y en el shock inducido por endotoxinas. En vista de lo anterior, es posible aislar y cultivar miembros de la familia Enterobacteriácea tanto a partir de muestras fecales y productos que pudieron haber sufrido una contaminación fecal como el agua, alimentos, utensilios, etc. (Winn *et al.*, 2008).

La razón para la importancia de la mastitis por *Escherichia coli* es su creciente incidencia y los síntomas severos. Este aumento puede ser debido al uso rutinario de la terapia de la vaca seca, la cual es eficaz contra el organismo contagioso Gram positivo, pero no contra el patógeno medioambiental como *E. coli*. La infección de la ubre por este patógeno probablemente es resultado de contaminación fecal (Guizar y Bedolla, 2008)

Según la bibliografía estos se encuentran entre los agentes infecciosos más importantes por lo cual fueron elegidos para la realización de esta investigación.

Los agentes etiológicos de mastitis más comunes son *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*. *S. aureus* y *St. agalactiae* se han aislado de leche de animales con casos de mastitis subclínica. La vía principal de transmisión es de vaca a vaca cuando se utilizan los mismos instrumentos para lavar las glándulas de los animales, así como de pezoneras y equipo de ordeño mal desinfectado (Ruiz Romero, 2016).

Blood *et al.* (2006) dice que la etiología de las mastitis bacterianas infecciosas los principales agentes responsables son: *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*; en el caso de mastitis ambientales en primer lugar se encuentra *Escherichia coli*.

2.8. Métodos de detección de la mastitis bovina

2.8.1. Observación y palpación de la ubre

La infección puede provocar inflamación de uno, varios cuartos o de toda la glándula, aumento de la temperatura en el área afectada, así como enrojecimiento de la zona y dolor, entre otros. Estos eventos provocan que el sistema inmune del animal actué tratando de aliviar el problema, además de lograr la mayoría de las veces mantener la infección únicamente en el área

afectada sin alterar otros órganos o sistemas del animal (Pérez *et al.*, 2005).

Cuando se encuentran todos o alguno de los síntomas enumerados se puede interpretar como un caso de mastitis clínica (Pérez *et al.*, 2005). En la mastitis subclínica, la ubre de la vaca permanece aparentemente sana, la leche que produce, a simple vista, es una leche normal, pero una infección incipiente puede estar dañando el tejido glandular y provocando por lo tanto una alteración en la leche que esta produce (Bedolla *et al* 2007).

2.8.2. Pruebas físicas

Estas sólo son útiles cuando la mastitis ya está avanzada y no detectan mastitis subclínica. Dentro de estas se encuentran las siguientes:

Prueba del paño negro. Consiste en la detección de grumos en la leche haciendo pasar los primeros chorros a través de una malla negra o bien utilizando una cubetilla especialmente diseñada para eso es recomendable realizar este procedimiento en todos los ordeños ya que además de detectar leche anormal, se eliminan bacterias que normalmente se encuentran en mayor cantidad en estos primeros chorros y además se estimula la “bajada” de la leche (Pérez.D, 1986).

Prueba de la taza probadora. Se deben examinar los primeros chorros de leche de cada ordeño sobre un recipiente de fondo oscuro los coágulos, escamas, hilos, materia fibrosa, secreciones acuosas, o color anormal indican que la leche no es normal y que hay problemas probables. En la mastitis crónica la leche no tiene apariencia visible anormal en todos los ordeños (Bedolla *et al* 2007).

2.8.3. Pruebas químicas

Pruebas para la detección de mastitis:

- Prueba de California para mastitis (CMT).
- Conductividad eléctrica de la leche.
- Prueba de whiteside.
- Papel indicador de mastitis.
- Pruebas de laboratorio (NAGasa, Prueba de elisa captura indirecta, prueba del cloruro, albúmina sérica bovina, atripsina.)
- Recuento celular de laboratorio (células somáticas).
- Recuento de bacterias totales. (Blood *et al*, 2006).

A continuación, se describirán algunas de las pruebas más utilizadas:

Prueba de California para Mastitis (CMT)

La Prueba de California para Mastitis (CMT, por sus siglas en inglés). Es una prueba sencilla que es útil para detectar la mastitis subclínica por valorar groseramente el recuento de células somáticas de la leche (Medina y Montaldo, 2003; Bedolla, 2008). No proporciona un resultado numérico, sino más bien una indicación de si el recuento es elevado o bajo, por lo que todo resultado por encima de una reacción vestigial se considera sospechoso. La prueba consiste en el agregado de un detergente a la leche alquil-aril sulfonato de sodio causando la liberación del ADN de los leucocitos presentes en la ubre y este se convierte en gel al combinarse con agentes proteicos de la leche, es decir, permite determinar la respuesta inflamatoria con base en la viscosidad del gel que se forma al mezclar el reactivo (púrpura de bromocresol) con la leche, permitiendo evaluar cada cuarto independientemente. Esta reacción se clasifica en 0, T (Trazas), 1, 2, ó 3 dependiendo de la cantidad de gel formado (Mellenberger y Roth 2000).

Conductividad eléctrica:

se utiliza como un método para la detección de mastitis se basa en el aumento en la cantidad de sodio y cloro presentes en la leche cuando existe una alteración de la glándula mamaria, provocándose entonces un aumento en la conductividad de la misma (Guerra 2000).

El método tradicional de recuento de células somáticas:

Es un recuento directo realizado por microscopía óptica, utilizando un aumento de 500x. Es un ensayo cuantitativo de laboratorio, por el cual se examinan bajo el microscopio un frotis teñido de leche problema y se cuenta el número de células somáticas. El recuento microscópico directo de células somáticas de la leche, denominado también método óptico, si bien es de referencia actualmente es de poca utilidad cuando se trata de un gran número de muestras, porque es una metodología muy demorada. Sin embargo, aún mantiene su utilidad para los trabajos de investigación (Mellenberger y Roth 2000).

Pasos a seguir para la realización de la Prueba de California para Mastitis:

Se desecha la leche del pre ordeño, se ordeñan uno o dos chorros de leche de cada cuarto en cada una de las placas de la paleta, se inclina la paleta de modo que se desecha la mayor parte de esta leche, se añade a la leche un volumen igual de reactivo, se mezcla el reactivo y se examina en cuanto a la presencia de una reacción de verificación. Previo a continuar con otra muestra, se debe enjuagar la placa (Blowey y Edmonson, 1995).

Cuadro 1 Interpretación de la Prueba de California para Mastitis

Grado CMT	Viscosidad	RCS/ml
Negativo (N)	Ninguna	< 200.000
Trazas (T)	Leve	200000 - 500.000
Una cruz (+)	Leve moderada	400.000 - 1.500.000
Dos cruces (++)	Moderada	800.000 - 5.000.000
Tres cruces (+++)	Severa	>5.000.000

Fuente: Mellenberger, Roth. Hoja de información de Prueba de Mastitis. Universidad de WisconsinMadison
 NOTA* (Si la muestra resulto en Trazas o 1+ a la prueba CMT es considerada para ser llevada a laboratorio)

2.9 Tratamiento de mastitis

Se han descrito diferentes prácticas de manejo para mitigar la mastitis como el vaciado frecuente de la ubre, aislamiento y ordeño aparte. Sin embargo, la terapia antibiótica es el método más directo para aliviar su impacto en el animal. El tratamiento parenteral con antibióticos de amplio espectro ha sido usado. Complementar el tratamiento sistémico con infusiones intramamarias, debería proporcionar niveles adecuados de antibióticos en el cuarto durante 6 días.

Rutinariamente cuando la mastitis clínica es detectada, la vaca es ordeñada a fondo y después se administra una infusión de antibiótico por vía intramamaria directamente en la glándula infectada (Olguin y Bernal s.f).

El tratamiento intramamario se ha realizado principalmente con mezcla de aminoglucósidos (frameticina o neomicina) y penicilina, ampicilina, amoxicilina y cefalosporinas de tercera generación (Blood *et al*, 2006).

La totalidad de los 4 cuartos de vacas infectadas deben ser tratados para asegurar la eliminación del patógeno y evitar las posibles infecciones cruzadas de cuartos no infectados. Siempre es preferible antes de instaurar un tratamiento antibiótico realizar un antibiograma; ninguna pérdida económica importante sucederá como resultado del retraso de la terapia hasta que el cultivo bacteriano esté completado (Merck, 2006).

2.10. Resistencia y multiresistencia a los antibióticos

Los antibióticos se usan para el tratamiento de las enfermedades infecciosas, tanto en las personas como en los animales, y tienen un efecto bactericida (causando la muerte) o bacteriostático (inhibiendo el crecimiento) sobre el patógeno que se pretende erradicar (Torres, 2012).

Actualmente las enfermedades infecciosas en medicina veterinaria como la mastitis subclínica siguen siendo un problema serio de salud con una tendencia hacia el aumento debido a la aparición de cepas resistentes a los antibióticos convencionales. Es por esta razón que se hace necesario el estudio de los factores de resistencia bacteriana. La resistencia bacteriana tiene una base genética intrínseca y una adquirida (Pérez *et al* 2013).

A continuación, se describe de manera breve los tipos de resistencia bacteriana que se presentan:

Resistencia natural

En este caso se transmite de forma vertical de generación en generación (Couvalin, 1988). En el caso de la resistencia natural todas las bacterias de la misma especie son resistentes a algunas familias de antibióticos y eso les permite tener ventajas competitivas con respecto a otras cepas y pueden sobrevivir en caso de que se emplee ese antibiótico. (Guerra,2000).

Resistencia adquirida.

Constituye un problema en la clínica, se detectan pruebas de sensibilidad y se pone de manifiesto en los fracasos terapéuticos en un paciente infectado con cepas de un microorganismo en otros tiempos sensibles. Dicha transferencia de genes se realiza horizontalmente a través de plásmidos u otro material genético movable como integrones y transposones. De esta forma una bacteria puede adquirir la resistencia a uno o varios antibióticos sin necesidad de haber estado en contacto con estos.

Esta resistencia no solo permite la transmisión a otras generaciones, sino también a otras especies bacterianas (Guerra, 2000).

2.10.1. Mecanismos de resistencia.

Cabrera *et al* (2008) describe los mecanismos más importantes de resistencia a los antibióticos de la siguiente manera:

➤ **Modificación enzimática o destrucción del antibiótico**

Es el mecanismo de resistencia que utilizan algunas bacterias contra medicamentos betalactámicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes y monoatómicos). El ejemplo más representativo son las betalactamasas, enzimas que inactivan el antibiótico al hidrolizar el anillo betalactámico de la molécula. Otra clase importante de antibióticos que son destruidos por enzimas, son los aminoglucósidos. La resistencia surge de estímulos naturales o mutaciones en los cromosomas de los genes o de la adquisición de elementos genéticos extra cromosomales (plásmidos o transposones) que portan los genes de transferencia (Martínez *et al* 2013).

➤ **Presencia de bombas de reflujo que expulsan el antibiótico**

Este modo de resistencia puede llegar a disminuir o inclusive suprimir la susceptibilidad a un amplio rango de antimicrobianos. El diseño de reflujo (bomba) es mediado por proteínas de transporte, que confieren resistencia a los componentes tóxicos. En las bacterias Gramnegativas es necesario un sistema de eflujo tripartita para expulsar el antimicrobiano hacia el medio externo: una proteína localizada en la membrana citoplasmática, otra en el espacio periplasmático (proteína de fusión de membrana MFP) y una tercera en la membrana externa (factor de

membrana externa). Los sistemas de eflujo particularmente de bacterias Gramnegativas se asocian con resistencia a múltiples antimicrobianos de importancia clínica como las fluoroquinolonas (Cabrera *et al* 2008).

➤ **Impermeabilidad al antibiótico.**

Existen diferencias en la composición de la envoltura celular de las bacterias y en especial en la cantidad del peptidoglucano. Además de una capa pequeña de peptidoglucano en las bacterias Gramnegativas, se conoce una estructura de membrana consistente en lipopolisacárido y lipoproteína anclados al peptidoglucano junto con grandes proteínas de membrana externa llamadas porinas. Estas porinas varían en número y tamaño y funcionan como canales acuosos generan una ruta hidrofílica a través de la estructura de la membrana hacia el espacio periplásmico. La resistencia intrínseca de bacterias como *Pseudomona aeruginosa* y *Enterococcus spp* se relaciona con la poca cantidad de moléculas de porina, las mutaciones que resultan por la alteración de la forma y el número de las ya existentes influyen en la permeabilidad a los antibióticos, por lo cual se presentan diversos tipos de resistencia a través de la membrana (Cabrera *et al* 2008).

➤ **Modificación del sitio blanco.**

Uno de los mecanismos de resistencia más importante, es aquel en el que la mutación bacteriana se manifiesta en un cambio de la estructura del sitio de acción del fármaco. En este grupo se puede destacar las modificaciones por metilación del ARNr (Ácido ribonucleico ribosomal) que hacen resistentes a algunas bacterias Gram negativas, frente a los macrólidos, este mecanismo constituye el método por el cual disminuye la afinidad del antibiótico por el ribosoma sin afectar la síntesis de proteínas bacterianas (Martínez *et al* 2013).

2.10.2. Medidas de prevención contra la resistencia bacteriana

Hacer uso racional de los antibióticos e incremento en los planes de educación médica de pregrado y posgrado sobre el estudio de las enfermedades infecciosas, el uso de los agentes antimicrobianos y su prescripción basada en evidencia, el establecimiento de programas de vigilancia para detectar la aparición de cepas resistentes y mejoramiento de la calidad de los métodos para determinar susceptibilidad antimicrobiana para guiar la terapéutica empírica contra los patógenos que producen las enfermedades infecciosas más comunes (Perez *et al*, 2013).

La salud pública aconseja el uso prudente de antibióticos, pues su uso indiscriminado puede promover la resistencia bacteriana en la cadena alimenticia; la mayor consecuencia, del abuso de los antibióticos, incluye el desarrollo de resistencia antibiótica en la flora bacteriana de los animales (Guizar y Bedolla, 2008).

Otro factor importante que causa la aparición de cepas resistentes es el consumo de productos que contienen antibióticos, esto es un claro ejemplo del uso indiscriminado de antibacterianos, lo cual hace necesario tomar medidas para la racionalización de antibióticos en la medicina veterinaria, sobre todo para la encargada de la producción de alimento de origen animal (Pérez *et al* 2013).

2.11. Métodos de determinación de la sensibilidad antibiótica en bacterias aisladas.

Métodos para probar la sensibilidad a los antimicrobianos Los tres métodos que se citan a continuación son los únicos que suministran resultados significativamente reproducibles:

Difusión en disco

Dilución en medio líquido

Dilución en medio sólido con agar. (OIE, 2008)

Método de difusión en disco. Consiste en la difusión que experimenta un agente antimicrobiano a una determinada concentración a partir de discos, que se depositan en un medio de cultivo sólido que ha sido inoculado con el aislamiento bacteriano obtenido. Este método se basa en la medición de una zona de inhibición del crecimiento que es proporcional a la sensibilidad de la bacteria frente al antimicrobiano presente en el disco. (OIE, 2008)

Métodos de dilución en un medio líquido y en un medio sólido. La finalidad de estos métodos es determinar la concentración más baja del antimicrobiano ensayado que es capaz de inhibir el crecimiento de la bacteria analizada concentración inhibitoria mínima (MIC), que normalmente se expresa en mililitros o miligramos/litro. Sin embargo, la MIC no siempre representa un valor absoluto. La "verdadera" MIC es un punto que se encuentra entre la concentración más baja del ensayo que inhibe el crecimiento de la bacteria y la siguiente concentración más baja del ensayo. Por tanto, se puede considerar que las determinaciones de la MIC utilizando una serie de diluciones tienen una variación inherente de una dilución (OIE, 2008).

2.12. Uso de selladores de pezón y sus beneficios.

Al final del ordeño de la hembra bovina, el esfínter del pezón permanece abierto y dilatado durante 30 a 60 minutos aproximadamente. Este tiempo favorece el ingreso de microorganismos ambientales por el conducto del pezón a la glándula mamaria, causando nuevas infecciones y comprometiendo la salud de la vaca. En la actualidad se utilizan desinfectantes bactericidas como el yodo para impedir la entrada de microorganismos a la glándula mamaria después de la rutina de ordeño. Sin embargo, este se puede quedar inactivado fácilmente por contacto con residuos de leche, estiércol, barro y orina presentes en los pezones o en el cuarto. (Miguel Ángel R. *et al* 2014)

El pezón tiene como función permitir el paso de la leche al momento de ser extraída ya sea por medios mecánicos o manuales. Además, está diseñado como barrera para agentes extraños que quieran ingresar a colonizar la glándula mamaria (Ávila y Romero, s.f.; Wattiaux, 2013).

Por otra parte, el pezón es susceptible a la contaminación por bacterias, clasificadas en contagiosas y ambientales. Las bacterias contagiosas se diseminan entre los pezones de una vaca a otra como resultado de un manejo inadecuado al momento del ordeño. Las bacterias ambientales penetran en la ubre cuando se les proporciona las condiciones óptimas como, por ejemplo: la inactivación del yodo utilizado en el post-sellado debido a la presencia de materia orgánica, las incorrectas disoluciones del producto, daños en el esfínter del pezón, entre otros. (Ramón *et. al.*, 2011, Izak Eial, 2006).

El post-sellado en la rutina de ordeño se realiza al finalizar la extracción de la leche, consiste en una desinfección de pezones con un producto yodado. Una limitación para el uso de bactericidas son las formulaciones inadecuadas de productos, ya que pueden ocasionar irritaciones en pezones debido a su principio activo y pH, sin embargo, la mayoría de productos están hechos a base de sustancias emolientes como lanolina o glicerina, por lo tanto, su concentración no debe ser mayor al 12%, ya que puede haber riesgo de inactivarse el principio activo (Soto, 1998).

Los selladores de pezones son productos elaborados a base de látex natural o acrílico, que actúa formando una película firme sobre la superficie del pezón, evitando la entrada de microbios y materia orgánica por este conducto hasta la glándula mamaria entre los periodos de ordeño. Estos productos son poco irritantes y tienen baja toxicidad para los pezones, pero aun así pueden generar daño cuando van a ser removidos. (Soto, 1998).

Está suficientemente comprobado que esta práctica disminuye en un 50 % las nuevas infecciones en el rodeo cuando se realiza con un producto de eficacia probada. No existen

diferencias en el uso por inmersión y por spray, cuando este se aplica correctamente (Chávez. 2010).

3. METODOLOGÍA

3.1 Ubicación geográfica

La fase de campo de este estudio se realizó en dos ganaderías lecheras del municipio de Caluco en el departamento de Sonsonate a 400-425 msnm con Latitud: 13.7447°, Longitud: -89.6731° (Figura 1).

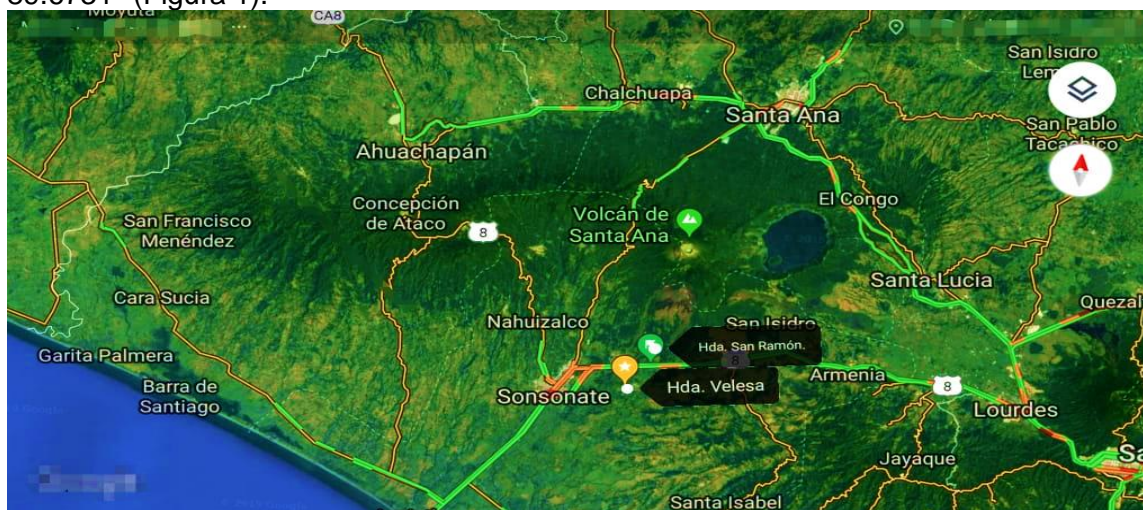


FIGURA 1. Ubicación geográfica del Municipio de Caluco y las haciendas en estudio, Departamento de Sonsonate.

Ambas ganaderías se caracterizaban por ser de fácil accesibilidad al encontrarse en la misma área geográfica, tienen un nivel de tecnificación adecuado, así como un número significativo de animales en ordeño con un número superando los 300 animales en producción. En las dos ganaderías los animales estaban estabulados (figura 2), poseen registros productivos y sanitario de las enfermedades más comunes que se presentan al ganado; incluyendo mastitis subclínica y clínica, así como de los medicamentos que se utilizan para su tratamiento.

El estudio de campo tuvo una duración de 63 días a partir de la primera semana del mes de junio del 2017, Los análisis bacteriológicos y de resistencia de antibióticos se realizaron en el Laboratorio de Control de Calidad Microbiológico del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador.



FIGURA 2. Ejemplo de unidades experimentales en las ganaderías estudiadas.

4. DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO.

4.1. Ganaderías y vacas

El estudio se desarrolló en las Ganaderías lecheras Velesa y San Ramón en el Municipio de Caluco, departamento de Sonsonate entre junio-agosto de 2017 que cuentan con sistemas de producción intensiva, manejo estabulado, ordeños mecanizados y genética predominantemente Holstein. Las ganaderías fueron seleccionadas para cumplir con una cantidad mayor a 120 vacas en ordeño, usando un protocolo de ordeño que incluía, la aplicación de un sellador de barrera a base de yodo y realizar de forma periódica la prueba california de mastitis test (CMT). Se siguió el protocolo de ordeño recomendado por la Cooperativa La Salud de Sonsonate que incluía: lavado de manos, despunte, resellado, secado, colocación y lavado de pezoneras y aplicación de sellador.

4.2 PRUEBA DE EFECTIVIDAD DE SELLADORES.

4.2.1 Materiales y equipo.

Los materiales utilizados fueron hieleras, gel refrigerante, frascos estériles de 500 ml, guantes, gabacha, papel toalla, botas de hule, marcadores permanentes, libreta de apuntes, cintas de 3 colores diferentes, reactivo para CMT, paletas para CMT.

4.2.2 Unidades experimentales.

Al inicio del estudio, se escogieron 60 vacas en ordeño en cada ganadería a las que se les realizó la prueba CMT y resultaron negativas; además, debían tener menos de 150 días en lactancia, con condición corporal mayor a 3.0 y con historias de salud normales. Las vacas fueron repartidas al azar en tres grupos de tratamiento, los cuales consistían en tres diferentes selladores de pezón (a base de yodo). Las vacas fueron identificadas por grupos con listón de color diferente para cada sellador y los ordeñadores instruidos para usar el sellador correspondiente en cada caso (figura 3).



FIGURA 3. Identificación de unidades experimentales en las ganaderías estudiadas.

4.2.3. Aplicación de los tratamientos.

El experimento consistió en tratar 120 vacas negativas, 60 por cada ganadería divididas en grupos de 20 vacas, a las cuales se le aplicaron uno de tres selladores a base de yodo activo (2200-2500 ppm) durante 21 días, 20 con A=Tensolac STD 2500 (TENSOLAC, Argentina); B=20 con el sellador I-Shield™ (Ecolab, MN USA) y C= Scud (Kemical, Costa Rica). Las vacas de ambas ganaderías fueron preselladas con Virkon® (Bayer) Al final de un periodo de 21 días se realizó la prueba de CMT registrando como negativas a las vacas sin reacción y positivas a las vacas que presentaron reacción grado T(trazas) leve y (+) leve moderada en uno o más cuartos, las vacas positivas en al menos un cuarto de la ubre se sustituyeron con una vaca negativa para mantener el número de vacas en estudio. Luego las vacas de cada grupo de debían pasar a usar el siguiente sellador hasta que se completaron los tres productos. Se previó que el trabajo de campo y muestreo tendría una duración de 63 días (9 semanas), por ganadería y el trabajo de laboratorio este mismo periodo más una semana. La dinámica de trabajo fue escalonada con un desfase de una semana por ganadería, haciéndose un total de 78 días de ensayo (Ver anexos, Cuadro 3), de manera que se inició el mes de junio y se terminó a finales de agosto de 2017.

4.2.4 Prueba CMT.

La prueba CMT se realizó en las ganaderías a las vacas al inicio del experimento y luego cada 21 días hasta que se completaron los 3 ciclos de 21 días. La prueba CMT consistió en la adición de 1 ml leche de 4 cuartos en 4 pozos de una paleta blanca, la cual se mezcló con el reactivo CMT. La viscosidad de la mezcla se interpretó como grados de mastitis según la escala propuesta anteriormente por (Mellenberger y Roth 2000) ver (cuadro 1)

Toma de datos. Durante la prueba CMT, se anotó el grado de reacción en todos los cuartos de todas las vacas de las ganaderías y así se obtuvo el número de casos nuevos de mastitis dentro de cada tratamiento (Figura 4).



FIGURA 4. Realización de prueba California para mastitis.

4.3 Estudio de aislamiento de bacterias y antibiograma

Durante las pruebas de CMT se escogieron diez vacas positivas en cada ganadería a las que se les realizó un estudio de aislamiento de bacterias y sensibilidad a antibióticos (No siempre fueron diez muestras pues algunas vacas eran retiradas del grupo y puestas en tratamiento por el personal de la ganadería). Para lo que se estableció una dinámica de muestreo y análisis en el laboratorio (Bacteriological Analytical Manual (**BAM**), 2016). Todas las muestras fueron manejadas según el procedimiento presentado en (anexo 1) basados en national Committee for clinical and Laboratory Standards, 2002 (NCCLS) y transportados al Laboratorio de Control de Calidad Microbiológico del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador, el cual se realizó en el siguiente orden establecido.

Para obtener las muestras se realizó una higienización de la ubre y el pezón para retirar residuos contaminantes de la muestra. Se procedió a eliminar los restos de cualquier material contaminante con agua y posteriormente se secó con papel toalla, luego se limpiaron los pezones con presellador de pezón y se secó con papel toalla, se eliminaron los primeros dos o tres chorros

de leche. Las muestras fueron tomadas de forma manual directamente del pezón afectado y depositado en bolsas plásticas estériles y se almacenaron en hielera a una temperatura de 4°C hasta su análisis de laboratorio.

4.3.1 Procedimiento general para bacterias:

Se siguieron los procedimientos establecidos por BAM (2016) para el aislamiento de bacterias importantes para la mastitis: *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (Figura 5).

Se realizó una siembra primaria de cada una de las muestras de leche para cada una de las tres bacterias causantes de la mastitis subclínica en un caldo enriquecido, luego se procedió a incubar por un periodo de 24-48 horas en anaerobiosis o aerobiosis según lo requería cada bacteria (cuadro anexo 2).

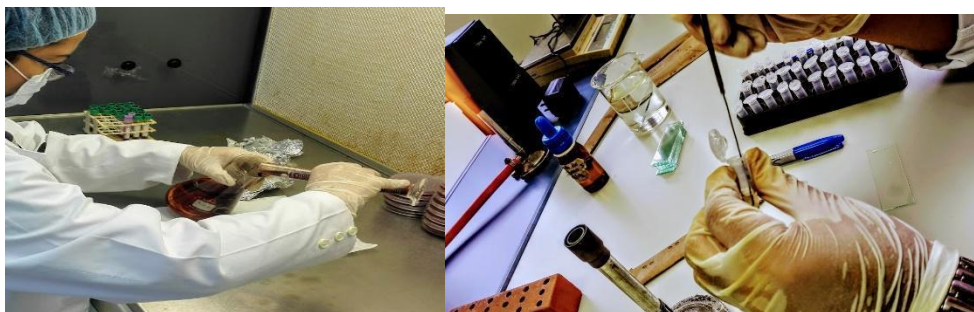


FIGURA 5. proceso de pesaje y vertido de placas para medios de cultivo selectivos e inoculación de bacterias.

4.3.2 Pruebas confirmatorias según bacterias en estudio.

Procedimiento de pruebas confirmatorias: las pruebas confirmatorias se realizaron según la bacteria a identificar.

***Streptococcus agalactiae*:** el procedimiento general se describe en el anexo 2, luego se realizaron las siguientes pruebas complementarias específicas.

Prueba de CAMP. Para esto se procedió a sembrar una estría de la cepa de *S. aureus* y perpendicularmente a esta (lo más cerca posible sin llegar a tocarla) se sembró la cepa de *Streptococcus spp* en estudio. Se dejó incubar por 24 horas a 35°C en aerobiosis y su interpretación fue el sinergismo de las hemólisis causadas por ambas bacterias, en forma de punta de flecha en la zona que estaba más cercana a ambas estrías. (BAM, 2016)

Prueba de la catalasa: (se realizó según procedimiento para *Staphylococcus* a partir del medio baird parker) (BAM, 2016).

***Staphylococcus aureus*:** para el procedimiento general ver (anexo 2), luego se realizaron las siguientes pruebas complementarias específicas según bacteria.

Prueba de la catalasa: Se utilizó el crecimiento en Baird-Parker, se tomó una asada y se colocó en un portaobjetos de vidrio inclinándolo para el test de catalasa, debe iluminarse apropiadamente para observar la producción de burbujas de gas. (BAM, 2016)

Procedimiento: Se colocaba una colonia crecida en un portaobjetos de vidrio y se agregaba una gota de peróxido de hidrógeno al 3% sobre esta, luego y se observaba burbujeo inmediato y vigoroso debido a la producción de oxígeno gaseoso.

Los micrococos y los estafilococos son catalasa positivos, mientras que los estreptococos y los enterococos son catalasa negativos. (Winn *et al*, 2008).

Prueba de coagulasa: se transferían de las placas con Baird-parker anteriormente ver procedimiento en anexo 2, las colonias sospechosas de *S. aureus* se colocaron en pequeños tubos conteniendo 0.2-0.3 ml de caldo BHI y se emulsionan a fondo; se incubó en suspensión por 18-24 horas a 35-37°C, luego se le agregó 0.5 ml de plasma al cultivo BHI y se mezclaba

profundamente; se dejaba incubar a 35-37°C y se examinaba periódicamente durante 6 horas, lo necesario para la formación del coágulo (BAM, 2016).

Solo la formación completa del coágulo aun cuando el tubo es inclinado o invertido era considerada positivo para *S. aureus* (Figura 6).



FIGURA 6. Realización de prueba de la coagulasa para *Staphylococcus aureus*.

***Escherichia coli*:** para el procedimiento general ver (anexo 2), luego se realizaron las siguientes pruebas complementarias específicas según bacteria.

Prueba confirmatoria de coliformes fecales (EC).

- I. Se inoculó con tres asadas de cada colonia positiva en la caja Petri (realizadas anteriormente descritas en el anexo 2) un tubo que contenía 10 ml de caldo EC y tubo de Durham, para comprobar la presencia de coliformes fecales.
- II. Se incubó durante 24-48 horas a 44.5°C.
- III. Luego del periodo de incubación se observaron los tubos y si se observaba turbidez y producción de gas, la prueba se consideraba positiva. Si no se observaba producción de gas, aun cuando se observó turbidez, se consideró que la prueba era negativa (Camacho et al,2009).

Prueba confirmativa para *Escherichia coli* (VRBA , EMB y Rapid Hicoliform).

- Se tomó una asada de cada uno de los tubos positivos en caldo EC y sembrar por estría cruzada en agar eosina azul de metileno (EMB) y agar bilis rojo violeta (VRBA) para su aislamiento.
- Se incubaron las placas invertidas a 35°C por 18-24 h.
- Se seleccionaron dos colonias de cada placa con la siguiente morfología colonial: colonias planas con o sin brillo metálico (EMB) y colonias planas color rosa con decoloración del medio. Si no hay colonias con morfología típica, probar una o más colonias lo más parecido *E. coli* para realizar las pruebas de morfología microscópica
- Se seleccionaron colonias características de *E.coli* Y sembrar por estría cruzada en agar Rapid Hicoliform Incubar las placas a 37°C por 18-24 h. observación macroscópica en presencia de luz ultravioleta, el cual presenta un color verde fluorescente
- Se hizo un frotis y se tiño por Gram. Observando al microscopio la presencia de bacilos cortos o cocobacilos Gram-negativos (Camacho et al,2009).

4.4 Evaluación de resistencia a antibióticos.

Antibiograma por el método de discos por difusión: se realizó con anticipación la preparación de placas petri con agar Müller-Hinton. Los antibióticos evaluados fueron: ampicilina (AMP), amoxicilina con ácido clavulanico (AMC), enrofloxacina (ENR), gentamicina (CN), neomicina (N) y penicilina G (P). Estos antibióticos son los utilizados en el tratamiento de la mastitis subclínica en las ganaderías en estudio. (BAM, 2016)

Preparación del inóculo. Se preparó el inóculo con solución salina estéril, a partir de 3-5 colonias de las bacterias aisladas del estudio, que fueron seleccionadas de un tubo inclinado de TSA de 18-24 horas de incubación. Dicha suspensión se ajustó a la escala 0.5 de McFarland.

Inoculación de placas. Luego de la preparación del inóculo previamente ajustado, se impregnó un hisopo estéril en la suspensión, y se removió el exceso de líquido rotando el hisopo sobre la pared interior del tubo. Se inocularon la superficie de las placas con agar Müller-Hinton y se hacía estriando en tres direcciones distintas, inoculando toda la placa uniformemente (Erna Cona, 2002).

Aplicación de sensidisco. Los discos se colocaron sobre la superficie del agar Müller-Hinton y para eso se usó una pinza estéril haciendo leve presión para asegurar el contacto completo del disco con el agar, la cantidad de los discos dependía del diámetro de la caja Petri siendo así 12 unidades en placas de 150 mm de diámetro y 5 unidades en placas de 100 mm de diámetro, con una separación de 24-25 mm (del centro de un sensidisco al otro más cercano).

Incubación: se incubaron en aerobiosis a 35° C por 24 horas posterior a la aplicación de los discos, luego del tiempo de incubación, se realizó la lectura de cada una de las placas, midiendo los diámetros de los halos de inhibición que se formaban alrededor de cada disco (Erna Cona, 2002).

Lectura e interpretación de resultados. Después del periodo de incubación, se midió el diámetro de las zonas de completa inhibición con un pie de rey o regla. Se observó con luz y con fondo negro, para poder visualizar mejor el halo y cualquier colonia pequeña que podía haber crecido en él. La interpretación de los diámetros de inhibición fue interpretada según las tablas propuestas por Clinical & Laboratory Standards NCCLS (2002).



FIGURA 7. Aplicación de sensidiscos e interpretación de antibiogramas.

4.5 Metodología estadística.

4.5.1 Estudio de selladores.

Se evaluó el efecto de tres selladores sobre la incidencia de la mastitis subclínica en dos ganaderías mediante la prueba de Chi cuadrado; la cual es una prueba de hipótesis que compara la distribución de la frecuencia de los datos observados contra la distribución de las estimaciones teóricas ó esperadas;

Para ello se utilizó el programa IBM SPSS versión 25; con dos grados de libertad y el 95% de

confiabilidad, donde la variable independiente es el efecto que producen los selladores sobre las unidades experimentales y la variable dependiente es el resultado que se obtiene al realizar la prueba de mastitis. Los tratamientos en estudio son tratamiento A:Tensolac, tratamiento B:Io-shield, tratamiento C:Scud

Los datos de aislamientos y antibiogramas se presentan en cuadros y gráficos que son descritos y discutidos en relación con la literatura pertinente y las condiciones del estudio.

4.5.2 Estudio de aislamiento y antibiograma.

Los aislamientos se presentaron como número de positivos y negativos en relación con las muestras analizadas para cada bacteria en una tabla de contingencia.

Los resultados de antibiogramas se clasificaron como sensible, intermedio y resistente para las tres bacterias en las que se basó el estudio.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1 Efectividad de los selladores en la prevención de la mastitis subclínica.

5.1.1 Resultados generales a prueba California de mastitis (CMT).

Se determinaron los resultados de la prueba de California Mastitis Test (CMT) para mastitis subclínica en 360 observaciones las que se obtuvieron de 60 pruebas en 3 periodos (de 3 semanas cada uno) en las dos ganaderías. Los valores globales de resultados para CMT en las vacas incluidas en el estudio, independientemente del sellador usado, se muestran en la tabla 2. Estos corresponden a **310 (86.11%)** casos negativos y **50 (13.88 %)** casos positivos.

Cuadro 2 Resultados de prueba California mastitis Test (CMT) en vacas en ordeño en dos ganaderías lecheras de Sonsonate, El Salvador.

Vacas / Ganadería	Vacas positivas**		Vacas negativas		TOTAL
	Casos*	%	Casos*	%	Casos
Ganadería 1	29	16.11	151	83.89	180
Ganadería 2	21	11.66	159	88.33	180
TOTAL	50	13.88	310	86.11	360

Ganadería 1= San Ramon; Ganadería 2 = Velesa

*Durante el período que duró el experimento junio-agosto 2017.

** Se consideró caso positivo a cualquier vaca que tuviera uno o más cuartos afectados, y caso negativo cuando no hubo cuartos afectados.

En el presente estudio, la prevalencia de mastitis subclínica fue de 16.11% en la ganadería 1 y 11.66% en la ganadería 2 con lo que el promedio global de prevalencia fue de 13.88% de vacas positivas a mastitis subclínica, dichos resultados se obtuvieron bajo el uso de selladores de barrera (base Yodo-povidona, 2500 ppm) para pezón y en ordeño mecánico. En un estudio reciente, Perla y Herrera (2017) encontraron una prevalencia de 60% de mastitis subclínica en vacas lecheras de la Zona Norte de El Salvador que eran ordeñadas manualmente. Contrastantemente en Brasil, Ruiz *et al*, (2011) reportaron 54.8% en vacas ordeñadas mecánicamente y 39.3 % en ordeño manual.

Se considera que la prevalencia de mastitis subclínica puede tener un amplio rango que puede encontrarse entre un mínimo del 15% y alcanzar un máximo de 60 % según (Ruiz.R. 2016 y García, *et al* 2018). Estudios recientes, han reportado prevalencias de mastitis subclínica que van desde de 3.25 % en Colombia (Becerra *et al* 2014), 11.62 % en Costa Rica (Mora *et. al*, 2015); 21 % en Colombia (Mendoza *et al* 2017) y 35.6 % en México (Aguilar 2014).

Los resultados reportados de mastitis subclínica en diferentes estudios varían mucho, ya que la ocurrencia de mastitis es influenciada por factores como la región, época, tipo de ordeño, higiene, instalaciones y equipo (Pagliano Falero, 2016). Esto implica que los resultados obtenidos en esta investigación pudieron estar influenciados por el tipo de ordeño mecánico (donde se restringe la influencia de los manipuladores de las vacas) y el uso de selladores demuestra que pueden haber influido en la baja incidencia de mastitis subclínica observada.

5.1.2 Efectividad de los selladores.

La efectividad de los tres selladores se evaluó por medio de los casos (frecuencia) positivos y negativos a CMT en vacas que fueron tratadas por tres semanas, completando tres periodos con 20 vacas en cada caso (para completar 60 vacas para cada sellador en cada ganadería). En las tablas 3 y 4 se presentan los resultados para las ganaderías 1 y 2 respectivamente. En la ganadería 1, se encontró un total de 28 casos positivos de los cuales 14 fueron de vacas tratadas con sellador B, los selladores A y C permitieron la presentación de 7 casos positivos cada uno.

En la ganadería 1 (cuadro 3), se encontró un total de 28 casos positivos de los cuales 7 fueron de vacas tratadas con sellador C, 7 vacas con sellador A y 14 para sellador B respectivamente.

Cuadro 3 Efecto del uso de tres selladores de barrera sobre la incidencia de mastitis subclínica según la prueba CMT en la ganadería 1 Sonsonate, El Salvador.

	Sellador A		Sellador B		Sellador C		Total
	Casos	%	Casos	%	Casos	%	
Negativos	53	88.33	46	76.66	53	88.33	152
Positivos	7	11.66	14	23.33	7	11.66	28
Total	60	100.0	60	100.0	60	100.0	180

El nivel de significancia para la prueba de chi fue del 5 % y los resultados no fueron significativos, por lo cual todos los selladores ejercen un efecto similar.

En la ganadería 2 (cuadro 4), se encontró un total de 20 casos positivos, de los cuales las vacas con selladores B y C tuvieron 7 cada grupo y las del sellador A tuvieron 6.

Cuadro 4 Efecto del uso de tres selladores de barrera sobre la incidencia de mastitis subclínica según la prueba CMT en la ganadería 2 Sonsonate, El Salvador.

	Sellador A		Sellador B		Sellador C		Total
	Casos	%	Casos	%	Casos	%	
Negativos	54	90.0	53	88.33	53	88.33	160
Positivos	6	10.0	7	11.66	7	11.66	20
Total	60	100.0	60	100.0	60	100.0	180

El nivel de significancia para la prueba de chi fue del 5 % y los resultados no fueron significativos, por lo cual todos los selladores ejercen un efecto similar.

Cuadro 5 Efecto del uso de tres selladores de barrera sobre la incidencia de mastitis subclínica según la prueba CMT en dos ganaderías lecheras en Sonsonate, El Salvador.

	Sellador A		Sellador B		Sellador C		Total
	Casos	%	Casos	%	Casos	%	
Negativos	107	89.17	99	82.50	106	88.33	312
Positivos	13	10.83	21	17.50	14	11.66	48
Total	*120	100.0	*120	100.0	*120	100.0	360

El nivel de significancia para la prueba de chi fue del 5 % y los resultados no fueron significativos, por lo cual todos los selladores ejercen un efecto similar.

*De las 60 vacas seleccionadas por ganadería como total se tomó el número sumado de ambas ganaderías.

La prueba de chi cuadrado dio como resultado un valor calculado de 1.10, que es menor al valor de tabla 5.99 (a una probabilidad de 0.05%), por lo tanto, se asume que el efecto de los diferentes selladores sobre la presentación de casos nuevos de mastitis subclínica, no es significativo. Lo que significa que cualquiera de ellos tendrá un efecto similar sobre el control de la mastitis.

El porcentaje de vacas negativas representa la efectividad de los selladores. En la figura 2 se presenta el resultado global de las dos ganaderías y los tres periodos para los selladores en estudio. El nivel de protección fue similar entre ellos con un rango de 82.5% a 89.17%.

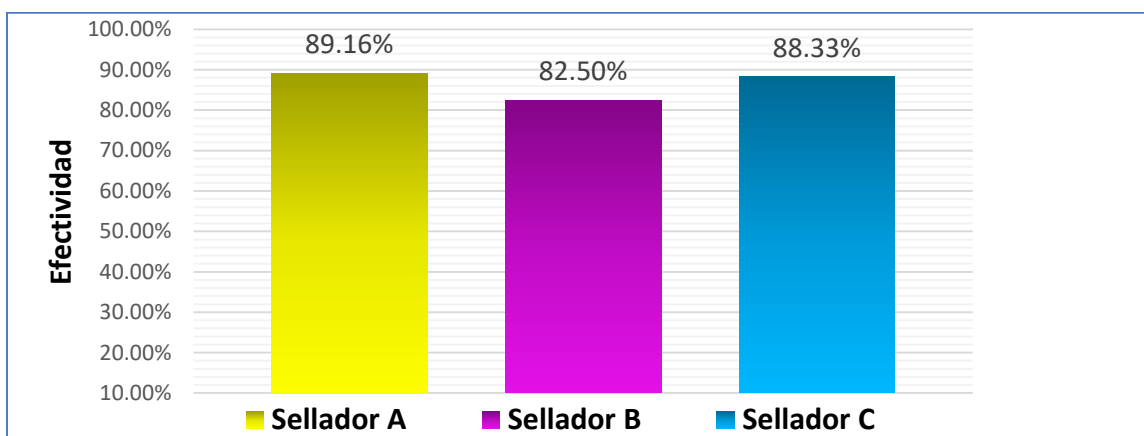


FIGURA 8. Porcentaje de vacas con prueba CMT negativa después de 3 rotaciones de 21 días de uso de diferentes selladores de pezón.

A = Tensolac; B = Io Shield; C= Scud.

Se observó que los selladores en estudio presentaron niveles de protección aceptables contra mastitis, permitiendo solamente entre un 10.84 - 17.5% de incidencia de mastitis subclínica en las vacas del estudio (figura 1). Esta prevención de nuevos casos con el uso de selladores de barrera es un importante aporte a la estrategia de manejo higiénico del ordeño y sanitario de las vacas.

Está ampliamente documentado el efecto positivo del sellado de pezones sobre las infecciones mamarias. Williamson y Lacy (2013), indican que el sellado reduce de un 50-70 % los patógenos contagiosos causantes de mastitis, pero logra efectos variables para otros. Según el National Mastitis Council (Tirante, 2007), para que un sellador de pezón pueda considerarse eficaz debe reducir el porcentaje de nuevas infecciones intramamarias en más del 40%. Chávez, (2010) afirma que está suficientemente comprobado que la práctica de sellado disminuye en un 50 % las nuevas infecciones en el hato cuando se realiza con un producto de eficacia probada. Los resultados de esta investigación muestran que se puede evitar los nuevos casos de mastitis

en un porcentaje superior al 80 % cuando se usa los selladores evaluados en este estudio.

En un estudio realizado en Costa Rica los selladores de barrera de pezón a base de Yoduro metálicos protegieron un 58.62% contra mastitis y los de base de Iodo-povidona protegieron un 89.65%, también observaron que el sellador disminuyó en un 66% las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* y en un 100% las causadas por coliformes fecales (Fernández *et al.* 2008).

En un estudio realizado en Uruguay se evaluó la incidencia de las infecciones intramamarias comparando dos selladores de barrera a base de yodo en tres establecimientos, los resultados (63% y 60%), mostraron que no hubo diferencias significativas en la prevención de infecciones intramamarias entre los dos selladores evaluados (Pagliano 2016), en dicho estudio se consideraron negativas a infecciones intramamarias a las vacas que no presentaban aislamientos de *Staphylococcus aureus* y bacilos gram negativos en ningún cuarto; a diferencia con este estudio se consideró vacas positiva a mastitis subclínicas las que tuvieron reacción grado 2 a CMT en al menos un cuarto según lo recomendado por Saran y Chaffer (2000) y la presencia de al menos una de las tres bacterias de nuestro interés.

En México un estudio en el que se trabajó con 222 animales alojados en corrales húmedos y sucios reveló que al hacer la aplicación de un sellador de barrera permitió nada más un 3% de casos de mastitis en un periodo de 18 días de tratamiento (Caro, 2011); estas condiciones ambientales son similares a las del presente estudio, en el cual los animales siempre llegaban al ordeño con una capa de lodo y excretas en la parte ventral de su cuerpo.

5.2 Aislamiento de bacterias en leches de vacas positivas a CMT.

Se buscó aislar 3 de las bacterias importantes para mastitis en vacas positivas a CMT . De las 50 muestras de vacas positivas a CMT se descartaron tres debido a que los animales estaban en tratamiento antibiótico (al momento del muestreo), lo cual interferiría con el aislamiento, por lo cual se trabajó con 47 muestras. De estas muestras se obtuvieron 94 aislamientos de microorganismos considerados de interés para la mastitis subclínica en esta investigación (Cuadro 6).

Cuadro 6 Microorganismos aislados en muestras de leche provenientes de vacas positivas a CMT. (Total de pruebas = 360, total de muestras positivas = 47).

Microorganismos aislados.	CMT (+)	Muestras positivas para cada microorganismo		Aislados obtenidos de cada microorganismo				
		No.	%	A*	B*	C*	TOTAL	%
<i>Streptococcus agalactiae</i>	47	0	0	0	0	0	0	0.00%
<i>Streptococcus spp</i>	47	15	31.91%	3	6	6	15	16.48%
<i>Staphylococcus aureus</i>	47	16	34.04%	4	9	3	23	21.97%
<i>Staphylococcus coagulasa negativa</i>	47	17	36.17%	6	6	5	17	18.68%
<i>Escherichia coli</i>	47	32	68.08%	6	14	12	39	42.85%
TOTAL							94	100.00%

*A = Tensolac; B = Io Shield; C= Scud.

Se aislaron dos de los tres microorganismos de interés en la investigación, y para el caso de los géneros *Streptococcus* y *Staphylococcus* se identificaron de manera general otras especies no contempladas inicialmente en el estudio.

Los porcentajes correspondientes de aislamientos fueron *Streptococcus spp.* (16.48%), *Staphylococcus aureus* (21.97%), *Staphylococcus coagulasa* negativa (18.68%) y *Escherichia coli* (42.85%) (Cuadro 5.). Es de notar que *Streptococcus agalactiae* fue buscado en este trabajo pues en la literatura y estudios previos a esta investigación lo señalan como uno de los principales agentes etiológicos en mastitis (Morales, 2011; Figueroa *et al*, 1984; Wolter *et al*, 2002); sin embargo, no se encontró ningún aislado correspondiente a este microorganismo. Por otra parte, del total de las 47 muestras positivas a CMT, se aisló *Streptococcus spp* en 31.91%, *Staphylococcus spp* en 40.65 %, y *Escherichia coli* en 68.08 %.

A pesar de no haber sido identificado *Streptococcus agalactiae*, la prevalencia de otras especies de *Streptococcus* fue de 16.48% en este estudio, lo cual es comparable con investigaciones con resultados similares en América Latina, como en Brasil donde la prevalencia de *Streptococcus sp.* en hatos con ordeño mecánico fue de 12,9% (Ruiz *et al*, 2011). En Argentina fue de 12,5% (Calvinho, 2005), Colombia de 4,1% (Andrade-Becerra *et al*, 2014), 19.5% reportado en Uruguay (Giannenci *et al*, 2014) y el 8.8% en Argentina (Dieser *et al*, 2014).

De los tres géneros de interés, el género *Staphylococcus* representa el 40.65% del total del género aislado, 21.97% *Staphylococcus aureus* y 18.68% *Staphylococcus coagulasa* negativo. En un trabajo reciente en El Salvador, Perla y Herrera (2017) reportaron que *Staphylococcus aureus* se encontró en un 22.61% de todos los aislamientos de muestras de leche provenientes de ganaderías con ordeño manual, lo cual se asemeja a lo encontrado en estudio actual con ordeño mecánico.

Diferentes estudios han señalado a *Staphylococcus aureus* como uno de los principales causantes de mastitis. En Montería, Colombia, se evaluaron 2.854 vacas de 40 fincas especializadas encontrando *Sta. aureus* (29.09 %) como principal patógeno (Calderón *et al*. 2011). En Brasil se estudiaron 185 vacas en 11 propiedades productoras de leche bovina del estado de Pernambuco; seis con ordeño manual y cinco con ordeño mecánico (Ruiz *et al* 2011), determinando una prevalencia de *Staphylococcus sp.* en ordeño mecánico del 36,4%. En otro estudio en Colombia con 348 vacas Holstein con ordeño mecánico, Sánchez *et al* (2017) encontró una prevalencia de 31.1% para *Sta. aureus*. Otros reportes de prevalencias de *Sta. aureus* en Suramérica son 13.9% (Calvinho, 2005), 74.4% (Mendoza *et al* 2017), 6.6 % (Andrade-Becerra *et al*, 2014) y 8 % (Ramírez *et al.* en 2014). Los bajos valores encontrados en los últimos dos estudios probablemente se deban a que fueron desarrollados en ganaderías con buen nivel tecnológico y de higiene.

Escherichia coli presentó una prevalencia de 38.55% en esta investigación, un valor mayor al reportado por otra investigación realizada El Salvador con una prevalencia de *E. coli* (17.85%) (Perla y Herrera 2017). Probablemente el valor mayor en el estudio actual se deba a que las vacas estaban estabuladas con una densidad alta que permitía mayor contacto con material fecal, mientras que en el otro caso se usaron ganaderías más extensivas. Otros estudios han reportado prevalencias de *E. coli* de 13,3% en Colombia (Mendoza *et al*, 2017) y en Paraguay un 3.77% (Aponte, 2007) se observa un menor porcentaje de presentación a diferencia de los resultados obtenidos en El Salvador.

E. coli se encuentra en el ambiente, no forma parte de la microbiota normal de la ubre. Estos microorganismos se consideran contaminantes medioambientales y han sido señalados como agentes causales hasta en un 97,5% en otras explotaciones en regiones tropicales (Olivarez-Pérez *et al.* 2015). Por el contrario de los agentes patógenos contagiosos de la mastitis, se localizan principalmente en el medio que rodea a la vaca. Las bacterias pertenecen a la microbiota normal del ambiente y se encuentran en cada establo (Wolter *et al*, 2002).

Es posible que estos patógenos están aumentando debido a las fallas observadas en las prácticas de prevención y control de la mastitis, como en la implementación de la higiene de la ubre antes del ordeño o la presencia del ambiente contaminado por la presencia de heces, de aguas encharcadas y de lodazales; Según Calderón y Rodríguez (2008), las malas prácticas ganaderas en la implementación de las medidas profilácticas, hace que algunos de estos

microorganismos puedan llegar a desarrollar signos sistémicos en la vaca e incluso, provocar la muerte.

5.3 Resultados de sensibilidad antimicrobiana a los antibióticos.

El estudio de la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos es una de las funciones más importantes de los laboratorios de microbiología clínica. Su realización se desarrolla mediante las pruebas de sensibilidad o antibiograma, cuyo principal objetivo es evaluar en el laboratorio la respuesta de un microorganismo a uno o varios antimicrobianos, traduciendo, en una primera aproximación, su resultado como factor predictivo de la eficacia clínica. El antibiograma define la actividad in vitro de un antibiótico frente a un microorganismo determinado y refleja su capacidad para inhibir el crecimiento de una bacteria o población bacteriana (García *et al*, 2000).

Los aislamientos se categorizaron como (R) resistentes, (I) intermedio, y (S) susceptible de acuerdo con los parámetros establecidos por la NCCLS (2002). Los seis antimicrobianos utilizados en este estudio son: penicilina G (P), amoxicilina con ácido clavulánico (AMC), gentamicina (CN), enrofloxacina (ENR), neomicina (N), ampicilina (AMP) de uso más común para la mastitis en El Salvador.

5.3.1. Porcentaje de resistencia y sensibilidad *Streptococcus spp.*

De un total de 15 aislamientos (provenientes de 47 muestras de leche de vacas positivas a mastitis subclínica), se evaluaron los perfiles de resistencia de los microorganismos aislados de las muestras de las dos ganaderías lecheras (figura 9).

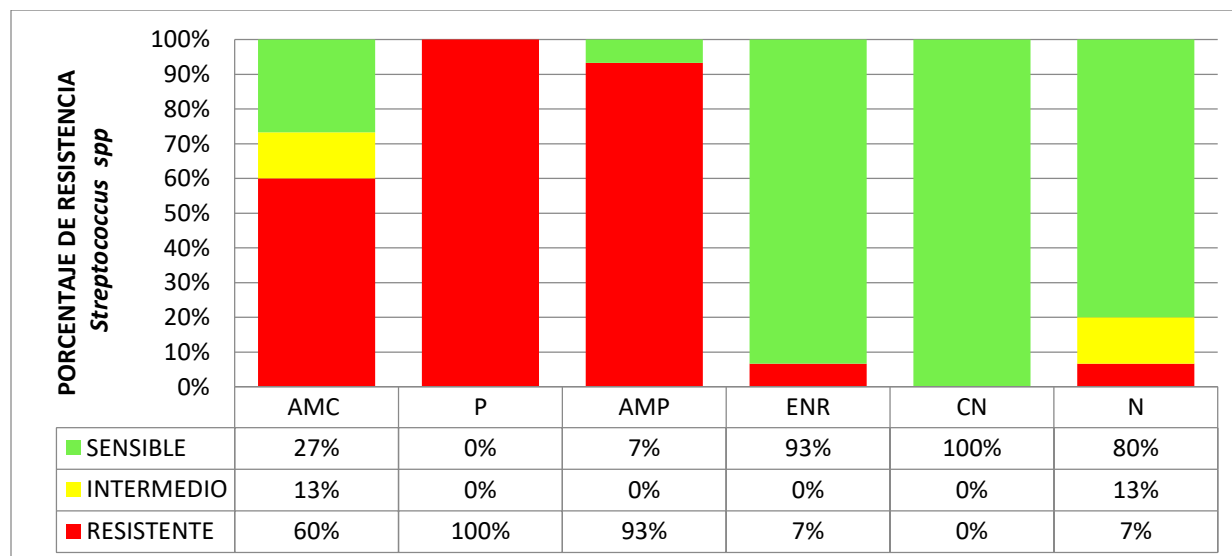


FIGURA 9. Perfil de resistencia antibiótica de *Streptococcus spp* aislados de muestras de leches con reacción positiva a CMT.

Basados en los datos de laboratorio los antibióticos que más eficacia tiene contra *Streptococcus spp.*, son gentamicina (CN) y enrofloxacina (ENR), ya que sus niveles de sensibilidad entre el 93 - 100% mientras que fue 80% sensible a neomicina (N). Diferentes autores recomiendan el uso de aminoglucósidos (entre ellos CN y N) para el tratamiento de mastitis subclínica, los resultados obtenidos en este estudio respaldan dicha recomendación.

De los antibióticos que pertenecen al grupo de los betalactámicos, se encontró el 100% de resistencia a penicilina (P), 93% a ampicilina (AMP) y 60% de resistencia para amoxicilina

más ácido clavulánico (AMC). (Figura 2), García (2000) sugiere que el uso de betalactámicos (P y AMP) no es recomendable, aunque si estos antibióticos llevan ácido clavulánico tienen mayor efectividad como en el caso de (AMC) debido a que ese componente inhibe la acción de las betalactamasas, que son las enzimas bacterianas que las hacen resistentes a esta familia de antibióticos lo cual nos deja un porcentaje de sensibilidad en este estudio de 27% para ayudar a combatir infección por *Streptococcus spp.*

Estudios realizados en Suramérica en vacas con mastitis, han mostrado resistencia de *Streptococcus spp* a antibióticos. En Chile, en la (X) Región, se determinó que el 40.5% fueron resistentes al test de penicilina (Concha y Álvarez, 2007). En otro estudio realizado en Perú se encontró una resistencia a penicilina del 56% (Ayala y Vidalina, 2017).

En Colombia se reportó resultados de 21% de resistencia a ampicilina (Cruz A. *et al*, 2007). En Paraguay, se presentó un 20% de resistencia a gentamicina, un 64% a penicilina, un 56% a ampicilina y un 88% a neomicina (Florentín, 2007).

En Chile otro estudio reportó cepas de *Streptococcus* resistentes a los tres antibióticos pertenecientes al grupo de betalactámicos (Martínez, M., *et al*, 2013), el cual presenta los resultados similares al del estudio actual. Sin embargo, en Colombia otros resultados de análisis para *Streptococcus agalactiae* mostraron que el 100% de las cepas evaluadas fueron sensibles a los antibióticos del grupo de los betalactámicos.

5.3.2. Porcentaje de resistencia y sensibilidad *Staphylococcus aureus*

De un total de 23 aislamientos (provenientes de 47 muestras de leche de vacas positivas a mastitis subclínica), los antibióticos más efectivos fueron neomicina con 87% de sensibilidad, 78% gentamicina, amoxicilina con ácido clavulánico con 70% y enrofloxacin con 87 % de sensibilidad. Por otra parte, los menos efectivos fueron penicilina con 87% y ampicilina con 73 % de resistencia (Figura 10).

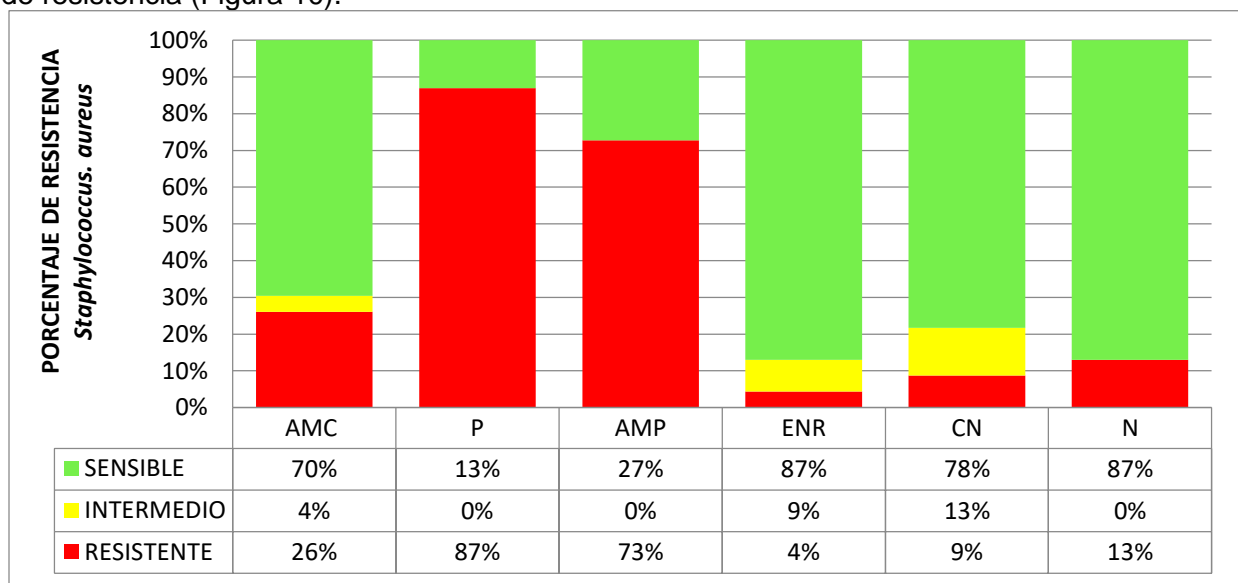


FIGURA 10. Perfil de resistencia antibiótica de *Staphylococcus aureus* aislados de muestras de leches con reacción positiva a CMT.

La penicilina que fue el antibiótico menos eficaz contra *Staphylococcus aureus* en este estudio. En Argentina (2007) Aguirre en un estudio comprobó que *Staphylococcus aureus* presentó resistencia a ampicilina (9%) y para penicilina (34%).

Para penicilina se observan resultados similares en estudios realizados los cuales se mencionan a continuación, en El Salvador, municipio de Chalatenango según Perla Y Herrera, se evidencia

una resistencia de 57.14% a penicilina y en Nicaragua un 16.7% de resistencia (Aguirre, 2007) porcentajes menores que el de esta investigación.

En Santa Fe, Argentina, (2008) Russi reportó que un 48.4% de los aislamientos fueron considerados resistentes a la penicilina. Otros reportes, sin embargo, han mostrado menores porcentajes en resistencias, tal es el caso de Argentina donde reporto un 22,2% (Pellegrino *et al*, 2011), Venezuela 12,4% (Valero-Leal, 2010) y El Salvador 5.71 % (Arreces Martínez, 2015).

En Nicaragua se reporta una sensibilidad de 88.33 % hacia la gentamicina (Aguirre y Zeledón, 2007) resultado similar al de esta investigación, así también Perla y Herrera reportan resultado similar en El Salvador con un 94,73% de sensibilidad a gentamicina así mismo sensibilidad de enrofloxacina donde ellas presentan un 94.73% que es similar a la de esta investigación.

Se encontraron resultados parecidos en el cono sur, en Argentina un estudio revela que el 100% de cepas analizadas fueron sensibles a gentamicina y ampicilina (Pellegrino *et al*, 2011). Diferenciándose con 73% de resistencia de esta investigación en los valores de ampicilina pues siempre se encontró alta resistencia en este estudio. En este caso el antibiótico de elección es neomicina, enrofloxacina y gentamicina esto debido a que se presentaron valores arriba del 70% de sensibilidad.

5.3.3. Porcentaje de resistencia y sensibilidad de *Escherichia coli*.

De un total de 39 aislamientos (provenientes de 47 muestras de leche de vacas positivas a mastitis subclínica), se encontró 97% de sensibilidad a gentamicina, 92% a enrofloxacina, y 87.17% a neomicina (figura 11). A su vez, estos aislados presentaron mayores resistencias a penicilina 100% y ampicilina 58.97%, ambos betalactámicos; y una menor resistencia a amoxicilina más ácido clavulánico 28%.

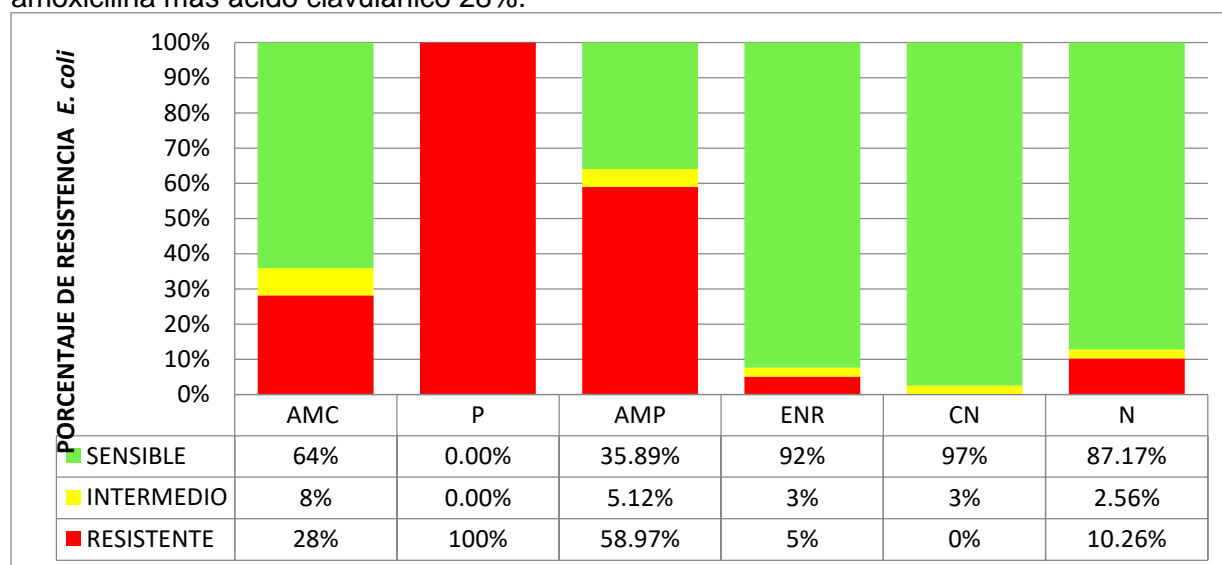


FIGURA 11. Perfil de resistencia antibiótica de *Escherichia coli* aislados de muestras de leches con reacción positiva a CMT.

En este estudio de sensibilidad en placa, los aislamientos de *E. coli* mostraron alta sensibilidad a gentamicina, enrofloxacina y neomicina. Sumano y Ocampo (2008), señala que la acción de algunos antibióticos como gentamicina puede ser limitada por la capacidad del fármaco de actuar en la zona, su uso no es viable pues no alcanza concentraciones adecuadas en la glándula mamaria y tiene efectos nulos en presencia de leche u otras secreciones. Por lo tanto, los resultados utilizados en campo podrían no coincidir con los resultados en este estudio; debido a que estos antibióticos resultaron ser sumamente efectivos contra *E. coli*, pero según este autor

en la práctica no sería viable su uso.

En el caso de la enrofloxacin el 8% de resistencia observado podría ser un resultado positivo, comparado con un estudio en Chile, el cual reportó un 21.9% de resistencia a enrofloxacin (San Martín *et al* 2002).

Estudios previos han reportado resistencias de *E. coli* a antibióticos como a ampicilina (76.5%) Jiménez *et al* (2017) y a penicilina (93%) Perla y Herrera (2017).

El desarrollo de resistencia a antibioticos en bacterias causantes de mastitis subclínica en las ganaderías puede relacionarse al uso indiscriminado de antibióticos que no son recetados, controlados o supervisados por médicos veterinarios además de cambios genéticos o mecanismos adaptativos de las bacterias para enfrentar la acción de éstos.

En el caso de los antimicrobianos, se producen problemas cuando se emplean para tratar enfermedades cuando no corresponde utilizarlos, en dosis inapropiadas, durante periodos de tiempo inadecuado y en preparación farmacéutica incorrecta (OMS, 2000). Las bacterias causantes de mastitis y el desarrollo de resistencia a los antibióticos podrían tener implicaciones en la salud humana. El abuso y el uso indebido de antibióticos en animales y humanos están contribuyendo al aumento de la amenaza que representa la resistencia a los antimicrobianos. Algunos tipos de bacterias causantes de infecciones humanas graves ya son resistentes a la mayoría o a la totalidad de los tratamientos disponibles, y hay muy pocas alternativas prometedoras en fase de investigación (Lindmeier, 2017).

La OIE anima a hacer un uso responsable y prudente de los antimicrobianos en los animales terrestres, de tal forma que se preserve su eficacia terapéutica y que se puedan seguir utilizando sin riesgos para los animales ni para el hombre (Lindmeier, 2017).

Los resultados de este estudio muestran que los antibióticos penicilina y ampicilina, han perdido eficacia en el control de bacterias importantes para mastitis. Los niveles de resistencia encontrados para penicilina fueron 100% en *Streptococcus spp* 87%, para *Staphylococcus aureus* y 100% para *Escherichia coli* mientras que para ampicilina la resistencia fueron 93% *Streptococcus spp*, 73% para *Staphylococcus aureus* y 58.97% *Escherichia coli*. Por lo tanto, su uso a nivel de campo podría tener un impacto limitado en el control de la mastitis.

5.4. Resultados de multiresistencia antimicrobiana.

La figura 12 muestra los porcentajes obtenidos por bacteria, a las distintas multiresistencia que se obtuvieron de las 3 familias a las que pertenecen los antibióticos en estudio.

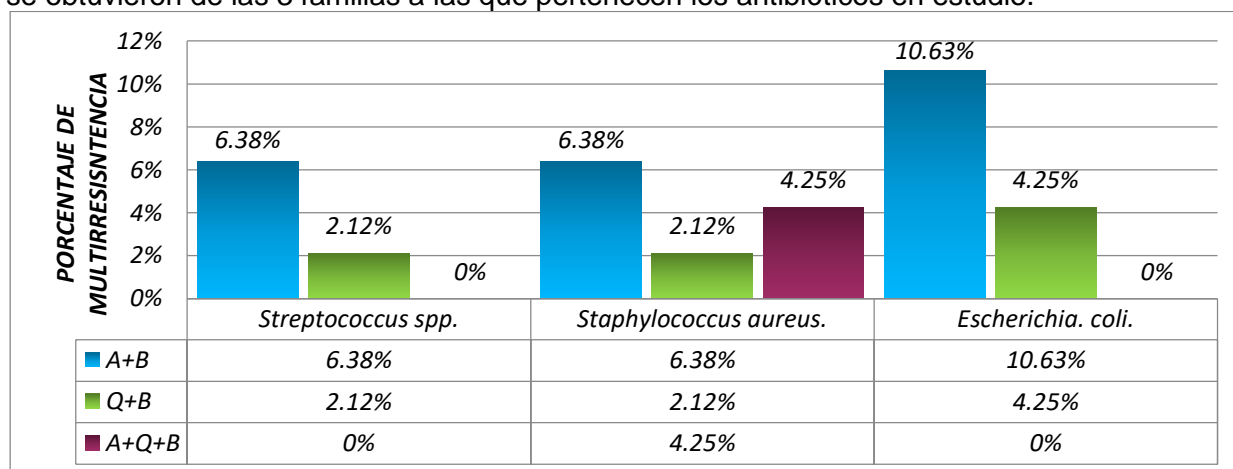


FIGURA 12. Perfil de multiresistencia antibiótica aislados de muestras de leches con reacción positiva a CMT. A= aminoglucósidos= gentamicina; neomicina. B= betalactámicos = amoxicilina + a. clavulánico; penicilina; ampicilina Q= quinolona = enrofloxacin

Cuadro 7 Aislados totales del estudio con multirresistencia antibiótica de muestras de leches con reacción positiva a CMT.

Bacterias / n` de aislados por bacteria.	A+B	Q+B	A+Q+B	Total/Total de aislados.
<i>Streptococcus spp.</i>	3/6.38%	1/2.12%	0/0%	4/15
<i>Staphylococcus aureus.</i>	3/6.38%	1/2.12%	2/4.25%	6/23
<i>Escherichia coli.</i>	5/10.63%	2/4.25%	0/0%	7/39

A= aminoglucósidos= gentamicina; neomicina. B= Bbetalactámicos = amoxicilina + a. clavulánico; penicilina; ampicilina
Q= quinolona = enrofloxacina

El perfil de multirresistencia obtenido para los 15 aislados del género de *Streptococcus* indicó que 3 de ellos (6.38%) presentaron multirresistencia a la combinación de las familias de los betalactámicos junto con aminoglucósidos, también hubo una muestra que presentó multirresistencia a betalactámicos y quinolonas, siendo los antibióticos más resistentes, los de la familia de los betalactámicos, penicilina fue la que presentó mayor resistencia con un 100%.

La resistencia de alto nivel frente a aminoglucósidos puede ser por mutación ribosómica o por inactivación enzimática de una adeniltransferasa. La resistencia de alto nivel se traduce en la anulación del sinergismo bactericida entre el aminoglucósido y los betalactámicos (Gilbert, 2000).

En Colombia *Streptococcus spp* presentó una multirresistencia del 20.7% a penicilina y a Eritromicina. El mecanismo de resistencia característico de este género es la alteración de la proteína de unión de las penicilinas (PBP), que se da por la modificación de la enzima en la pared bacteriana y la convierte en PBP2alfa para los cuales no tienen afinidad los betalactámicos (Lencastre *et al.*, 1994)

De las bacterias aisladas de las muestras de leche con mastitis subclínica, se identificaron cepas multirresistentes de *S. aureus* a dos interacciones de familias e incluso a la multirresistencia de las 3 familias de antibióticos en estudio, siendo sus valores para betalactámicos y quinolonas de 2.12% y también para betalactámicos y aminoglucósidos, con un 6.38%, dentro de las cuales los antibióticos más resistentes fueron: amoxicilina más ácido clavulánico, ampicilina y penicilina para el grupo de los betalactámicos y gentamicina para los aminoglucósidos (figura 5).

En Argentina, se reportó un 19% de cepas de *S. aureus* con multirresistencia a las familias de betalactámicos y aminoglucósidos (Pellegrino *et al*, 2011), mostrando similitud con el presente estudio.

Perla y Herrera (2017), mencionan que las bacterias que evaluaron presentaron multirresistencia, y el 87% mostró resistencia a antibióticos pertenecientes al grupo de los betalactámicos; pudiéndose relacionar con el mecanismo de resistencia que estas bacterias poseen debido a la producción de betalactamasas y la proteína de unión de la penicilina (PBP2a) que afectaría en el sitio de unión del antibiótico y haría imposible la función del mismo (De Lencastre *et al.*, 1994).

Para el género *Escherichia coli*, se lograron identificar 7 aislados multirresistentes a dos

familias de antibióticos evaluados, de los cuales la combinación de betalactámicos con aminoglucósidos fue la más alta con un 10.63% y quinolona más betalactámicos con 4.25%; siendo el grupo de los betalactámicos la familia con más resistencia bacteriana observada, siendo penicilina resistente en el 100% de los aislados.

Entre algunos mecanismos de resistencia que se le pueden atribuir a *Escherichia coli*, está la producción de betalactamasas, enzimas que se caracterizan por hidrolizar el enlace amida del núcleo betalactámico, inactivando de esta manera el antibiótico. También hay mutaciones puntuales que generan el cambio de aminoácidos en el enzima blanco del antibiótico (Mosquito et al, 2011).

6. CONCLUSIONES

1. Los selladores a base de yodo evaluados en esta investigación demostraron tener una buena tasa de protección (86.12%) en la prevención de la mastitis subclínica. Las prácticas de ordeño higiénico y el uso de selladores aun permiten una incidencia de mastitis de 13.88%
2. Los tres selladores a base de yodo utilizados en este estudio produjeron un nivel de protección similar en la presentación de casos nuevos de mastitis subclínica.
3. Los aislamientos de bacterias difieren con investigaciones que reportan que *Streptococcus agalactiae* es uno de los mayores causantes de mastitis subclínica y clínica, pues en el estudio actual no se aisló esta bacteria de leches mastíticas.
4. Los resultados del estudio sugieren que existe contaminación ambiental en el proceso de ordeño ya que el mayor agente etiológico aislado fue *Escherichia coli* la cual es una bacteria ambiental.
5. Existe resistencia a antibióticos en *Streptococcus* spp, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en las ganaderías estudiadas, principalmente para la familia de betalactámico como penicilina, ampicilina y en menor medida en amoxicilina más ácido clavulánico.
6. Existen diferentes porcentajes de multirresistencia antibiótica entre las familias siendo el principal, aminoglucósidos (gentamicina y neomicina) más betalactámicos (penicilina, ampicilina y amoxicilina más ácido clavulánico) en las 3 bacterias estudiadas

7. RECOMENDACIONES

1. Utilizar selladores de barrera a base de yodo dentro de un programa de ordeño higiénico para disminuir los casos de mastitis en las ganaderías lecheras, considerando criterios como gasto por número de vacas selladas y costo para su elección.
2. Mejorar el protocolo actual de ordeño higiénico, por medio una evaluación continua y de una mayor limpieza y mejoras de infraestructura en las zonas de descanso para evitar el contacto de los pezones con material fecal.
3. Utilizar los resultados de las pruebas california de mastitis para realizar aislamientos y pruebas de sensibilidad para implementar un programa de uso de antibióticos controlado por un profesional competente, que permita alcanzar una mayor efectividad en el tratamiento antibiótico de los casos de mastitis, manejando de mejor manera el problema de la resistencia.

8. BIBLIOGRAFÍA.

Aguilar, A. A; Pineda, J.; Barrios; Flores, A.; Moran, P. 2014. Prevalencia de mastitis subclínica en la región ciénega del estado de Jalisco; *Abanico Veterinario*, enero-abril. 2014, México, P. 8, En línea, Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=49036>

Aguirre, J.; Zeledón, A. 2007. Aislamiento e identificación fenotípica de *Staphylococcus aureus* mediante la técnica de fingerprint (PHP) a partir de leche bovina afectada con mastitis subclínica en seis fincas del municipio de León, durante el periodo mayo 2005 - mayo 2006, León, Nicaragua, 2007, 59 p. en línea, consultado el 25 de octubre de 2017, Disponible en: <http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/bitstream/123456789/1042/1/203954.pdf>

Andrade – Becerra, R.J, Caro – Carvajal, Z.E, Dallos – Baez, A.E, 2014, Prevalencia de mastitis subclínica bovina y su etiología infecciosa en fincas lecheras del altiplano Boyacense, Colombia, P. 7, en línea, disponible en: <http://clacso.redalyc.org/pdf/959/95931404001.pdf>

Aponte Florentin, C.C. 2007, Perfil de resistencia in vitro a antimicrobianos de cepas causantes de mastitis aisladas de leche cruda bovina en establecimientos de pequeña y mediana producción, P. 19, en línea, disponible en: <http://scielo.iics.una.py/pdf/iics/v5n1/v5n1a05.pdf>

Ariznabarreta, A.; Gonzalo, C.; San Primitivo, F. 2002. Microbiological Quality and Somatic Cell Count of Ewe Milk with Special Reference to Staphylococci. 85:1370-1375. (en línea). consultado 04 oct del 2016. disponible en: [https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(02\)74203-3/pdf](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(02)74203-3/pdf)

Arreces Martínez, G. 2015, Determinación de la multiresistencia a los antibióticos en cepa de *Staphylococcus aureus*, aislada de leche cruda de vaca obtenida de una lechería del departamento de Santa Ana, Universidad de El Salvador, 151 P. en línea, consultado el 6 de junio de 2017, disponible en: <http://ri.ues.edu.sv/8772/1/16103639.pdf>

Ávila Tellés, S.; Romero, L. Anatomía y fisiología de la glándula mamaria. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. México, D.F. P. 35, En línea, Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_bovina_de_leche/produccion_bovina_leche/110-anatomia.pdf

Ayala Tineo, J. Vidalina Ayme, A. 2017, Mastitis bovina por recuento de células somáticas con PortaSCC® y Test de California en el fundo de Allpacaca – UNSCH, Ayacucho, Perú, P. 13, en línea, disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63652580009>

BCR, (Banco Central de Reserva) 2016. Documento de trabajo; La transformación productiva en el sector agropecuario: una herramienta para el crecimiento económico en el área rural de El Salvador, segundo semestre de 2016, Banco central de reserva de El Salvador, 54 p. En línea, consultado el 17 de junio de 2017, Disponible en: <https://www.bcr.gob.sv/bcrsite/uploaded/content/category/1105524910.pdf>

BAM (Microbiological Methods & Bacteriological Analytical Manual), 2016, 8th Edition, Revision A, 1998, en línea, Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm2006949.htm> consultado el 22 de noviembre de 2016

Becerra, A.; Roy, J.; Carvajal.; Dallos-Baez, A. 2014. Prevalencia de mastitis subclínica bovina y su etiología infecciosa en fincas lecheras del altiplano boyacense (Colombia) *Revista Científica*, vol. XXIV, núm. 4, julio-agosto, 2014, 7 p. en línea, consultado el 22 de noviembre de 2016, Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/959/95931404001.pdf>

Bedolla, C; Castañeda, V; Wolter W. 2007. Métodos de detección de la mastitis bovina (en línea). Revista electrónica de veterinaria. 7(9):1-17. Consultado 04 oct. del 2016. Disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090907/090702.pdf>.

Blood et al, 2002 S.A. MCGRAW-HILL. Manual de medicina veterinaria (9ª ed.) interamericana de españa, castellano, Madrid.

Blowey, R.; Edmondson, P. 1995. Control de la Mastitis en Granjas de Vacuno de Leche, guía ilustrada y práctica. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza. P. 95.

Bradley, J.; Green, M. 2001. Adaptation of Escherichia coli to the Bovine Mammary Gland. Journal of Clinical Microbiology. 39: 1845 -1849. En línea, disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88036/pdf/jm001845.pdf>

Cabrera, C.; Mejía, C. 2008. Los mecanismos de resistencia a antibióticos: ¿Podremos lograr un equilibrio entre el uso – abuso de los antibióticos y así lograr la disminución de la resistencia bacteriana a estos medicamentos?, Cali, Colombia, en línea. Consultado 29 oct. 2015. Disponible en: <http://revistasoj.s.unilibrecali.edu.co/index.php/rcslibre/article/view/213/242>

Callejo Ramos, A. 2010. Desinfectantes de pezones (en línea). Frisona Española N° 178 (94-95), en línea, Consultado 26 oct. 2016. Disponible en http://oa.upm.es/7650/2/INVE_MEM_2010_80160.pdf

Calvinho, L. F. Y Tirante, L. 2005 Prevalencia de microorganismos patógenos de mastitis bovina y evolución del estado de salud de la glándula mamaria en Argentina en los últimos 25 años, INTA, Santa Fe, Buenos aires, 2005, 12 p. En línea, consultado en agosto de 2017, Disponible en: <https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar/publicaciones/index.php/FAVEveterinaria/article/download/1413/2261/>

Calvinho, L. F. 2010 Higiene pre-ordeño y desinfección de pezones, INTA, APROCAL, 2010, 43 p. en línea, Consultado el: 21 de Noviembre de 2018, Disponible en: http://www.aprocal.com.ar/wp-content/uploads/Desinfeccion_pezones_Calvinho.pdf

Calvinho, L. F. Rafaela, E.E.A., INTA F.C.V. Esperanza, U.N.L. 2010 Tratamiento de mastitis clínicas y manejo de antibióticos en el tambo, APROCAL, 11 p. en línea, Agosto, 2010, Disponible en: http://www.aprocal.com.ar/wp-content/uploads/manejo_antibioticos.htm.pdf

Camacho, A.; Giles, M.; Ortegón, A.; Palao, M.; Serrano, B.; Velázquez, O. 2009. Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. 2ª ed. Facultad de Química, UNAM. México. 17 p. En línea, consultado en junio de 2017, Disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasicas-Colif-tot-fecales-Ecoli-NMP_6529.pdf

Caro, J.A. 2011 DISMINUCIÓN DE LA INCIDENCIA DE MASTITIS EN GANADO VACUNO CON LA APLICACIÓN DE UN SELLADOR DE BARRERA, Universidad autónoma agraria “Antonio Narro” unidad laguna división regional de ciencia animal, Torreon, Coahuila, Mexico, 2011.

Concha C. Álvarez S. 2007. Informe anual resultados año 2006. Empresa Udder Health, Osorno. 5p.

Cotrino, V. 2001. Diagnóstico de mastitis (en línea). Bogotá, Universidad Nacional de Colombia. Consultado 08 oct. 2016. Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/remevez/article/download/13936/14757>

Couvalin, J. 1998. El final de la edad de oro de los antibióticos. Ther Nat 1988; 314(3):50-2 Consultado 28 oct. 2016.

Cruz, A.; Estepa, E.; Hernández, L.; Sanabria, V. 2007. identificación de bacterias causantes de mastitis bovina y su resistencia ante algunos antibacterianos, Colombia, 2007, 8 p. En línea, consultado en octubre de 2017, Disponible en : <https://www.redalyc.org/pdf/636/63646040004.pdf>

De Luca L. J, Caggiano N; Castrillón M. 2015. Daño en el tejido mamario durante la mastitis bovina, consultado 28 mar. 2019. Disponible en: <https://www.engormix.com/ganaderia-leche/articulos/dano-tejido-mamario-durante-t32519.htm>

De Lencastre, H.; De Jonge, B.; Matthews, P.; Tomasz, A. 1994. Molecular aspects of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 1994; 33:7-24. (en línea) Consultado el 20 de Junio de 2019. Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/sarm.pdf>

Dieser, S.A, Vissio, C. Lasagno, M.C, Bogni, C.I, Larriestra, A.J, Odierno, L.M, 2014, Prevalence of pathogens causing subclinical mastitis In Argentinean dairy herds, Universidad nacional de rio cuarto, Cordoba, Argentina, P. 124 – 126, En línea, disponible en: https://www.researchgate.net/publication/288673300_Prevalence_of_Pathogens_Causing_Subclinical_Mastitis_in_Argentinean_Dairy_Herds

Erna, Cona. 2002 Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar, Revista chilena de infectología, Rev. chil. infectol. v.19 supl.2 Santiago 2002, 5 p. En línea, Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v19s2/art01.pdf>

Escobar W.; Lopez L.: Rivas M. 2011 Tratamiento contable y tributario de las operaciones que realiza una cooperativa ganadera en el salvador (en línea) consultado 8 de septiembre 2019. Disponible en: <http://ri.ues.edu.sv/288/1/10136897.pdf>

FAO (Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura.) 2019 Produccion lechera consultado 8 de septiembre 2019. Disponible en: <http://www.fao.org/dairy-production-products/production/es/>

Fernández, M.; Ramírez, J.; Chaves, C.; Arias, M. 2008. Disminución en la incidencia de mastitis en ganado vacuno con la .aplicación de un sellador de barrera experimental. *Agronomía Costarricense* 32(1): 107-112. En línea, Disponible en: https://www.mag.go.cr/rev_agr/v32n01-107.pdf

Florentín A. 2007. Perfil de resistencia in vitro a antimicrobianos de cepas causantes de mastitis aisladas de leche cruda bovina en establecimientos de pequeña y mediana producción, Paraguay, 2007, 7 p. en línea, Disponible en: <http://scielo.iics.una.py/pdf/iics/v5n1/v5n1a05.pdf>

Gallegos, A.; Moncada, J. 2011. Uso de extractos de semillas de cítricos Para El Control De La Mastitis Bovina. (en línea). consultado 04 oct del 2016. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_leche/78-mastitis.pdf

García, F.; Sánchez, T.; López, O.; Benítez, M. 2018. Prevalencia de mastitis subclínica y microorganismos asociados a esta. pastos y forrajes (en línea). 2018, vol.41, n.1 [citado 2019-01-16], pp.35-40. disponible en: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s0864-03942018000100005&lng=es&nrm=iso>. issn 0864-0394.

García, J.; Canton, R.; Garcia, E.; Gomez, L.; Martínez, L.; Rodriguez, C.; Vila, J. 2000. Procedimientos en microbiología clínica. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos, 54 p. en línea, consultado en junio del 2019. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia11.pdf>

Gianneschi, R.; Concha, C.; Delucci, I.; Gil, J.; Salvarrey, L.; Rivero, R. 2014. Mastitis bovina, reconocimiento de los patógenos y su resistencia antimicrobiana, veterinaria (Montevideo) Vol. 50 Uruguay, 2014. 29 p. en línea, Disponible en: <http://www.revistasmvu.com.uy/index.php/smvu/article/view/132/75>

Gilbert, D. 2000. Aminoglycosides. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000; p. 307-36, en línea, consultado el 20 de junio de 2019. Disponible en: <http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/apua-cuba/a6-aminogluocosidos.pdf>

Guerra, B. 2000. Antimicrobial resistance and spread of class 1-Integrans among Salmonella Serotypes. Antimicrob Agent Chemother 2000;44(8):2166-9. consultado el 28 de octubre 2016. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC90030/pdf/ac002166.pdf>

Guizar Figueroa, J. I, Bedolla Cedello, J.L.C, 2008 Determinación de la prevalencia de mastitis bovina en el municipio de Tarimbaro Michoacan, mediante la prueba de California, Mexico, P. 34, En línea, consultado en marzo de 2016, Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101008.html>

Halasa T, Huijps K, Østerås O, Hogeveen H; 2007 Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review; Vet Q. 2007 Mar;29(1):18-31. 2007

INATEC (Instituto nacional tecnológico) 2016 Manual del protagonista, Sanidad animal (en línea) consultado el 9 de septiembre 2019 Disponible en: https://www.jica.go.jp/project/nicaragua/007/materials/ku57pq0000224spz-att/Manual_de_Sanidad_animal_Part1.pdf

Izak eial. 2006. En mastitis, prevenir es la clave. Producir XXI, Bs. As., 15(181):20-26. P. 3, En línea, Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infeciosas/bovinos_leche/05-prevenir_mastitis.pdf

Jeromy T. H 2001; Programa de Aseguramiento de Calidad de Leche, Ministerio de Agricultura, alimentación y Asuntos Rurales de Ontario, CANADÁ. Fuente: Ontario Milk Producer, octubre 2001. Canadá. Ultima revisión: Junio de 2010.

Jimenez, R.; Gudino, L.; Aguilar, J.; Loeza. 2017. Caracterización molecular de escherichia coli resistente a antibióticos aislada de mastitis bovina en Michoacán, México. Rev. mex. de cienc. pecuarias [online]. 2017, vol.8, n.4 [citado 2018-09-23], pp.387-396. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11242017000400387

Julio, J. A, Hernández - Barrera, J, Suárez, M.C 2014, Identificación manual y automatizado de aislamientos de la familia Streptococcacea proveniente de muestras de leches de vaca, Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/272621471_Identificacion_Manual_y_Automatizado_de_Aislamientos_de_la_Familia_Streptococcacea_Provenientes_de_Muestras_de_Leche_de_Vacas_con_Mastitis

Lindmeier, C. Responsable de prensa OMS, Dejemos de administrar antibióticos a animales sanos para prevenir la propagación de la resistencia a los antimicrobianos, comunicado de prensa, 2017, Consultado en mayo de 2018, disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/detail/07-11-2017-stop-using-antibiotics-in-healthy-animals-to-prevent-the-spread-of-antibiotic-resistance>

Manual Merck de veterinaria. 2006. Sexta edición, océano/ centrium, merial, editorial océano Barcelona, ES, 2006. Vol. I; 1307 p.

Martínez, D., Cruz, A., Moreno, G. 2013. Resistencia de las bacterias causantes de mastitis bovina frente a los antimicrobianos más frecuentes. (en línea). Conexión Agropecuaria JDC. 3(1):53-73. Consultado 25 nov. 2015. Disponible en: <http://www.revistasjdc.com/main/index.php/conexagro/article/download/273/265>

Medina, C.; Montaldo, V. 2003. El uso de la prueba de conductividad eléctrica y su relación con la prueba de California para mastitis. CNM. V Congreso Nacional de Control de Mastitis. Aguascalientes, México.

Mellenberger, R; Roth, C. 2000. Hoja de información de la prueba de Mastitis California (CMT). Dpto. de Ciencia Animal, Universidad del Estado de Michigan y Universidad de Wisconsin-Mádison, US. (en línea). Consultado 11 septiembre 2019. Disponible en: <http://www.uwex.edu/milkquality/PDF/CMT%20spanish.pdf>

Mendoza, J.; Vera, A.; Peña, L. 2017 Prevalencia de mastitis subclínica y microorganismos asociados y factores de riesgo identificados en hatos de la provincia de Pamplona, norte de Santander, Revista Medica Vet Zoot 64, 2017, Colombia, 14 p. en línea, disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rfmvz/v64n2/v64n2a02.pdf>

Mosquito, S.; Ruiz, J.; Bauer, J.; Ochoa, T. 2011. Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociada a diarrea. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima, Perú, 9 p. en línea Consultado en Julio, 2019. Disponible en: <https://rpmesp.ins.gob.pe/index.php/rpmesp/article/view/430>

NCCLS ,(National committee for clinical laboratory standards) 2002. Document M39-A. Analysis and Presentation of Cumulative Antimicrobial Susceptibility Test Data; Approved Guideline. NCCLS document M39-A. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA, 30 pp.

OIE (Oficinas internacionales de Epizootias). 2008. Manual de la OIE sobre animales terrestres, Capítulo 1.1.6. Métodos de laboratorio para los ensayos de sensibilidad de las bacterias frente a los antimicrobianos (en línea) consultado 26 de sep. del 2016 disponible en: <http://www.oie.int/doc/ged/d6508.pdf>

Olguín y Bernal. A, (s.f) Enfermedades de la glándula mamaria, universidad nacional autónoma de méxico facultad de medicina veterinaria y zootecnia, asociación mexicana de médicos veterinarios especialistas en bovinos, 11p. en línea, consultado el 27 de julio de 2016, disponible en: http://www.ammvbe.net/clinica/enfermedades_de_la_glandula_mamaria.pdf

OMS,(Organización Mundial de la Salud);2000. Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos, 2000 , 99 p. En línea, consultado en marzo de 2017, disponible en: http://www.antibioticos.mscbs.gob.es/PDF/resist_OMS_estrategia_mundial_contra_resistencias.pdf

Pagliano, S. 2016. Comparación de la eficacia de dos selladores en la prevención de las infecciones intramamarias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, 2016, 29 p. en línea, disponible en: <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/10392/1/FV-31702.pdf>

Pastor, J.; Bedolla, J. 2008. Determinación de la prevalencia de mastitis bovina en el municipio de tarímbaro, michoacán, mediante la prueba de california(en línea). Revista electrónica de veterinaria 9(10): 1695-7504. Consultado 5 oct. 2016 Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101008/101004.pdf>

Pellegrino, M.; Frola, I.; Odierno, L.; Bogni, C. 2011. Mastitis Bovina: Resistencia a antibióticos de cepas de *Staphylococcus aureus* asiladas de leche.(en línea) Revista electronica de veterinaria, vol. 11, n° 7, año 2011, 15 p. en línea, consultado en Junio del 2019. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/636/63622567006.pdf>

Pérez, C.; Bedolla, C.; Castañeda, V. 2005. Importancia del conteo de células somáticas en la cría sustentable de vacas productoras de leche. sustentabilidad. 3(1):86-94 Universidad de Guadalajara, Jalisco. México. En línea, Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/636/63617329004.pdf>

Pérez, D. 1986. Manual sobre ganado productor de leche. edit. Villacañas s.a., México. pp 710-744.

Pérez, Héctor.; Robles, A. 2013. aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana.(en línea).revista médica 4(3):186-191pp. consultado 05 de oct. 2016 disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/revmed/md-2013/md133i.pdf>

Perla, A.; Herrera, M. 2017. Evaluación in vitro de la multiresistencia antimicrobiana de bacterias causantes de mastitis subclínica y mastitis clínica identificadas en vacas en ordeño manual en tres ganaderías del Municipio de Agua Caliente, Chalatenango, El Salvador, 2017, 93 p.

Radostits, M.; Gay, C.; Blood, D.; Hinchcliff, K. 2002. Medicina Veterinaria. Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. 9a ed. Vol. 1. Ed. McGraw - Hill Interamericana. Madrid, España, pp. 711-718.

Ramón, J.; Ruiz, C.; Olivera, M. 2011. Detección de riesgos de contaminación con microbios ambientales en un sistema de ordeño mecánico de un hato lechero del norte de Antioquia. Revista Lasallista de investigación, Vol 8, no. 1, P. 15 En línea, disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69522600002>

Riffon, R.; Sayasith, K.; Khalil, H.; Dubreuil, P.; Drolet, M.; Lagacé J. 2001. Development of a Rapid and Sensitive Test for Identification of Major Pathogens in Bovine Mastitis by PCR. Journal of Clinical Microbiology. 39:2584-2589. En línea, Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88189/pdf/jm002584.pdf>

Rodríguez, G. 2008. Genero Streptococcus y enterococcus, Temas de bacteriología y virología médica. (en línea). Consultado 13 Nov. 2016. Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/StreptococcusyEnterococcus.pdf>

Rodríguez, G. M, 2006. Comportamiento de la mastitis bovina y su impacto económico en algunos hatos de la Sabana de Bogotá, /Colombia. En línea, Consultado 20 Jul. 2016 Revista de Medicina Veterinaria, disponible en: https://www.researchgate.net/publication/237043024_Comportamiento_de_la_mastitis_bovina_y_su_impacto_economico_en_algunos_hatos_de_la_Sabana_de_Bogota_Colombia

Rossitto, P.; Ruiz, L.; Kikuchi, Y.; Glenn, K.; Luiz, K.; Watts, J. 2002. Antibiotic Susceptibility Patterns for Environmental Streptococci Isolated from Bovine Mastitis in Central California Dairies. J. Dairy Sci. 85:132-138.

Ruiz, A.; Ponce, G.; Gomes, R.; Mota, E.; Sampaio, E.; Lucena, S. 2011. Prevalencia de mastitis bovina subclínica y microorganismos asociados: Comparación entre ordeño manual y mecánico, en Pernambuco, Brasil, Revista Salud animal volumen 33 No 1, 2011, 8 p. en línea, disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v33n1/rsa09111.pdf>

Ruiz, R. 2016. Mastitis bacteriana en ganado bovino: etiología y técnicas de diagnóstico en el laboratorio, departamento de medicina y zootecnia de rumiantes (en línea). Mexico, UNAM. 15 p Consultado 27 jul. 2016 Disponible en http://www.ammveb.net/articulos/mastitis_bacteriana.pdf

Russi, N. 2008. Susceptibilidad a antibióticos de *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina, Universidad Nacional Del Litoral, Santa Fé, Argentina, 86 p. en línea, disponible en: <https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443/bitstream/handle/11185/259/tesis.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Sánchez, M.; Gutiérrez, N.; Posada, I. 2017. Prevalencia de mastitis bovina en el cañón de Anaime, región lechera de Colombia, incluyendo etiología y resistencia microbiana. Anaime, Colombia. 226 p. En línea, consultado Febrero 2018. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v29n1/a22v29n1.pdf>

Saran, A.; Chaffer, M. 2000. Mastitis y calidad de leche. Inter-Médica. Buenos Aires. 194 pp.

Seegers, H.; Fourichon, C.; Beaudeau, F. 2003. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *vet. res.* 34:475–491. servet talavera. consultado 20 jul. 2016, en línea, disponible en : <http://www.servetalavera.es/documentos/cmt.pdf>

Sixtos, E. 2011. Frecuencia y etiología de la mastitis bovina en Cherán. (en línea). consultado 04 Oct. de 2016. disponible en : http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infeciosas/bovinos_leche/78-mastitis.pdf

Soto, P. 1998. Determinación del contenido de Yodo en productos comerciales para selladores utilizados a nivel mundial para el control de Mastitis. Tesis de grado presentada como parte de los requisitos para optar al Grado de Licenciado en Medicina Veterinaria. Valdivia Chile. En línea, Disponible en: <http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/1190/1/616-1604-1-PB.pdf>

Sumano, H.S. Ocampo, L. 2008. Farmacología Veterinaria, Tercera Edición, Mc Graw Hill, P. 1092

Tirante, L. 2007. Requisitos de un buen antiséptico para pezones, II Jornada de actualización en mastitis para técnicos, Uruguay , 2007. 6 p. en línea, consultado en agosto de 2018, Disponible en: <http://www.lactodiagnosticosur.com.ar/wp-content/uploads/2011/12/Selladores.pdf>

Torres, C. 2012. La resistencia bacteriana a los antibióticos , siete décadas después de Fleming. (en línea) consultado el 28 octubre 2016. Zaragoza. disponible en <http://www.academiadefarmaciadearagon.es/docs/Documentos/Documento48.pdf>

Valero-Leal, K. Valbuena, E. Chacón, F. Olivares, Y. Briñez, R. 2010, Patógenos contagiosos y ambientales aislados de cuartos mamarios con mastitis subclínica de alto riesgo en tres fincas del estado zulía, Maracaibo, Venezuela, 9 p. en línea, consultado en julio de 2017 Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/262479997_Patogenos_contagiosos_y_ambientales_aislados_de_cuartos_mamarios_con_mastitis_subclinica_de_alto_riesgo_en_tres_fincas_del_estado_Zulia

Vargas, Diana S; Agustín Góngora Orzuela; Jiro Jime Correa ,2012, Enfermedades virales emergentes en ganado de leche de américa latina (en línea). consultado el 7 de septiembre 2019. disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rori/v16n2/v16n2a10.pdf>

Wattiaux, M. 2013. The Babcock Institute's. Dairy Essentials Chapter 23: Mastitis: The Disease and Its Transmission Value 1994-2013 board of regents of the University of Wisconsin System.

Wellenberg, G.; Van Der Poel, W.; Van Oirschot, J. 2002. Viral infections and bovine mastitis: a review. *Veterinary Microbiology*, Article 2361, pp. 2-21. (en línea). consultado 04 oct del 2016. disponible en : http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infeciosas/bovinos_leche/78-mastitis.pdf

Williamson, J.; Lacy, S. 2013. Effect of disinfecting teats post-milking or pre-and post-milking on intramammary infection and somatic cell count. *N.Z. Vet. J.* 61: 262-268.

Winn, H.; Allen; Janda; Koneman; Procop; Schreckenber; Woods; 2008. Koneman diagnóstico microbiológico texto y atlas en color 6a EDICIÓN, editorial médica panamericana, Madrid, España, 2008, 593 p.

Wolter; Castañeda, V.H; Kloppert B; Zschoeck M. 2002 La mastitis bovina, Instituto estatal de investigaciones de Hesse, Universidad de Guadalajara, Mexico, 2015, 68 p, en línea, consultado en agosto de 2017 disponible en: <http://infolactea.com/wp-content/uploads/2015/03/608.pdf>

Zhao, X.; Lacasse, P. 2008. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. *j. anim. sci.* 86:57–65.

9. ANEXOS

anexo. 1 Antibióticos sistémicos de elección contra mastitis.

Bencilpenicilina G *	Neomicina*
Cloxacilina	Gentamicina*
Ampicilina*	Estreptomicina y dihidroestreptomicina
Cefalosporinas. (ceftiofur, ceftriaxona, cefadroxil.)	Cloranfenicol

fuente: (Blood *et al*, 2006); * (antibióticos utilizados en la investigación: AMC= Amoxicilina más ácido clavulánico.; P = penicilina; AMP = ampicilina; ENR = enrofloxacina.; CN =gentamicina; N = neomicina).

anexo. 2 Procedimientos generales para siembra primaria de bacterias

<i>Escherichia coli.</i>	<i>Staphylococcus aureus.</i>	<i>Streptococcus agalactiae.</i>
1. Realizar una dilución primaria con 10 ml de la muestra de leche diluida en 90 ml de agua peptonada al 0.1%, mezclar y homogeneizar. Esta constituye la primera dilución de la serie (1:10 o 10 ⁻¹)		1. Realizar una dilución- tomando 10 ml de la muestra en 90 ml de caldo infusión cerebro corazón (BHI) e incubar a 35°C por 24 horas en condiciones de anaerobiosis. Luego se pasó a agar sangre por el método de estrías.
2. Tomar 1 ml de la dilución anterior 10 ⁻¹ con una pipeta estéril y transferirlo a un tubo con 9 ml de agua peptonada al 0.1% para obtener la dilución 10 ⁻² (1:100), (1:10); tomar 1 ml de la dilución anterior 10 ⁻² (1:100), con una pipeta estéril y transferirlo a un tubo con 9 ml de agua peptonada al 0.1% para obtener la dilución 10 ⁻³ (1:1000)	2. Tomar 1 ml de la dilución 10 ⁻¹ con una pipeta estéril. 3. Transferir el inóculo uniformemente a 3 placas con agar Baird-Parker (BP). 0.3 ml, 0.3 ml y 0.4 ml. 4. Mantener las placas en posición vertical hasta que sea absorbido el inóculo por el agar, cerca de unos 10 minutos. 5. Invertir las placas al momento de incubar durante 48 horas a 35-37°C. 6. Seleccionar las placas que tengan de 20-200 colonias, (a no ser que las colonias con menores diluciones tengan colonias con apariencia de <i>S. aureus.</i>) (BAM, 2016).	Nota: son cocos Gram positivos, anaerobios facultativos, exigentes, que en medios sólidos con sangre crecen formando colonias grisáceas de 3 a 4 mm de diámetro, rodeadas de un halo estrecho de beta-hemólisis. (Temas de bacteriología y virología médica, 2006)
3. Luego se con la misma pipeta utilizada para cada dilución correspondiente se toma 1ml de la cada una de las diluciones 10 ⁻¹ , 10 ⁻² , 10 ⁻³ y verter 1 ml en cada una de las dos cajas Petri estéril, vacía y debidamente identificada. En duplicado de las diluciones hechas anteriormente.		
4. Se obtienen 6 cajas Petri que corresponden dos a cada dilución, 10 ⁻¹ , 10 ⁻² , 10 ⁻³ a las cuales se añadió 15 ml de agar (VRBA) atemperado a 45°C , se homogeneizó con movimientos de vaivén y rotación, cada placa y dejó solidificar.	Nota: las colonias de 4 - 6 mm de diámetro; lisas enteras y de consistencia cremosa pigmento amarillo o amarillo naranja. (Winn <i>et al</i> , 2009)	
5. Incubar las placas a 35°C durante 24 horas. Para <i>E. coli.</i> (BAM,2002) Sus siglas en inglés, VRBA: Violet Red Bilis Agar		

anexo. 3 Programación de actividades en campo y laboratorio para el experimento

Actividades 2017	Mes (semanas)		
	JUNIO	JULIO	AGOSTO

	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
aplicación tratamiento grupo 1 en ganadería 01	X											
aplicación tratamiento grupo 1 en ganadería 02		X										
rotación de tratamientos 2, recolección de muestras de leche tratamiento 1, transporte y Análisis laboratorio grupo 1 ganadería 01			X	X	X	X						
rotación de tratamientos 2, recolección de muestras de leche tratamiento 1, transporte y Análisis laboratorio grupo 1 ganadería 02				X	X	X	X					
rotación de tratamientos 3, recolección de muestras de leche tratamiento 2, transporte y Análisis laboratorio grupo 2 ganadería 01					X	X	X	X				
rotación de tratamientos 3, recolección de muestras de leche tratamiento 2, transporte y Análisis laboratorio grupo 2 ganadería 02						X	X	X	X			
finalización 3, recolección de muestras de leche tratamiento 3 transporte y Análisis laboratorio grupo 3 de la ganadería 01							X	X	X	X	X	X
finalización 3, recolección de muestras de leche tratamiento 3 transporte y Análisis laboratorio grupo 3 de la ganadería 02								X	X	X	X	X

(S1= SELLADOR UNO. S2=SELLADOR DOS. S3= SELLADOR TRES.)

anexo. 4 Resultados de prueba California mastitis Test (CMT) en vacas en ordeño en dos ganaderías lecheras de Sonsonate, El Salvador.

	Periodo 1		Negativa	Positiva	Total vacas		Periodo 1		Negativa	Positiva	Total vacas
			s	s					s	s	
Ganadería A		Sellador A	19	1	20	Ganadería B		Sellador A	19	1	20
		Sellador B	16	4	20			Sellador B	14	6	20
		Sellador C	19	1	20			Sellador C	18	2	20
	Periodo 2		Negativas	Positivas			Periodo 2		Negativas	Positivas	
		Sellador A	18	2	20			Sellador A	20	0	20
		Sellador B	16	4	20			Sellador B	18	2	20
		Sellador C	17	3	20			Sellador C	18	2	20
	Periodo 3		Negativas	Positivas			Periodo 3		Negativas	Positivas	
		Sellador A	16	4	20			Sellador A	15	5	20
		Sellador B	13	7	20			Sellador B	20	0	20
		Sellador C	17	3	20			Sellador C	17	3	20

anexo. 5 Pruebas de laboratorio para *Staphylococcus aureus*.

Código	MX/ pruebas	Agar Baird Parker	Catalasa	Coagulasa	Gram	Código	MX/ pruebas	Agar Baird Parker	Catalasa	Coagulasa	Gram
010101A	MX1 0.3 SR1	+	-			020101B	MX1 0.3 V1	+	-		
010102B	MX2 0.3 SR1	+	-				MX1 0.3 V1	+	+	-	+
010103B	MX3 0.3 SR1	+	+	+	+	020102B	MX2 0.3 V1	+	-		
	MX3 0.4 SR1	+	-				MX2 0.3 V1	+	-		
010104B	MX4 0.3 SR1	+	-				MX2 0.4 V1	+	+	+	+
	MX4 0.3 SR1	+	+	-	+	020103B	MX3 0.3 V1	+	-		
	MX4 0.4 SR1	+	+	+	+		MX3 0.4 V1	+	+	+	+
010105B	MX5 0.3 SR1	+	-			020104B	MX4 0.3 V1	+	-		
	MX5 0.3 SR1	+	-			020105B	MX5 0.3 V1	+	+	-	+
	MX5 0.4 SR1	+	-				MX5 0.3 V1	+	+	+	+
010107B	MX7 0.3 SR1	+	+	+	-		MX5 0.4 V1	+	+	+	+
	MX7 0.3 SR1	+	+	+	+	020106A	MX6 0.3 V1	+	+	+	+
010108B	MX8 0.4 SR1	+	-				MX6 0.3 V1	+	+	+	+
010109B	MX9 0.3 SR1	+	+	+	+		MX6 0.4 V1	+	-		
	MX9 0.3 SR1	+	+	+	+	020107C	MX7 0.3 V1	+	-		
	MX9 0.4 SR1	+	+	+	+	020108C	MX8 0.3 V1	+	+	+	+
Código	MX/Pruebas	Agar Baird Parker	Catalasa	Coagulasa	Gram		MX8 0.3 V1	+	+	-	+
010202B	MX2 0.4 SR2	+	+	+	+	Código	MX/ pruebas	Agar Baird Parker	Catalasa	Coagulasa	Gram
	MX 2 0.3 SR2	+	+	+	+	020201B	MX1V2	+	+	-	
	MX 2 0.3 SR2	+	-	-	-		MX1	+	+	-	
010204B	MX4 SR2	-	-				MX1	+	-		
010205C	MX5 0.4 SR2	+	-		-	20202	MX2V2	+	+	-	
010206B	MX6 0.4 SR2	+	+	-	+		MX2	+	+	-	
	MX6 0.3 2 SR2	+	-		-		MX2	+	+	-	
						020203B	MX3V2	-			
Código	MX/ pruebas	Agar Baird Parker	Catalasa	Coagulasa	Gram		MX3	-			
010302B	MX2 0.4 SR3	+	+	-			MX3	+	-		
	MX2 0.31 SR3	+	+	-		020204C	MX4 0.3 1 V2	+	-	-	-
010305A	MX5 0.4 SR3	+	+	-			MX4 0.3 2 V2	+	-	-	-
	MX5 0.31 SR3	+	+	+	+		MX4 0.4 V2	+	+	+	+
	MX5 0.32 SR3	+	+	-		020205C	MX5 0.3 1 V2	+	-		-
010306A	MX6 0.4 SR3	+	+	-			MX5 0.3 2 V2	+	+	+	+
	MX6 0.31 SR3	+	-				MX5 0.4 V2	+	+	+	+
	MX6 0.32 SR3	+	+	-							
010307B	MX7 0.4 SR3	+	-			Código	MX/ pruebas	Agar Baird Parker	Catalasa	Coagulasa	Gram
	MX7 0.31 SR3	+	-			020301A	MX1 0.4 V3	+	+	+	+
	MX7 0.32 SR3	+	+	-			MX1 0.31 V3	+	+	-	+
							MX1 0.32 V3	+	+	+	+
16 MXS						020302A	MX2 0.4 V3	+	-		
							MX2 0.31 V3	+	+	-	
							MX2 0.32 V3	+	+	-	
						020305C	MX5 0.4 V3	+	+	-	

010305A*	5	+	+	+/+	+	+	+	-	020305C*	5	+	+	+/+	+	+	+	+	-
010306A*	6	+	+	+/+	+	+	+	-	020306C*	6	+	+	+/+	+	+	+	+	-
010307B*	7	+	+	+/+	+	+	+	-	020307C*	7	+	+	+/+	+	+	+	+	-
010308B*	8	+	+	+/+	+	+	+	-	020308C*	8	+	+	+/+	+	+	+	+	-
010309B*	9	+	+	+/+	+	+	+	-	020309A	9	+	-	+/-	-	/	/	/	
010310B*	10	+	+	+/+	+	+	+	-	020310A	10	+	-	+/-	-	/	/	/	

*=MUESTRAS CON ANTIBIOGRAMA DEL ESTUDIO SELLADORES.
**=MUESTRAS CON ANTIBIOGRAMA DE LA GANADERIA COMPLEMENTARIA

anexo. 7 Pruebas de resultados de las pruebas realizadas para la detección de Estreptococcus spp.

Mx	A.S.	Catalasa	CAMP	Bilis Escu.	Gram	Mx	A.S.	Catalasa	CAMP	Bilis Escu.	Gram
010101 A	+	-	-	+	-	020101 B	+	-	-	-	-
010102 B	+	-	-	+	-	020102 B	+	-	-	+	-
010103 B	+	-	-	+	-	020103 B	+	-	-	+	-
010104	+	-	-	+	-	020104 B	+	-	-	+	-
010105	+	-	-	-	-	020105 B	+	+	-	+	+
10106	+	-	-	-	-	020106 A	+	+	-	-	-
10107	+	-	-	+	-	20107	+	-	-	-	-
10108	+	-	-	-	-	20108	+	-	-	+	-
10109	+	-	-	+	-	20109	+	-	-	-	-
10110	+	-	-	+	-	020110	+	-	-	+	+
Mx	A.S.	Catalasa	CAMP	Bilis Escu.	Gram	Mx	A.S.	Catalasa	CAMP	Bilis Escu.	Gram
010201 C	+	+	-	/	-	020201 B	+	+	-	/	+
010202 B	+	+	-	/	-	20202	+	+	-	/	-
10203	+	-	-	/	-	020203 B	+	-	-	/	-
10204	+	-	-	/	-	020204 C	+	-	-	/	-
010205 C	+	-	-	/	-	020205 C	+	+	-	/	+
10206	+	-	-	/	-	020206C	+	+	-	/	+
010207 A	+	-	-	/	-	20207	+	-	-	/	-
10208	+	-	-	/	-	020208C	+	+	-	/	+
10209	+	-	-	/	-	20209	+	-	-	/	+
10210	+	-	-	/	-	20210	+	-	-	/	+
Mx	A.S.	Catalasa	CAMP	Bilis Escu.	Gram	Mx	A.S.	Catalasa	CAMP	Bilis Escu.	Gram
010301 B	+	-	-	-	-	020301	+	-	-	-	-
010302 B	+	+	-	+	+	020302	+	-	-	-	-
010303 C	+	+	-	+	+	20303	+	-	-	+	-
010304 A	+	+	-	+	+	20304	+	-	-	+	-
010305 A	+	+	-	+	+	020305 C	+	+	-	+	+

010306 A	+	+	-	+	+	020306	+	-	-	-	-
10307B	+	+	-	+	+	20307	+	-	-	-	-
10308	+	-	-	+	-	20308	+	-	-	-	-
010309B	+	+	-	+	+	020309	+	-	-	+	-
10310B	+	+	-	+	+	020310	+	-	-	+	-

anexo. 8 Resultados de antibiogramas *Escherichia coli*

ANTIBIOTICOS	AMC	CN	ENR	AMP	N	P	ANTIBIOTICOS	AMC	CN	ENR	AMP	N	P
MX E. coli /mm							MX E. coli /mm						
010202B	22	20	28	20	18	7	020101B	24	23	31	22	21	10
010102B	24	22	31	23	21	11	020102B	25	24	32	19	24	9
10208	9	24	35	6	#	6	020105B	26	27	12	25	24	11
10209	21	18	37	12	19	6	020106 ^a	18	23	19	14	21	8
10210	23	20	30	19	17	6	020107C	23	24	32	22	22	10
ANTIBIOTICOS	AMC	CN	ENR	AMP	N	P	ANTIBIOTICOS	AMC	CN	ENR	AMP	N	P
MX E. coli /mm							MX E. coli /mm						
010301B	22.6	22	32	19.3	18	6	020201B	24	23	25	7	15	6
010303C	26	23	35	6	6	6	020201B1	18	21	40	18	18	6
010304A	9.1	20	33	6	18	6	020201B1	22	22	40	20	18	6
010305A	21.5	19	30	16.5	18	6	020201B1	18	22	41	20	19	6
010306A	19.3	18	25	6	18	6	020201B1	22	22	39	19	18	6
010307A	19.2	23	28	20.4	#	6	020202B	25	24	32	19	24	9
010308B	13.7	27	35	6	#	6	020203B	26	23	46	39	24	11
010309B	6	19	32	6	19	6	020204C	27	24	43	21	22	10
0103010B	28.1	20	34	21.5	17	6		23	24	38	21	21	6
							020204C1	25	22	41	28	23	14
							020205C	23	20	34	19	18	10
								26	23	40	23	20	14
							020209**	18	20	21	10	19	6
							020210**	23	19	33	20	18	6
							ANTIBIOTICOS	AMC	CN	ENR	AMP	N	P
							MX E. coli /mm						
							020301 ^a	19	23	32	23	24	6
							020301A 1	21	18	25	6	19	6
							020301A 1	22	24	34	6	19	6
							020301A 2	11	22	28	6	13	6
							020301A 3	11	23	26	6	18	6
							020302 ^a	11	23	39	13	24	6
							020302A 1	10	22	26	6	24	6

						020302A 1	10	23	37	6	24	6
						020302A 1	10	19	39	6	23	6
						020302A 1	9	23	37	6	24	6
						020303**	12	24	32	6	22	6
						020303**	10	21	27	6	25	6
						020303**	12	24	28	6	15	6
						020303 1**	9	6	19	6	15	6
						020303**	6	24	20	6	22	6
						020303**	9	23	15	6	15	6
						020304**	15	18	26	7	18	9
						020305C	15	20	26	6	17	7
						020306C	11	24	36	6	26	6
						020306C	9	20	34	6	22	6
						020306C	10	25	37	6	23	6
						020306C	9	22	33	6	22	6
						020306C	6	22	37	6	19	6
						020307**	15	23	26	6	21	6
						020307**	10	21	26	13	17	6
						020307**	13	25	30	12	22	6
						020307**	13	25	24	14	22	13
						020307 1**	24	13	26	15	20	11
						020307 1**	26	20	29	23	18	15
						020308**	16	23	6	6	11	6
						020308**	20	23	6	6	14	6
						020308**	25	22	6	6	13	6
						020308**	17	21	6	6	11	6
						020308 1**	21	22	6	6	12	6
						020308 1**	24	22	6	6	14	6

anexo. 9 Resultados de antibiograma para Staphylococcus aureus.

Antibióticos	AMC	CN	ENR	AMP	N	P
MX S. Aureus /mm						

010103B/MX3 S3 0.3 SR	29.5	15.5	18.5	19.5	24.8	20
010104B/ MX4 S3 0.4 SR	18.5	13	29	7	14	6
010105B/ MX5 0.3 1 SR	31	30	23.5	29.5	25	27
010107B/ MX7 0.3 SR	41	16	30	25	15	24
010109B/ MX9 0.3 1 SR	20	22.6	32	14	24	10
010109B/ MX9 0.3 2 S.R	12	12.5	27	16	32	11
010109B/ MX9 0.4 SR	21	18	30	14	22	6
010202B/ MX2 0.3 SR2	37	30	32	28	29	20
010202B/ MX2 0.4 S R2	14	24	32	6	22	6
010305A/ MX5 SR3 0.3 1	29	30.5	34	18.5	24	9
020102B/ MX2 A2 0.4 V	32.5	32	24.8	32	30.5	25
020103B/ MX3 A4 0.4 V	37.2	29	32	34	30	32
020105B/ MX5 A6 0.3 2 V	12	22	24.5	6	24	6
020105B /MX5 A6 0.4 V	28	14	20	14	6	8
020106A/ MX6 Y1 0.3 1 V	34	13	28	21	18	19.5
020106A/MX6 Y1 0.3 2 V	6	6	6	6	6	6
020108C/MX8 0.3 1 V	40	31.5	35	34	29	33
020204C/ MX4 A5 V2 0.4	32	30	42	24	28.5	6
020205C/ MX5 A6 V2 0.4	22	25.5	31	21	27	17.5
020205C/MX5 A6 V2 0.3	19.5	24.5	26	6	17	6
020301A/ MX1 A1 V3 0.3 2	37	34	35	30	39	25
020301A/ MX1 A1 V3 0.4	44	33	37	34	34	33
010305B/ MX5 Y1 SR3 0.3 1	29	30.5	34	18.5	24	9
020309A/ MX9 V3 A2 0.3 2	41	28	37	24.5	29	21

anexo. 10 Resultados de antibiogramas *Streptococcus spp.*

MX S. SPP/ mm	AMC	CN	ENR	AMP	N	P	Antibióticos	AMC	CN	ENR	AMP	N	P
010302B Mx2	14	22	27	6	6	6	MX S. SPP/mm						
010303CMx3	17	21	28	6	19	6	020105B (mx5)	10	25	31	6	23	6
010304AMx4 SR3	6	17	25	6	20	6	020110B (mx10)	21	24	6	6	19	6

010305AMx5 SR3	7	16	28	6	15	6							
010306AMx6 SR3	6	19	25	6	19	6	S.PP SVELESA 2						
010307Mx7 SR3	6	21	30	12	22	6	MX S. SPP/mm	AMC	CN	ENR	AMP	N	P
010309Mx9 SR3	6	19	26	6	16	6	020201B(Mx1)	6	20	28	6	22	6
010310Mx10 SR3	8	20	29	6	23	6	020205C(Mx5)	22	19	28	6	19	6
							020206(Mx6)	13	17	28	6	17	6
							020208(Mx8)	20	20	29	20	20	6
							S.PP SVELESA 3						
							MX S. SPP/mm	AMC	CN	ENR	AMP	N	P
							020305C(Mx5)	20	23	30	6	20	6

anexo. 11 Listado de muestras y las diferentes cepas en los aislamientos.

	<i>E. coli</i>			<i>S. aureus</i>			<i>S. spp</i>
	Muestras (32)	Aislamientos(39)		Muestras (16)	Aislamientos (23)		Muestras/Aislamientos (15)
1	010202B	010202B/MX2	1	010103B	010103B/MX4 S3 0.3 SR	1	010302B
2	010208B	010208B/MX8	2	010104B	010104B/ MX4 S3 0.4 SR	2	010303C
3	010209B	010209B/MX9	3	010105B	010105B/ MX5 0.3 1 SR	3	010304A
4	010210B	010210B/MX10	4	010107B	010107B/ MX7 0.3 SR	4	010305A
5	010301B	010301B/MX1	5	010109B	010109B/ MX9 0.3 1 SR	5	010306A
6	010303C	010303C/MX3			010109B/ MX9 0.3 2 S. R	6	010307B
7	010304A	010304A/MX4			010109B/ MX9 0.4 SR	7	010309B
8	010305A	010305A/MX5	6	010202B	010202B/ MX2 0.3 SR2	8	010310B
9	010306A	010306A/MX6			010202B/MX2 0.4 SR2	9	020105B
10	010307A	010307A/MX7	7	010305A	010305A/MX5 SR3 0.3	10	020110B
11	010308B	010308B/MX8	8	020102B	020102B/ MX2 A2 0.4 V	11	020201B
12	010309B	010309B/MX9	9	020103B	020103B/ MX3 A4 0.4 V	12	020205C
13	010310B	0103010B/MX10	10	020105B	020105B/ MX5 A6 0.3 2 V	13	020306C
14	020101B	020101B/MX1			020105B/ MX5 A6 0.4 V	14	020308C
15	020102B	020102B/MX2	11	020106A	020106A/ MX6 Y1 0.3 1 V	15	020305C
16	020105B	020105B/MX5			020106A/MX6 Y1 0.3 2 V		
17	020106A	020106A/MX6	12	020108C	020108C/MX8 0.3 1 V		
18	020107C	020107C/MX7	13	020204C	020204C/ MX4 A5 V2 0.4		
19	020201B	020201B/MX1	14	020205C	020205C/ MX5 A6 V2 0.4		
		020201B/MX1			020205C/MX5 A6 V2 0.3		

20	020203B	020203B/MX3	15	020301A	020301A/ MX1 A1 V3 0.3 2		
21	020204C	020204C/MX4			020301A/ MX1 A1 V3 0.4		
22	020205C	020205C/MX5	16	020309A	020309A/ MX9 V3 A2 0.3 2		
23	020209C	020209C					
24	020210C	020210C					
25	020301A	020301A/MX1/0					
		020301A/1					
		020301A/2					
		020301A/3					
26	020302A	020302A/MX2/0					
		020302A/1					
27	020303C	020303C					
28	020304C	020304C					
29	020305C	020305C/MX5					
30	020306C	020306C/MX6					
31	020307C	020307C/1					
		020307C/2					
32	020308C	020308C					

anexo. 12 Listado de códigos de muestras obtenidas por ganadería; periodo, muestra; sellador.

SAN RAMON	VACA	CODIGO	VELESA	VACA	CÓDIGO
PRIMER PERIODO				PRIMER PERIODO	
MX1	Y1 6566	010101A	MX1	A1 AIDA	020101B
MX2	N1 7402	010102B	MX2	A2 COLOMBIANA	020102B
MX3	N2 7771	010103B	MX3	A4 FRUTITA	020103B
MX4	S3 6665	010104B	MX4	A5 HAPPY	020104B
MX5	S1 7732	010105B	MX5	A6 MAJO	020105B
MX6	S2 7514	010106B	MX6	Y1 GUARA	020106A
MX7	S7 7580	010107B	MX7	S1	020107C
MX8	S4 5937	010108B	MX8	S2	020108C
MX9	S5 7871	010109B	MX9	S3	020109C
MX10	S6 6205	010110B	MX10	S4	020110C
SEGUNDO PERIODO				SEGUNDO PERIODO	
MX1	N1 7710	010201C	MX1	N1 LICHA	020201B
MX2	Y1 7733	010202B	MX2	S1 PANAMA	020202C

MX3	S1	010203B	MX3	N2 JEMIMA	020203B
MX4	S2	010204B	MX4	A1 MARIANA	020204C
MX5	N2 7381	010205C	MX5	A2 NORRY	020205C
MX6	S4	010206B	MX6	S2 SANDIA	020206C
MX7	A4 6124	010207A	MX7	S3 ELSITA	020207C
MX8	S5	010208B	MX8	S4 GALANA	020208C
MX9	S3	010209B	MX9	S5 CAPULINA	020209C
MX10	S6	010210B	MX10	S6 AMADA	020210C
TERCER PERIODO			TERCER PERIODO		
MX1	A 7187	010301B	MX1	N1 DELANCI	020301A
MX2	A 5482	010302B	MX2	N3 BLER	020302A
MX3	Y 6566	010303C	MX3	S2 BRASILEIRA	020303C
MX4	V 7278	010304A	MX4	S4 RAPUNZEL	020304C
MX5	V 6980	010305A	MX5	A1 PEÑA	020305C
MX6	V 7389	010306A	MX6	A2 DINORA	020306C
MX7	S1	010307B	MX7	S1 JEMIMA	020307C
MX8	S2	010308B	MX8	S3 PERLA	020308C
MX9	S3	010309B	MX9	N2 PELADA	020309A
MX10	S4	010310B	MX10	N4 BARILOCHE	020310A

GANADERIAS= 01: SAN RAMÓN; 02: VELESA. PERIODOS= 01 -02- 03 MUESTRAS= 01;02;03;04;05;06;07;08;09;10

SELLADORES= A= TENSOLAC B= IO-SHIELD C= SCU.D.

anexo. 13 Muestras dentro del experimento y fuera del experimento.

	San Ramon			Velesa	
	Con cinta/controlada	Sin cinta/no controladas		Con cinta	Sin cinta
1er Periodo	3	7	1er Periodo	6	4
lo	2		lo	5	
T	1		T	1	
S	0		S	0	
2do Periodo	4	6	2do Periodo	4	6
lo	1		lo	2	
T	1		T	0	
S	2		S	2	
3er Periodo	6	4	3er Periodo	6	4
lo	2		lo	0	
T	3		T	4	
S	1		S	2	

anexo. 14 Muestras positivas a cmt separadas por sellador.

	S. Ramon.				Velesa			
	1er P.	2do P.	3er P.	TOTAL	1er P.	2do P.	3er P.	TOTAL

lo	6149atb	4026atb	5482	15	Aida*	Gemima*	8	
	6906atb	5808atb	6291		Colombiana*	Licha*		
	7402	7511	6602		Frutita*			
	7771	7733	6815		Gracia			
			7187		Happy*			
			7250		Majo*			
			7341					
T	6566	6124	6980atb	7	Guara*		Bariloche*	6
		6677	6625				Bler*	
			7278				Delancy*	
			7389				Juguetona	
							Pelada*	
S	7412atb	6904atb	6566	7	Armida	Nory*	Dinora	7
		7710	7511		Galana	Mariana*	Peña	
		7381	7725					
TOTAL	6	9	14		9	4	8	

anexo. 15 Microorganismos encontrados por muestra.

Muestra/ Bacteria	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus COA -</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus spp</i>
010101A				
010102B				
010103B			X	
010104B		X	X	
010105B			X	
010106B				
010107B			X	
010109B			X	
010110B				
010201C				
010202B	X	X	X	
010203B				
010204B				
010205C				
010206B		X		
010207*				
010208B	X			
010209B	X			
010210B	X			
010301B	X			
010302B		X		X

010303C	X			X
010304*	X			X
010305A	X	X	X	X
010306A	X	X		X
010307B	X	X		X
010308B	X			
010309B	X			X
010310B	X			X
020101B	X	X		
020102B	X		X	
020103B			X	
020104B				
020105B	X	X	X	X
020106A	X		X	
020107C	X			
020108C		X	X	
020110C				X
020201B	X	X		X
020203B	X			
020202C		X		
020204C	X	X	X	
020205C	X		X	X
020206C				X
020208C				X
020209C	X			
020210C	X			
020301A	X	X	X	
020302A	X	X		
020303C	X			
020304C	X			
020305C	X	X		X
020306C	X	X		
020307C	X			
020308C	X			
020309A		X	X	
020310A		X		
	32	17	16	15

anexo. 16 Combinaciones de agente etiológico por muestra

COMBINACIONES DE AGENTE ETIOLÓGICO POR MUESTRA	No de MX
S. SPP + S. AUREUS	3
S. AUREUS	3

S. SPP	2
E. COLI	8
E. COLI + S. SPP	5
E. COLI + S. SPP + S. AUREUS	3
E. COLI + S. AUREUS	6
E. COLI + ST. SPP	5
ST. SPP	2
E. COLI + S. SPP + ST. SPP	2
E. COLI + S. SPP + S. AUREUS + ST. SPP	1
E. COLI + S. AUREUS + ST. SPP	1
	41