

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

**Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria**



**Caracterización molecular de los agentes  
bacterianos causantes de mastitis bovina  
asociados a resistencia de antibióticos en  
vacas lecheras de la Provincia de  
Cajamarca**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

Presentada por  
**Eva Gisela León Saldaña**

Asesores  
**Dr. Rodolfo Gustavo Gamarra Ramírez**  
**Dr. Marco Antonio Cabrera Gonzales**

**Cajamarca - Perú**  
**2025**

**CONSTANCIA DE INFORME DE ORIGINALIDAD**

1. **Investigador:** Eva Gisela León Saldaña  
DNI: 76700198  
Escuela Profesional: Medicina Veterinaria
2. **Asesores:** Dr. Rodolfo Gustavo Gamarra Ramírez y Dr. Marco Antonio Cabrera Gonzales
3. **Facultad:** Ciencias Veterinarias
4. **Grado académico o título profesional:** Título Profesional
5. **Tipo de Investigación:** Tesis
6. **Título de Trabajo de Investigación:** "Caracterización molecular de los agentes bacterianos causantes de mastitis bovina asociados a resistencia de antibióticos en vacas lecheras de la Provincia de Cajamarca"
7. **Fecha de Evaluación:** 19/05/2025
8. **Software Anti plagio:** Turnitin
9. **Porcentaje de Informe de Similitud:** 9 %
10. **Código Documento:** oid: 3117:460624554
11. **Resultado de la Evaluación de Similitud:** Aprobado



Universidad Nacional de Cajamarca  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
  
Dr. Wilder Quispe Urteaga  
Director de la Unidad de Investigación

Fecha Emisión: 22 de mayo del 2025



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA  
NORTE DE LA UNIVERSIDAD PERUANA  
Fundada Por Ley N°14015 Del 13 De Febrero De 1962  
UNIVERSIDAD LICENCIADA  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
DECANATO  
Av. Atahualpa 1050 – Ciudad Universitaria Edificio 2F – 205 Fono 076 365852



## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En Cajamarca, siendo las doce horas del día quince de mayo del dos mil veinticinco, se reunieron en el Auditorio de la Facultad de Ciencias Veterinarias “César Bazán Vásquez” de la Universidad Nacional de Cajamarca los integrantes del jurado calificador, designados por el Consejo de Facultad, con el objeto de evaluar la sustentación de Tesis titulada: **“Caracterización molecular de los agentes bacterianos causantes de mastitis bovina asociados a resistencia de antibióticos en vacas lecheras de la Provincia de Cajamarca”**, asesorada por el docente **Dr. Rodolfo Gustavo Gamarra Ramírez** y como Co-Asesor **Dr. Marco Antonio Cabrera Gonzales** y presentada por la Bachiller en Medicina Veterinaria: **EVA GISELA LEÓN SALDAÑA**.

Acto seguido el presidente del jurado procedió a dar por iniciada la sustentación y para los efectos del caso se invitó a la sustentante a exponer su trabajo.

Concluida la exposición de la Tesis, los miembros del jurado calificador formularon las preguntas que consideraron convenientes relacionadas con el trabajo presentado; asimismo, el presidente invitó al público asistente a formular preguntas concernientes al tema.

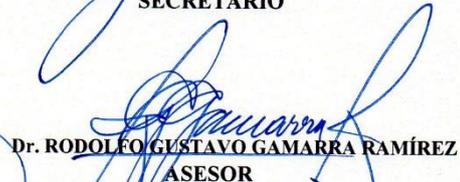
Después de realizar la calificación de acuerdo a las pautas de evaluación señaladas en el Reglamento de Tesis, el jurado calificador acordó: **APROBAR** la sustentación de Tesis para optar el Título Profesional de **MÉDICO VETERINARIO**, con el calificativo final obtenido de **DIECISIETE (17)**.

Siendo las trece horas y veinte minutos del mismo día, el presidente del jurado calificador dio por concluido el proceso de sustentación.

  
Dr. JOSÉ ANTONIO NIÑO RAMOS  
PRESIDENTE

  
Dr. JOSÉ FERNANDO CORONADO LEÓN  
SECRETARIO

  
Dr. GILBERTO FERNÁNDEZ IDROGO  
VOCAL

  
Dr. RODOLFO GUSTAVO GAMARRA RAMÍREZ  
ASESOR

  
Dr. MARCO ANTONIO CABRERA GÓNZALES  
CO-ASESOR

## DEDICATORIA

*Dedico este trabajo a mi madre, porque siempre me creyó y me brindó su apoyo incondicional. Su amor, paciencia y sabiduría fueron la base que me permitió llegar hasta aquí. También a mi familia, por ser el pilar en cada etapa de mi vida, por su comprensión, compañía y aliento durante todo este proceso; y también a todos aquellos que, de alguna manera, me motivaron a continuar. Este logro también es suyo.*

***Eva***

## AGRADECIMIENTO

*Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que, de una u otra manera, hicieron posible la realización de esta tesis.*

*En primer lugar, a Dios, por darme la sabiduría, la paciencia y la fortaleza necesarias para llevar a cabo este trabajo. Su guía y apoyo constante me han permitido superar las dificultades y encontrar claridad en los momentos más desafiantes.*

*A mi familia, especialmente a mi madre y hermanas, por su amor incondicional y su apoyo constante. Gracias por ser el pilar fundamental, por darme las fuerzas cuando la motivación flaqueaba y por siempre creer en mi.*

*A mis amigos, por su comprensión, y por brindarme su compañía y apoyo emocional durante todo este tiempo. Sus palabras de aliento y su presencia fueron un gran soporte en momentos difíciles.*

*Finalmente, a todas aquellas personas que, de manera anónima, han contribuido al desarrollo de este proyecto, ya sea con una palabra de aliento, un consejo o una pequeña ayuda. Este logro también es gracias a ustedes.*

***Eva***

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>DEDICATORIA</b> .....	i
<b>AGRADECIMIENTO</b> .....	ii
<b>ÍNDICE DE CONTENIDO</b> .....	iii
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	v
<b>RESUMEN</b> .....	vi
<b>ABSTRACT</b> .....	vii
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>CAPÍTULO I</b> .....	3
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	3
1.1. <b>Antecedentes de la investigación</b> .....	3
1.2. <b>Bases Teóricas</b> .....	7
1.3. <b>Definición de términos básicos</b> .....	32
<b>CAPÍTULO II</b> .....	34
<b>MARCO METODOLÓGICO</b> .....	34
2.1. <b>Ubicación Geográfica</b> .....	34
2.2. <b>Diseño de la Investigación</b> .....	35
2.3. <b>Métodos de Investigación</b> .....	41
2.4. <b>Población, muestra y unidad de análisis</b> .....	42
2.5. <b>Técnicas e instrumentos de recopilación de información</b> .....	43
2.6. <b>Técnicas para el procesamiento y análisis de la información</b> .....	43
2.7. <b>Equipos y materiales</b> .....	44
<b>CAPÍTULO III</b> .....	45
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	45
3.1. <b>Presentación de Resultados</b> .....	45
3.2. <b>Análisis, interpretación y discusión de resultados</b> .....	49
3.3. <b>Contrastación de hipótesis</b> .....	56
<b>CAPÍTULO IV</b> .....	57
<b>CONCLUSIONES</b> .....	57
<b>CAPÍTULO V</b> .....	59
<b>SUGERENCIAS</b> .....	59

<b>REFERENCIAS</b> .....	60
<b>ANEXOS</b> .....	79

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Frecuencia de bacterias causantes de mastitis subclínica en cinco predios ganaderos de la provincia de Cajamarca - 2024. ....	45
Tabla 2. Perfil de resistencia de antibióticos a los agentes bacterianos causantes de mastitis subclínica en cinco predios ganaderos de la provincia de Cajamarca - 2024. ....	45
Tabla 3. Perfil de resistencia de antibióticos a <i>Staphylococcus aureus</i> , identificado como causante de mastitis subclínica en cinco predios ganaderos de la provincia de Cajamarca - 2024. ....	46
Tabla 4. Perfil de resistencia de antibióticos a <i>Streptococcus agalactiae</i> , identificado como causante de mastitis subclínica en cinco predios ganaderos de la provincia de Cajamarca - 2024. ....	46
Tabla 5. Perfil de resistencia de antibióticos a <i>Escherichia coli</i> , identificado como causante de mastitis subclínica en cinco predios ganaderos de la provincia de Cajamarca - 2024. ....	47
Tabla 6. Perfil de resistencia de antibióticos a <i>Staphylococcus epidermidis</i> , identificado como causante de mastitis subclínica en cinco predios ganaderos de la provincia de Cajamarca - 2024. ....	47
Tabla 7. Perfil de resistencia de antibióticos a <i>Enterobacter cloacae</i> , identificado como causante de mastitis subclínica en cinco predios ganaderos de la provincia de Cajamarca - 2024. ....	48
Tabla 8. Perfil de resistencia de antibióticos a <i>Klebsiella oxytoca</i> , identificado como causante de mastitis subclínica en cinco predios ganaderos de la provincia de Cajamarca - 2024. ....	48

## RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo principal caracterizar molecularmente los agentes bacterianos responsables de la mastitis subclínica en cinco explotaciones ganaderas de la provincia de Cajamarca, así como determinar su perfil de resistencia a siete antibióticos. Para ello, se empleó la prueba de California Mastitis Test (CMT) para identificar las vacas afectadas en cada predio ganadero. Una vez detectados los casos positivos, se recolectaron muestras de leche de 20 vacas por predio, seleccionadas con base en los resultados de la prueba preliminar. Posteriormente, se realizó un cultivo bacteriológico en diversos medios de cultivo, a partir del cual se aislaron 150 colonias bacterianas, las cuales fueron sometidas a un antibiograma mediante el método de difusión en disco de Kirby-Bauer. La identificación molecular de los aislados se llevó a cabo mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciamiento genético. Se identificaron seis especies bacterianas: *Staphylococcus aureus* (59,33%), *Streptococcus agalactiae* (16%), *Escherichia coli* (9,33%), *Staphylococcus epidermidis* (7,33%), *Enterobacter cloacae* (5,33%) y *Klebsiella oxytoca* (2,67%). El análisis del perfil de resistencia antimicrobiana evidenció una mayor resistencia a la penicilina (59,33%), seguida de la lincomicina (18%) y la tetraciclina (15,33%). En menor proporción, se observó resistencia a la sulfa (8%), estreptomicina (7,33%), enrofloxacin (4%) y neomicina (1,33%). Los hallazgos de esta investigación resaltan la importancia de implementar estrategias de manejo racional de los antibióticos en la producción lechera con el fin de evitar el desarrollo de resistencia bacteriana y mejorar la salud de los bovinos en la región.

**Palabras clave:** Mastitis, antibiograma, PCR, ganadería, resistencia antimicrobiana.

## ABSTRACT

The main objective of this study was to molecularly characterize the bacterial agents responsible for subclinical mastitis in five dairy farms in the province of Cajamarca, Peru, and to determine their resistance profiles to seven antibiotics. The California Mastitis Test (CMT) was used to identify affected cows on each farm. From the positive cases, milk samples were collected from 20 cows per farm, selected based on the preliminary test results. Bacteriological culture was then performed using various culture media, from which 150 bacterial colonies were isolated. These isolates were subjected to antimicrobial susceptibility testing using the Kirby-Bauer disk diffusion method. Molecular identification of the isolates was carried out through polymerase chain reaction (PCR) and genetic sequencing. A total of six bacterial species were identified: *Staphylococcus aureus* (59.33%), *Streptococcus agalactiae* (16%), *Escherichia coli* (9.33%), *Staphylococcus epidermidis* (7.33%), *Enterobacter cloacae* (5.33%), and *Klebsiella oxytoca* (2.67%). The antimicrobial resistance analysis revealed the highest resistance to penicillin (59.33%), followed by lincomycin (18%) and tetracycline (15.33%). Lower resistance rates were observed for sulfonamides (8%), streptomycin (7.33%), enrofloxacin (4%), and neomycin (1.33%). These findings highlight the importance of implementing rational antibiotic management strategies in dairy production to mitigate bacterial resistance development and improve herd health.

**Keywords:** Mastitis, antibiogram, PCR, livestock, antimicrobial resistance.

## INTRODUCCIÓN

La mastitis es una de las patologías más comunes y graves dentro de los hatos lecheros a nivel mundial (1). Esto se debe a su gran impacto económico, llegando a ocasionar enormes pérdidas, debido a la disminución de la calidad y cantidad de leche o el descarte de la misma, el sacrificio prematuro, los costos de tratamiento y los costos laborales adicionales (2 - 4). En Estados Unidos, las pérdidas anuales estimadas por vaca se aproximan a los \$ 200 (5), mientras que, las pérdidas totales en 2009 fueron de \$ 2 mil millones (6). Por otro lado, en la India las pérdidas anuales se calcularon cerca de los 100 millones de dólares estadounidenses (7).

En Perú, la producción lechera constituye una actividad económica importante, con una tasa de crecimiento anual de 2,4%. El país importa aproximadamente el 25% de la leche que consume e invierte 200 millones de dólares al año en productos lácteos destinados a programas de asistencia alimentaria (8).

En este contexto, la región de Cajamarca desempeña un papel importante como una de las principales productoras de leche. La economía local depende en gran medida de la ganadería, y la producción de leche es una actividad clave de los sistemas agrícolas de la región, en donde el ingreso monetario agrícola representa desde el 55% hasta el 95% de los ingresos en grandes y pequeñas granjas, respectivamente (9). Sin embargo, la mastitis sigue siendo una barrera significativa para el desarrollo sostenible de esta actividad. A nivel nacional, son varios los estudios que han reportado tasas elevadas de mastitis clínica y subclínica (10–13), mientras que, en Cajamarca, un estudio reciente determinó una prevalencia de 43% de mastitis subclínica en hatos lecheros de una provincia de la región (14). Estos datos reflejan la magnitud que puede alcanzar la mastitis, así como la necesidad de desarrollar estrategias para su control.

Aunque a nivel global existen numerosas investigaciones sobre mastitis, en la provincia de Cajamarca es escasa la información detallada acerca de la etiología bacteriana responsable de esta enfermedad y su perfil de resistencia a antibióticos, lo que representa un limitante en la toma de decisiones respecto al manejo y tratamiento de la mastitis, dejando a los productores en desventaja frente a un problema que compromete tanto la sostenibilidad económica como la salud animal. Ante esta problemática, el presente estudio busca llenar esta brecha de conocimiento mediante la identificación de los agentes bacterianos causantes de la mastitis clínica y subclínica, además de su perfil de resistencia a antibióticos. Los resultados obtenidos contribuirán al entendimiento de la epidemiología de la mastitis en la localidad, con el fin de que se puedan elaborar herramientas para el diseño de estrategias de manejo y control específicas en los predios ganaderos locales.

El objetivo principal de esta investigación fue caracterizar molecularmente los agentes bacterianos causantes de mastitis y determinar su resistencia a antibióticos en predios ganaderos de la provincia de Cajamarca. Para ello se realizaron pruebas de diagnóstico en muestras de leche, seguidas de análisis microbiológicos y moleculares para identificar a los agentes bacterianos y evaluar su resistencia a antibióticos. En los siguientes capítulos, se presentan los resultados obtenidos, los cuales se discuten en función de la literatura científica disponible y se presentan conclusiones que aporten en mitigar el impacto de la mastitis en los sistemas de producción lechera de la región.

# CAPÍTULO I

## MARCO TEÓRICO

### 1.1. Antecedentes de la investigación

#### 1.1.1. Internacionales

Un estudio realizado en Colombia en 2007, tuvo como objetivo identificar los principales agentes bacterianos responsables de la mastitis clínica y subclínica, así como evaluar el estado de resistencia a los antibióticos. Para ello, se evaluaron 541 vacas en producción, distribuidas en 25 fincas del municipio de Duitama, Boyacá. Se encontró que las bacterias Gram positivas son la principal causa de mastitis en la zona, siendo *Staphylococcus aureus* el agente causal más frecuente tanto en mastitis clínica como subclínica, con porcentajes de 32 % y 42 %, respectivamente, seguido de otras especies de *Staphylococcus*. Con menor frecuencia, *Streptococcus sp.* fue el agente causal en ambos tipos de mastitis. En cuanto al estado de resistencia, se observó que los agentes Gram positivos mostraron sensibilidad a la oxacilina, tetraciclina y estreptomicina (15).

Otro estudio realizado en Colombia en 2015, tuvo como objetivo identificar los principales agentes bacterianos causantes de mastitis bovina y sus patrones de sensibilidad a antibióticos en el departamento de Boyacá. Para ello, se procesaron 214 muestras de vacas con algún grado de mastitis bovina. Los patrones de sensibilidad a antibióticos se determinaron mediante la técnica de Kirby-Bauer. En este estudio, se aislaron e identificaron varios agentes etiológicos causantes de mastitis bovina de origen contagioso, ambiental y oportunista, así como algunos agentes infrecuentes (como *Bacillus spp.* y *Lactobacillus spp.*). Los aislamientos mostraron una alta sensibilidad a

antibióticos, principalmente a los betalactámicos. Se encontró una prevalencia del 31 % (n=214) de bacterias causantes de mastitis contagiosa, siendo *Staphylococcus aureus* el agente etiológico más importante, con un 26 % de prevalencia (16).

En 2018 se realizó una investigación en México, que tuvo como objetivo principal identificar a los agentes bacterianos causantes de mastitis bovina en siete establos de la Península de Baja California. Se tomaron 316 muestras de leche, pertenecientes a 186 vacas en producción que a la prueba de California tuvieron reacción positiva. Se obtuvieron 182 aislados bacterianos de 163 cuartos pertenecientes a 106 vacas y se identificaron por PCR y secuenciación, dando un total de 20 especies diferentes, siendo los agentes causales más frecuentes: *Staphylococcus aureus* (58,8%), *Streptococcus agalactiae* (13,2%), *Staphylococcus chromogenes* (8,8%), *Escherichia coli* (0,2%) y *Streptococcus uberis* (2,2%). El 6,13 % (10/163) de los cuartos con aislamiento presentaron infección mixta, siendo la combinación más frecuente *Staphylococcus aureus* con *Streptococcus agalactiae* (30%). Estos resultados indican una alta frecuencia de microorganismos causantes de mastitis bovina, algunos de los cuales son de importancia para la salud pública (17).

En 2022 se llevó a cabo un estudio en la India, con el objetivo de aislar y caracterizar genótipicamente las bacterias causantes de mastitis en vacas, además de evaluar la presencia de genes relacionados con la producción de toxinas. Con esta finalidad, se recogieron un total de 300 muestras de leche de vacas lecheras con mastitis, independientemente del parto y etapa de lactancia, 235 (78,33%) muestras hubo crecimiento bacteriano y en el examen cultural se

obtuvo un total de 1,100 aislamientos bacterianos. Se descubrió que *Staphylococcus aureus* era el principal agente etiológico implicado en la mastitis, seguido de *Escherichia coli*. En la caracterización molecular, se encontraron diversos genes tóxicos como nuc, seb, hla, stx1, stx 2, hly y SagI. Se concluyó que la leche afectada por mastitis no es apta para el consumo humano (18).

Un estudio realizado en Ecuador en 2024, tuvo como objetivo determinar molecularmente los agentes bacterianos causantes de mastitis en vacas. Para ello, se colectaron un total de 24 muestras positivas para mastitis mediante la prueba de CMT. Se utilizaron pruebas bioquímicas como tinción de Gram, catalasa, coagulasa y agar manitol sal. También se emplearon primers específicos (RNA16S), para la identificación molecular de 9 agentes etiológicos responsables de la enfermedad en las unidades productivas. Los microorganismos encontrados fueron: *Staphylococcus pasteurii*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus sp.*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Sphingomonas sp.*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, la mayoría presentes en mastitis clínica. Para detectar genes de resistencia, se utilizaron primers específicos, de los cuales 7 muestras presentaron el gen de resistencia a blaTEM ( $\beta$ -lactámicos) y 6 muestras presentaron el gen de resistencia a tetA (tetraciclinas). Se identificó multiresistencia en las especies: *Staphylococcus pasteurii*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus uberis* y *Sphingomonas sp.* (19).

### 1.1.2. Nacionales

Mulato (2018) mencionó que en Huancavelica - Perú, se recolectaron 16 muestras de vacas en producción mediante la prueba CMT. Las muestras se sembraron en agar sangre, agar manitol y agar MacConkey. Se realizaron pruebas bioquímicas en agar hierro-triple azúcar (TSI), agar lisina-hierro (LIA), citrato de Simmons y formación de indol. La susceptibilidad antimicrobiana se determinó mediante el método de Kirby-Bauer, utilizando discos de enrofloxacina, tetraciclina, gentamicina, penicilina y amoxicilina. Se encontró que el 44 % de las muestras analizadas dieron positivo a mastitis, de las cuales el 6 % correspondió a mastitis clínica y el 38% a mastitis subclínica. La bacteria *Staphylococcus aureus* fue la principal causante de mastitis, mientras que en menor grado se encontraron presentes *Staphylococcus sp.*, *Escherichia coli* y *Streptococcus sp.* La sensibilidad de *Staphylococcus aureus* frente a los antibióticos mostró que el 83% fue sensible a enrofloxacina, el 67% a gentamicina y el 92% a amoxicilina. Además, se encontraron cepas resistentes en un 83 % a tetraciclina y en un 75 % a penicilina (20).

Miranda *et al.* (2022), mencionaron que en Lima- Perú, se evaluaron 586 vacas Holstein, de las cuales se colectaron muestras positivas al CMT y se procedió al cultivo bacteriológico en agar sangre y agar MacConkey. Se evaluó la resistencia microbiana a ocho antibióticos utilizando la prueba de Kirby-Bauer. Se encontró que el 43,7% (256/586) de las vacas presentaron mastitis subclínica, y el 12,4% (291/2344) de los cuartos mamarios estuvieron afectados. Las bacterias más frecuentes fueron *Klebsiella oxytoca* (20,2%), *Enterobacter cloacae* (12,1%) y *Streptococcus agalactiae* (9,1%). Se observó resistencia a antibióticos en

*Klebsiella oxytoca* frente a penicilina, cefalotina, amikacina, estreptomicina, tetraciclina, gentamicina, cefalexina y enrofloxacin, con resistencias entre el 62,9% y el 91,9%. Las cepas de *Enterobacter cloacae* presentaron un 100 % de resistencia a la penicilina, y resistencias para cefalotina, amikacina, estreptomicina, tetraciclina, gentamicina, cefalexina y enrofloxacin, entre el 86,5% y el 97,3%. En los aislados de *Streptococcus agalactiae*, la resistencia observada a penicilina, cefalotina, estreptomicina, tetraciclina, gentamicina, cefalexina y enrofloxacin estuvo entre el 10,7% y el 82,1%. Para la amikacina, la sensibilidad fue del 100% (10).

## **1.2. Bases Teóricas**

### **1.2.1. Mastitis**

La mastitis es una inflamación del tejido mamario y una de las patologías más reconocidas y graves en los hatos lecheros a nivel mundial. Esto se debe a su gran impacto económico, que ocasiona enormes pérdidas, no solo reflejadas en la disminución de la producción, sino también en las tasas de descarte (2, 3). Afecta la producción de leche y provoca cambios patológicos como hinchazón, dolor, edema, inflamación y fibrosis de la ubre (21).

El orificio del pezón está formado por un esfínter de músculo liso, cuya función es mantener cerrado el canal del pezón y evitar que fluya la leche. Además, esta función previene la invasión de patógenos en el canal. La queratina presente en el pezón es fundamental, ya que forma un tapón que actúa como barrera protectora contra la entrada de bacterias. La queratina es producida por el revestimiento del pezón y se regenera tanto después del ordeño como durante el período seco, reforzando el canal del

pezón y haciéndolo más resistente y flexible. Las lesiones físicas en el pezón lo hacen más vulnerable a la invasión bacteriana, así como a la colonización e infección, debido al daño en la queratina o en las membranas mucosas que recubren el seno del pezón. El grado de respuesta inflamatoria depende del patógeno invasor y de factores del huésped, tales como la etapa de la lactancia, la edad, el estado inmunológico de la vaca, la genética y el estado nutricional (22).

La mastitis bovina provoca cambios en las propiedades físicas, químicas y bacteriológicas de la leche. La disminución de los niveles de lactosa, grasa, proteína y nitrógeno ureico en la leche afectada por mastitis se observa en diversas infecciones, principalmente debido a la presencia de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulasa negativos* (CNS) y otros patógenos bacterianos (23). Las reacciones inmunológicas desencadenadas por invasiones de patógenos dan lugar a infección e inflamación intramamaria (IM) (24).

Además, la resistencia bacteriana se ha convertido en una amenaza creciente, ya que los mecanismos de resistencia se están extendiendo globalmente. Hasta la fecha, los tratamientos antibióticos tradicionales favorecen fácilmente la aparición de cepas resistentes (26). Se ha informado ampliamente sobre la resistencia a antimicrobianos, entre los cuales se mencionan la penicilina, amoxicilina, tetraciclina, amikacina, gentamicina y eritromicina. Sin embargo, según estudios recientes, se ha reportado un aumento en la resistencia a nuevos antimicrobianos; los perfiles bacterianos indicaron resistencia a piperacilina, ceftazidima,

cefquinoma, tigeciclina, colistina y vancomicina. Además, el problema de los residuos de medicamentos también está en aumento (25).

## **1.2.2. Tipos de mastitis**

### ***1.2.2.1. Mastitis clínica***

La mastitis clínica puede clasificarse en hiperaguda, aguda y subaguda, según la gravedad de los síntomas. El contagio está determinado por varios factores que contribuyen al nivel de infección, entre los cuales se incluyen el agente causante de la enfermedad, la edad del animal, su estado inmunológico y la etapa de lactancia. (26). En la mastitis se manifiestan tanto etapas locales como sistémicas. Estas incluyen enrojecimiento e inflamación de las áreas afectadas (generalmente, los cuartos infectados están hinchados, calientes y son dolorosos), pérdida de apetito, aumento de la temperatura corporal, hipertermia, anorexia, depresión, reducción en la producción de leche y cambios en la composición de la leche, que se caracteriza por la presencia de escamas, coágulos o secreciones acuosas (27).

### ***1.2.2.2. Mastitis subclínica***

La mastitis subclínica no presenta alteraciones visibles en la glándula mamaria ni en la leche, lo que la hace más difícil de diagnosticar debido a la ausencia de signos evidentes en la leche o en los animales. El recuento de células somáticas es uno de los principales indicadores de mastitis subclínica. Otros indicadores incluyen un aumento en la población bacteriana de la leche, una disminución en la producción de leche y cambios en la composición y calidad de la leche (28). La fase

subclínica tiene una duración mayor que la fase clínica, y la infección facilita la propagación de patógenos dentro del rebaño (29).

La detección de la mastitis subclínica es crucial para implementar estrategias de control y manejo de la enfermedad (30). El diagnóstico de laboratorio es necesario para el aislamiento e identificación del patógeno involucrado (31).

### **1.2.3. Etiología de la mastitis**

La etiología de enfermedades complejas como la mastitis no se conoce por completo y continuamente se detectan y notifican nuevos patógenos (21). Puede ser causada por microorganismos patógenos e irritantes químicos que pueden desencadenar una respuesta inmunitaria o cualquier tipo de lesión fisiológica. Sin embargo, los microorganismos patógenos son la principal causa de mastitis (32).

#### ***1.2.3.1. Causas no infecciosas***

Las lesiones mecánicas asociadas al ordeño mecánico pueden inducir daños severos en los cuartos, lo que los hace más vulnerables a infecciones debido al daño en la queratina o en las membranas mucosas que recubren el seno del pezón (33). Las malas prácticas higiénicas están altamente relacionadas, como la ubre sucia al inicio del ordeño. Además, las vacas de raza Holstein son más susceptibles a la mastitis que otras razas (34). Pérez Morales *et al.* (35), reportaron que las vacas con siete o más partos mostraron una mayor prevalencia de mastitis y que los días de lactancia también pueden aumentar la prevalencia de la enfermedad.

### ***1.2.3.2.Causas infecciosas***

Las causas infecciosas son las más comunes y, en varios casos, las infecciones asociadas a bacterias son la presentación más prevalente dentro de los rebaños. Los patógenos bacterianos también se clasifican en diferentes categorías: bacterias contagiosas, ambientales y oportunistas (36). Se han identificado más de 150 especies bacterianas como patógenos de la mastitis (37). Tanto las bacterias grampositivas como las gramnegativas pueden causar mastitis. Las bacterias grampositivas incluyen varias especies de *Staphylococcus* y *Streptococcus* y las bacterias gramnegativas más comunes son *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* (38).

Los patógenos contagiosos viven en la ubre y se transmiten de pezones infectados a no infectados durante el proceso de ordeño. Entre ellos se incluyen principalmente *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* y *Mycoplasma bovis* (39). Los patógenos oportunistas tienen propiedades adhesivas muy fuertes que les ayudan a invadir el revestimiento interno de la glándula. Pueden causar episodios periódicos de mastitis clínica (40). Los patógenos ambientales suelen encontrarse en el alojamiento y la cama, y tienden a ingresar al canal del pezón durante el proceso de ordeño. Algunos ejemplos son: *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, y *Enterococcus spp.*

Los estafilococos coagulasa negativos (SCN), como *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus saprophyticus* y *Staphylococcus chromogenes* (41) son patógenos oportunistas que

colonizan el revestimiento de la piel del pezón o de la ubre. Se ha señalado que la mastitis estafilocócica es la causa más frecuente de pérdidas económicas debido a la baja producción de leche en el sur de Asia, y es también la principal causa de mastitis en Europa (21). Los patógenos más frecuentes de la mastitis bovina en todo el mundo son *Streptococcus aureus* y especies de *Staphylococcus coagulasa*-negativos (42). Esta etiología es compleja debido a la gran cantidad de posibles patógenos, lo que dificulta su control.

– *Mastitis por hongos y levaduras*

En los últimos años se han reportado mayores tasas de morbilidad causadas por mastitis micóticas en bovinos. Un estudio reciente detectó levaduras zoonóticas, entre ellas *Candida albicans* y *Kodamaea ohmeri* (43). Se reportaron otras especies de *Candida*: *C. guilliermondii*, *C. famata*, *C. tropicalis*, *C. colliculosa*, *C. krusei*, *C. rugosa*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. inconspicua*; así como *Trichosporon sp.*, *Rhodotorula glutinis*, *Saccharomyces fragilis*, *Pichia kudriavzevii* y *Cyberlindnera rhodanensis*. También se encontraron especies de moho *Aspergillus amstelodami*, *A. fumigatus* y *Geotrichum candidum* (44, 45).

– *Mastitis virales*

Es probable que la inmunosupresión inducida por virus sea la base de la mastitis. Se ha informado que el Herpesvirus bovino 1, el virus de la fiebre aftosa y el virus de la parainfluenza causaron mastitis clínica, y el Herpesvirus bovino 4 causa mastitis subclínica. Por otro lado, las lesiones en los pezones asociadas con el Herpesvirus bovino

2, la viruela bovina, el pseudovirus de la viruela bovina, la fiebre aftosa, el virus de la estomatitis vesicular, el papiloma y el virus de la leucemia bovina contribuyen indirectamente a la mastitis (46, 47).

– *Mastitis bacterianas*

Las bacterias son los agentes etiológicos más comunes y prevalentes asociados con la mastitis. La ubre actúa como reservorio de patógenos contagiosos que se transmiten de pezones infectados a pezones no infectados durante el proceso de ordeño. Entre estos, se encuentran principalmente *Mycoplasma bovis*, *Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus aureus* (48). Sin embargo, otros estudios han reportado una mayor incidencia de *Streptococcus agalactiae* aislado de vacas mastíticas. Debido a esto, muchos países consideran que este patógeno predomina sobre otros patógenos contagiosos (49, 50).

A pesar de esto, un número diverso de informes aún consideran a *Staphylococcus aureus* como el agente contagioso más prevalente asociado con la mastitis, ya que esta bacteria es persistente dentro de la ubre (51). Otro patógeno contagioso menos común es *Mycobacterium bovis*, aunque muy pocos estudios evidencian su prevalencia. Sin embargo, los brotes debidos a *Mycoplasma bovis* se están volviendo comunes y se consideran la especie de micoplasma más prevalente que causa mastitis bovina en todo el mundo (52). Por otro lado, los patógenos ambientales se transmiten a través de las heces, el ambiente interior y los pastos, siendo los más comunes las

bacterias: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Streptococcus uberis* (39).

*Escherichia coli*, es el coliforme Gram-negativo más común responsable de causar mastitis clínica ambiental, debido principalmente a la alta variabilidad genotípica (53). *Klebsiella pneumoniae*, es la segunda causa más común de mastitis bovina y, se considera la más perjudicial en la disminución de la producción y calidad de la leche, así como en términos económicos. Aunque se clasifica como un patógeno ambiental, también se ha encontrado que se transmite de vacas infectadas a sanas (54). *Streptococcus uberis*, causa alrededor de un tercio de todos los casos de infección intramamaria en vacas en todo el mundo, invadiendo el canal del pezón después del ordeño o después de un daño (55). Un estudio reportó agentes causales de mastitis, se identificaron dos cepas como *Mycobacterium fortuitum II* y *Mycobacterium mageritense*, que son resistentes a la claritromicina (56).

Kotzamanidis *et al.* (57), afirmaron que es necesario comprender la estructura de la población, la transmisión, las características de virulencia y la patogenicidad de los patógenos asociados con la mastitis para desarrollar estrategias para reducir la propagación del patógeno entre los rebaños en una región geográfica específica.

### ***1.2.3.3. Bacterias asociadas a la mastitis***

– *Staphylococcus aureus*

Patógeno grampositivo más frecuente conocido por estar asociado con varias formas de mastitis clínica y subclínica (58). El reservorio principal de *Streptococcus aureus* es la glándula mamaria infectada de forma crónica. Por lo tanto, es fundamental mantener una buena higiene de la ubre, ya que el ordeño adecuado puede proteger a las vacas sanas de las infectadas, reduciendo así el riesgo de infección (59). Esta bacteria no provoca una respuesta inmune en la vaca tan intensa como la de *Escherichia coli*; por lo tanto, la infección suele ser más leve, lo que puede dar lugar a una mastitis crónica que dura varios meses (60). No causa anomalías ni fatalidades, sin embargo, produce enzimas degradativas y toxinas que dañan irreversiblemente el tejido de la ubre, lo que, en última instancia, disminuye la producción de leche.

– *Streptococcus agalactiae*

Patógeno grampositivo que causa mastitis contagiosa. Se puede encontrar en el tracto gastrointestinal bovino, así como en el entorno de las vacas lecheras. Puede transmitirse a través de la máquina de ordeño y por vía oro-fecal, especialmente mediante el consumo de agua potable contaminada. Un estudio reciente demostró que, para controlar la infección por *Streptococcus agalactiae*, no basta con mantener la ubre y el ordeño sanitarios; también es necesario gestionar adecuadamente las heces y el ambiente (61). *Streptococcus agalactiae* causa mastitis subclínica con alto RCS (recuento de

células somáticas) y baja producción de leche, aunque no se mostraron anomalías en la leche (62). Puede sobrevivir indefinidamente en las glándulas mamarias de las vacas, formando una biopelícula que les permite adherirse y persistir en la glándula mamaria, mejorando concomitantemente la resistencia al factor huésped y la privación de nutrientes (63).

– *Streptococcus uberis*

Patógeno ambiental que causa mastitis recurrente, asociada con infecciones clínicas y subclínicas (64). Se informó que los componentes  $\alpha$ -caseína y  $\beta$ -caseína en la leche, inducen la producción de biopelícula, que ayuda a *Streptococcus uberis* a persistir bajo estrés ambiental y resistir el tratamiento con antibióticos (65). Se ha detectado en diferentes partes de los animales, incluidos los labios, las amígdalas, la piel, la cavidad oral, el rumen, el tracto respiratorio, el recto, el orificio del pezón, los canales del pezón, las ubres infectadas, las heces y las heridas (66).

– *Escherichia coli*

Patógeno gramnegativo más frecuente. Invade la ubre a través del pezón, prolifera e inicia una respuesta inflamatoria en la vaca lechera. Se puede encontrar en el entorno que rodea a la vaca lechera, como la cama del rebaño, especialmente en condiciones húmedas (67). La mastitis causada por *Escherichia coli* suele ser clínica y transitoria. Los síntomas son variados, desde leves con solo signos locales (ubre roja e hinchada) hasta graves con signos sistémicos (fiebre). La mastitis clínica grave causada por *Escherichia coli* puede

causar daño tisular irreversible en la glándula mamaria, pérdida completa de la producción de leche, a veces incluso provocando la muerte de la vaca lechera (68).

– *Streptococcus dysgalactiae*

La patogenicidad de *Streptococcus dysgalactiae* se atribuye a varios factores de virulencia (FV) que participan en diferentes categorías, tales como: adherencia, enzimas (incluyendo hialuronidasa, factor mitogénico, enolasa estreptocócica y estreptodornasa), evasión inmune, antígenos inmunorreactivos, captación de hierro y manganeso, proteasas, superantígenos y procesos de formación de toxinas, según la base de datos de factores de virulencia de *Streptococcus*. Estos genes de virulencia facilitan la adherencia a las células epiteliales, su internalización y, posteriormente, la diseminación a las células del huésped (69).

#### **1.2.4. Inmunidad de la glándula mamaria**

El sistema inmune se caracteriza por su capacidad de reconocer y diferenciar agentes extraños invasores y moléculas producidas por el organismo (70). La glándula mamaria realiza una variedad de funciones inmunológicas que confieren protección; incluso antes del parto, se producen anticuerpos secretados en el calostro para proteger al recién nacido contra agentes infecciosos (71). El tejido de la glándula mamaria (GM), está protegido por dos formas de mecanismos de defensa inmune: inmunidad innata e inmunidad adquirida.

Los sistemas inmunes innato y adquirido interactúan estrechamente en un intento de proporcionar protección contra los microorganismos de la

mastitis (71). En primer lugar, la respuesta inmune innata estimula la respuesta inmune adquirida e influye en su naturaleza. En segundo lugar, la respuesta inmune adquirida utiliza muchos mecanismos efectores inmunes innatos para eliminar agentes extraños, y su acción aumenta con frecuencia la actividad antimicrobiana de la respuesta inmune innata. La eficiencia de estas respuestas determina la susceptibilidad o resistencia de la GM a la infección. La inmunidad innata predomina en la etapa temprana de la infección, está mediada por: macrófagos, neutrófilos, células asesinas naturales (NK) y citocinas. Reconoce y responde a diferentes patógenos, incluso si están invadiendo la membrana plasmática de las células por primera vez.

En particular, las bacterias tienen diferentes estructuras de pared celular que son reconocidas por receptores específicos de la membrana plasmática de las mismas. Estas estructuras son lipopolisacárido (LPS), peptidoglicano (PGN) y ácido lipoteicoico (LTA), que constituyen los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) (72).

#### **1.2.5. Fisiopatología de la mastitis**

Los sistemas inmunológicos innato y adquirido de las glándulas mamarias, trabajan juntos y brindan máxima protección contra los microorganismos patógenos que causan mastitis (73).

Casi todos los patógenos mamarios ingresan a la ubre a través de la abertura del pezón (orificio), excepto en casos raros en los que la ubre se infecta secundariamente a través de una infección sistémica (*Mycoplasma bovis*). El orificio del pezón está cerrado por una capa del músculo del esfínter del pezón, también conocido como roseta de Furstenberg,

ubicado directamente sobre el canal de la estría. Está formado por pliegues sueltos de una membrana que se alisan a medida que la leche se acumula en la ubre (71). Ayuda a prevenir la fuga de leche entre ordeños y sirve como barrera física para la entrada de patógenos de mastitis a través del orificio del pezón. Dentro del canal de la estría, la queratina es producida por el epitelio del conducto del pezón para servir como barrera física contra la entrada de patógenos de mastitis. La queratina también tiene un efecto antibacteriano como consecuencia de diferentes ácidos grasos bacteriostáticos como los ácidos mirístico, láurico, palmitoleico y linoleico. Las proteínas fibrosas también componen la queratina específicamente implicada para unirse y destruir la pared celular de los patógenos. El daño a la queratina por infusión intramamaria incorrecta o por sistemas de máquinas de ordeño defectuosos aumenta el potencial de colonización del canal del pezón por bacterias (74). Al ingresar a través de la abertura del pezón, *Staphylococcus aureus*, se adhiere a las células del huésped e invade los tejidos circundantes para evitar ser expulsado por la leche.

Las bacterias que penetran en las glándulas mamarias colonizan el tejido y posteriormente comienzan a multiplicarse. Los metabolitos que forman en el lugar de multiplicación provocan una reacción inflamatoria y los tejidos afectados comienzan a liberar mediadores de la inflamación. Estos mediadores atraen a los leucocitos, que comienzan a migrar al lugar de la inflamación (75). Dependiendo del agente causal, la extensión del tejido infectado y la inmunocompetencia del huésped, la glándula mamaria se infiltra rápidamente por leucocitos (76). Esta respuesta varía

entre bacterias Gram-negativas y Gram-positivas (77). Los mecanismos de defensa de la vaca contra la infección de la glándula mamaria incluyen componentes de la leche con actividad bactericida, como la lisozima, la lactoferrina y la peroxidasa. El sistema de defensa humoral (anticuerpos específicos) y celular (células somáticas), van a desempeñar un papel importante en la lucha contra los microorganismos patógenos en la glándula mamaria (78).

Las infecciones causadas por *Escherichia coli*, una bacteria Gram-negativa, generan una respuesta inmune muy rápida y agresiva por parte de las células mamarias del huésped, mientras que *Staphylococcus uberis*, una bacteria Gram-positiva, es responsable de una respuesta inmune lenta o moderada (79).

La mastitis relacionada con *Staphylococcus aureus* produce una respuesta inmune innata muy lenta o, a veces, no observable (80). Después de adherirse a la célula huésped deseada, el *Staphylococcus aureus* y los *Staphylococcus non aureus*, o CNS, secretan varias exotoxinas y enzimas que ayudarán a invadir, penetrar y destruir células y tejidos. La exotoxina hemolisina y las exoenzimas son responsables de descomponer el tejido epitelial en los conductos y alvéolos de las glándulas mamarias, lo que contribuye a las pérdidas de producción de leche durante la mastitis en el ganado lechero (81).

De acuerdo con lo anterior, las células fagocíticas del sistema inmune innato se encargarán de engullir y destruir tanto a *Staphylococcus aureus* como a los *Staphylococcus non aureus*. Sin embargo, *Staphylococcus aureus* y el sistema nervioso central (CNS) cuentan con diversas

estrategias de evasión. Entre las proteínas de evasión utilizadas por muchas cepas de *Staphylococcus* se encuentran las proteínas de unión al fibrinógeno extracelular (Efb) y la subunidad de leucotoxina (LukM). La proteína Efb puede enmascarar la superficie de *Staphylococcus aureus* con un escudo similar a una cápsula, con el fin de evitar la unión de anticuerpos a *Staphylococcus aureus* y su posterior eliminación por los neutrófilos fagocíticos. Por otro lado, la subunidad de unión de LukM es capaz de eliminar los leucocitos al interactuar con su receptor diana en la superficie de los neutrófilos (82). Esto permite que la bacteria persista hasta que las condiciones sean más favorables para su proliferación. Las bacterias Gram-positivas no inducen una respuesta de señalización TLR, y es por eso que producen una respuesta lenta o moderada del sistema inmune del huésped (68).

#### **1.2.6. Diagnóstico de la mastitis**

El diagnóstico de mastitis clínica se basa con frecuencia en la inspección de la glándula mamaria, la presencia de cambios en las características físicas de la leche, el aumento en el número de células somáticas y la identificación de bacterias mediante pruebas indirectas (83).

En contraste, el diagnóstico de mastitis subclínica es más complicado y se basa en métodos directos, así como en diversos métodos indirectos para estimar el aumento en el recuento de células somáticas (SCC) (84).

##### ***1.2.6.1. Diagnóstico básico***

###### ***– Examen bacteriológico***

El cultivo bacteriológico (BC) es el método de referencia para detectar microorganismos que causan mastitis. Este método identifica

los patógenos en función de la forma de las colonias, el medio de cultivo, las técnicas de tinción y diversos ensayos, como la hemólisis, el óxido de potasio (KOH), la prueba de catalasa, la hidrólisis de esculina, la utilización de citrato y la prueba de Christie, Atkins, Munch y Peterson (CAMP) (84).

La técnica de cultivo de mastitis reportó una Sp (especificidad) del 99,8% para *Staphylococcus aureus*, con un porcentaje muy bajo de falsos positivos (0,2%) y una Se (sensibilidad) del 88,4%, lo que la hace adecuada como prueba estándar de oro (85). Sin embargo, los resultados serán deficientes si se utilizan los medios incorrectos para los microorganismos; la leche parece normal sin alteraciones durante la etapa de desprendimiento, pero puede ocurrir una infección intramamaria. Además, los cultivos bacterianos requieren mucho tiempo y no detectan el nivel de inflamación relacionada con la infección (86).

– *Recuento de células somáticas en leche*

El recuento de células somáticas (RCS) proporciona una visión en profundidad de la calidad de la leche. La medición de las células somáticas de la leche mediante microscopía directa o utilizando un contador electrónico automático de células sigue siendo el método más frecuente y fácil para el diagnóstico de mastitis sub clínica (SCM). La microscopía directa convencional requiere mucha mano de obra, es lenta y necesita un microscopio de alta calidad y personal capacitado para mejorar la eficiencia. Un contador electrónico automático de células mide los recuentos de células basándose en el

principio de citometría de flujo. Demuestra ser un método rápido, sensible y preciso para medir el RCS (87). La correlación más precisa entre la infección de la glándula mamaria (IMI) y RCS se encuentra al analizarlo a nivel de cuarto. Además, datos reportados sugieren que los cuartos sanos tienen un RCS medio de aproximadamente 70,000 células/ml, y un RCS de  $> 200,000$  células/ml indica cuartos infectados (88).

La Se, la Sp y la precisión del RCS fueron del 86,60 %, 97,76 % y 91,94 %, respectivamente, con un VPP y un VPN del 98,33 % y del 84,52 %, respectivamente (89). Estas células están presentes en la leche normal en pequeñas cantidades, pero sus niveles podrían ser más altos en la leche del ganado enfermo, posiblemente alcanzando más del 90 % (90). Existen diferentes opiniones sobre el umbral del RCS. Aunque el RCS se ha utilizado durante décadas en el diagnóstico de mastitis, tiene algunas limitaciones. Por ejemplo, puede verse afectado por la edad, la estación, el estrés, el manejo, el parto y el período de lactancia (91). Por lo tanto, estas limitaciones deben considerarse al interpretar el resultado.

- Prueba de mastitis de California (CMT)

La prueba CMT es rápida, económica y sencilla, y se considera una de las técnicas más comunes para la medición cualitativa de células somáticas en muestras de leche (91). Esta prueba es la principal utilizada en el sitio de la vaca para detectar cuartos infectados, lo que permite realizar un examen bacteriológico posterior (92). Sharma *et al.* (89), informaron que la CMT tiene

valores de Se, Sp, precisión, PPV y NPV de 86,07%, 59,70%, 75,52%, 76,21% y 74,07%, respectivamente. Sin embargo, esta prueba tiene algunas limitaciones como por ejemplo que no se puede utilizar para el monitoreo a gran escala. Sólo se utiliza en la granja para un primer enfoque a nivel de vaca (93).

– *Evaluación histopatológica*

La histopatología es una herramienta importante y comúnmente utilizada para evaluar el daño en el tejido mamario causado por infecciones bacterianas de la glándula (94). Las muestras de tejido glandular mamario se pueden obtener mediante el uso de agujas y pistolas de biopsia, como en un sistema automático de punción con aguja, o mediante un sistema de vacío seguido de un lavado con solución salina del sitio biopsiado (95).

Los resultados histopatológicos representativos en la mastitis bovina afectada por *Staphylococcus aureus* son los siguientes: infiltración extensa de neutrófilos (PMN) en la glándula; espacio luminal reducido de los alvéolos; necrosis y atrofia del tejido mamario; y reemplazo de tejido mamario secretor lesionado con tejido no secretor. En una evaluación histológica, la tinción y el examen tienen una importancia clínica muy alta en el diagnóstico y tratamiento médico en casi todos los campos de la medicina. Un examen histológico es el estándar de oro para diagnosticar muchas enfermedades patológicas, incluida la mastitis. El análisis histoquímico de una muestra de tejido permite un diagnóstico y una determinación de la gravedad y el pronóstico de la enfermedad. Por

otro lado, las evaluaciones histológicas requieren un proceso complejo, que incluye la toma de muestras de tejido, su fijación, procesamiento, inclusión, corte y tinción. Finalmente, se somete a un análisis mediante microscopía y los hallazgos son interpretados por un patólogo (96).

#### ***1.2.6.2. Diagnóstico basado en ácidos nucleicos***

##### ***– Reacción en cadena de polimerasa (PCR)***

Se utilizan diferentes tipos de PCR para identificar las estructuras del genoma de los patógenos causantes de mastitis: amplificación de su fragmento de ADN para su detección (PCR convencional), detección y cuantificación de un patógeno (reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa [RT-PCR]) y detección y cuantificación de los diversos patógenos en la misma muestra (PCR multiplex) (97). Las dos primeras técnicas para la detección de mastitis son la PCR convencional (98) y la PCR multiplex (99). Ambos métodos tienen cebadores diseñados para el ácido ribonucleico ribosómico (ARNr) 23S y 16S.

Estas pruebas tienen varios méritos, como alta Se y Sp, velocidad y evitar los inconvenientes relacionados con las pruebas basadas en cultivos. Además, pueden detectar las bacterias en muestras de leche incluso en presencia de residuos de medicamentos y conservantes (100). Los productos de PCR se pueden almacenar en un refrigerador o congelador durante un período prolongado. Por el contrario, el almacenamiento prolongado de placas de Petri de cultivo conduce a la sequedad de la placa o aumenta el crecimiento de hongos. En

comparación con la PCR convencional, la RT-PCR es segura porque no es necesaria la tinción con bromuro de etidio; los resultados de la PCR no requieren manipulación y son rentables si se utilizan muchas muestras. La RT-PCR puede diferenciar entre brotes clonales y múltiples cepas y su Se y Sp alcanzan el 100% (100).

Por otro lado, la PCR tiene algunas limitaciones. Por ejemplo, suele ser más cara que los inmunoensayos y se ha utilizado con acceso limitado en países en desarrollo (101). Los resultados falsos positivos se pueden encontrar cuando hay residuos de leche en la máquina de ordeño, contaminación y colonización del canal del pezón. También pueden surgir, cuando se utilizan cebadores que no son lo suficientemente específicos o cuando se cambian las condiciones del ciclo de PCR. Además, las muestras de leche coagulada o la presencia de inhibidores de PCR en las muestras de leche pueden dar lugar a una extracción y purificación de ADN incorrecta, lo que puede conducir a un resultado falso negativo. Este problema se puede solucionar mediante la purificación en columna (102).

– *ELISA*

Estudios han evaluado esta técnica para desarrollar una herramienta avanzada para el diagnóstico más temprano, como un ELISA de bloqueo en fase líquida basado en biomarcadores para la mastitis subclínica, un ELISA indirecto para detectar anticuerpos contra las proteínas rAP1-BP-AP2 de *Streptococcus agalactiae* y la proteína de fusión rSip-PGK-FbsA (103). Los marcadores que indican la respuesta inflamatoria durante la infección de la ubre han sido

evaluados mediante ELISA en la última década. La detección de citocinas, como los factores de necrosis tumoral e interleucinas (104). Así como de proteínas de fase aguda, como la haptoglobina, mediante ELISA, se ha considerado un marcador importante para la identificación de mastitis en bovinos (105).

#### ***1.2.6.3. Biochips para detección de mastitis***

Se han implementado nuevas tendencias en el diagnóstico de mastitis utilizando microfluídica o biochips. Los microchips desechables, junto con un lector portátil, pueden utilizarse para medir el recuento de células somáticas (RCS) en muestras de leche. Para ello, se mezcla la muestra con una solución que destruye las células somáticas y la expone a un tinte fluorescente que tiñe el ADN. Luego, la muestra se coloca en el microchip y se mide la fluorescencia mediante el sistema de lectura portátil (106).

#### ***1.2.6.4. Nanotecnología***

La nanotecnología ofrece una nueva oportunidad para el progreso de enfoques sensibles, rápidos, específicos y rentables para diagnosticar infecciones bacterianas, incluida la mastitis. La nanotecnología puede captar y discriminar moléculas objetivo o microbios de otros constituyentes en una matriz de muestra compleja (107). Estas moléculas están unidas a sondas de afinidad, como anticuerpos y ácidos nucleicos, que pueden distinguir entre biomarcadores microbianos. Las nanoformas magnéticas, de oro y fluorescentes son ejemplos de nanomateriales utilizados para el análisis. Las nanopartículas pueden diseñarse para que

sean fluorescentes mediante motivación de luz o excitación de dos fotones (108).

### **1.2.7. Tratamiento**

La principal estrategia para el tratamiento de la mastitis se basa en la administración de antibióticos, los cuales pueden ser aplicados por vía intramamaria, intramuscular o intravenosa (109). El tratamiento óptimo debe ser lo suficientemente prolongado para garantizar la curación de la mastitis subclínica, pero a la vez lo bastante breve para evitar el desarrollo de resistencias antimicrobianas. El período de seca de la vaca representa el momento más adecuado para llevar a cabo este tratamiento, ya que, al no existir secreción de leche, se previene la eliminación de residuos de antibióticos a través de esta vía, reduciendo el riesgo de que estos sean consumidos por los seres humanos (110).

Cuando se identifica una vaca positiva a mastitis, se debe realizar el ordeño completo para eliminar bacterias, coágulos, residuos y toxinas, seguido de la infusión intramamaria de antibióticos para tratar la ubre y la circulación sanguínea (109). Sin embargo, pueden ocurrir casos graves en los que la inflamación impide el ordeño completo al bloquear los conductos lácteos. En estos casos es recomendable la administración de antibióticos por vía parenteral junto con la intramamaria (111). Los antibióticos de acción prolongada no son adecuados durante la lactancia, ya que el objetivo es que la vaca vuelva a ser ordeñada lo más pronto posible, por lo que resulta crucial identificar el patógeno para seleccionar el tratamiento adecuado (112).

Aunque la causa bacteriana de la mastitis puede variar, muchos casos mejoran tras la rápida administración de un antimicrobiano efectivo. Los productores y veterinarios tienen a su disposición múltiples opciones de antibióticos; sin embargo, para tomar decisiones informadas, es necesario contar con datos sobre la eficacia relativa de estos productos (113). Tras el tratamiento, la proporción de glándulas mamarias que experimentan curación varía entre un 37% y un 84% (114), dependiendo de factores como las especies bacterianas presentes, la etapa de lactancia, el antibiótico utilizado, la vía de administración, la resistencia a los antibióticos, la duración del tratamiento, la gravedad de la patología y la respuesta inmune (115).

Para el tratamiento de la mastitis se han probado diferentes antibióticos como el ceftiofur, amoxicilina, cefuroxima, cloxacilina (116) pirlimicina (117), oxitetraciclina, doxiciclina, gentamicina, doxiciclina, gentamicina, enrofloxacin, entre otros (118).

#### **1.2.8. Resistencia a antibióticos**

La resistencia a los antibióticos representa un desafío en el control de la mastitis. Ya que los perfiles de resistencia son a menudo específicos del rebaño, la elección del protocolo de tratamiento debe basarse en el conocimiento de la sensibilidad antimicrobiana de las cepas implicadas. La combinación de más de un antibiótico sinérgico puede ser un método más efectivo que el uso de un solo antibiótico y puede lograr una alta tasa de curación (119). Sin embargo, el uso generalizado de antibióticos en el control de las mastitis aumenta en gran medida el riesgo de instalar y transmitir resistencia a los antibióticos a los consumidores (120).

Los mecanismos por los cuales las bacterias llegan a desarrollar resistencia a los antibacterianos como los macrólidos y lincosamidas, incluyen mutaciones ribosomales en los sitios de unión de los antibióticos, la metilación ribosomal mediada por genes *erm* y la expulsión activa de antibióticos mediante bombas de eflujo, principalmente mediada por genes *mef* y *msr*, los cuales suelen estar en elementos genéticos transferibles, facilitando la diseminación de la resistencia (121).

En el caso de las tetraciclinas la resistencia está mediada por cerca de 50 genes identificados en 126 genes bacterianos, agrupados en dos mecanismos principales: el eflujo activo, en el que genes como el tet(k) y tet(L) codifican bombas de eflujo que expulsan la tetraciclina fuera de la célula, sin conferir resistencia a la minociclina; y la protección ribosoma, en la que genes como el tet(M), tet(O), tet(S), tet(Q), tet(T) y tet(W) producen proteínas que protegen al ribosoma de la acción de la tetraciclina, otorgando resistencia a toda la familia de estos antibióticos (122). EL gen tet(M) es el más ampliamente distribuido, pudiendo encontrarse en elementos genéticos móviles, que pueden portar además genes de resistencia a eritromicina y kanamicina, favoreciendo de esta manera la diseminación de cepas multirresistentes (123).

En el caso de los betalactámicos, la resistencia se produce, para el caso de bacterias como estreptococos, mediante modificaciones en las proteínas de transporte de las penicilinas (PBP), aunque existen otros mecanismos independientes de las PBP como el Operón MurMN, Operón ciaRH, Gen *adr*, Gen *stkP*, Gen *spr1178*, que producen efectos

como la biosíntesis de componentes muropeptídicos ramificados, la codificación de un peptidoglicano O-acetiltransferasa, serina/treonina quinasa o una posible permeasa de hierro (124).

Los mecanismos descritos para las fluoroquinolonas incluyen mutaciones puntuales en las regiones determinantes de resistencia a quinolonas de los genes *gyrA* y *parC* (125), bombas de eflujo y genes *qnr* plasmídicos que diseminan la resistencia de bajo nivel (124).

Otros mecanismos como el desarrollo de biopelículas por bacterias como los estafilococos en el parénquima de la ubre han sido responsables de que se agrave aún más el problema de resistencia a los antibióticos (126).

#### **1.2.9. Vacunación**

La vacunación de las vacas puede considerarse una estrategia preventiva para la mastitis en los rebaños. La mayoría de las vacunas están diseñadas para combatir *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*. Las vacunas dirigidas a *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* están compuestas por el organismo completo (células inactivadas, altamente encapsuladas o no encapsuladas, y vacunas atenuadas) o por subunidades (toxinas, extractos de superficie bacteriana y extractos crudos de polisacáridos). En el caso de *Escherichia coli*, se ha utilizado ampliamente el antígeno central mutante J5. Sin embargo, las vacunas aún no proporcionan una protección completamente confiable. Por ejemplo, una vacuna comercialmente disponible llamada Startvac (Hipra S.A., Girona, España), dirigida a *Staphylococcus aureus*, ha sido estudiada en varios informes, como el de

Schukken *et al.* (128), demostraron que Starvac solo puede reducir moderadamente la nueva infección y la duración de la mastitis.

Como se mencionó anteriormente, la mastitis es causada por diversos patógenos bacterianos, por lo que la falta de eficacia de las vacunas también podría atribuirse a la naturaleza multietiológica de la mastitis bovina. No solo varía el sitio de infección en la glándula mamaria entre diferentes cepas bacterianas, sino que también pueden diferir sus características de virulencia y capacidades inmunogénicas (130).

Por lo tanto, independientemente del tipo de vacuna, la vacunación por sí sola no es efectiva para prevenir la mastitis, especialmente en rebaños lecheros que tienen altas tasas de mastitis. La vacunación debe combinarse con otros procedimientos de control, como el ordeño higiénico, el tratamiento con antibióticos, el sacrificio de vacas infectadas, etc., para reducir la incidencia y la duración de los casos de mastitis (128).

### 1.3. Definición de términos básicos

- **Mastitis:** Es una inflamación de la glándula mamaria, generalmente causada por infecciones bacterianas. Puede ser clasificada como clínica o subclínica, dependiendo de la manifestación de los síntomas.
- **CMT (California Mastitis Test):** Es una prueba rápida y sencilla utilizada para detectar mastitis en vacas, que mide la cantidad de células somáticas presentes en la leche. Es útil para el diagnóstico de mastitis subclínica.
- **Cultivo bacteriano:** Técnica de laboratorio que permite el crecimiento de bacterias en un medio específico para su identificación y análisis. Se usa para

detectar los agentes causantes de la mastitis y evaluar su resistencia antimicrobiana.

- **Resistencia antimicrobiana:** Es la capacidad de una bacteria de resistir los efectos de los antibióticos que anteriormente eran eficaces en su eliminación. Este fenómeno puede complicar el tratamiento de infecciones como la mastitis.
- **Antibiograma:** Prueba de laboratorio utilizada para determinar la sensibilidad o resistencia de bacterias a diferentes antibióticos. Es una herramienta clave para la selección del tratamiento más eficaz contra la mastitis bovina.
- **PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa):** Técnica molecular utilizada para amplificar y detectar material genético de microorganismos patógenos en muestras biológicas.

## CAPÍTULO II

### MARCO METODOLÓGICO

#### 2.1. Ubicación Geográfica

El trabajo de campo se desarrolló en los fundos de Santa Bárbara (Otuzco), Tartar (sector agrícola y pecuario), La Victoria, Betania y Centro Experimental Agropecuario La Victoria, de la provincia de Cajamarca. El estudio de laboratorio se llevó a cabo en la Estación Experimental Agraria (INIA) ubicada en los Baños del Inca de la provincia de Cajamarca.

##### 2.1.1 Características geográficas y meteorológicas (\*)

Las características geográficas y meteorológicas de la Provincia de Cajamarca son:

- Altitud: : 2723 msnm
- Latitud: : 7° 09' 26" S
- Longitud : 78° 31' 03" W
- Temperatura máxima promedio\* : 22,2°C
- Temperatura mínima promedio\* : 5°C
- Precipitación pluvial anual\* : 609 mm
- Humedad relativa media anual \* : 60%
- Clima: Semi seco, templado moderado lluvioso y semi frío, con ausencia de lluvias en las estaciones de otoño, invierno y primavera.

---

(\*) FUENTE: SERVICIO NACIONAL DE METEOROLOGÍA E HIDROLOGÍA DEL PERÚ – (SENAMHI) – ESTACIÓN UNC CAJAMARCA – 2024

## **2.2. Diseño de la Investigación**

La investigación se dividió en las siguientes fases:

### **2.2.1. Selección de los predios**

- Se seleccionaron mediante un muestreo por conveniencia, cinco predios de la provincia de Cajamarca cuyos propietarios autorizaron la realización del estudio.
- Los fundos seleccionados debieron contar con un número mínimo de 30 vacas en producción y método de ordeño manual.

### **2.2.2. Selección de los animales**

- Se incluyeron todas las vacas en producción en cada predio para la realización de las pruebas de campo.
- Se consideraron únicamente aquellas vacas a partir de los 15 días post inicio de lactación, con el fin de evitar alteraciones fisiológicas propias del posparto, como procesos inflamatorios no infecciosos y la transición de calostro a leche.

### **2.2.3. Sujeción y preparación de las vacas**

- Las vacas se sujetaron mediante cuerdas o lazos.
- Se procedió a manearlas de las patas traseras.
- El personal encargado del ordeño se lavó y desinfectó las manos antes de proceder al contacto con la ubre.
- Se realizó el lavado de los pezones con agua limpia para eliminar suciedad, seguido de un secado con toallas de papel desechables.

### **2.2.4. Diagnóstico de mastitis subclínica mediante la prueba de CMT**

- Para la realización de la prueba se siguió el procedimiento propuesto por Schalm y Noorlander (131).

- La prueba fue realizada al inicio del ordeño, se recolectaron 3 ó 4 chorros de leche (aproximadamente 2 mL) de cada cuarto mamario en cada compartimento de la paleta de CMT.
- Se igualó el volumen de leche en los compartimentos eliminando el excedente.
- Se añadió una cantidad de reactivo CMT equivalente al volumen de leche en cada compartimento y se agitó la paleta en forma circular.
- Transcurridos 10 segundos, se procedió a la lectura de las muestras según la escala establecida por Schalm *et al.* (132) (El tiempo máximo para la lectura no fue mayor a 30 segundos):

**Cuadro 1.** Descripción de la prueba CMT

Score	Significado	Descripción de la reacción	Interpretación (Rcs/mL)
N	Negativo	La mezcla permanece en estado líquido homogéneo.	0 - 200,000
T	Trazas	Hay algo de engrosamiento. La reacción es reversible y la viscosidad observada por primera vez tiende a desaparecer.	150,000 - 500,000
1	Ligeramente positivo	La mezcla espesa, pero no hay formación de gel en el medio de la paleta y la viscosidad observada tiende a persistir. La mezcla cae poco a poco.	400,000 - 1,500,000
2	Positivo	Gel se formará en el centro de la paleta durante el movimiento giratorio. El gel se acumula en la parte inferior de la paleta cuando el movimiento giratorio se interrumpe. Cuando se vierte la mezcla la masa gelatinosa cae y puede dejar un poco de líquido en el pocillo.	800,000 - 5,000,000
3	Muy positivo	Gel se formará en el centro de la paleta y se pega en el fondo del pocillo, pero no a un lado. Cuando se vierte la mezcla, se cae sin dejar líquido detrás.	>5,000,000

Fuente: Schalm *et al.* (132).

- Los resultados de las pruebas de fondo oscuro y CMT se registraron en la ficha de campo.

#### **2.2.5. Recolección de muestras de leche para cultivo bacteriológico**

- Se recolectaron 10 mL de leche de los cuartos mamarios identificados como positivos a mastitis.
- Las muestras se depositaron en frascos estériles con tapa hermética y se etiquetaron individualmente.
- Se recolectaron 20 muestras positivas por cada predio para garantizar la representatividad del muestreo.

#### **2.2.6. Transporte de muestras al laboratorio**

- Las muestras se transportaron en cajas térmicas equipadas con gel refrigerante, manteniendo una temperatura aproximada de 4 °C.
- El traslado fue desde cada predio hasta el Laboratorio de Microbiología de la Estación Experimental Agraria (INIA) en el distrito de Baños del Inca, Cajamarca, no superó en ningún caso las dos horas para preservar la integridad de las muestras.

#### **2.2.7. Aislamiento bacteriológico**

- Las muestras de leche se homogenizaron y se sembraron en placas Petri utilizando el método de estría y agotamiento.
- Se emplearon medios de cultivo selectivos, como Agar sangre, Agar MacConkey y Agar *Staphylococcus*.
- Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 a 48 horas.
- Se realizó la observación macroscópica de las colonias y la evaluación microscópica para una identificación preliminar.

### **2.2.8. Identificación preliminar mediante tinción Gram**

- De los cultivos bacteriológicos, se aislaron un total de 150 colonias bacterianas (30 por predio), considerando que en algunas placas se observó el crecimiento de múltiples colonias con distinta morfología.
- *Tinción Gram:*
  - Se prepararon frotis de cada aislamiento y se fijaron al calor.
  - Se aplicó la secuencia estándar de tinción (cristal violeta, lugol, decoloración con alcohol y safranina) para determinar la naturaleza Gram positiva o Gram negativa de las bacterias.
  - La observación se realizó a través de un microscopio, registrándose las características morfológicas (forma, agrupación y coloración).

### **2.2.9. Antibiograma**

- Se aplicó el método de Kirby-Bauer (133), ajustando el inóculo bacteriano a la concentración estándar 0,5 de McFarland.
- Se sembró la superficie de placas mediante hisopos estériles y, en un plazo máximo de 15 minutos, se colocaron discos impregnados con los antibióticos: tetraciclina, penicilina, estreptomina, neomicina, sulfas, enrofloxacina y lincomicina.
- Las placas se incubaron a 35 °C durante un plazo no mayor de 24 horas.
- Se midió el diámetro de la zona de inhibición (desde el borde exterior de la placa, sin retirar la tapa) utilizando un calibrador Vernier, considerando los patrones estándar (Cuadro 2):

**Cuadro 2.** Patrones estándar del diámetro del halo de inhibición

Antibiótico	Disco (µg)	Diámetro del halo de inhibición (mm)		
		Resistente	Intermedia	Sensible
<i>Tetraciclina</i>	30 µg	≤14	15-18	≥19
<i>Penicilina</i>	10 U	≤11	12-21	≥22
<i>Streptomycina</i>	10 µg	≤6	7-9	≥10
<i>Neomicina</i>	30 µg	≤12	13-16	≥17
<i>Sulfa</i>	250 µg	≤10	11-15	≥19
<i>Enrofloxacina</i>	5 µg	≤14	15-18	≥19
<i>Lincomicina</i>	2 µg	≤2	4-8	≥18

Fuente: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (134).

#### 2.2.10. Extracción de ADN y caracterización molecular

Se realizó el análisis molecular las 150 colonias aisladas, para lo cual:

- Se recolectó cada colonia en un tubo con 200 µL de agua grado molecular.
- Se homogenizó el contenido hasta la completa disolución de las colonias.
- El tubo se incubó en un baño de agua en ebullición 90 °C, durante 15 minutos.
- Posteriormente, se sometió el tubo a congelación a una temperatura de -90 °C, durante 20 minutos.
- Se centrifugó a 13,500 rpm durante 5 minutos y se transfirieron 50 µL del sobrenadante a un nuevo microtubo.
- La calidad y concentración del ADN extraído se evaluó mediante un espectrofotómetro de microvolúmenes.

### **2.2.11. Amplificación del gen 16s -Procesamiento molecular (PCR)**

- Se siguió la metodología propuesta por Weisburg *et al.* (135). Se llevó a cabo la amplificación del gen 16s rRNA mediante PCR utilizando primers dirigidos a regiones conservadas del ADN ribosomal bacteriano.
- Se utilizaron dos primers, Forward primer y Reverse primer con una secuencia de (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' y 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'), respectivamente.
- Se preparó la mezcla de amplificación, utilizando los siguientes componentes: Master mix (14,5 µl), forward primer (0,85 µl), reverse primer (0,85 µl), ADN (2), y agua (11,8 µl), haciendo un total de 30 µg de mezcla.
- Las reacciones se realizaron en un termociclador con las siguientes condiciones: Desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 minutos, desnaturalización a 94°C por 1 minuto ciclos de hibridación a 52 °C durante 1 minuto y extensión a 72 °C durante 1 minuto y un ciclo final de extensión a 72 °C durante 5 minutos.
- Para visualizar los resultados de la PCR, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.

### **2.2.12. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5%**

- Se preparó la electroforesis para visualizar las amplificaciones de genes de resistencia.
- Se pesó la cantidad adecuada de agarosa (0,75) y se preparó el tampón de corrida TAE (50 ml), se licuo en microondas para obtener el volumen de gel deseado. Se dejó enfriar el contenido en el matraz de Erlenmeyer hasta alcanzar una temperatura de 65 °C.

- Se añadieron 5 µl de SYBR (solución) con una concentración de 10,000x.
- Se colocó el peine adecuado y se vertió la agarosa en el soporte correspondiente.
- Una vez solidificado, se posicionó el gel en la cubeta de electroforesis y se añadió tampón de corrida TAE 1x hasta cubrirlo aproximadamente 0,5 a 1 cm.
- Se cargaron 5 µl en cada pocillo, asegurándose de orientar los pocillos hacia el polo negativo.
- El gel se corrió a 100 V hasta que el colorante se desplazó aproximadamente 4 cm en el gel.
- Finalmente, el gel se retiró de la cubeta de electroforesis y los resultados se visualizaron utilizando un fotodocumentador.

#### **2.2.13. Secuenciamiento**

- Se envió 20 µl del producto de PCR (sin purificar) a la empresa MacroGen para la purificación y secuenciamiento

#### **2.2.14. Análisis de secuencias y comparación con bases de datos**

- Las secuencias obtenidas fueron revisadas y editadas mediante el programa BioEdit.
- Posteriormente, se compararon con las bases de datos públicas GenBank (NCBI) utilizando la herramienta BLASTn, para identificar la especie bacteriana.

### **2.3. Métodos de Investigación**

- Método inductivo – deductivo: En el presente estudio se emplea el método inductivo, ya que parte de la observación y análisis de casos de mastitis, a partir

de los cuales se extraen generalizaciones sobre la frecuencia de agentes bacterianos y patrones de resistencia bacteriana. Del mismo modo, se emplea el método deductivo, ya que parte de conocimientos previos sobre los principales agentes etiológicos que causan mastitis bovina y sus mecanismos de resistencia antibiótica, a partir de los cuales se diseñan y aplican técnicas de laboratorio para confirmar la presencia de dichos patógenos y evaluar su comportamiento frente a diferentes antibióticos.

- Analítico-sintético: Se emplea también el método analítico al partir de la presencia de la mastitis, y descomponerla en diferentes niveles de estudio, considerando su diagnóstico, la identificación microbiológica de los agentes causales y la evaluación de su resistencia a antibióticos. Posteriormente, se aplica el método sintético para integrar los resultados obtenidos en las diferentes etapas del estudio para poder elaborar conclusiones.

## **2.4. Población, muestra y unidad de análisis**

### **2.4.1. Población**

La población está constituida por todas las vacas en producción positivas a mastitis bovina de los cinco fundos seleccionados de la provincia de Cajamarca.

- Criterio de inclusión: Aquellas vacas en producción positivas a mastitis clínica o subclínica.
- Criterio de exclusión: Aquellas vacas negativas a mastitis clínica o subclínica, y las vacas con mastitis clínica que estén siendo tratadas en el momento de la recolección.

#### **2.4.2. Muestra**

La muestra estuvo conformada por 100 vacas positivas a mastitis subclínica de cinco predios de la provincia de Cajamarca (20 vacas de cada predio). Se debe mencionar que en el muestreo se buscó incluir a vacas con mastitis clínica y subclínica; sin embargo, no se detectaron casos de mastitis clínica en las vacas de los predios incluidos en el estudio, por lo que la muestra se conformó con vacas positivas a mastitis subclínica.

#### **2.4.3. Unidad de Análisis**

La unidad de análisis fue cada una de las 100 muestras de leche obtenidas de las vacas positivas a mastitis subclínica.

### **2.5. Técnicas e instrumentos de recopilación de información**

- Técnica: Observación, análisis microbiológico, método de Kirby-Bauer (antibiograma), análisis molecular, secuenciación y análisis bioinformático.
- Instrumento: Ficha de campo para registro de diagnóstico de mastitis (Anexo 1), registro de datos para laboratorio para aislamiento e identificación bacteriana (Anexo 2), registro de resultados de antibiograma (Anexo 3).

### **2.6. Técnicas para el procesamiento y análisis de la información**

Los datos recolectados en el campo y laboratorio fueron registrados en hojas de cálculo de Microsoft Excel, donde se organizaron en tablas para su posterior análisis.

Se aplicó estadística descriptiva para la presentación de los resultados, utilizando frecuencias absolutas y relativas para cada variable analizada. Los resultados

fueron presentados en tablas de distribución de frecuencias con el fin de facilitar la interpretación de los resultados.

## **2.7. Equipos y materiales**

### **2.7.1. Equipos**

- Incubadora, microscopio óptico, centrífuga, termociclador, electroforesis en gel de agarosa, fotodocumentador de geles, espectrofotómetro Nanodrop®, secuenciador automático 3500 Genetic analyzer®.

### **2.7.2. Materiales**

- Materiales para pruebas de campo: Paleta de fondo oscuro, paleta de CMT, caja térmica, gel refrigerante, frascos estériles, reactivo CMT, sogas, toallas de papel, guantes de látex, alcohol al 70%.
- Materiales para cultivo bacteriológico y prueba de antibiograma: Medios de cultivo, placas Petri estériles, asas bacteriológicas, pipetas y puntas estériles, solución de McFarland 0,5, discos de antibióticos.
- Materiales para PCR y electroforesis: Reactivos para PCR, reactivos para electroforesis, kits de purificación de ADN, tiras de electroforesis capilar.

## CAPÍTULO III

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Presentación de Resultados

##### 3.1.1. Caracterización molecular de los agentes bacterianos

**Tabla 1.** Frecuencia de bacterias causantes de mastitis subclínica en cinco predios ganaderos de la provincia de Cajamarca - 2024.

Bacteria	n	Porcentaje
<i>Staphylococcus aureus</i>	89	59,33%
<i>Streptococcus agalactiae</i>	24	16,0%
<i>Escherichia coli</i>	14	9,33%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	11	7,33%
<i>Enterobacter cloacae</i>	8	5,33%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	4	2,67%
<b>Total</b>	<b>150</b>	<b>100%</b>

##### 3.1.2. Perfil de resistencia a antibióticos

**Tabla 2.** Perfil de resistencia de antibióticos a los agentes bacterianos causantes de mastitis subclínica en cinco predios ganaderos de la provincia de Cajamarca - 2024.

Antibiótico	Sensible		Intermedio		Resistente		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>Tetraciclina</i>	95	63,33%	32	21,33%	23	15,33%	150	100%
<i>Penicilina</i>	36	24,00%	25	16,67%	89	59,33%	150	100%
<i>Estreptomicina</i>	125	83,33%	14	9,33%	11	7,33%	150	100%
<i>Neomicina</i>	141	94,00%	7	4,67%	2	1,33%	150	100%
<i>Sulfa</i>	118	78,67%	20	13,33%	12	8,00%	150	100%
<i>Enrofloxacina</i>	129	86,00%	15	10,00%	6	4,00%	150	100%
<i>Lincomicina</i>	118	78,67%	5	3,33%	27	18,00%	150	100%

**Tabla 3.** Perfil de resistencia de antibióticos a *Staphylococcus aureus*, identificado como causante de mastitis subclínica en cinco predios ganaderos de la provincia de Cajamarca - 2024.

Antibiótico	Sensible		Intermedio		Resistente		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>Tetraciclina</i>	62	69,66%	18	20,22%	9	10,11%	89	100%
<i>Penicilina</i>	9	10,11%	18	20,22%	62	69,66%	89	100%
<i>Estreptomicina</i>	76	85,39%	7	7,87%	6	6,74%	89	100%
<i>Neomicina</i>	85	95,51%	3	3,37%	1	1,12%	89	100%
<i>Sulfa</i>	74	83,15%	9	10,11%	6	6,74%	89	100%
<i>Enrofloxacina</i>	80	89,89%	7	7,87%	2	2,25%	89	100%
<i>Lincomicina</i>	86	96,63%	2	2,25%	1	1,12%	89	100%

**Tabla 4.** Perfil de resistencia de antibióticos a *Streptococcus agalactiae*, identificado como causante de mastitis subclínica en cinco predios ganaderos de la provincia de Cajamarca - 2024.

Antibiótico	Sensible		Intermedio		Resistente		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>Tetraciclina</i>	12	50,00%	6	25,00%	6	25,00%	24	100%
<i>Penicilina</i>	23	95,83%	1	4,17%	0	0,00%	24	100%
<i>Estreptomicina</i>	21	87,50%	2	8,33%	1	4,17%	24	100%
<i>Neomicina</i>	23	95,83%	1	4,17%	0	0,00%	24	100%
<i>Sulfa</i>	18	75,00%	4	16,67%	2	8,33%	24	100%
<i>Enrofloxacina</i>	20	83,33%	3	12,50%	1	4,17%	24	100%
<i>Lincomicina</i>	22	91,67%	2	8,33%	0	0,00%	24	100%

**Tabla 5.** Perfil de resistencia de antibióticos a *Escherichia coli*, identificado como causante de mastitis subclínica en cinco predios ganaderos de la provincia de Cajamarca - 2024.

Antibiótico	Sensible		Intermedio		Resistente		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>Tetraciclina</i>	8	57,14%	3	21,43%	3	21,43%	14	100%
<i>Penicilina</i>	2	14,29%	3	21,43%	9	64,29%	14	100%
<i>Estreptomicina</i>	10	71,43%	2	14,29%	2	14,29%	14	100%
<i>Neomicina</i>	12	85,71%	1	7,14%	1	7,14%	14	100%
<i>Sulfa</i>	9	64,29%	3	21,43%	2	14,29%	14	100%
<i>Enrofloxacina</i>	10	71,43%	2	14,29%	2	14,29%	14	100%
<i>Lincomicina</i>	0	0,00%	0	0,00%	14	100%	14	100%

**Tabla 6.** Perfil de resistencia de antibióticos a *Staphylococcus epidermidis*, identificado como causante de mastitis subclínica en cinco predios ganaderos de la provincia de Cajamarca - 2024.

Antibiótico	Sensible		Intermedio		Resistente		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>Tetraciclina</i>	8	72,73%	2	18,18%	1	9,09%	11	100%
<i>Penicilina</i>	2	18,18%	3	27,27%	6	54,55%	11	100%
<i>Estreptomicina</i>	9	81,82%	1	9,09%	1	9,09%	11	100%
<i>Neomicina</i>	10	90,91%	1	9,09%	0	0,00%	11	100%
<i>Sulfa</i>	9	81,82%	1	9,09%	1	9,09%	11	100%
<i>Enrofloxacina</i>	10	90,91%	1	9,09%	0	0,00%	11	100%
<i>Lincomicina</i>	10	90,91%	1	9,09%	0	0,00%	11	100%

**Tabla 7.** Perfil de resistencia de antibióticos a *Enterobacter cloacae*, identificado como causante de mastitis subclínica en cinco predios ganaderos de la provincia de Cajamarca - 2024.

Antibiótico	Sensible		Intermedio		Resistente		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>Tetraciclina</i>	3	37,50%	2	25,00%	3	37,50%	8	100%
<i>Penicilina</i>	0	0,00%	0	0,00%	8	100%	8	100%
<i>Estreptomicina</i>	6	75,00%	1	12,50%	1	12,50%	8	100%
<i>Neomicina</i>	7	87,50%	1	12,50%	0	0,00%	8	100%
<i>Sulfa</i>	5	62,50%	2	25,00%	1	12,50%	8	100%
<i>Enrofloxacina</i>	6	75,00%	1	12,50%	1	12,50%	8	100%
<i>Lincomicina</i>	0	0,00%	0	0,00%	8	100%	8	100%

**Tabla 8.** Perfil de resistencia de antibióticos a *Klebsiella oxytoca*, identificado como causante de mastitis subclínica en cinco predios ganaderos de la provincia de Cajamarca - 2024.

Antibiótico	Sensible		Intermedio		Resistente		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>Tetraciclina</i>	2	50,00%	1	25,00%	1	25,00%	4	100%
<i>Penicilina</i>	0	0,00%	0	0,00%	4	100%	4	100%
<i>Estreptomicina</i>	3	75,00%	1	25,00%	0	0,00%	4	100%
<i>Neomicina</i>	4	100%	0	0,00%	0	0,00%	4	100%
<i>Sulfa</i>	3	75,00%	1	25,00%	0	0,00%	4	100%
<i>Enrofloxacina</i>	3	75,00%	1	25,00%	0	0,00%	4	100%
<i>Lincomicina</i>	0	0,00%	0	0,00%	4	100%	4	100%

### 3.2. Análisis, interpretación y discusión de resultados

La identificación molecular realizada en 100 muestras de leche positivas a mastitis, detectadas mediante el Test de Mastitis de California (CMT) (Tabla 1), mostró que la bacteria con mayor frecuencia fue *Staphylococcus aureus*, (59,33%), seguida por *Streptococcus agalactiae* (16%), *Escherichia coli* (9,33%), *S. epidermidis* (7,33%), *Enterobacter cloacae* (5,33%) y *Klebsiella oxytoca* (2,67%). La alta prevalencia de *S. aureus* observada en este estudio, coincide con los reportes de Mulato (20) en Huancavelica en 2018, quien empleó pruebas bioquímicas convencionales (agar hierro-triple azúcar [TSI], agar lisina-hierro [LIA], citrato de Simmons y prueba de indol). Asimismo, los resultados coinciden con los de Carrillo *et al.* (15) y Hernández *et al.* (16) en Colombia, en 2007 y 2015, respectivamente, quienes utilizaron tinción de Gram, pruebas de catalasa y coagulasa; con Bonifaz *et al.* (19) en Ecuador en 2024, que combinaron métodos bioquímicos (tinción de Gram, catalasa, coagulasa y agar manitol) con identificación molecular; y con Brisuela *et al.* (17) en México en 2018 y Huma *et al.* (18) en la India en 2022, quienes emplearon técnicas moleculares (PCR y secuenciación). Sin embargo, estos resultados difieren de los reportados por Miranda *et al.* (10) en Lima en 2022, quienes, mediante un perfil bioquímico (pruebas de tres azúcares, urea, lisina, citrato, esculina, manitol y TSC con plasma), identificaron una mayor prevalencia de *Klebsiella oxytoca* (20,2%), en contraste con el 2,67% observado en el presente estudio. *Klebsiella oxytoca* es un patógeno coliforme (29), asociado a cuadros de mastitis clínicas ambientales derivadas de contaminación fecal (136). Por otro lado, *S. aureus*, que fue la bacteria con mayor frecuencia en este estudio, es reconocido como uno de los principales

patógenos contagiosos de la mastitis bovina, junto a *Str. agalactiae*. Estos microorganismos se propagan principalmente durante el ordeño, cuando la leche infectada entra en contacto con una glándula mamaria sana, permitiendo la penetración de las bacterias a través del canal del pezón (137). La similitud entre los reportes que indican a *S. aureus* como la bacteria con mayor frecuencia en casos de mastitis, puede atribuirse, en gran medida, a la falta de higiene durante el ordeño. Esta situación favorece el desarrollo de mastitis subclínicas que, al no ser detectadas oportunamente, evolucionan hacia infecciones persistentes o crónicas, facilitando la transmisión del patógeno a animales sanos (138). Las vacas ya infectadas representan la principal fuente de contagio en los hatos lecheros (139). En países con industrias lecheras avanzadas, la implementación de estrictos protocolos de higiene y planes de control ha permitido reducir la incidencia de mastitis contagiosa. Sin embargo, la mastitis ambiental representa aún un desafío, ya que el riesgo de infección en el entorno de las vacas no puede eliminarse por completo (138).

El perfil de resistencia antibiótica evaluado en las 150 cepas aisladas de muestras positivas a mastitis (Tabla 2), mostró una mayor resistencia a la penicilina (59,33%), mientras que la resistencia a la enrofloxacin y la neomicina fue significativamente menor, con valores del 4% y 1,33%, respectivamente. La resistencia a los antibióticos representa un serio problema en el control de enfermedades infecciosas en vacunos (120). Diversos estudios han reportado niveles de resistencia a la penicilina superiores al 50% (10, 20, 120, 140), lo que podría estar relacionado con el uso prolongado e ineficaz de tratamientos antibióticos para la mastitis. Este fenómeno no solo incrementa el riesgo de resistencia bacteriana, sino que

también constituye una de las principales amenazas para la salud animal y humana (141, 142). No obstante, se debe tener en cuenta que el espectro de resistencia a los antibióticos, dependerá de las especies de microorganismos causante de la mastitis en cada hato en específico, lo que subraya la necesidad de un enfoque específico para su control en cada caso en particular.

El perfil de resistencia antibiótica de *S. aureus* (Tabla 3) reveló una elevada resistencia a la penicilina (69,66%), resultado que se aproxima a los reportes de estudios previos, donde se han registrado tasas del 75% (20) y 82,1% (10). Al respecto, se ha señalado que las tasas de curación para la mastitis causada por este patógeno son considerablemente bajas durante la lactancia, favoreciendo la progresión de la infección hacia un estado crónico y, en algunos casos, requiriendo el sacrificio de los animales afectados (143). Aunque las cepas de *S. aureus* pueden ser susceptibles a una amplia variedad de antibióticos en estudios *in vitro* (138), este microorganismo posee una gran capacidad para evadir la respuesta inmune del hospedador, sobreviviendo a la acción de los neutrófilos, induciendo fibrosis en la glándula mamaria e invadiendo las células epiteliales del tejido mamario (144). Además, se ha sugerido que la principal razón de la baja tasa de curación radica en su capacidad para formar microabscesos, los cuales impiden la penetración eficaz de los antibióticos hasta el patógeno (137,145). Se ha descrito que la mastitis causada por *S. aureus* solo puede controlarse eficazmente mediante la prevención de nuevas infecciones y el descarte de los animales infectados (143). Teniendo en cuenta que la transmisión de este agente ocurre a través de los componentes de las máquinas de ordeño, las manos del personal y las toallas de secado (137),

es fundamental implementar estrictas medidas de higiene para evitar su diseminación.

El perfil de resistencia antibiótica en *Streptococcus agalactiae* mostró que la mayor frecuencia de resistencia se presentó frente a la tetraciclina, con un 25% de los casos, mientras que la penicilina y la lincomicina demostraron una efectividad del 100% (Tabla 4). Se ha descrito que este patógeno responde favorablemente a la terapia antibiótica (146), lo que concuerda con los hallazgos del presente estudio. No obstante, existen reportes de cepas resistentes a la tetraciclina (147, 148), fenómeno que también fue observado en este estudio. Dado que *S. agalactiae* no puede multiplicarse ni desarrollarse fuera de la glándula mamaria, aunque puede sobrevivir por un corto período en las manos del personal de ordeño, en los equipos de ordeño y en la superficie de los pezones (138), su erradicación en los hatos lecheros es posible mediante la implementación de estrategias eficaces de control de mastitis. Entre las medidas más recomendadas se encuentran la desinfección de los pezones después del ordeño y la administración de terapia antibiótica durante el período de secado (143).

El perfil de resistencia antibiótica en *E. coli* evidenció una resistencia del 100% a la lincomicina, seguida de un 64,29% a la penicilina, mientras que la neomicina fue el fármaco con mayor eficacia, con un 85,71% de sensibilidad. Estudios previos también han reportado una alta resistencia a la penicilina en *E. coli* (20), mientras que la resistencia del 100% observada frente a la lincomicina se debe a su falta de actividad contra bacterias gramnegativas (149). Algunos estudios han recomendado el uso de gentamicina y enrofloxacin para el tratamiento de mastitis causadas por *E. coli* (150, 151), antibióticos que en el presente estudio presentaron bajas

tasas de resistencia, con un 14% para la enrofloxacin y un 7,14% para la neomicina, que pertenece al grupo de los aminoglucósidos, al igual que la gentamicina. Sin embargo, es importante considerar que las mastitis causadas por *E. coli* pueden tener consecuencias mortales si no son detectadas y tratadas oportunamente (152), siendo los casos hiperagudos la principal causa de mortalidad asociada a esta infección (153). En casos leves, se ha descrito que los ordeños frecuentes pueden contribuir a la eliminación del patógeno, dado que *E. coli* generalmente no invade los alveolos ni el tejido mamario (154). Asimismo, se ha demostrado que el 50% de los casos de mastitis por *E. coli* tienen su origen durante el período de seca (155), por lo que un adecuado manejo del hato en esta fase resulta crucial para el control de la enfermedad.

El perfil de resistencia antibiótica en *S. epidermidis* (Tabla 6) mostró una alta eficacia de antibióticos como la neomicina, enrofloxacin y lincomicina, mientras que la mayor resistencia se observó frente a la penicilina (54,55%). Este microorganismo es considerado un patógeno menor, al igual que *Staphylococcus xylosus* y *Staphylococcus chromogenes*, y se ha descrito que su origen en la glándula mamaria proviene de fuentes ambientales (156), causando episodios de mastitis durante el período de secado o en la lactación temprana (157). Se ha reportado previamente la resistencia de *S. epidermidis* a la penicilina debido a la producción de  $\beta$ -lactamasa, mientras que la enrofloxacin ha demostrado una alta eficacia contra este patógeno (156), en concordancia con los hallazgos del presente estudio, donde no se registró resistencia a este antibiótico. Debido a la elevada incidencia de resistencia a los  $\beta$ -lactámicos como la penicilina, el uso de estos fármacos debe ser evaluado cuidadosamente en hatos donde se

detecten estas bacterias. Esto resalta también la importancia de realizar una correcta identificación bacteriana en los programas de control de la mastitis. El perfil de resistencia antibiótica en *Enterobacter cloacae* (Tabla 7) mostró una resistencia del 100% a la lincomicina y la penicilina, seguida de un 37,5% a la tetraciclina, mientras que la resistencia a la neomicina fue nula. La resistencia a la penicilina concuerda con estudios previos que también reportaron un 100% de resistencia a este fármaco. Sin embargo, la resistencia observada a la tetraciclina en este estudio fue menor al 92,9% reportado por Miranda y Morales (10). Este agente bacteriano puede ocasionar brotes de mastitis en los que predomina como el principal patógeno gramnegativo y, en casos severos, puede generar reacciones sistémicas, aunque suele ser menos grave en comparación con infecciones causadas por *Klebsiella spp.* o *E. coli* (158, 159). Se ha demostrado que las cepas de *E. cloacae* presentan resistencia a antibióticos como penicilinas, cefalosporinas y tetraciclinas (160), debido a la producción de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido y la presencia de genes de resistencia (161, 162). Esta bacteria, junto con otras como *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*, forma parte de un grupo de patógenos frecuentemente aislados en entornos clínicos, asociados con infecciones de alta morbilidad y mortalidad en humanos, y se han identificado en reservorios como alimentos (163). Dado que la leche puede actuar como un vehículo de diseminación para *Enterobacter* resistente a antibióticos (160), es fundamental la implementación de buenas prácticas agropecuarias, como el monitoreo de mastitis subclínicas, para garantizar la calidad de la leche y prevenir la propagación de estos patógenos.

El perfil de resistencia antibiótica en *Klebsiella oxytoca* mostró una alta eficacia de antibióticos como la neomicina, estreptomicina, sulfonamidas y enrofloxacina; sin embargo, se observó una resistencia del 100% a la penicilina y del 25% a la tetraciclina. La resistencia a la penicilina ya ha sido ampliamente documentada en estudios previos, coincidiendo con los hallazgos del presente estudio. No obstante, a diferencia de lo reportado por otros autores, en este estudio no se observó la elevada resistencia a la enrofloxacina y estreptomicina descrita por Miranda y Morales (10). Un estudio realizado por Massé *et al.* (164) indicó que los niveles más altos de resistencia en *K. oxytoca* se presentan frente a la tetraciclina (19%), lo que concuerda con los resultados obtenidos en este estudio. Sin embargo, dicho estudio también reportó una elevada resistencia a la estreptomicina, lo que no concuerda con los resultados observados en el presente estudio. Las diferencias en los patrones de resistencia pueden atribuirse a la capacidad de ciertas cepas de *Klebsiella* para formar biopelículas, lo que se ha relacionado directamente con la resistencia antimicrobiana (165, 166). Estas biopelículas están compuestas por estructuras fibrilares que recubren la superficie bacteriana, protegiéndola de la fagocitosis y evitando la acción bactericida de los factores séricos (167–169). *Klebsiella oxytoca* es un patógeno oportunista responsable de mastitis clínicas ambientales (159), caracterizadas por signos clínicos graves y bajas tasas de curación tras la administración de antibióticos (170, 171). Dado que se ha identificado la contaminación ambiental como la principal fuente de infección en vacas lecheras (164), la prevención de la mastitis por *Klebsiella* debe enfocarse en mejorar las condiciones higiénicas del entorno de los animales y durante el proceso de ordeño.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran la variabilidad en los perfiles de resistencia antimicrobiana de los principales agentes bacterianos asociados a la mastitis bovina. La capacidad de estos patógenos para desarrollar resistencia a los antibióticos, resalta la importancia de estrategias de control basadas en la higiene, el monitoreo de mastitis subclínicas y la correcta elección de antibióticos. Estos hallazgos subrayan la necesidad de programas de vigilancia epidemiológica y de un uso racional de antimicrobianos para mitigar la propagación de resistencia en los hatos lecheros.

### **3.3. Contratación de hipótesis**

#### **3.3.1. Hipótesis de investigación**

Los principales agentes bacterianos encontrados en leche de vacas con mastitis subclínica en la provincia de Cajamarca son *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli* y su perfil de resistencia es múltiple.

Se acepta parcialmente esta hipótesis, ya que los agentes bacterianos identificados en el presente estudio fueron: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter cloacae* y *Klebsiella oxytoca*.

## CAPÍTULO IV

### CONCLUSIONES

- Los agentes bacterianos causantes de mastitis subclínica en predios ganaderos de la provincia de Cajamarca, identificados molecularmente fueron: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter cloacae* y *Klebsiella oxytoca*.
- El perfil de resistencia antimicrobiana de los agentes bacterianos reveló una mayor resistencia a la penicilina (59,33%), seguida por la lincomicina (18%) y la tetraciclina (15,33%). En menor medida, se observó resistencia a la sulfa (8%), estreptomycin (7,33%), enrofloxacin (4%) y neomicina (1,33%).
- El análisis del perfil de resistencia antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* mostró una elevada resistencia a la penicilina (69,66%), y una alta sensibilidad frente a la lincomicina (96,63%) y la neomicina (95,51%).
- En el caso de *Streptococcus agalactiae*, se observó una mayor resistencia a la tetraciclina (25%) y una alta sensibilidad a la penicilina y neomicina, ambas con un 95,83%.
- Por su parte, *Escherichia coli* evidenció una resistencia absoluta a la lincomicina (100%) y una elevada sensibilidad a la neomicina (85,71%).
- Asimismo, *Staphylococcus epidermidis* presentó una mayor resistencia a la penicilina (54,55%) y una alta sensibilidad a la neomicina, enrofloxacin y lincomicina, con un 90,91% para los tres antibióticos.

- En cuanto a *Enterobacter cloacae*, se identificó una resistencia total a la lincomicina (100%) y una sensibilidad elevada a la neomicina (87,50%).
- Finalmente, *Klebsiella oxytoca* demostró también una resistencia completa a la lincomicina (100%), mientras que presentó una sensibilidad absoluta a la neomicina (100%).

## **CAPÍTULO V**

### **SUGERENCIAS**

- ❖ Debido a la variabilidad en los perfiles de resistencia observados en este estudio se sugiere aplicar tratamientos antibióticos dirigidos y basados en el perfil de resistencia específico para cada patógeno. Para esto se hace necesario realizar diagnósticos microbiológicos previos al tratamiento con el fin de evitar la aplicación inadecuada de antibióticos.
- ❖ Se sugiere realizar estudios que incluyan análisis de factores de manejo y ambientales asociados a la mastitis en los predios evaluados y la implementación de programas de control de mastitis, que incluyan protocolos estrictos de higiene de ordeño, así como el monitoreo y diagnóstico temprano de la mastitis mediante las pruebas de mastitis subclínica y la identificación microbiológica de los agentes causantes de la enfermedad.
- ❖ Se podrían incluir análisis del impacto económico de las mastitis en los predios estudiados, considerando pérdidas en la producción de leche, costos de tratamiento y descarte de animales.

## REFERENCIAS

1. FAO [Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación]. (Impact of mastitis in small scale dairy production systems). *Animal Production and Health Working Paper. No. 13*. 2014.
2. Azooz, M.F., El-Wakeel, S.A., Yousef, H.M. (Financial and economic analyses of the impact of cattle mastitis on the profitability of Egyptian dairy farms). *Veterinary World*. 2020. 13:1750-9. <https://doi.org/10.14202/VETWORLD.2020.1750-1759>.
3. Sharun, K., Dhama, K., Tiwari, R., Gugjoo, M.B., Iqbal Yattoo, M., Patel, S.K., Pathak, M., Karthik, K., Khurana, S.K., Singh, R., Puvvala, B., Amarpal, Singh, R., Singh, K.P., Chaicumpa, W. (Advances in therapeutic and managerial approaches of bovine mastitis: a comprehensive review). *Veterinary Quarterly*. 2021. 41:107-36. <https://doi.org/10.1080/01652176.2021.1882713>.
4. Hogeveen, H., Huijps, K., Lam, T.J.G.M. (Economic aspects of mastitis: New developments). *New Zealand Veterinary Journal*. 2011. 59:16-23. <https://doi.org/10.1080/00480169.2011.547165>.
5. Costello, S. (Consultant guide to economics of mastitis). Penn State Nutrition Conference, 2004.
6. Viguier, C., Arora, S., Gilmartin, N., Welbeck, K., O'Kennedy, R. (Mastitis detection: current trends and future perspectives). *Trends in Biotechnology*. 2009. 27:486-93. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.05.004>.
7. Bansal, B.K., Gupta, D.K. (Economic analysis of bovine mastitis in India and Punjab-A review). *Indian Journal of Dairy Science*. 2009. 62:337-45.
8. Ministerio de Agricultura y Riego. (Estudio de la ganadería lechera en el Perú). Lima: 2017. 81 p.
9. García, O., Gomez, C.A. (Economía de la producción de leche en Cajamarca, Perú, con énfasis particular en los pequeños productores). *Vivir del Ganado. Iniciativa de políticas pecuarias a favor de los pobres - Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO)*. 2015. 1:1-5. <https://doi.org/http://infoandina.org/infoandina/sites/default/files/publication/files/OGarciaEtAl43.pdf>.
10. Miranda Quezada, M., Morales-Cauti, S. (Evaluación de la resistencia antibiótica de bacterias aisladas de mastitis subclínica en bovinos de establos lecheros de Lurín, Lima). *Salud y Tecnología Veterinaria*. 2022. 10:8-15. <https://doi.org/10.20453/STV.V10I1.4235>.

11. Moriano, C., Gómez, J., Gómez-Urviola, N. (Prevalencia de Mastitis Subclínica en Bovinos Criollos (*Bos taurus*) en el Distrito de Pacobamba, Andahuaylas, Apurímac, Perú). *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal AICA*. 2020. 15:42-6.
12. Tineo-Ayala, J.J., Andía-Ayme, V. (Mastitis bovina por recuento de células somáticas con PortaSCC® y Test de California en el fundo de Allpachaca-UNSCH, Ayacucho, Perú). *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*. 2017. 18:1-13.
13. Chamba Infante, D.J. (Prevalencia de mastitis subclínica en vacas de la asociación de ganaderos de Pueblo Nuevo de Colán-provincia de Paita-Piura-Perú 2018). [Tesis de Grado]. Piura: Universidad Nacional de Piura. 2019. 69 p.
14. Flores Monsalve, K.L., Cieza Mejía, R.D. (Prevalencia de mastitis subclínica bovina mediante la prueba de Mastitis California Test en el Distrito de Tacabamba, Cajamarca - Perú, 2018). Lambayeque: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. 2022. 57 p.
15. Carillo, A.C., Estepa, C.E., Lizarazo, J.J.H., Villate, J.P.S. (Identificación de bacterias causantes de mastitis bovina y su resistencia ante algunos antibacterianos). *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*. 2007. 10:81-91. <https://doi.org/10.31910/rudca.v10.n1.2007.569>.
16. Hernández Barrera, J.C., Merchán, M.A., Benavides Sánchez, D.A., Prada Quiroga, C.F. (Agentes etiológicos de mastitis bovina en municipios con importante producción lechera del departamento de Boyacá). *Revista investigación en salud universidad de Boyacá*. 2015. 2:162-76. <https://doi.org/10.24267/23897325.135>.
17. Brisuela Raygosa, J., Palacios Torres, J., López Valencia, G., Hori-Oshima, S., Herrera Ramírez, J.C., Pujol Manríquez, L.C., Angulo Valadez, C.E., Rentería Evangelista, T.B., Medina Basulto, G.E. (Identificación molecular y frecuencia de patógenos aislados de mastitis bovina en establos de la Península de Baja California, México). *Revista mexicana de ciencias pecuarias*. 2018. 9:754-68.
18. Huma, Z.I., Sharma, N., Kour, S., Lee, S.J. (Phenotypic and Molecular Characterization of Bovine Mastitis Milk Origin Bacteria and Linkage of Intramammary Infection With Milk Quality). *Frontiers in Veterinary Science*. 2022. 9:885134. <https://doi.org/10.3389/FVETS.2022.885134/BIBTEX>.
19. Bonifaz, N., Galarza, X., Fuertes, B., Beltrán, J. (Determinación molecular del agente etiológico de la mastitis bovina de muestras provenientes de unidades Productoras Andinas). *LA GRANJA. Revista de Ciencias de la Vida*. 2024. 39:139-49. <https://doi.org/10.17163/lgr.n39.2024.08>.

20. Mulato Sánchez, J. (Resistencia antibiótica a los agentes causantes de mastitis en vacas). [Tesis de Grado]. Huancavelica: Universidad Nacional de Huancavelica. 2018. 102 p. <https://doi.org/https://repositorio.unh.edu.pe/items/619a9762-2dd7-4f23-aea3-8a9c1f3a6c17>.
21. Shaheen, M., Ha, T., Su, N. (A Treatise on Bovine Mastitis: Disease and Disease Economics, Etiological Basis, Risk Factors, Impact on Human Health, Therapeutic Management, Prevention and Control Strategy). *Advances in Dairy Research*. 2015. 04. <https://doi.org/10.4172/2329-888X.1000150>.
22. Harmon, R.J. (Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts). *Journal of dairy science*. 1994. 77:2103-12. [https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302\(94\)77153-8](https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302(94)77153-8).
23. Kayano, M., Itoh, M., Kusaba, N., Hayashiguchi, O., Kida, K., Tanaka, Y., Kawamoto, K., Gröhn, Y.T. (Associations of the first occurrence of pathogen-specific clinical mastitis with milk yield and milk composition in dairy cows). *Journal of Dairy Research*. 2018. 85:309-16. <https://doi.org/10.1017/S0022029918000456>.
24. Abera, M., Demie, B., Aragaw, K., Regassa, F., Regassa, A. (Isolation and identification of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitic milk and their drug resistance patterns in Adama town, Ethiopia). *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*. 2010. 2:29-34.
25. Campos, F.C., Castilho, I.G., Rossi, B.F., Bonsaglia, É.C.R., Dantas, S.T.A., Dias, R.C.B., Fernandes Júnior, A., Hernandes, R.T., Camargo, C.H., Ribeiro, M.G., Pantoja, J.C.F., Langoni, H., Rall, V.L.M. (Genetic and Antimicrobial Resistance Profiles of Mammary Pathogenic *E. coli* (MPEC) Isolates from Bovine Clinical Mastitis). *Pathogens*. 2022. 11:1435. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS11121435/S1>.
26. Hurley, W.L., Theil, P.K. (Perspectives on Immunoglobulins in Colostrum and Milk). *Nutrients* 2011, Vol. 3, Pages 442-474. 2011. 3:442-74. <https://doi.org/10.3390/NU3040442>.
27. De Vliegher, S., Fox, L.K., Piepers, S., McDougall, S., Barkema, H.W. (Invited review: Mastitis in dairy heifers: Nature of the disease, potential impact, prevention, and control). *Journal of Dairy Science*. 2012. 95:1025-40. <https://doi.org/10.3168/JDS.2010-4074/ASSET/1FB2B9F0-975D-4192-A97D-62DDCE786D2E/MAIN.ASSETS/GR2.JPG>.
28. Bian, Y., Lv, Y., Li, Q. (Identification of diagnostic protein markers of subclinical mastitis in bovine whey using comparative proteomics). *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*. 2014. 58:385-92. <https://doi.org/10.2478/BVIP-2014-0060>.

29. Cobirka, M., Tancin, V., Slama, P. (Epidemiology and Classification of Mastitis). *Animals* 2020, Vol. 10, Page 2212. 2020. 10:2212. <https://doi.org/10.3390/ANI10122212>.
30. Hoque, M.N., Das, Z.C., Talukder, A.K., Alam, M.S., Rahman, A.N.M.A. (Different screening tests and milk somatic cell count for the prevalence of subclinical bovine mastitis in Bangladesh). *Tropical Animal Health and Production*. 2015. 47:79-86. <https://doi.org/10.1007/S11250-014-0688-0/METRICS>.
31. Madouasse, A., Huxley, J.N., Browne, W.J., Bradley, A.J., Green, M.J. (Somatic cell count dynamics in a large sample of dairy herds in England and Wales). *Preventive Veterinary Medicine*. 2010. 96:56-64. <https://doi.org/10.1016/J.PREVETMED.2010.05.005>.
32. Eberhart, R.J., Harmon, R.J., Jasper, D.E., Natzke, R.P., Nickerson, S.C., Reneau, J.K., Row, E.H., Smith, K.L., Spencer, S.B. (Current concepts of bovine mastitis). *The National Mastitis Council, Arlington, Virginia, 47p*. 1987. <https://doi.org/https://search.worldcat.org/es/title/036026153>.
33. Ashraf, A., Imran, M. (Causes, types, etiological agents, prevalence, diagnosis, treatment, prevention, effects on human health and future aspects of bovine mastitis). *Animal Health Research Reviews*. 2020. 21:36-49. <https://doi.org/10.1017/S1466252319000094>.
34. Ramírez, N.F., Keefe, G., Dohoo, I., Sánchez, J., Arroyave, O., Cerón, J., Jaramillo, M., Palacio, L.G. (Herd- and cow-level risk factors associated with subclinical mastitis in dairy farms from the High Plains of the northern Antioquia, Colombia). *Journal of Dairy Science*. 2014. 97:4141-50. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6815>.
35. Pérez-Morales, R., Padilla-Ramírez, F., González-Ríos, H., De-la-Cruz-Leyva, M., Castañeda-Vázquez, H., Hernández-Moreno, M. (Factores asociados a la prevalencia de mastitis subclínica en ganado bovino de doble propósito). *Abanico veterinario*. 2022. 12. <https://doi.org/10.21929/abavet2022.16>.
36. Ndahetuye, J.B., Persson, Y., Nyman, A.K., Tukei, M., Ongol, M.P., Båge, R. (Aetiology and prevalence of subclinical mastitis in dairy herds in peri-urban areas of Kigali in Rwanda). *Tropical Animal Health and Production*. 2019. 51:2037-44. <https://doi.org/10.1007/S11250-019-01905-2/TABLES/3>.
37. Kuang, Y., Tani, K., Synnott, A.J., Ohshima, K., Higuchi, H., Nagahata, H., Tanji, Y. (Characterization of bacterial population of raw milk from bovine mastitis by culture-independent PCR–DGGE method). *Biochemical Engineering Journal*. 2009. 45:76-81. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2009.02.010>.

38. Cadona, J.S., Hernandez, L.B., Lorenzo, R., Bottini, E., Bustamante, A. V., Sanso, A.M. (Draft Genome Sequence of *Streptococcus agalactiae* TA B490, a Multidrug-Resistant Strain Isolated from Bovine Mastitis in Argentina). *Microbiology Resource Announcements*. 2021. 10. <https://doi.org/10.1128/MRA.01429-20>.
39. Klaas, I.C., Zadoks, R.N. (An update on environmental mastitis: Challenging perceptions). *Transboundary and Emerging Diseases*. 2018. 65:166-85. <https://doi.org/10.1111/TBED.12704>.
40. Fox, L.K., Gay, J.M. (Contagious Mastitis). *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 1993. 9:475-87. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30615-0](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30615-0).
41. Nascimento, J.D.S., Fagundes, P.C., Brito, M.A.V.D.P., Netto Dos Santos, K.R., Bastos, M.D.C.D.F. (Production of bacteriocins by coagulase-negative staphylococci involved in bovine mastitis). *Veterinary Microbiology*. 2005. 106:61-71. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2004.10.014>.
42. Graber, H.U., Casey, M.G., Naskova, J., Stelner, A., Schaeren, W. (Development of a highly sensitive and specific assay to detect *Staphylococcus aureus* in bovine mastitic milk). *Journal of Dairy Science*. 2007. 90:4661-9. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-902>.
43. Awandkar, S.P., Kulkarni, M.B., Agnihotri, A.A., Chavan, V.G., Chincholkar, V. V. (Novel fluconazole-resistant zoonotic yeast isolated from mastitis). *Animal Biotechnology*. 2023. 34:746-55. <https://doi.org/10.1080/10495398.2021.1982725>.
44. Dalanezi, F.M., Souza da Paz, G., Joaquim, S.F., Guimarães, F.F., Bosco, S. de M.G., Langoni, H. (Short communication: The first report of *Cyberlindnera rhodanensis* associated with clinical bovine mastitis). *Journal of Dairy Science*. 2018. 101:581-3. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13347>.
45. Ksouri, S., Djebir, S., Hadeif, Y., Benakhla, A. (Survey of Bovine Mycotic Mastitis in Different Mammary Gland Statuses in Two North-Eastern Regions of Algeria). *Mycopathologia*. 2015. 179:327-31. <https://doi.org/10.1007/S11046-014-9845-2/METRICS>.
46. Cuesta, L.M., Liron, J.P., Farias, M.V.N., Dolcini, G.L., Ceriani, M.C. (Effect of bovine leukemia virus (BLV) infection on bovine mammary epithelial cells RNA-seq transcriptome profile). *PLOS ONE*. 2020. 15:e0234939. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0234939>.

47. Herlekar, D.A., Shashikant, C.S., Gurjar, A.A., Jayarao, B.M. (Presence of viral and bacterial organisms in milk and their association with somatic cell counts). *Journal of Dairy Science*. 2013. 96:6336-46. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6631>.
48. Cvetnić, L., Samardžija, M., Habrun, B., Kompes, G., Benić, M. (Microbiological monitoring of mastitis pathogens in the control of udder health in dairy cows.). *Slovenian Veterinary Research*. 2016. 53:131-40. [https://doi.org/Slovenian Veterinary Research, 53, 131-140](https://doi.org/Slovenian_Veterinary_Research,53,131-140). [https://www.researchgate.net/publication/310615852\\_Microbiological\\_monitoring\\_of\\_mastitis\\_pathogens\\_in\\_the\\_control\\_of\\_udder\\_health\\_in\\_dairy\\_cows](https://www.researchgate.net/publication/310615852_Microbiological_monitoring_of_mastitis_pathogens_in_the_control_of_udder_health_in_dairy_cows).
49. Abd El-Aziz, N.K., Ammar, A.M., El Damaty, H.M., Abd Elkader, R.A., Saad, H.A., El-Kazzaz, W., Khalifa, E. (Environmental *Streptococcus uberis* associated with clinical mastitis in dairy cows: Virulence traits, antimicrobial and biocide resistance, and epidemiological typing). *Animals*. 2021. 11:1849. <https://doi.org/10.3390/ANI11071849/S1>.
50. Zhang, H., Jiang, H., Fan, Y., Chen, Z., Li, M., Mao, Y., Karrow, N.A., Looor, J.J., Moore, S., Yang, Z. (Transcriptomics and iTRAQ-Proteomics Analyses of Bovine Mammary Tissue with *Streptococcus agalactiae*-Induced Mastitis). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2018. 66:11188-96. [https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.8B02386/SUPPL\\_FILE/JF8B02386\\_SI\\_002.PDF](https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.8B02386/SUPPL_FILE/JF8B02386_SI_002.PDF).
51. Lamari, I., Mimoune, N., Khelef, D. (Effect of feed additive supplementation on bovine subclinical mastitis). *Veterinarska stanica*. 2021. 52:0-0. <https://doi.org/10.46419/VS.52.4.12>.
52. Gelgie, A.E., Korsá, M.G., Kerro Dego, O. (*Mycoplasma bovis* Mastitis). *Current Research in Microbial Sciences*. 2022. 3:100123. <https://doi.org/10.1016/J.CRMICR.2022.100123>.
53. Bag, M.A.S., Khan, M.S.R., Sami, M.D.H., Begum, F., Islam, M.S., Rahman, M.M., Rahman, M.T., Hassan, J. (Virulence determinants and antimicrobial resistance of *E. coli* isolated from bovine clinical mastitis in some selected dairy farms of Bangladesh). *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2021. 28:6317-23. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2021.06.099>.
54. Fu, S., Wen, C., Wang, Z., Qiu, Y., Zhang, Y., Zuo, J., Xu, Y., Han, X., Luo, Z., Chen, W., Miao, J. (Molecular Epidemiology and Antimicrobial Resistance of Outbreaks of *Klebsiella pneumoniae* Clinical Mastitis in Chinese Dairy Farms). *Microbiology Spectrum*. 2022. 10. [https://doi.org/10.1128/SPECTRUM.02997-22/SUPPL\\_FILE/SPECTRUM.02997-22-S0001.PDF](https://doi.org/10.1128/SPECTRUM.02997-22/SUPPL_FILE/SPECTRUM.02997-22-S0001.PDF).

55. Monistero, V., Barberio, A., Cremonesi, P., Castiglioni, B., Morandi, S., Lassen, D.C.K., Astrup, L.B., Locatelli, C., Piccinini, R., Filippa Addis, M., Bronzo, V., Moroni, P. (Genotyping and antimicrobial susceptibility profiling of *Streptococcus uberis* isolated from a clinical bovine mastitis outbreak in a dairy farm). *Antibiotics*. 2021. 10:644. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10060644/S1>.
56. Cvetnić, L., Špičić, S., Kompes, G., Habrun, B., Katalinić-Janković, V., Cvetnić, M., Zdelar-Tuk, M., Reil, I., Duvnjak, S., Cvetnić, Benić, M. (Bovine mastitis caused by rapid-growth environmental mycobacteria). *Veterinarska stanica*. 2022. 53:493-501. <https://doi.org/10.46419/VS.53.5.11>.
57. Kotzamanidis, C., Vafeas, G., Giantzi, V., Anastasiadou, S., Mygdalias, S., Malousi, A., Loukia, E., Daniel, S., Zdragas, A. (*Staphylococcus aureus* Isolated from Ruminants with Mastitis in Northern Greece Dairy Herds: Genetic Relatedness and Phenotypic and Genotypic Characterization). *Toxins* 2021, Vol. 13, Page 176. 2021. 13:176. <https://doi.org/10.3390/TOXINS13030176>.
58. Vasudevan, P., Nair, M.K.M., Annamalai, T., Venkitanarayanan, K.S. (Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation). *Veterinary Microbiology*. 2003. 92:179-85. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00360-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00360-7).
59. Rainard, P., Foucras, G., Fitzgerald, J.R., Watts, J.L., Koop, G., Middleton, J.R. (Knowledge gaps and research priorities in *Staphylococcus aureus* mastitis control). *Transboundary and Emerging Diseases*. 2018. 65:149-65. <https://doi.org/10.1111/TBED.12698>.
60. Gilbert, F.B., Cunha, P., Jensen, K., Glass, E.J., Foucras, G., Robert-Granić, C., Rupp, R., Rainard, P. (Differential response of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* or *Escherichia coli* agonists of the innate immune system). *Veterinary Research*. 2013. 44:1-23. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-40/FIGURES/6>.
61. Jørgensen, H.J., Nordstoga, A.B., Sviland, S., Zadoks, R.N., Sølverød, L., Kvitle, B., Mørk, T. (*Streptococcus agalactiae* in the environment of bovine dairy herds – rewriting the textbooks?). *Veterinary Microbiology*. 2016. 184:64-72. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2015.12.014>.
62. Kibebew, K. (Bovine Mastitis: A Review of Causes and Epidemiological Point of View). *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*. 2017. <https://doi.org/https://www.iiste.org/Journals/index.php/JBAH/article/viewFile/34975/35976>.

63. Rosini, R., Margarit, I. (Biofilm formation by *Streptococcus agalactiae*: Influence of environmental conditions and implicated virulence factor). *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2015. 5:129892. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2015.00006/BIBTEX>.
64. Abureema, S., Smooker, P., Malmo, J., Deighton, M. (Molecular epidemiology of recurrent clinical mastitis due to *Streptococcus uberis*: Evidence of both an environmental source and recurring infection with the same strain). *Journal of Dairy Science*. 2014. 97:285-90. <https://doi.org/10.3168/JDS.2013-7074>.
65. Gomes, F., Henriques, M. (Control of Bovine Mastitis: Old and Recent Therapeutic Approaches). *Current Microbiology*. 2016. 72:377-82. <https://doi.org/10.1007/S00284-015-0958-8/METRICS>.
66. Whetstone, C.A., Miller, J.M., Seal, B.S., Bello, L.J., Lawrence, W.C. (Latency and reactivation of a thymidine kinase-negative bovine herpesvirus 1 deletion mutant). *Archives of Virology*. 1992. 122:207-14. <https://doi.org/10.1007/BF01321129/METRICS>.
67. Smith, K.L., Hogan, J.S. (Environmental Mastitis). *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 1993. 9:489-98. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30616-2](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30616-2).
68. Petzl, W., Zerbe, H., Günther, J., Seyfert, H.M., Hussen, J., Schuberth, H.J. (Pathogen-specific responses in the bovine udder. Models and immunoprophylactic concepts). *Research in Veterinary Science*. 2018. 116:55-61. <https://doi.org/10.1016/J.RVSC.2017.12.012>.
69. O'Halloran, F., Beecher, C., Chaurin, V., Sweeney, T., Giblin, L. (Lactoferrin affects the adherence and invasion of *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *dysgalactiae* in mammary epithelial cells). *Journal of dairy science*. 2016. 99:4619-28. <https://doi.org/10.3168/JDS.2015-10465>.
70. Janeway, C.A., Medzhitov, R. (Innate immune recognition). *Annual review of immunology*. 2002. 20:197-216. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.20.083001.084359>.
71. Sordillo, L.M. (Mammary Gland Immunobiology and Resistance to Mastitis). *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 2018. 34:507-23. <https://doi.org/10.1016/J.CVFA.2018.07.005>.
72. Han, S.H., Kim, J.H., Martin, M., Michalek, S.M., Nahm, M.H. (Pneumococcal lipoteichoic acid (LTA) is not as potent as staphylococcal LTA in stimulating Toll-like receptor 2). *Infection and Immunity*. 2003. 71:5541-8. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.10.5541-5548.2003/ASSET/2BE6DCAD-F5BB-401F-B37F-B0A7079FA162/ASSETS/GRAPHIC/III030541006.JPEG>.

73. Rivas, A.L., Tadevosyan, R., Quimby, F.W., Coksaygan, T., Lein, D.H. (Identification of subpopulations of bovine mammary-gland phagocytes and evaluation of sensitivity and specificity of morphologic and functional indicators of bovine mastitis). *Canadian Journal of Veterinary Research*. 2002. 66. <https://doi.org/https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC227000/>.
74. BlumJ, F., Barbieri, J. (Exotocinas) 2019.
75. Ruegg, P.L. (Investigation of mastitis problems on farms). *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 2003. 19:47-73. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(02\)00078-6](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(02)00078-6).
76. Rainard, P., Riollet, C. (Innate immunity of the bovine mammary gland). *Veterinary Research*. 2006. 37:369-400. <https://doi.org/10.1051/VETRES:2006007>.
77. Oviedo-Boyso, J., Valdez-Alarcón, J.J., Cajero-Juárez, M., Ochoa-Zarzosa, A., López-Meza, J.E., Bravo-Patiño, A., Baizabal-Aguirre, V.M. (Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis). *Journal of Infection*. 2007. 54:399-409. <https://doi.org/10.1016/J.JINF.2006.06.010/ASSET/E3761938-BAB5-499D-9900-2393409EF287/MAIN.ASSETS/GR1.SML>.
78. Alnakip, M.E., Quintela-Baluja, M., Böhme, K., Fernández-No, I., Caamaño-Antelo, S., Calo-Mata, P., Barros-Velázquez, J. (The Immunology of Mammary Gland of Dairy Ruminants between Healthy and Inflammatory Conditions). *Journal of Veterinary Medicine*. 2014. 2014:659801. <https://doi.org/10.1155/2014/659801>.
79. Genini, S., Badaoui, B., Sclep, G., Bishop, S.C., Waddington, D., Pinard van der Laan, M.H., Klopp, C., Cabau, C., Seyfert, H.M., Petzl, W., Jensen, K., Glass, E.J., de Greeff, A., Smith, H.E., Smits, M.A., Olsaker, I., Boman, G.M., Pisoni, G., et al. (Strengthening insights into host responses to mastitis infection in ruminants by combining heterogeneous microarray data sources). *BMC Genomics*. 2011. 12:1-17. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-225/FIGURES/3>.
80. Petzl, W., Zerbe, H., Günther, J., Yang, W., Seyfert, H.M., Nürnberg, G., Schuberth, H.J. (*Escherichia coli*, but not *Staphylococcus aureus* triggers an early increased expression of factors contributing to the innate immune defense in the udder of the cow). *Veterinary Research*. 2008. 39:1-23. <https://doi.org/10.1051/VETRES:2007057>.

81. Côté-Gravel, J., Malouin, F. (Symposium review: Features of *Staphylococcus aureus* mastitis pathogenesis that guide vaccine development strategies). *Journal of Dairy Science*. 2019. 102:4727-40. <https://doi.org/10.3168/JDS.2018-15272/ASSET/94FADBD3-59A4-4103-886D-B9C09CE4FD5E/MAIN.ASSETS/GR1.JPG>.
82. Boerhout, E., Vrieling, M., Benedictus, L., Daemen, I., Ravesloot, L., Rutten, V., Nuijten, P., Van Strijp, J., Koets, A., Eisenberg, S. (Immunization routes in cattle impact the levels and neutralizing capacity of antibodies induced against *S. aureus* immune evasion proteins). *Veterinary Research*. 2015. 46:1-9. <https://doi.org/10.1186/S13567-015-0243-7/FIGURES/4>.
83. Hyde, R.M., Down, P.M., Bradley, A.J., Breen, J.E., Hudson, C., Leach, K.A., Green, M.J. (Automated prediction of mastitis infection patterns in dairy herds using machine learning). *Scientific Reports* 2020 10:1. 2020. 10:1-8. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61126-8>.
84. Algharib, S.A., Dawood, A.S., Huang, L., Guo, A., Zhao, G., Zhou, K., Li, C., Liu, J., Gao, X., Luo, W., Xie, S. (Basic concepts, recent advances, and future perspectives in the diagnosis of bovine mastitis). *Journal of Veterinary Science*. 2023. 25. <https://doi.org/10.4142/JVS.23147>.
85. Chamchoy, T., Okello, E., Williams, D.R., Tonooka, K., Glenn, K., Maehana, K., Gardner, I.A., Aly, S.S. (Bayesian estimation of sensitivity and specificity of a rapid mastitis test kit, bacterial culture, and PCR for detection of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* species, and coliforms in bovine milk samples). *Journal of Dairy Science*. 2022. 105:6240-50. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20940>.
86. Galfi, A.L., Radinović, M.Ž., Davidov, I.N., Erdeljan, M.M., Kovačević, Z.R. (Detection of subclinical mastitis in dairy cows using California and Draminski mastitis test). *Biotechnology in Animal Husbandry*. 2017. 33:465-73. <https://doi.org/10.2298/BAH1704465G>.
87. Adkins, P.R.F., Middleton, J.R. (Methods for Diagnosing Mastitis). *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 2018. 34:479-91. <https://doi.org/10.1016/J.CVFA.2018.07.003>.
88. Jashari, R., Piepers, S., De Vliegher, S. (Evaluation of the composite milk somatic cell count as a predictor of intramammary infection in dairy cattle). *Journal of Dairy Science*. 2016. 99:9271-86. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10753>.

89. Sharma, N., Pandey, V., Sudhan, N.A. (Comparison of some indirect screening tests for detection of subclinical mastitis in dairy cows.). *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. 2010. 13. <https://doi.org/https://www.cabidigitallibrary.org/doi/pdf/10.5555/20103310599>.
90. Sztachańska, M., Barański, W., Janowski, T., Pogorzelska, J., Zduńczyk, S. (Prevalence and etiological agents of subclinical mastitis at the end of lactation in nine dairy herds in North-East Poland). *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 2016. 19:119-24. <https://doi.org/10.1515/PJVS-2016-0015>.
91. Schukken, Y.H., Wilson, D.J., Welcome, F., Garrison-Tikofsky, L., Gonzalez, R.N. (Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts). *Veterinary Research*. 2003. 34:579-96. <https://doi.org/10.1051/VETRES:2003028>.
92. Pyörälä, S. (Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis). *Veterinary Research*. 2003. 34:565-78. <https://doi.org/10.1051/VETRES:2003026>.
93. Petzer, I.M., Karzis, J., Donkin, E.F., Webb, E.C., Etter, E.M.C. (Somatic cell count thresholds in composite and quarter milk samples as indicator of bovine intramammary infection status). *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. 2017. 84:10. <https://doi.org/10.4102/OJVR.V84I1.1269>.
94. Zhao, X., Lacasse, P. (Mammary tissue damage during bovine mastitis: Causes and control). *Journal of Animal Science*. 2008. 86:57-65. <https://doi.org/10.2527/JAS.2007-0302>.
95. VanKlompbergen, M.K., McMicking, H.F., Hovey, R.C. (Technical note: A vacuum-assisted approach for biopsying the mammary glands of various species). *Journal of Dairy Science*. 2012. 95:243-6. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4565>.
96. Gurina, T.S., Simms, L. (Histology, Staining). *StatPearls Publishing LLC*. 2023. <https://doi.org/https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557663/>.
97. Mahmmud, Y. (The future of PCR technologies in diagnosis of bovine mastitis pathogens). *Advances in Dairy Research*. 2013. 2:10-4172. <https://doi.org/10.4172/2329-888X.1000e106>.
98. Riffon, R., Sayasith, K., Khalil, H., Dubreuil, P., Drolet, M., Lagacé, J. (Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR). *Journal of Clinical Microbiology*. 2001. 39:2584-9. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.7.2584-2589.2001/ASSET/132A4239-A0D2-4173-A494-DCF574D3B6CA/ASSETS/GRAPHIC/JM0711639003.JPEG>.

99. Phuektes, P., Mansell, P.D., Browning, G.F. (Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and streptococcal causes of bovine mastitis). *Journal of dairy science*. 2001. 84:1140-8. [https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302\(01\)74574-2](https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302(01)74574-2).
100. Koskinen, M.T., Holopainen, J., Pyörälä, S., Bredbacka, P., Pitkälä, A., Barkema, H.W., Bexiga, R., Roberson, J., Sølverød, L., Piccinini, R., Kelton, D., Lehmusto, H., Niskala, S., Salmikivi, L. (Analytical specificity and sensitivity of a real-time polymerase chain reaction assay for identification of bovine mastitis pathogens). *Journal of Dairy Science*. 2009. 92:952-9. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1549>.
101. Studer, E., Schaeren, W., Naskova, J., Pfaeffli, H., Kaufmann, T., Kirchhofer, M., Steiner, A., Graber, H.U. (A longitudinal field study to evaluate the diagnostic properties of a quantitative real-time polymerase chain reaction-based assay to detect *Staphylococcus aureus* in milk). *Journal of Dairy Science*. 2008. 91:1893-902. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0485>.
102. Ghorbanpoor, M., Seifiabad Shapouri, M., Motamedi, H., Jamshidian, M., Gooraninejad, S. (Comparison of PCR and bacterial culture methods for diagnosis of dairy cattle subclinical submastitis caused by *Staphylococcus aureus*). *Iranian Journal of Veterinary Medicine*. 2007. 1:87-91. <https://doi.org/10.22059/IJVM.2008.65738>.
103. Bu, R.E., Wang, J.L., Wu, J.H., Xilin, G.W., Chen, J.L., Wang, H. (Indirect enzyme-linked immunosorbent assay method based on *Streptococcus agalactiae* rSip-Pgk-FbsA fusion protein for detection of bovine mastitis). *Polish journal of veterinary sciences*. 2017. 20:355-62. <https://doi.org/10.1515/PJVS-2017-0043>.
104. Al-Rasheed, A.A., Ahmed, S.S., Al-Jashamy, K.A., Garba, B. (Immunopathological Responses to the Bovine Mastitis Associated with *Staphylococcus* Species Infection). *The Iraqi Journal of Veterinary Medicine*. 2022. 46:7-11. <https://doi.org/10.30539/IJVM.V46I2.1398>.
105. Thomas, F.C., Geraghty, T., Simões, P.B.A., Mshelbwala, F.M., Haining, H., Eckersall, P.D. (A pilot study of acute phase proteins as indicators of bovine mastitis caused by different pathogens). *Research in Veterinary Science*. 2018. 119:176-81. <https://doi.org/10.1016/J.RVSC.2018.06.015>.
106. Kim, B., Lee, Y.J., Park, J.G., Yoo, D., Hahn, Y.K., Choi, S. (A portable somatic cell counter based on a multi-functional counting chamber and a miniaturized fluorescence microscope). *Talanta*. 2017. 170:238-43. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2017.04.014>.

107. Algharib, S.A., Dawood, A., Zhou, K., Chen, D., Li, C., Meng, K., Maa, M.K., Ahmed, S., Huang, L., Xie, S. (Designing, structural determination and biological effects of rifaximin loaded chitosan- carboxymethyl chitosan nanogel). *Carbohydrate Polymers*. 2020. 248:116782. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2020.116782>.
108. Zhu, X., Radovic-Moreno, A.F., Wu, J., Langer, R., Shi, J. (Nanomedicine in the management of microbial infection – Overview and perspectives). *Nano Today*. 2014. 9:478-98. <https://doi.org/10.1016/J.NANTOD.2014.06.003>.
109. Hossain, M.K., Paul, S., Hossain, M.M., Islam, M.R., Alam, M.G.S. (Bovine mastitis and its therapeutic strategy doing antibiotic sensitivity test). *Austin J Vet Sci Anim Husb*. 2017. 4:1030.
110. Biggs, A. (Update on dry cow therapy 1. antibiotic v non- antibiotic approaches). *In Practice*. 2017. 39:328-33.
111. Du Preez, J.H. (Bovine mastitis therapy and why it fails). *Journal of the South African Veterinary Association*. 2000. 71:201-8. <https://doi.org/10.4102/JSAVA.V71I3.714>.
112. Cheng, W.N., Han, S.G. (Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments — A review). *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 2020. 33:1699. <https://doi.org/10.5713/AJAS.20.0156>.
113. Winder, C.B., Sargeant, J.M., Hu, D., Wang, C., Kelton, D.F., Godkin, M.A., Churchill, K.J., O'connor, A.M. (Comparative efficacy of antimicrobials for treatment of clinical mastitis in lactating dairy cattle: a systematic review and network meta-analysis). *Animal health research reviews*. 2019. 20:229-46. <https://doi.org/10.1017/S1466252319000318>.
114. McDougall, S., Agnew, K.E., Cursons, R., Hou, X.X., Compton, C.R.W. (Parenteral Treatment of Clinical Mastitis with Tylosin Base or Penethamate Hydriodide in Dairy Cattle). *Journal of Dairy Science*. 2007. 90:779-89. [https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302\(07\)71562-X](https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302(07)71562-X).
115. Bradley, A.J., Green, M.J. (Factors affecting cure when treating bovine clinical mastitis with cephalosporin-based intramammary preparations). *Journal of Dairy Science*. 2009. 92:1941-53. <https://doi.org/10.3168/JDS.2008-1497>.
116. McDougall, S., Arthur, D.G., Bryan, M.A., Vermunt, J.J., Weir, A.M. (Clinical and bacteriological response to treatment of clinical mastitis with one of three intramammary antibiotics). *New Zealand Veterinary Journal*. 2007. 55:161-70. <https://doi.org/10.1080/00480169.2007.36762>.

117. Gillespie, B.E., Moorehead, H., Lunn, P., Dowlen, H.H., Johnson, D.L., Lamar, K.C., Lewis, M.J., Ivey, S.J., Hallberg, J.W., Chester, S.T. (Efficacy of extended pirlimycin hydrochloride therapy for treatment of environmental *Streptococcus* spp and *Staphylococcus aureus* intramammary infections in lactating dairy cows). *Vet Ther.* 2002. 3:373-80.
118. Ali, T., Kamran, Raziq, A., Wazir, I., Ullah, R., Shah, P., Ali, M.I., Han, B., Liu, G. (Prevalence of Mastitis Pathogens and Antimicrobial Susceptibility of Isolates From Cattle and Buffaloes in Northwest of Pakistan). *Frontiers in Veterinary Science.* 2021. 8:746755. <https://doi.org/10.3389/FVETS.2021.746755>.
119. Laven, R.A., Balcomb, C.C., Tulley, W.T., Lawrence, K.E. (Effect of dry period length on the effect of an intramammary teat sealant on the risk of mastitis in cattle treated with antibiotics at drying off). *New Zealand veterinary journal.* 2014. 62:214-20. <https://doi.org/10.1080/00480169.2013.879689>.
120. Pascu, C., Herman, V., Iancu, I., Costinar, L. (Etiology of Mastitis and Antimicrobial Resistance in Dairy Cattle Farms in the Western Part of Romania). *Antibiotics.* 2022. 11:57. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS11010057>.
121. Leclercq, R. (Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications). *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* 2002. 34:482-92. <https://doi.org/10.1086/324626>.
122. Roberts, M.C., Schwarz, S. (Tetracycline and Phenicol Resistance Genes and Mechanisms: Importance for Agriculture, the Environment, and Humans). *Journal of environmental quality.* 2016. 45:576-92. <https://doi.org/10.2134/JEQ2015.04.0207>.
123. Roberts, M.C. (Update on acquired tetracycline resistance genes). *FEMS microbiology letters.* 2005. 245:195-203. <https://doi.org/10.1016/J.FEMSLE.2005.02.034>.
124. Haenni, M., Lupo, A., Madec, J.Y. (Antimicrobial Resistance in *Streptococcus* spp). *Microbiology Spectrum.* 2018. 6:10.1128/microbiolspec.arba-0008-2017. <https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.ARBA-0008-2017>.
125. Haenni, M., Galofaro, L., Ythier, M., Giddey, M., Majcherczyk, P., Moreillon, P., Madec, J.Y. (Penicillin-binding protein gene alterations in *Streptococcus uberis* isolates presenting decreased susceptibility to penicillin). *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2010. 54:1140-5. <https://doi.org/10.1128/AAC.00915-09>.

126. K, D., X, Z. (DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones). *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*. 1997. 61:377-92. <https://doi.org/10.1128/MMBR.61.3.377-392.1997>.
127. Neelam, Jain, V.K., Singh, M., Joshi, V.G., Chhabra, R., Singh, K., Rana, Y.S. (Virulence and antimicrobial resistance gene profiles of *Staphylococcus aureus* associated with clinical mastitis in cattle). *PLoS ONE*. 2022. 17:e0264762. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0264762>.
128. Kumar, R., Yadav, B.R., Singh, R.S. (Genetic determinants of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from milk of mastitic crossbred cattle). *Current microbiology*. 2010. 60:379-86. <https://doi.org/10.1007/S00284-009-9553-1>.
129. Schukken, Y.H., Bronzo, V., Locatelli, C., Pollera, C., Rota, N., Casula, A., Testa, F., Scaccabarozzi, L., March, R., Zalduendo, D., Guix, R., Moroni, P. (Efficacy of vaccination on *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci intramammary infection dynamics in 2 dairy herds). *Journal of Dairy Science*. 2014. 97:5250-64. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8008>.
130. Ruegg, P.L. (A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention). *Journal of Dairy Science*. 2017. 100:10381-97. <https://doi.org/10.3168/JDS.2017-13023/ASSET/8BF5A3B9-A134-4587-A6BF-5B3C3D103489/MAIN.ASSETS/GR2.JPG>.
131. Schalm, O.W., Noorlander, D.O. (Experiments and observations leading to development of the California mastitis test.) 1957.
132. Schalm, O.W., Carroll, E.J., Jain, N.C. (Bovine mastitis.) 1971.
133. Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C., Turck, M. (Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method). *American Journal of Clinical Pathology*. 1966. 45:493-6. [https://doi.org/10.1093/AJCP/45.4\\_TS.493](https://doi.org/10.1093/AJCP/45.4_TS.493).
134. Clinical and Laboratory Standards Institute. (Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 34th Ed. CLSI supplement M100). Pittsburgh: 2024. 428 p.
135. Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J. (16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study). *Journal of Bacteriology*. 1991. 173:697-703. <https://doi.org/10.1128/JB.173.2.697-703.1991>.
136. Massé, J., Dufour, S., Archambault, M. (Characterization of *Klebsiella* isolates obtained from clinical mastitis cases in dairy cattle). *Journal of dairy science*. 2020. 103:3392-400. <https://doi.org/10.3168/JDS.2019-17324>.
137. Petersson-Wolfe, C.S., Mullarky, I.K., Jones, G.M. (*Staphylococcus aureus* Mastitis: Cause, Detection, and Control) 2010.

138. Cobirka, M., Tancin, V., Slama, P. (Epidemiology and Classification of Mastitis). *Animals: an Open Access Journal from MDPI*. 2020. 10:2212. <https://doi.org/10.3390/ANI10122212>.
139. Ndahetuye, J.B., Persson, Y., Nyman, A.K., Tukei, M., Ongol, M.P., Båge, R. (Aetiology and prevalence of subclinical mastitis in dairy herds in peri-urban areas of Kigali in Rwanda). *Tropical Animal Health and Production*. 2019. 51:2037. <https://doi.org/10.1007/S11250-019-01905-2>.
140. Oliver, S.P., Murinda, S.E. (Antimicrobial resistance of mastitis pathogens). *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*. 2012. 28:165-85. <https://doi.org/10.1016/J.CVFA.2012.03.005>.
141. Oliveira, M., Nunes, S.F., Carneiro, C., Bexiga, R., Bernardo, F., Vilela, C.L. (Time course of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates). *Veterinary microbiology*. 2007. 124:187-91. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2007.04.016>.
142. Schönborn, S., Krömker, V. (Detection of the biofilm component polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* infected cow udders). *Veterinary microbiology*. 2016. 196:126-8. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2016.10.023>.
143. Khan, M.Z., Khan, A. (Basic facts of mastitis in dairy animals: A review). *Pakistan veterinary journal*. 2006. 26:204.
144. Mullarky, I.K., Su, C., Frieze, N., Park, Y.H., Sordillo, L.M. (*Staphylococcus aureus* agr Genotypes with Enterotoxin Production Capabilities Can Resist Neutrophil Bactericidal Activity). *Infection and Immunity*. 2001. 69:45. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.1.45-51.2001>.
145. Erskine, R.J., Wagner, S., DeGraves, F.J. (Mastitis therapy and pharmacology). *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*. 2003. 19:109-38. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(02\)00067-1](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(02)00067-1).
146. Tomazi, T., de Souza Filho, A.F., Heinemann, M.B., dos Santos, M.V. (Molecular characterization and antimicrobial susceptibility pattern of *Streptococcus agalactiae* isolated from clinical mastitis in dairy cattle). *PLoS ONE*. 2018. 13:e0199561. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0199561>.
147. Rato, M.G., Bexiga, R., Florindo, C., Cavaco, L.M., Vilela, C.L., Santos-Sanches, I. (Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of streptococci from bovine mastitis). *Veterinary microbiology*. 2013. 161:286-94. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2012.07.043>.

148. Dogan, B., Schukken, Y.H., Santisteban, C., Boor, K.J. (Distribution of Serotypes and Antimicrobial Resistance Genes among *Streptococcus agalactiae* Isolates from Bovine and Human Hosts). *Journal of Clinical Microbiology*. 2005. 43:5899. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.12.5899-5906.2005>.
149. Vardanyan, R.S., Hruby, V.J. (Antibiotics). *Synthesis of Essential Drugs*. 2006:425-98. <https://doi.org/10.1016/B978-044452166-8/50032-7>.
150. Persson, Y., Katholm, J., Landin, H., Mörk, M.J. (Efficacy of enrofloxacin for the treatment of acute clinical mastitis caused by *Escherichia coli* in dairy cows). *The Veterinary record*. 2015. 176:673. <https://doi.org/10.1136/VR.102667>.
151. Quinn, P.J., Markey, B.K., Leonard, F.C., Hartigan, P., Fanning, S., Fitzpatrick, Es. (Veterinary microbiology and microbial disease). John Wiley & Sons. 2011.
152. Burvenich, C., Van Merris, V., Mehrzad, J., Diez-Fraile, A., Duchateau, L. (Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors). *Veterinary research*. 2003. 34:521-64. <https://doi.org/10.1051/VETRES:2003023>.
153. Menzies, F.D., Bryson, D.G., McCallion, T., Matthews, D.I. (A study of mortality among suckler and dairy cows in Northern Ireland in 1992). *The Veterinary record*. 1995. 137:531-6. <https://doi.org/10.1136/VR.137.21.531>.
154. Burvenich, C., Van Merris, V., Mehrzad, J., Diez-Fraile, A., Duchateau, L. (Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors). *Veterinary Research*. 2003. 34:521-64. <https://doi.org/10.1051/VETRES:2003023>.
155. Bradley, A.J., Green, M.J. (A study of the incidence and significance of intramammary enterobacterial infections acquired during the dry period). *Journal of dairy science*. 2000. 83:1957-65. [https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302\(00\)75072-7](https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302(00)75072-7).
156. Nunes, S.F., Bexiga, R., Cavaco, L.M., Vilela, C.L. (Technical Note: Antimicrobial Susceptibility of Portuguese Isolates of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in Subclinical Bovine Mastitis). *Journal of Dairy Science*. 2007. 90:3242-6. <https://doi.org/10.3168/JDS.2006-739>.
157. Rajala-Schultz, P.J., Smith, K.L., Hogan, J.S., Love, B.C. (Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens from first lactation and older cows). *Veterinary Microbiology*. 2004. 102:33-42. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2004.04.010>.
158. Lafta, M.H. (Acute Buffalo mastitis cause by mixed infection of *Enterobacter cloacae* and *Proteus mirabilis* at Basrah, Iraq). *Basrah Journal of Veterinary Research*. 2020. 19:130-41. <https://doi.org/10.23975/BJVETR.2020.174160>.

159. Schukken, Y., Chuff, M., Moroni, P., Gurjar, A., Santisteban, C., Welcome, F., Zadoks, R. (The “Other” Gram-Negative Bacteria in Mastitis: *Klebsiella*, *Serratia*, and More). *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 2012. 28:239-56. <https://doi.org/10.1016/J.CVFA.2012.04.001>.
160. Alves, J.S., de Moura Souza, R., Lima Moreira, J.P. de, Gonzalez, A.G.M. (Antimicrobial resistance of Enterobacteriaceae and *Staphylococcus* spp. isolated from raw cow’s milk from healthy, clinical and subclinical mastitis udders). *Preventive Veterinary Medicine*. 2024. 227:106205. <https://doi.org/10.1016/J.PREVETMED.2024.106205>.
161. Kim, S.H., Wei, C.I. (Expression of AmpC beta-lactamase in *Enterobacter cloacae* isolated from retail ground beef, cattle farm and processing facilities). *Journal of applied microbiology*. 2007. 103:400-8. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.2006.03255.X>.
162. Waade, J., Seibt, U., Honscha, W., Rachidi, F., Starke, A., Speck, S., Truyen, U. (Multidrug-resistant enterobacteria in newborn dairy calves in Germany). *PLoS ONE*. 2021. 16:e0248291. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0248291>.
163. Denissen, J., Reyneke, B., Waso-Reyneke, M., Havenga, B., Barnard, T., Khan, S., Khan, W. (Prevalence of ESKAPE pathogens in the environment: Antibiotic resistance status, community-acquired infection and risk to human health). *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2022. 244:114006. <https://doi.org/10.1016/J.IJHEH.2022.114006>.
164. Massé, J., Dufour, S., Archambault, M. (Characterization of *Klebsiella* isolates obtained from clinical mastitis cases in dairy cattle). *Journal of Dairy Science*. 2020. 103:3392-400. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17324>.
165. Vuotto, C., Longo, F., Balice, M.P., Donelli, G., Varaldo, P.E. (Antibiotic Resistance Related to Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae*). *Pathogens (Basel, Switzerland)*. 2014. 3:743-58. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS3030743>.
166. Schönborn, S., Wentz, N., Paduch, J.H., Krömker, V. (In vitro ability of mastitis causing pathogens to form biofilms). *The Journal of dairy research*. 2017. 84:198-201. <https://doi.org/10.1017/S0022029917000218>.
167. Amako, K., Meno, Y., Takade, A. (Fine structures of the capsules of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* K1). *Journal of bacteriology*. 1988. 170:4960-2. <https://doi.org/10.1128/JB.170.10.4960-4962.1988>.
168. Podschun, R., Ullman, U. (*Klebsiella* capsular type K7 in relation to toxicity, susceptibility to phagocytosis and resistance to serum). *Journal of medical microbiology*. 1992. 36:250-4. <https://doi.org/10.1099/00222615-36-4-250>.

169. Williams, P., Lambert, P.A., Brown, M.R.W., Jones, R.J. (The role of the O and K antigens in determining the resistance of *Klebsiella aerogenes* to serum killing and phagocytosis). *Journal of general microbiology*. 1983. 129:2181-91. <https://doi.org/10.1099/00221287-129-7-2181>.
170. Oliveira, L., Hlland, C., Ruegg, P.L. (Characterization of clinical mastitis occurring in cows on 50 large dairy herds in Wisconsin). *Journal of dairy science*. 2013. 96:7538-49. <https://doi.org/10.3168/JDS.2012-6078>.
171. Fuenzalida, M.J., Ruegg, P.L. (Negatively controlled, randomized clinical trial to evaluate intramammary treatment of nonsevere, gram-negative clinical mastitis). *Journal of dairy science*. 2019. 102:5438-57. <https://doi.org/10.3168/JDS.2018-16156>.

## ANEXOS

## ANEXO 1. PRUEBAS DE CAMPO

## 1. Prueba de campo Fundo Otuzco

VACA	RAZA	TIPO DE MASTITIS	PRUEBA DE CMT			
			CUARTOS AFECTADOS	# DE CRUCES	CUARTO TOMADO	OBSERVACIONES
NOELIA	HOLSTEIN	SubClinica	2 Anteriores y posterior izquierda	Anterior derecha + Anterior izquierda ++ Posterior izquierda +	Anterior izquierda ++	Sin antibioticos
MARCELA	HOLSTEIN	SubClinica	Posterior izquierda	Posterior izquierda +	Posterior izquierda +	Sin antibioticos
MILAGROS	HOLSTEIN	SubClinica	2 Anteriores y 2 posteriores	2 Anteriores ++ Posterior izquierda ++ Posterior derecha +++	Posterior derecha +++	Sin antibioticos
LULU	CRIOLLA	SubClinica	2 Anteriores y 2 posteriores	Anterior derecha + Anterior izquierda ++ Posterior derecha + Posterior izquierda +	Anterior izquierda ++	Sin antibioticos
MULATA	HOLSTEIN	SubClinica	2 Anteriores y 2 posteriores	Anterior derecha +++ Anterior izquierda + Posterior derecha +++ Posterior izquierda +++	Anterior derecha +++	Sin antibioticos
LIDIA	CRIOLLA	SubClinica	2 Anteriores y 2 posteriores	Anterior derecha ++ Anterior izquierda + Posterior derecha ++ Posterior izquierda +	Posterior derecha ++	Sin antibioticos
EMILIA	BROWN SWISS	SubClinica	2 Posteriores	Posterior derecha +++ Posterior izquierda ++	Posterior derecha +++	Sin antibioticos
NANCY	CRIOLLA	SubClinica	2 Anteriores y 2 posteriores	Anterior derecha + Anterior izquierda + Posterior derecha + Posterior izquierda ++	Posterior izquierda ++	Sin antibioticos
JULIA	HOLSTEIN	SubClinica	Posterior derecha	Posterior derecha ++	Posterior derecha ++	Sin antibioticos
LUCIA	HOLSTEIN	SubClinica	2 Anteriores y 2 posteriores	Anterior derecha ++ Anterior izquierda + Posterior derecha + Posterior izquierda +	Anterior derecha ++	Sin antibioticos
NEGRA	CRIOLLA	SubClinica	2 Anteriores y 2 posteriores	Anterior derecha +++ Anterior izquierda +++ Posterior derecha ++ Posterior izquierda +	Anterior derecha +++	Sin antibioticos
RUTH	HOLSTEIN	SubClinica	Anterior derecha y 2 posteriores	Anterior derecha + Posterior derecha ++ Posterior izquierda ++	Posterior izquierda ++	Sin antibioticos
DALIA	HOLSTEIN	SubClinica	2 Anteriores y 2 posteriores	Anterior derecha ++ Anterior izquierda ++ Posterior derecha ++ Posterior izquierda ++	Anterior derecha ++	Sin antibioticos

ALEXA	HOLSTEIN	SubClinica	2 Anteriores y 2 posteriores	Anterior derecha ++ Anterior izquierda + Posterior derecha + Posterior izquierda ++	Anterior derecha ++	Sin antibioticos
BLANCA FLOR	BROWN SWISS	SubClinica	Anterior izquierda y 2 posteriores	Anterior izquierda +++ Posterior derecha ++ Posterior izquierda ++	Anterior izquierda +++	Sin antibioticos
MALENA	HOLSTEIN	SubClinica	2 Anteriores y 2 posteriores	Anterior derecha + Anterior izquierda + Posterior derecha ++ Posterior izquierda +	Posterior derecha ++	Sin antibioticos
CALY	CRIOLLA	SubClinica	Anterior izquierda y posterior derecha	Anterior izquierda ++ Posterior derecha +	Anterior izquierda ++	Sin antibioticos
JENY	HOLSTEIN	SubClinica	Anterior izquierda	Anterior izquierda ++	Anterior izquierda ++	Sin antibioticos
NORA	CRIOLLA	SubClinica	2 Anteriores y posterior izquierda	Anterior derecha ++ Anterior izquierda + Posterior izquierda +++	Posterior izquierda +++	Sin antibioticos
GREYCI	CRIOLLA	SubClinica	Anterior izquierda y posterior izquierda	Anterior izquierda + Posterior izquierda +	Anterior izquierda +	Sin antibioticos

## 2. Prueba de campo Fundo CEA La Victoria

VACA	RAZA	TIPO DE MASTITIS	PRUEBA DE CMT			
			CUARTOS AFECTADOS	# DE CRUCES	CUARTO TOMADO	OBSERVACIONES
MELA	CRIOLLA	SubClinica	Anterior derecha	Anterior derecha +	Anterior derecha +	Sin antibiotico
LENA	HOLSTEIN	SubClinica	Posterior izquierda	Posterior izquierda +	Posterior izquierda +	Sin antibiotico
ARIANA	HOLSTEIN	SubClinica	2 Anteriores	Anterior derecha + Anterior izquierda ++	Anterior izquierda ++	Sin antibiotico
ROSA	HOLSTEIN	SubClinica	2 Anteriores y 2 posteriores	Anterior derecha +++ Anterior izquierda +++ Posterior derecha + Posterior izquierda +	Anterior derecha +++	Sin antibiotico
ELA	CRIOLLA	SubClinica	2 Anteriores y 2 posteriores	Anterior derecha +++ Anterior izquierda + Posterior derecha + Posterior izquierda +	Anterior derecha +++	Sin antibiotico
OLGA	HOLSTEIN	SubClinica	Anterior derecha	Anterior derecha +	Anterior derecha +	Sin antibiotico
2130	HOLSTEIN	SubClinica	2 Anteriores y 2 posteriores	Anterior derecha +++ Anterior izquierda + Posterior derecha +++ Posterior izquierda +	Anterior derecha +++	Suministrando CEFALEXINA
FABI	HOLSTEIN	SubClinica	Anterior derecha	Anterior derecha +	Anterior derecha +	Sin antibiotico
FLOR	HOLSTEIN	SubClinica	2 Anteriores y 2 posteriores	Anterior derecha + Anterior izquierda + Posterior derecha +++ Posterior izquierda +++	Posterior derecha +++	Sin antibiotico
ANA	HOLSTEIN	SubClinica	Posterior derecha	Posterior derecha +++	Posterior derecha +++	Suministrando CEFALEXINA
NURI	BROWN SWISS	SubClinica	Anterior izquierda	Anterior izquierda +	Anterior izquierda +	Sin antibiotico
21422	HOLSTEIN	SubClinica	2 Anteriores	Anterior derecha +++ Anterior izquierda +++	Anterior izquierda +++	Sin antibiotico
21230	HOLSTEIN	SubClinica	Anterior derecha	Anterior derecha ++	Anterior derecha ++	Sin antibiotico

2151	HOLSTEIN	SubClinica	2 Anteriores y 2 posteriores	Anterior derecha +++ Anterior izquierda ++ Posterior derecha ++ Posterior izquierda ++	Anterior derecha +++	Sin antibiotico
2155	HOLSTEIN	SubClinica	2 Anteriores y 2 posteriores	Anterior derecha +++ Anterior izquierda +++ Posterior derecha + Posterior izquierda +	Anterior derecha +++	Sin antibiotico
KARLY	BROWN SWISS	SubClinica	2 Anteriores y 2 posteriores	Anterior derecha +++ Anterior izquierda ++ Posterior derecha +++ Posterior izquierda +++	Anterior derecha +++	Sin antibiotico
CIELO	BROWN SWISS	SubClinica	2 Anteriores y 2 posteriores	Anterior derecha + Anterior izquierda +++ Posterior derecha +++ Posterior izquierda +	Anterior izquierda +++	Sin antibiotico
2246	HOLSTEIN	SubClinica	2 Anteriores y posterior derecho	Anterior derecha + Anterior izquierda + Posterior derecha ++	Posterior derecha ++	Sin antibiotico
NORA	HOLSTEIN	SubClinica	2 Anteriores y 2 posteriores	Anterior derecha ++ Anterior izquierda ++ Posterior derecha +++ Posterior izquierda +++	Posterior izquierda +++	Sin antibiotico
MAJU	HOLSTEIN	SubClinica	2 Anteriores y posterior izquierda	Anterior derecha ++ Anterior izquierda +++ Posterior izquierda +++	Anterior izquierda +++	Sin antibiotico

### 3. Prueba de campo Fundo Betania

VACA	RAZA	TIPO DE MASTITIS	PRUEBA DE CMT			
			CUARTOS AFECTADOS	# DE CRUCES	CUARTO TOMADO	OBSERVACIONES
FLOR	HOLSTEIN	SubClinica	2 Anteriores y posterior izquierda	Anterior derecha + Anterior izquierda + Posterior izquierda ++	Posterior izquierda ++	x
CHINA	HOLSTEIN	SubClinica	2 Anteriores y 2 posteriores	Anterior derecha ++ Anterior izquierda +++ Posterior derecha +++ Posterior izquierda +++	Posterior derecha +++	x
6317	HOLSTEIN	SubClinica	2 Anteriores y 2 posteriores	Anterior derecha ++ Anterior izquierda +++ Posterior derecha + Posterior izquierda +++	Posterior izquierda +++	x
CELIA	HOLSTEIN	SubClinica	2 Posteriores	Posterior derecha ++ Posterior izquierda +	Posterior derecha ++	x
6312	HOLSTEIN	SubClinica	2 Anteriores y 2 posteriores	Anterior derecha + Anterior izquierda + Posterior derecha +++ Posterior izquierda ++	Posterior derecha +++	x
6325	HOLSTEIN	SubClinica	2 Anteriores y 2 posteriores	Anterior derecha +++ Anterior izquierda ++ Posterior derecha +++ Posterior izquierda +++	Posterior izquierda +++	x
KEIKO	HOLSTEIN	SubClinica	2 Anteriores y 2 posteriores	Anterior derecha ++ Anterior izquierda +++ Posterior derecha +++ Posterior izquierda ++	Posterior derecha +++	x
MAYA	HOLSTEIN	SubClinica	Anterior izquierda y posterior derecha	Anterior izquierda +++ Posterior derecha +	Anterior izquierda +++	Sin cuarto posterior izquierdo.
FLACA	HOLSTEIN	SubClinica	Anterior derecha y 2 posteriores	Anterior derecha +++ Posterior derecha +++ Posterior izquierda +++	Posterior izquierda +++	Cuarto anterior izquierdo no funcional.
JUANA	HOLSTEIN	SubClinica	2 Anteriores y 2 posteriores	Anterior derecha + Anterior izquierda +++ Posterior derecha +++ Posterior izquierda +++	Anterior izquierda +++	x
LOLA	HOLSTEIN	SubClinica	2 Anteriores y posterior izquierda	Anterior derecha + Anterior izquierda + Posterior izquierda ++	Posterior izquierda ++	x
DALIA	HOLSTEIN	SubClinica	2 Anteriores	Anterior derecha ++ Anterior izquierda +	Anterior derecha ++	x
6319	HOLSTEIN	SubClinica	2 Anteriores y 2 posteriores	Anterior derecha +++ Anterior izquierda +++ Posterior derecha +++ Posterior izquierda +	Posterior derecha +++	x

6280	HOLSTEIN	SubClinica	Anterior derecha	Anterior derecha +	Anterior derecha +	x
PRECIOSA	HOLSTEIN	SubClinica	Anterior izquierda y posterior derecha	Anterior izquierda +++ Posterior derecha +++	Anterior izquierda +++	x
1063	HOLSTEIN	SubClinica	2 Anteriores y 2 posteriores	Anterior derecha ++ Anterior izquierda ++ Posterior derecha +++ Posterior izquierda +++	Posterior derecha +++	x
6314	HOLSTEIN	SubClinica	Posterior izquierda	Posterior izquierda +	Posterior izquierda +	x
URSULA	HOLSTEIN	SubClinica	2 Anteriores y 2 posteriores	Anterior derecha ++ Anterior izquierda ++ Posterior derecha ++ Posterior izquierda ++	Posterior izquierda ++	x
DULCINEA	HOLSTEIN	SubClinica	Posterior izquierda	Posterior izquierda +	Posterior izquierda +	x
10601	BROWN SWISS	SubClinica	posterior izquierda	Posterior izquierda +	Posterior izquierda +	x

#### 4. Prueba de campo Fundo Tartar

VACA	RAZA	TIPO DE MASTITIS	PRUEBA DE CMT			
			CUARTOS AFECTADOS	# DE CRUCES	CUARTO TOMADO	OBSERVACIONES
MILI	HOLSTEIN	SubClinica	1 Anteriores y 2 posteriores	Anterior izquierda ++ Posterior izquierda + Posterior izquierda ++	Anterior izquierda ++	x
NIVIA	HOLSTEIN	SubClinica	2 Anteriores y 2 posteriores	Anterior derecha + Anterior izquierda ++ Posterior derecha + Posterior izquierda +	Anterior izquierda ++	x
JULIA	HOLSTEIN	SubClinica	2 Anteriores y 2 posteriores	Anterior derecha +++ Anterior izquierda ++ Posterior derecha ++ Posterior izquierda ++	Anterior derecha +++	x
JOVINA	HOLSTEIN	SubClinica	2 Anteriores y 2 posteriores	Anterior derecha +++ Anterior izquierda + Posterior derecha + Posterior izquierda +	Anterior derecha +++	x
JUANA	HOLSTEIN	SubClinica	2 Anteriores y 1 posteriores izquierda	Anterior derecha +++ Anterior izquierda +++ Posterior izquierda +++	Posterior izquierda +++	cuarto posterior derecha no funcional
NINA	HOLSTEIN	SubClinica	2 Anteriores y 2 posteriores	Anterior derecha +++ Anterior izquierda ++ Posterior derecha +++ Posterior izquierda +++	Posterior izquierda +++	x
JAIRA	HOLSTEIN	SubClinica	2 Anteriores y 2 posteriores	Anterior derecha + Anterior izquierda + Posterior derecha ++ Posterior izquierda +++	Posterior izquierda +++	x
MARÍA	HOLSTEIN	SubClinica	2 Anteriores y 2 posteriores	Anterior derecha +++ Anterior izquierda +++ Posterior derecha + Posterior izquierda +++	Posterior derecha +	x
EMILY	HOLSTEIN	SubClinica	Anterior izquierda y posterior posteriores	Anterior izquierda + Posterior izquierda ++	Posterior izquierda ++	x
DINA	HOLSTEIN	SubClinica	2 Anteriores y 2 posteriores	Anterior derecha + Anterior izquierda + Posterior derecha +++ Posterior izquierda ++	Anterior derecha +++	x
JELY	HOLSTEIN	SubClinica	2 Anteriores y 2 posterior	Anterior derecha ++ Anterior izquierda ++ Posterior derecha ++ Posterior izquierda +++	Posterior izquierda +++	x
MARTA	HOLSTEIN	SubClinica	2 Anteriores y posterior izquierda	Anterior derecha + Anterior izquierda + Posterior izquierda +++	Posterior izquierda +++	cuarto posterior derecha no tiene leche
FERIA	HOLSTEIN	SubClinica	2 Anteriores y 2 posteriores	Anterior derecha + Anterior izquierda + Posterior derecha ++ Posterior izquierda ++	Posterior izquierda +++	x

MIRIAM	HOLSTEIN	SubClinica	2 Anteriores y 2 posteriores	Anterior derecha + Anterior izquierda +++ Posterior derecha + Posterior izquierda +	Anterior izquierda +++	x
NILA	HOLSTEIN	SubClinica	2 Anteriores	Anterior izquierda ++ Anterior derecha +++	Anterior derecha +++	no tiene leche en 2 cuartos posteriores
213-2	HOLSTEIN	SubClinica	Anterior izquierda	Anterior izquierda +++	Anterior izquierda +++	x
218-14	HOLSTEIN	SubClinica	2 Anteriores y 2 Posteriores	Anterior derecha ++ Anterior izquierda ++ Posterior derecha +++ Posterior izquierda ++	Anterior derecha +++	x
217-10	HOLSTEIN	SubClinica	1Anteriores y 2 posteriores	Anterior izquierda + Posterior derecha +++ Posterior izquierda ++	Posterior derecha+++	x
213-1	HOLSTEIN	SubClinica	2 Anteriores y 2 Posteriores	Anterior derecha ++ Anterior izquierda +++	Anterior izquierda +++	x
Mar-20	HOLSTEIN	SubClinica	2 Anteriores	Anterior derecha ++ Anterior izquierda +++	Anterior izquierda +++	x

## 5. Prueba de campo Fundo La Victoria

VACA	RAZA	TIPO DE MASTITIS	PRUEBA DE CMT			
			CUARTOS AFECTADOS	# DE CRUCES	CUARTO TOMADO	OBSERVACIONES
SAUCELINA	HOLSTEIN	SubClinica	2 Anteriores y 2 posteriores	Anterior derecha +++ Anterior izquierda +++ Posterior derecha ++ Posterior izquierda +	Anterior derecha +++	Sin antibiotico
921	HOLSTEIN	SubClinica	2 Anteriores y 2 posteriores	Anterior derecha ++ Anterior izquierda + Posterior derecha + Posterior izquierda +	Anterior derecha ++	Sin antibiotico
GENOVEVA	HOLSTEIN	SubClinica	2 Anteriores y 2 posteriores	Anterior derecha + Anterior izquierda ++ Posterior derecha +++ Posterior izquierda ++	Posterior derecha +++	Sin antibiotico
BELÉN	HOLSTEIN	SubClinica	Posterior izquierda	Posterior izquierda +	Posterior izquierda +	Sin antibiotico
SALOME	CRIOLLA	SubClinica	Anterior izquierda	Anterior izquierda ++	Anterior izquierda ++	Sin antibiotico
ALFONCINA	HOLSTEIN	SubClinica	2 anteriores y 1 posterior derecha	Anterior derecha + Anterior izquierda + Posterior derecha +	Anterior derecha +	Sin antibiotico
ESPAÑOLA	HOLSTEIN	SubClinica	1 anterior derecha y 2 posteriores	Anterior izquierda +++ Posterior derecha + Posterior izquierda +++	Posterior izquierda +++	Sin antibiotico
LUZ MARINA	CRIOLLA	SubClinica	2 Anteriores y 2 posteriores	Anterior derecha +++ Anterior izquierda + Posterior derecha ++ Posterior izquierda +++	Anterior derecha +++	Sin antibiotico
LLUVIA	HOLSTEIN	SubClinica	Anterior izquierda y posterior izquierda	Anterior izquierda + Posterior izquierda +++	Posterior izquierda +++	Sin antibiotico
SIN NOMBRE 1	HOLSTEIN	SubClinica	Posterior derecha	Posterior derecha +	Posterior derecha +	Sin antibiotico
FORTACHONA	BROWN SWISS	SubClinica	Posterior izquierda	Posterior izquierda +	Posterior izquierda +	Sin antibiotico
SIN NOMBRE 2	HOLSTEIN	SubClinica	Posterior izquierda	Posterior izquierda +	Anterior izquierda +++	Sin antibiotico
VAINILLA	BROWN SWISS	SubClinica	Posterior derecha	Posterior derecha	Anterior derecha ++	Sin antibiotico

<i>BITER</i>	BROWN SWISS	SubClinica	2 Anteriores y 2 posteriores	Anterior derecha + Anterior izquierda ++ Posterior derecha + Posterior izquierda +++	Posterior izquierda +++	Sin antibiotico
<i>TELMA</i>	HOLSTEIN	SubClinica	Anterior derecha	Anterior derecha ++	Anterior derecha ++	Sin antibiotico
<i>MAR</i>	BROWN SWISS	SubClinica	1 Anterior izquierda y 1 posterior izquierda	Anterior izquierda +++ Posterior izquierda +++	Anterior izquierda +++	Sin antibiotico
<i>PERUANA</i>	BROWN SWISS	SubClinica	2 Posteriores	Posterior derecha ++ Posterior izquierda ++	Posterior derecha ++	Sin antibiotico
<i>PASCUALA</i>	HOLSTEIN	SubClinica	1 anterior derecha y 2 posteriores	Anterior derecha +++ Anterior izquierda ++ Posterior derecha +	Anterior derecha +++	Sin antibiotico
<i>AMELY</i>	HOLSTEIN	SubClinica	1 Anterior izquierda y 1 posterior izquierda	Anterior izquierda +++ Posterior izquierda +++	Anterior izquierda +++	Sin antibiotico
<i>MARGARITA</i>	HOLSTEIN	SubClinica	1 Anterior izquierda y 2 posteriores	Anterior izquierda +++ Posterior izquierda +++ Posterior derecha +++	Posterior derecha +++	Sin antibiotico

## ANEXO 2. Resultados de crecimiento bacteriano

## 1. Crecimiento bacteriano en muestras del Fundo Otuzco

CÓDIGO VACA	COLONIAS					
	# COLONIAS EN MEDIOS			FORMAY COLOR		
	AGAR McCONKEY	AGAR SANGRE	AGAR STAPYLOCOCO	AGAR McCONKEY	AGAR SANGRE	AGAR STAPYLOCOCO
NOE 1	X	1	1	X	Blanco pequeño	Blanco pequeño
MAR 2	X	2	1	X	A: Transparente grande. B: Blanco pequeño.	Blanco pequeño
MIL 3	X	1	1	X	Blanco pequeño	Blanco pequeño
LU 4	X	1	1	X	Blanco pequeño	Blanco pequeño
MUL 5	1	1	1	Morado pequeño	Morada pequeña	Blanco pequeño
LID 6	X	1	1	X	Blanco pequeño	Blanco pequeño
EMI 7	X	1	1	X	Blanco pequeño	Blanco pequeño
NAN 8	1	2	1	Morado pequeño	A: Amarillo pequeño. B: blanco pequeño.	Blanco pequeño
JUL 9	X	1	1	X	Blanco pequeño	Blanco pequeño
LUCI 10	X	2	1	X	A: Amarillo grande. B: Transparente mediano.	Blanco pequeño
NEL 11	X	2	1	X	A: Amarillo pequeño. B: Blanco pequeño.	Blanco pequeño
RU 12	X	1	1	X	Blanco pequeño	Blanco pequeño
DALI 13	1	1	1	Morado pequeño	A: Blanco pequeño B: Blanco pequeño	Blanco pequeño
ALE 14	X	2	1	X	A: Rosado grande. B: Blanco pequeño.	Blanco pequeño
BF 15	1	2	1	Morado grande	A: Amarillo pequeño. B: Grande rosa	Blanco pequeño
MAL 16	X	2	1	X	A: Amarillo grande. B: Blanco grande	Blanco pequeño
CAL 17	X	2	1	X	A: Armarillo pequeño. B: Blanco grande.	Blanco pequeño
JEN 18	1	1	X	Morado grande	Blanco pequeño B: Morado grande	Blanco pequeño
NOR 19	X	1	X	X	Blanco pequeño	x
GREY 20	X	1	X	X	Blanco pequeño	x

## 2. Crecimiento bacteriano en muestras del Fundo CAE La Victoria

CÓDIGO VACA	COLONIAS					
	# COLONIAS EN MEDIOS			FORMAY COLOR		
	AGAR McCONKEY	AGAR SANGRE	AGAR STAPYLOCOCO	AGAR McCONKEY	AGAR SANGRE	AGAR STAPYLOCOCO
MEL 1	x	x	1	x	x	Blanco pequeño
LEN 2	x	1	1	x	Blanco pequeño	Blanco pequeño
ARI 3	x	2	1	x	A: Blanco pequeño B: Blanco grande.	Blanco pequeño
ROSS 4	x	1	1	x	Blanco pequeño	Blanco pequeño
EL 5	x	3	1	x	A: Pequeño blanco. B: Blanco pequeño Hemolisis. C: Blanco grande.	Blanco pequeño
OL 6	x	1	1	x	Blanco pequeño	Blanco pequeño
2130	x	2	1	x	A: Blanco pequeño. B: Grande blanco.	Blanco pequeño
FAB 8	x	2	1	x	A: Blanco pequeño B: Grande blanco.	Blanco pequeño
FLO 9	x	2	1	x	A: Blanco pequeño B: Pequeño blanquiceleste	Blanco pequeño
ANA 10	x	2	1	x	A: Pequeña blanca. B: Pequeña blanquiceleste	Blanco pequeño
NU11	x	1	1	x	Blanco pequeño	Blanco pequeño
21422	x	2	1	x	A: Blanco pequeño B: Grande blanco con hemolisis.	Blanco pequeño
21230	1	1	1	Morado pequeño	A: Blanco pequeño B: Blanco pequeño	Blanco mediano
2151	x	1	1	x	Blanco pequeño	Blanco pequeño
2155	1	1	1	Morado pequeño	Blanco pequeño	Blanco pequeño
CARLI 16	x	1	X	x	Blanco pequeño	x
CIEL 17	1	x	1	Morado grande	x	Blanco pequeño
2246	x	1	1	x	Blanco pequeño	Blanco pequeño
NOR 19	x	1	1	x	Blanco pequeño	Blanco pequeño
MAJO 20	x	2	1	x	A: Blanco pequeño. B: Pequeño amarillo.	Blanco pequeño

### 3. Crecimiento bacteriano en muestras del Fundo Betania

CÓDIGO VACA	COLONIAS					
	# COLONIAS EN MEDIOS			FORMAY COLOR		
	AGAR McCONKEY	AGAR SANGRE	AGAR STAPYLOCOCO	AGAR McCONKEY	AGAR SANGRE	AGAR STAPYLOCOCO
FLOR	x	1	1	x	Blanco pequeño	Blanco pequeño
CHINA	x	1	x	x	Blanco pequeño	x
6317	1	2	1	Morado pequeño	A: Amarillo pequeño B: blanco pequeño	Blanco pequeño
CELIA	1	2	1	Morado pequeño	A: Amarillo pequeño B: blanco pequeño	Blanco pequeño
6312	x	1	1	x	blanco mediano	Blanco pequeño
6325	x	1	1	x	blanco grande	Blanco pequeño
KEIKO	X	2	1	X	A: Blanco pequeño B: Blanco grande	Blanco pequeño
MAYA	x	1	1	x	blanco grande	Blanco pequeño
FLACA	1	2	1	Morado mediano	A: blanco mediano B: Blanco pequeño	Blanco pequeño
JUANA	x	1	1	x	Blanco pequeño	Blanco pequeño
LOLA	1	2	1	Morado pequeño	A: blanco pequeño B: Amarillo pequeño	Blanco pequeño
DALIA	x	1	1	x	Blanco pequeño	Blanco pequeño
6319	1	2	1	Morado pequeño	A: Blanco grande B: Amarillo pequeñ	Blanco pequeño
6280	x	1	1	x	Blanco pequeño	Blanco pequeño
PRECIOSA	1	2	1	Morado pequeño	A: Blanco pequeño B: Amarillo pequeño	Blanco pequeño
1063	x	1	1	x	Blanco mediano	Blanco pequeño
6314	x	1	1	x	Blanco grande	Blanco pequeño
URSULA	x	1	1	x	Blanco pequeño	Blanco pequeño
DULCINEA	x	1	2	x	Blanco grande	A: Blanco pequeño B: Blanco pequeño
10601	x	1	x	x	Blanco grande	X

#### 4. Crecimiento bacteriano en muestras del Fundo Tartar

CÓDIGO VACA	COLONIAS					
	# COLONIAS EN MEDIOS			FORMAY COLOR		
	AGAR McCONKEY	AGAR SANGRE	AGAR STAPYLOCOCO	AGAR McCONKEY	AGAR SANGRE	AGAR STAPYLOCOCO
MIL1	1	1	x	Morado pequeño	Blanco pequeño	Blanco pequeño
NIV2	1	1	1	Morado pequeño	Blanco pequeño	Blanco pequeño
JU3	1	2	1	Morado grande	A: Blanco pequeño B: Grande blanca	Blanco pequeño
JOV4	x	1	1	x	Blanco pequeño	Blanco pequeño
JUA5	x	1	1	x	Blanco pequeño	Blanco pequeño
NI6	1	1	1	Morado grande	Blanco pequeño	Blanco pequeño
JAI7	1	1	1	Morado grande	Blanco pequeño	Blanco pequeño
MAR8	1	1	1	Morado grande	Blanco pequeño	Blanco pequeño
EMI9	x	1	1	x	Blanco pequeño	Blanco pequeño
DI10	x	2	1	x	A: Blanco pequeño B: Amarillo mediano	Blanco pequeño
JEL11	x	1	1	x	Blanco pequeño	Blanco pequeño
MAR12	x	1	1	x	Blanco pequeño	Blanco pequeño
FE13	x	2	1	x	A: Blanco pequeño B: Amarillo mediano	Blanco pequeño
MIR14	1	1	1	Morado pequeño	Blanco pequeño	Blanco pequeño
NI15	1	1	1	Morado pequeño	Blanco pequeño	Blanco pequeño
213-2	1	1	1	Morado pequeño	Blanco pequeño	Blanco pequeño
218-14	1	2	1	Morado pequeño	A: Blanco pequeño B: Amarillo mucosa grande	Blanco pequeño
217-10	1	2	1	Morado grande	A: Blanco pequeño B: Amarillo mucosa grande	Blanco pequeño
213-1	x	1	1	x	Blanco pequeño	Blanco pequeño
MAR20	x	1	1	x	Blanco pequeño	Blanco pequeño

## 5. Crecimiento bacteriano en muestras del Fundo La Victoria

CÓDIGO VACA	COLONIAS					
	# COLONIAS EN MEDIOS			FORMAY COLOR		
	AGAR McCONKEY	AGAR SANGRE	AGAR STAPYLOCOCO	AGAR McCONKEY	AGAR SANGRE	AGAR STAPYLOCOCO
SAUCELINA	x	1	1	x	Blanco pequeño	Blanco pequeño
921	x	1	1	x	Blanco pequeño	Blanco pequeño
GENOVEVA	2	1	1	A: Blanco mediano B: Morado grande	Blanco pequeño	Blanco pequeño
BELEN	x	1	1	x	Blanco pequeño	Blanco pequeño
SALOME	x	1	x	x	Amarillo grande	x
ALFONCINA	x	1	1	x	Blanco pequeño	Blanco pequeño
ESPAÑOLA	x	1	1	x	Blanco pequeño	Blanco pequeño
LUS MARINA	x	1	1	x	Blanco pequeño	Blanco pequeño
LLUVIA	1	1	1	Morado pequeño	Blanco pequeño	Blanco pequeño
SIN NOMBRE1	x	1	1	x	Blanco pequeño	Blanco pequeño
FORTACHONA	x	1	x	x	Blanco pequeño	x
SIN NOMBRE2	x	1	1	x	Blanco pequeño	Blanco pequeño
VAINILLA	x	1	1	x	Blanco pequeño	Blanco pequeño
BITER	x	1	x	x	Blanco pequeño	x
TELMA	x	1	1	x	Blanco pequeño	Blanco pequeño
MAR	x	1	1	x	Blanco pequeño	Blanco pequeño
PERUANA	x	1	1	x	Blanco pequeño	Blanco pequeño
PASCUALA	x	1	1	x	Blanco pequeño	Blanco pequeño
AMELY	x	2	x	x	A: Morado pequeño B: Amarillo mediano	x
MARGARITA	x	1	x	x	Blanco pequeño	X

## 6. Resultado cultivo bacteriológico Fundo Otuzco

VACA	CÓDIGO	RESULTADOS A CULTIVO BACTERIOLÓGICO					
		AGAR McCONKEY	AGAR SANGRE / HEMOLISIS			AGAR STAPYLOCOCO	
			RESULTADO PLACA	COL A	COL B		COL C
NOELIA	NOE 1	X	+	β hemolíticos	X	X	+
MARCELA	MAR 2	X	+	β hemolíticos	X	X	+
MILAGROS	MIL 3	X	+	β hemolíticos	X	X	+
LULU	LU 4	X	+	β hemolíticos	X	X	+
MULATA	MUL 5	+	+	β hemolíticos	γ hemolíticos	X	+
LIDIA	LID 6	X	+	β hemolíticos	X	X	+
EMILIA	EMI 7	X	+	α hemolíticos	X	X	+
NANCY	NAN 8	+	+	γ hemolíticos	X	X	+
JULIA	JUL 9	X	+	α hemolíticos	X	X	+
LUCIA	LUCI 10	X	+	β hemolíticos	X	X	+
NEGRA	NEL 11	X	+	γ hemolíticos	X	X	+
RUTH	RU 12	X	+	β hemolíticos	X	X	+
DALIA	DALI 13	+	+	α hemolíticos	β hemolíticos	X	+
ALEXA	ALE 14	X	+	β hemolíticos	X	X	+
BLANCA FLOR	BF 15	X	+	α hemolíticos	β hemolíticos	X	+
MALENA	MAL 16	X	+	β hemolíticos	X	X	+
CALY	CAL 17	X	+	α hemolíticos	X	X	+
JENY	JEN 18	X	+	γ hemolíticos	X	X	X
NORA	NOR 19	X	+	α hemolíticos	X	X	X
GREYCI	GREY 20	X	+	α hemolíticos	X	X	X

### 7. Resultado cultivo bacteriológico Fundo CAE La Victoria

VACA	CÓDIGO	RESULTADOS A CULTIVO BACTERIOLÓGICO					
		AGAR McCONKEY	AGAR SANGRE / HEMOLISIS			AGAR STAPYLOCOCO	
			RESULTADO PLACA	COL A	COL B		COL C
MELA	MEL 1	X	X	γ hemolíticos	X	X	+
LENA	LEN 2	X	+	β hemolíticos	X	X	+
ARIANA	ARI 3	X	+	β hemolíticos	X	X	+
ROSA	ROSS 4	X	+	β hemolíticos	x	X	+
ELA	EL 5	X	+	γ hemolíticos	α hemolíticos	gama hemolíticos	+
OLGA	OL 6	X	+	β hemolíticos	γ hemolíticos	X	+
2130	2130	X	+	β hemolíticos	α hemolíticos	X	+
FABI	FAB 8	X	+	β hemolíticos	γ hemolíticos	X	+
FLOR	FLO 9	X	+	β hemolíticos	γ hemolíticos	X	+
ANA	ANA 10	X	+	β hemolíticos	γ hemolíticos	X	+
NURI	NU11	X	+	β hemolíticos	X	X	+
21422	21422	X	+	β hemolíticos	γ hemolíticos	X	+
21230	21230	+	+	β hemolíticos	γ hemolíticos	X	+
2151	2151	X	+	γ hemolíticos	X	X	+
2155	2155	+	+	β hemolíticos	γ hemolíticos	X	+
KARLY	CARLI 16	X	+	β hemolíticos	X	X	+
CIELO	CIEL 17	+	+	γ hemolíticos	β hemolíticos	X	+
2246	2246	X	+	β hemolíticos	X	X	X
NORA	NOR 19	X	+	γ hemolíticos	X	X	+
MAJU	MAJO 20	X	+	β hemolíticos	α hemolíticos	X	+

### 8. Resultado cultivo bacteriológico Fundo Betania

VACA	CÓDIGO	RESULTADOS A CULTIVO BACTERIOLÓGICO					
		AGAR McCONKEY	AGAR SANGRE / HEMOLISIS			AGAR STAPYLOCOCO	
			RESULTADO PLACA	COL A	COL B		COL C
FLOR	FLO1	X	+	β hemolíticos	X	X	+
CHINA	CHI2	X	+	γ hemolítico	X	X	x
6317	6317	+	+	β hemolíticos	γ hemolítico	X	+
CELIA	CEL4	+	+	γ hemolítico	γ hemolítico	X	+
6312	6312	X	+	β hemolíticos	x	x	+
6325	6325	X	+	α hemolíticos	x	X	+
KEIKO	KEI7	X	+	α hemolíticos	β hemolíticos	X	+
MAYA	MAY8	X	+	β hemolíticos	x	X	+
FLACA	FLA9	+	+	β hemolíticos	γ hemolítico	X	+
JUANA	JUA10	X	+	β hemolíticos	x	X	+
LOLA	LO11	+	+	β hemolíticos	γ hemolítico	X	+
DALIA	DAL12	X	+	β hemolíticos	x	X	+
6319	6319	+	+	β hemolíticos	γ hemolítico	X	+
6280	6280	X	+	β hemolíticos	X	X	+
PRECIOSA	PRE15	+	+	β hemolíticos	γ hemolítico	X	+
1063	1063	X	+	β hemolíticos	X	X	+
6314	6314	X	+	γ hemolítico	β hemolíticos	X	+
URSULA	UR18	X	+	β hemolíticos	X	X	+
DULCINEA	DUL19	X	+	β hemolíticos	X	X	+
10601	10601	X	+	β hemolíticos	X	X	X

### 9. Resultado cultivo bacteriológico Fundo Tartar

VACA	CÓDIGO	RESULTADOS A CULTIVO BACTERIOLÓGICO					
		AGAR McCONKEY	AGAR SANGRE / HEMOLISIS			AGAR STAPYLOCOCO	
			RESULTADO PLACA	COL A	COL B		COL C
MILI	MIL1	+	+	γ hemolítico	X	X	x
NIVIA	NIV2	+	+	γ hemolítico	β hemolíticos	X	+
JULIA	JU3	+	+	γ hemolítico	γ hemolítico	X	+
JOVINA	JOV4	X	+	γ hemolítico	β hemolíticos	X	+
JUANA	JUA5	X	+	γ hemolítico	β hemolíticos	x	+
NINA	NI6	+	+	γ hemolítico	β hemolíticos	X	+
JAIRA	JAI7	+	+	γ hemolítico	β hemolíticos	X	+
MARIA	MAR8	+	+	α hemolíticos	β hemolíticos	X	+
EMILY	EMI9	X	+	α hemolíticos	β hemolíticos	X	+
DINA	DI10	X	+	α hemolíticos	α hemolíticos	X	+
JELY	JEL11	X	+	γ hemolítico	X	X	+
MARTA	MAR12	X	+	α hemolíticos	x	X	+
FERIA	FE13	X	+	β hemolíticos	β hemolíticos	X	+
MIRIAM	MIR14	+	+	γ hemolítico	X	X	+
NILA	NI15	+	+	γ hemolítico	β hemolíticos	X	+
213-2	213-2	+	+	γ hemolítico	β hemolíticos	X	+
218-14	218-14	+	+	γ hemolítico	γ hemolítico	X	+
217-10	217-10	+	+	γ hemolítico	γ hemolítico	X	X
213-1	213-1	X	+	β hemolíticos	x	X	+
MAR	MAR20	X	+	γ hemolítico	x	X	+

### 10. Resultado cultivo bacteriológico Fundo La Victoria

VACA	CÓDIGO	RESULTADOS A CULTIVO BACTERIOLÓGICO					
		AGAR McCONKEY	AGAR SANGRE / HEMOLISIS			AGAR STAPYLOCOCO	
			RESULTADO PLACA	COL A	COL B		COL C
SAUCELINA	SAU1	x	+	β hemolíticos	x	x	+
921	921	x	+	β hemolíticos	x	X	x
GENOVEVA	GENO3	+	+	γ hemolíticos	X	X	+
BELEN	BEL4	X	+	β hemolíticos	X	X	+
SALOME	SAL5	X	+	β hemolíticos	β hemolíticos	x	x
ALFONCINA	ALFO6	x	+	β hemolíticos	x	x	+
ESPAÑOLA	ESPA7	X	+	β hemolíticos	X	X	+
LUS MARINA	LM8	X	+	β hemolíticos	X	X	+
LLUVIA	LLU9	+	+	β hemolíticos	γ hemolíticos	X	+
SIN NOMBRE1	S/N1	X	+	β hemolíticos	X	X	+
FORTACHONA	FOR11	x	+	β hemolíticos	x	x	x
SIN NOMBRE2	S/N2	X	+	β hemolíticos	X	X	+
VAINILLA	VAI13	X	+	α hemolíticos	X	X	+
BITER	BIT14	X	+	α hemolíticos	β hemolíticos	X	X
TELMA	TEL15	X	+	α hemolíticos	β hemolíticos	X	+
MAR	MAR16	X	+	β hemolíticos	X	X	+
PERUANA	PER17	X	+	β hemolíticos	X	X	+
PASCUALA	PAS18	X	+	β hemolíticos	X	X	+
AMELY	AME19	X	+	β hemolíticos	X	X	+
MARGARITA	MARG20	X	+	β hemolíticos	X	X	X

## ANEXO 3. Resultados de antibiograma

1. Resultados de antibiograma para *Staphylococcus aureus*

N°	Antibiótico						
	Tetraciclina	Penicilina	Estreptomina	Neomicina	Sulfa	Enrofloxacin	Lincomicina
1	Sensible	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
2	Intermedio	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Resistente	Sensible
3	Resistente	Resistente	Sensible	Resistente	Intermedio	Intermedio	Sensible
4	Intermedio	Resistente	Sensible	Sensible	Intermedio	Sensible	Sensible
5	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
6	Sensible	Intermedio	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
7	Intermedio	Resistente	Intermedio	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
8	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
9	Intermedio	Resistente	Intermedio	Sensible	Sensible	Intermedio	Sensible
10	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
11	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
12	Intermedio	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
13	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Intermedio	Sensible
14	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
15	Sensible	Intermedio	Sensible	Sensible	Intermedio	Sensible	Resistente
16	Sensible	Intermedio	Sensible	Sensible	Sensible	Resistente	Sensible
17	Sensible	Intermedio	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
18	Sensible	Resistente	Intermedio	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
19	Resistente	Resistente	Sensible	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible
20	Sensible	Resistente	Sensible	Intermedio	Resistente	Sensible	Sensible
21	Intermedio	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
22	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible	Intermedio	Sensible	Sensible
23	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible
24	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
25	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
26	Sensible	Resistente	Sensible	Intermedio	Sensible	Sensible	Sensible
27	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
28	Resistente	Resistente	Sensible	Sensible	Intermedio	Sensible	Sensible
29	Sensible	Intermedio	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
30	Intermedio	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
31	Sensible	Resistente	Intermedio	Sensible	Intermedio	Sensible	Sensible
32	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
33	Sensible	Intermedio	Sensible	Sensible	Intermedio	Sensible	Sensible
34	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
35	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
36	Sensible	Intermedio	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible

37	Intermedio	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
38	Sensible	Resistente	Sensible	Intermedio	Sensible	Sensible	Sensible
39	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
40	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
41	Intermedio	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
42	Sensible	Intermedio	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
43	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
44	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
45	Sensible	Intermedio	Intermedio	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
46	Intermedio	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
47	Intermedio	Resistente	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
48	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
49	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
50	Intermedio	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
51	Sensible	Resistente	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
52	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
53	Sensible						
54	Sensible	Intermedio	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
55	Intermedio	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
56	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
57	Resistente	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
58	Sensible						
59	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
60	Resistente	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
61	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
62	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
63	Intermedio	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Intermedio
64	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Intermedio
65	Resistente	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
66	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible
67	Intermedio	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
68	Sensible	Intermedio	Sensible	Sensible	Sensible	Intermedio	Sensible
69	Intermedio	Intermedio	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
70	Sensible	Intermedio	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
71	Resistente	Resistente	Sensible	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible
72	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
73	Intermedio	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
74	Resistente	Intermedio	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
75	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
76	Sensible	Resistente	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
77	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Intermedio	Sensible
78	Intermedio	Intermedio	Sensible	Sensible	Intermedio	Intermedio	Sensible
79	Sensible	Intermedio	Intermedio	Sensible	Intermedio	Sensible	Sensible
80	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible



### 3. Resultados de antibiograma para *Escherichia coli*

N°	Antibiótico						
	Tetraciclina	Penicilina	Estreptomina	Neomicina	Sulfa	Enrofloxacina	Lincomicina
1	Resistente	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Resistente	Resistente
2	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Intermedio	Intermedio	Resistente
3	Resistente	Resistente	Sensible	Intermedio	Sensible	Sensible	Resistente
4	Intermedio	Sensible	Resistente	Sensible	Intermedio	Intermedio	Resistente
5	Intermedio	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Resistente
6	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Resistente
7	Sensible	Resistente	Intermedio	Sensible	Sensible	Sensible	Resistente
8	Intermedio	Resistente	Sensible	Resistente	Intermedio	Sensible	Resistente
9	Resistente	Intermedio	Intermedio	Sensible	Resistente	Sensible	Resistente
10	Sensible	Intermedio	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Resistente
11	Sensible	Resistente	Resistente	Sensible	Resistente	Sensible	Resistente
12	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Resistente
13	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Resistente
14	Sensible	Intermedio	Sensible	Sensible	Sensible	Resistente	Resistente

### 4. Resultados de antibiograma para *Staphylococcus epidermis*

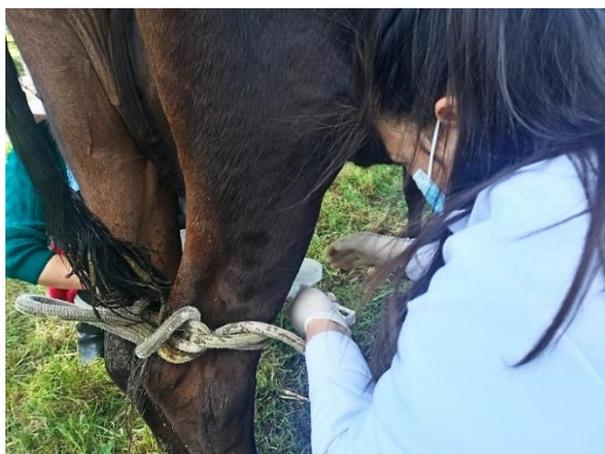
N°	Antibiótico						
	Tetraciclina	Penicilina	Estreptomina	Neomicina	Sulfa	Enrofloxacina	Lincomicina
1	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
2	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
3	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
4	Sensible	Intermedio	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
5	Intermedio	Resistente	Intermedio	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
6	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
7	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Intermedio	Sensible
8	Sensible	Intermedio	Sensible	Intermedio	Resistente	Sensible	Sensible
9	Intermedio	Intermedio	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Intermedio
10	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
11	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Intermedio	Sensible	Sensible

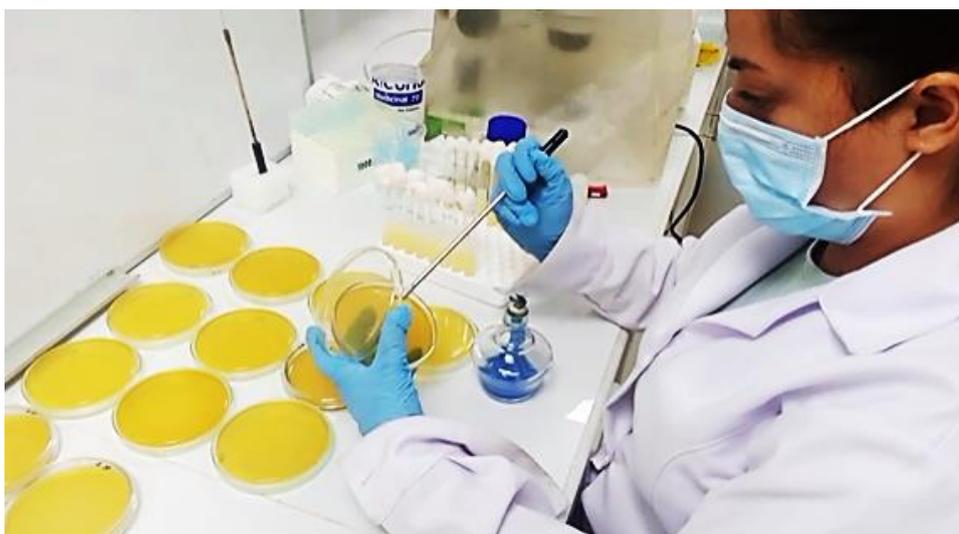
### 5. Resultados de antibiograma para *Enterobacter cloacae*

N°	Antibiótico						
	Tetraciclina	Penicilina	Estreptomina	Neomicina	Sulfa	Enrofloxacina	Lincomicina
1	Resistente	Resistente	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Resistente
2	Sensible	Resistente	Sensible	Intermedio	Intermedio	Intermedio	Resistente
3	Resistente	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Resistente
4	Intermedio	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Resistente
5	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible	Intermedio	Sensible	Resistente
6	Sensible	Resistente	Intermedio	Sensible	Sensible	Resistente	Resistente
7	Intermedio	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Resistente
8	Resistente	Resistente	Sensible	Sensible	Resistente	Sensible	Resistente

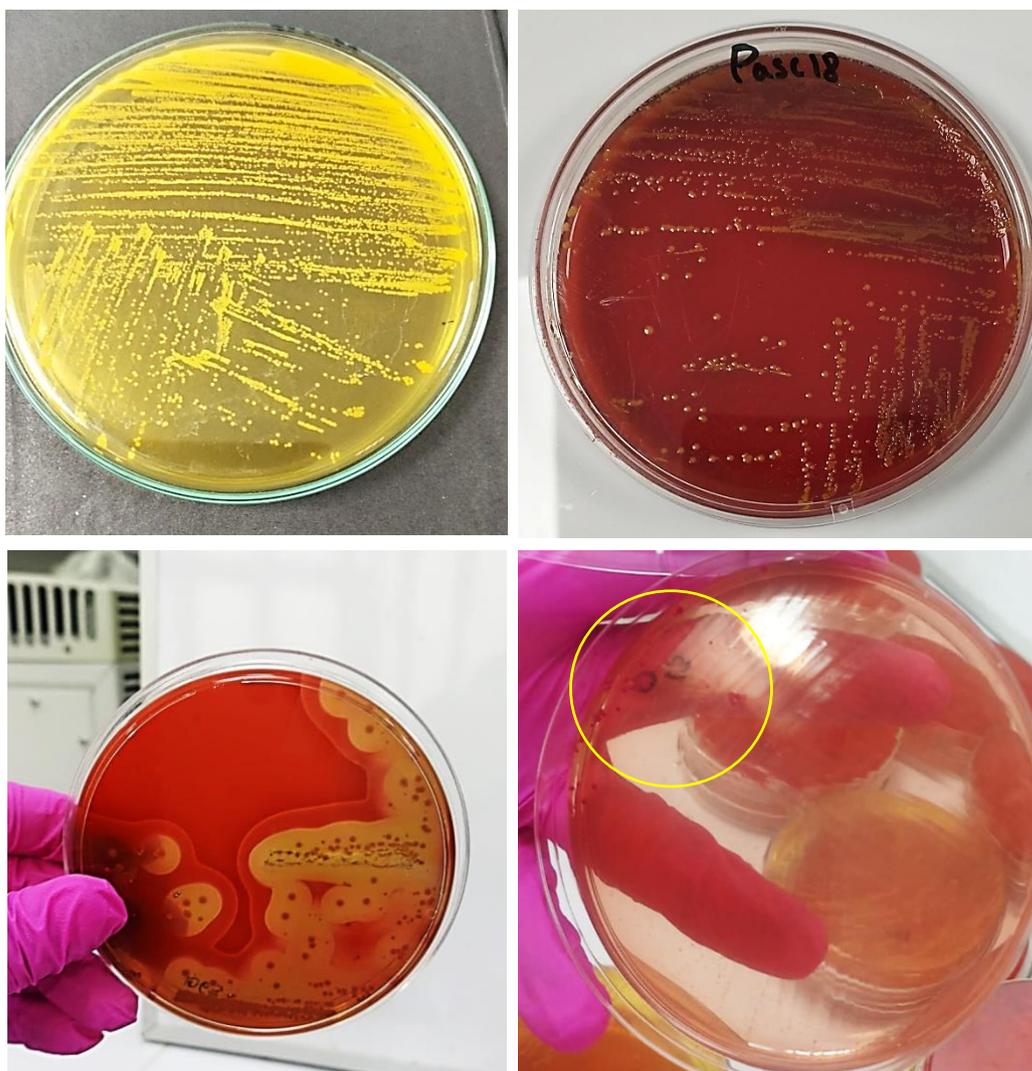
### 6. Resultados de antibiograma para *Klebsiella oxytoca*

N°	Antibiótico						
	Tetraciclina	Penicilina	Estreptomina	Neomicina	Sulfa	Enrofloxacina	Lincomicina
1	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Resistente
2	Intermedio	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Resistente
3	Resistente	Resistente	Intermedio	Sensible	Intermedio	Intermedio	Resistente
4	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Resistente

**ANEXO 4. Material fotográfico****Figura 1.** Recolección de muestras de leche.**Figura 2.** Realización de la prueba de CMT.**Figura 3.** Muestras de leche con inóculo para siembra en placas.



**Figura 4.** Siembra de muestras en medios de cultivo.



**Figura 5.** Crecimiento bacteriano en medios de cultivo.



**Figura 6.** Extracción de colonias bacterianas para viales.



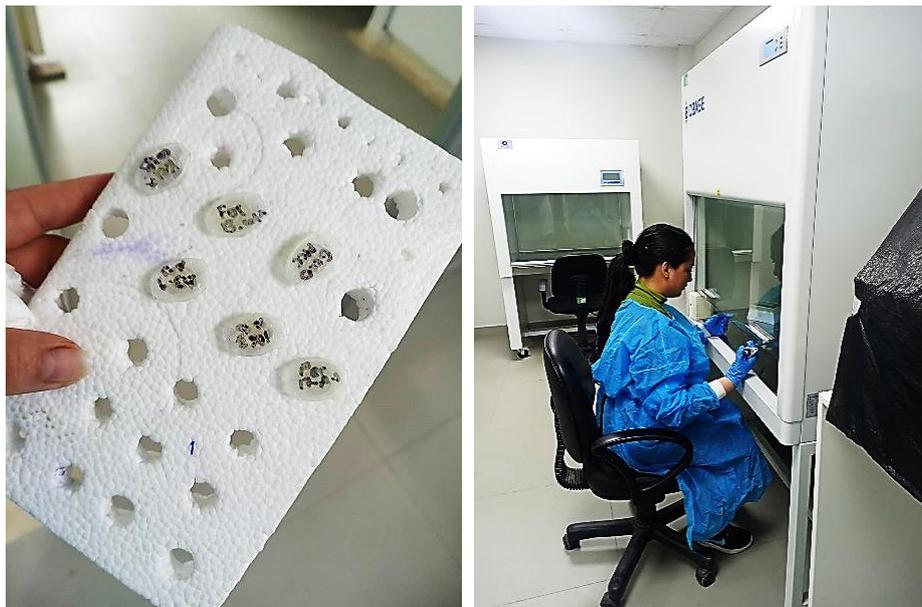
**Figura 7.** Hisopado de muestras en agar base para antibiograma.



**Figura 8.** Medición del halo de inhibición.



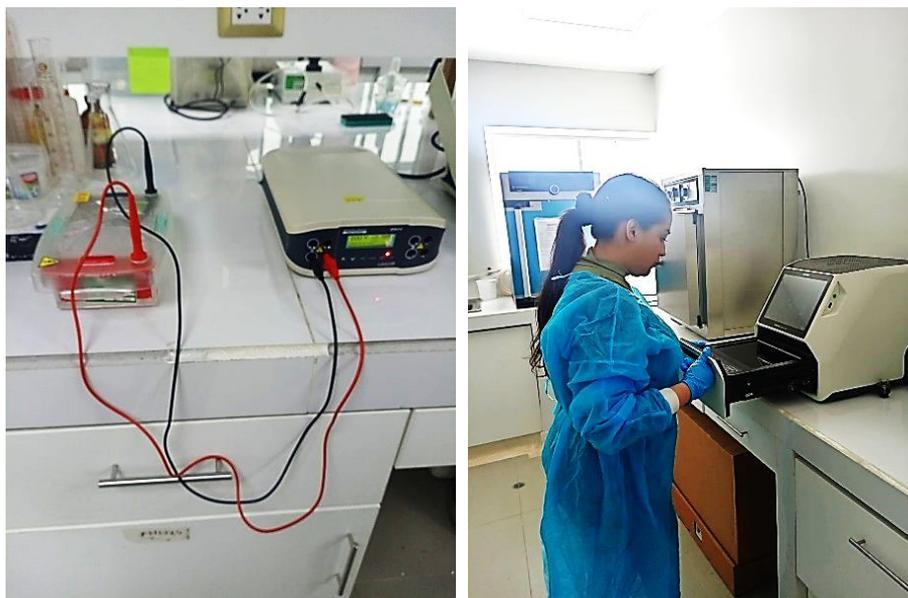
**Figura 9.** Extracción de muestras de ADN para calidad.



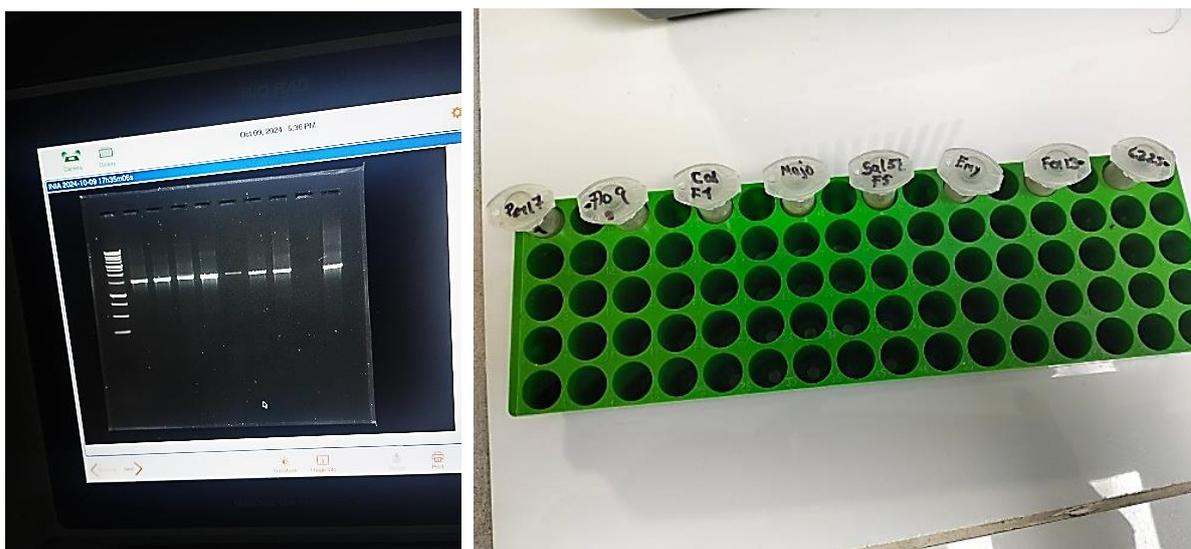
**Figura 10.** Muestras de ADN para PCR y proceso de PCR.



**Figura 11.** Identificación de muestras de PCR para electroforesis.



**Figura 12.** Procedimiento de electroforesis y colocación de muestras con gel en fotodocumentador.



**Figura 13.** Resultado de electroforesis y muestras para secuenciación.