



Por un Desarrollo Agrario
Integral y Sostenible

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

FACULTAD DE CIENCIA ANIMAL

Trabajo de Tesis

Resistencia antimicrobiana de bacterias productoras
de mastitis clínica y subclínica en Finca Santa Rosa de
la UNA- Managua-2023

Autores:

Br. Larissa Elena Hurtado Fonseca

Br. Pablo Emilio Cruz Useda

Asesora:

Dra. Martha Nohemí Rayo Rodríguez M.Sc.

Managua, Nicaragua,

Septiembre, 2023



Por un Desarrollo Agrario
Integral y Sostenible

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

FACULTAD DE CIENCIA ANIMAL

Trabajo de Tesis

Resistencia antimicrobiana de bacterias productoras
de mastitis clínica y subclínica en Finca Santa Rosa de
la UNA- Managua-2023

Autores:

Br. Larissa Elena Hurtado Fonseca

Br. Pablo Emilio Cruz Useda

Asesora:

Dra. Martha Nohemí Rayo Rodríguez M.Sc.

Presentado a la consideración del honorable
comité evaluador como requisito final para optar
al grado de Médico Veterinario en grado de
licenciatura

Managua, Nicaragua,

Septiembre, 2023

Este trabajo de graduación fue evaluado y aprobado por el honorable comité evaluador designado por la decanatura de la Facultad de Ciencia Animal como requisito final para optar al título profesional de:

Médico Veterinario en grado de Licenciatura

Miembros del Comité Evaluador

M.Sc. Varinia del Socorro Paredes
Vanegas
Presidente

Lic. Junior Raxa Chavarría Rivera
Secretario

M.Sc. Mauricio Dagoberto Silva Torrez
Vocal

Universidad Nacional Agraria: Managua, Nicaragua, 3 de octubre del 2023

AGRADECIMIENTO

A Dios principalmente por brindarnos la salud y sabiduría para enfrentar las situaciones difíciles que se nos presentaron en el transcurso de la carrera, por brindarnos espíritu de perseverancia para seguir luchando aun en los momentos que todo pareciera estar perdido.

A nuestros padres, Fátima del Rosario Useda, Larry Hurtado García y Araceli Fonseca por apoyarnos y siempre estar con nosotros en los buenos y malos momentos, por siempre aconsejarnos y guiarnos para elegir el buen camino y no permitir que dejemos de luchar por nuestros sueños.

A nuestra tutora, la Dra. Martha Nohemí Rayo Rodríguez por habernos brindado su tiempo y dedicación desde inicio a fin del estudio, por su paciencia y esmero en cada proceso para lograr obtener buenos resultados.

Br. Larissa Elena Hurtado Fonseca

Br. Pablo Emilio Cruz Useda

ÍNDICE DE CONTENIDO

SECCIÓN	PÁGINA
AGRADECIMIENTO	i
ÍNDICE DE CONTENIDO	ii
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURA	v
ÍNDICE DE ANEXOS	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo General	3
2.2 Objetivos Específicos	3
III. MARCO DE REFERENCIA	4
3.1 Ganadería en Nicaragua	4
3.2 Importancia de la ganadería	4
3.3 Mastitis	5
3.3.1 Patógenos que provocan mastitis	5
3.3.2 Tipos de mastitis	5
3.3.3 Factores que predisponen a la aparición de mastitis en el ganado	7
3.4 Diagnóstico de mastitis a nivel de campo	8
3.4.1 California Mastitis Test	8
3.4.2 Draminski detector de mastitis 4Q	9
3.5 Resistencia microbiana	10
3.5.1 Mecanismos de resistencia bacteriana	10
3.5.2 Diagnóstico de resistencia	11
3.5.3 Métodos para determinar resistencia microbiana	12

IV. MATERIALES Y METODOS	14
4.1 Ubicación del estudio	14
4.2 Diseño metodológico	14
4.3 Metodología	15
4.3.1 Fase de laboratorio	16
4.4 Variables a evaluar	18
4.5 Análisis de datos	19
4.6 Materiales y equipos	19
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
5.1 Sensibilidad y resistencia en las bacterias causantes de mastitis	20
5.2 Mecanismos de resistencia BLEE y AmpC en bacterias aisladas de vacas con mastitis clínica y subclínica	24
VI. CONCLUSIONES	26
VII. RECOMENDACIONES	27
VIII. LITERATURA CITADA	28
IX. ANEXOS	33

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO		PÁGINA
1.	Variables evaluadas	18
2.	Materiales y equipos utilizados en el laboratorio	19
3.	Resultados de sensibilidad y resistencia en <i>S. aureus</i>	20
4.	Resultados de sensibilidad y resistencia en <i>Klebsiella spp</i>	22
5.	Resultados de sensibilidad y resistencia en <i>Corynebacterium spp</i>	23
6.	Enzimas betalactámicas en <i>Klebsiella spp</i> y hetero resistencia	25

ÍNDICE DE FIGURA

FIGURA		PÁGINA
1.	Vista satelital de la Facultad de Ciencia Animal	14

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO		PÁGINA
1.	Formato de hoja de registro de resultados	33
2.	Escala de MacFarland de 0.5	34
3.	Preparación del inóculo	34
4.	Siembra bacteriana en agar Mueller-Hinton	34
5.	Colocación de discos	34
6.	Antibiograma de <i>Corynebacterium spp</i>	35
7.	Antibiograma de <i>Klebsiella spp</i>	35
8.	Antibiograma de <i>S. aureus</i>	35
9.	Medición de halos para determinación de sensibilidad y resistencia	35
10.	Lista de halos de inhibición de la CLSI para determinación de resistencia bacteriana	36

RESUMEN

La mastitis bovina es considerada la enfermedad infecciosa del ganado lechero de mayor impacto económico debido a una disminución en la producción de leche y deterioro en la calidad, *Staphylococcus aureus* es el principal agente infeccioso por su prevalencia y patogenicidad, ocasionando más del 80% de las infecciones intramamarias. Si bien existe una gran variedad de medidas de control de la enfermedad, la terapia con antibióticos desempeña un papel determinante en la eliminación de la infección, pero existe un inconveniente debido que, además de ser utilizados por su acción terapéutica en el tratamiento de las infecciones intramamarias, también son administrados con fines profilácticos en la prevención de la enfermedad durante el secado de las vacas al final del parto, esta práctica favorece la selección de cepas resistentes en la población microbiana e influye negativamente en el tratamiento de la enfermedad. En la búsqueda de vigilar el comportamiento de las bacterias productoras de mastitis, en el contexto actual sobre la resistencia antimicrobiana, se llevó a cabo un estudio de tipo descriptivo con corte transversal, con el objetivo de determinar la resistencia bacteriana y mecanismos de resistencia, BLEE y AmpC en bacterias aisladas de vacas con mastitis clínica y subclínica del Centro de Formación Práctica Bovino de la Facultad de Ciencia Animal, para lo que se analizaron muestras de vacas positivas y se aplicó el método Kirby-Bauer, analizando la sensibilidad, las variables estudiadas fueron sensibilidad, betalactamasas BLEE, AmpC y hetero resistencia, los antibióticos utilizados en este estudio fueron: Tetraciclina, Amoxicilina + ácido clavulánico, Ampicilina + sulbactam, Ceftriaxona, Gentamicina, Penicilina, Eritromicina, Ciprofloxacina. Entre las bacterias aisladas se identificaron *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella spp* y *Corynebacterium spp*, las cuales resultaron ser sensible a la mayoría de los antibióticos, encontrándose que, *S. aureus* presentó sensibilidad en un 100% a los antibióticos, *Klebsiella spp* resultó ser resistente frente a Penicilina y Eritromicina, además expresó sensibilidad intermedia a Gentamicina y fue sensible a los demás antibióticos, en el caso de *Corynebacterium spp* expresó resistencia a Amoxicilina + ácido clavulánico, sensibilidad intermedia a Gentamicina y fue sensible al resto de los antibióticos utilizados, respecto a los mecanismos de resistencia BLEE y AmpC, las pruebas solo se aplicaron a la bacteria *Klebsiella spp* por pertenecer al grupo de enterobacterias que son productoras de BLEE y AmpC, no expresando ningún de estos tipos de mecanismo de resistencia.

Palabras clave: Antibiótico, Mecanismos de resistencia, Aislamiento, Método Kirby-Bauer, *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT

Bovine mastitis is considered the infectious disease of dairy cattle with the greatest economic impact due to a decrease in milk production and deterioration in quality. *Staphylococcus aureus* is the main infectious agent due to its prevalence and pathogenicity, causing more than 80% of the intramammary infections. Although there is a wide variety of disease control measures, antibiotic therapy plays a decisive role in eliminating the infection, but there is a drawback because, in addition to being used for their therapeutic action in the treatment of infections, intramammary, are also administered for prophylactic purposes in the prevention of the disease during the drying of the cows at the end of calving. This practice favors the selection of resistant strains in the microbial population and negatively influences the treatment of the disease. In the search to monitor the behavior of mastitis-producing bacteria, in the current context of antimicrobial resistance, a descriptive cross-sectional study was carried out, with the objective of determining bacterial resistance and resistance mechanisms, ESBL. and AmpC in bacteria isolated from cows with clinical and subclinical mastitis from the Bovine Practical Training Center of the Faculty of Animal Science, for which samples from positive cows were analyzed and the Kirby-Bauer method was applied, analyzing the sensitivity, the variables studied were sensitivity, ESBL beta-lactamases, AmpC and hetero resistance, the antibiotics used in this study were: Tetracycline, Amoxicillin + clavulanic acid, Ampicillin + sulbactam, Ceftriaxone, Gentamicin, Penicillin, Erythromycin, Ciprofloxacin. Among the isolated bacteria, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* spp and *Corynebacterium* spp were identified, which turned out to be sensitive to most antibiotics, finding that *S. aureus* presented 100% sensitivity to antibiotics, *Klebsiella* spp turned out to be resistant to Penicillin and Erythromycin, also expressed intermediate sensitivity to Gentamicin and was sensitive to the other antibiotics, in the case of *Corynebacterium* spp it expressed resistance to Amoxicillin + clavulanic acid, intermediate sensitivity to Gentamicin and was sensitive to the rest of the antibiotics used, with respect to the mechanisms of ESBL and AmpC resistance, the tests were only applied to the bacteria *Klebsiella* spp because it belongs to the group of enterobacteria that produce ESBL and AmpC, not expressing any of these types of resistance mechanism.

Key words: Antibiotic, Resistance mechanisms, Isolation, Kirby-Bauer method, *Staphylococcus aureus*.

I. INTRODUCCIÓN

La leche es uno de los alimentos más consumidos y valorados en el mundo, debido a su gran aporte nutricional y su versatilidad, esta se puede consumir de forma líquida o transformada en otros productos lácteos, como el queso, el yogur, la mantequilla o el helado. La leche tiene una importancia fundamental para la salud humana, especialmente en las etapas de crecimiento y desarrollo.

Según la Cámara Nicaragüense del Sector Lácteo (CANISLAC, 2019) Nicaragua es el primer país de exportación de Centroamérica y a nivel de Latinoamérica se ubica en el cuarto, luego de Uruguay, Argentina y Brasil. El Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA, s.f.) menciona que, en Nicaragua se ordeña un aproximado a 1.2 millones de vacas al día, lo cual representa una producción estimada de 389.6 millones de galones de leche, de los cuales el 61 por ciento se vende como leche fluida, el 36% se destina a la producción de productos derivados de la leche y el 3 por ciento se consume en fincas.

La producción láctea se enfrenta a desafíos; de estos podríamos mencionar las enfermedades del ganado lechero. Meza y Flores (2019) mencionan que entre las enfermedades más importantes que afectan al ganado bovino de leche está la mastitis, patología reconocida mundialmente por causar grandes pérdidas económicas tanto al productor como a la industria, se estima que entre el 15% y el 20% de las vacas de un rodeo lechero están afectadas por alguna forma de mastitis en uno o más cuartos.

A su vez Meza y Flores (2019) explican que la mastitis provoca una disminución de los márgenes económicos de un 40 a 50% netos por vaca, en mayor parte por pérdidas debidas a la disminución en la producción láctea en un 5 a 7% en la cantidad de leche producida por lactancia. Las estimaciones de las pérdidas causadas por un menor rendimiento fluctúan entre 100 a 500 kg/vaca por lactancia.

Otro desafío que enfrenta la producción láctea en el país es la sobre utilización de antibióticos en el tratamiento de mastitis que ha generado la problemática de resistencia bacteriana, esto viene a afectar directamente la salud de los animales por provocar resistencia antimicrobiana por el mal manejo de los fármacos y también afecta la calidad de la leche al detectarse residuos de antibiótico provocando alergias en la población consumidora. Según Mulato (2018) hoy en día, la multirresistencia de cepas bacterianas ha llegado a ser un grave problema para la salud pública internacional por la ineficiencia en el tratamiento y la transmisión de enfermedades zoonóticas.

El presente estudio se realizó con el objetivo de determinar la resistencia antimicrobiana y mecanismos de resistencia de bacterias productoras de mastitis clínica y subclínica en Finca Santa Rosa, tema que es de mucha importancia en la actualidad y contribuirá a la protección de la salud pública, el medio ambiente, así como permitió sugerir medidas para lograr el uso racional y responsable de los antimicrobianos.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Determinar la resistencia bacteriana y mecanismos de resistencia en bacterias aisladas de vacas con mastitis clínica y subclínica en Finca Santa Rosa de la UNA

2.2 Objetivos Específicos

Realizar antibiograma utilizando el método Kirby-Bauer para determinar el perfil de sensibilidad y resistencia en bacterias causantes de mastitis

Determinar la presencia del mecanismo de resistencia BLEE y AmpC en bacterias aisladas de vacas con mastitis clínica y subclínica con el uso del antibiograma Kirby-Bauer y la aplicación de diferentes pruebas

III. MARCO DE REFERENCIA

3.1 Ganadería en Nicaragua

La ganadería en Nicaragua ha sido históricamente una de las actividades económicas de mayor relevancia para los nicaragüenses. Según Díaz y Pérez (2013) mencionan que “En Nicaragua existe la ganadería desde el siglo XVI, esta es el medio de subsistencia de un amplio sector de la población rural del país” (p. 10).

3.2 Importancia de la ganaderia

En Nicaragua predominan los sistemas ganaderos tradicionales como es el sistema extensivo es decir los productores aprovechan al maximo el terreno manejando los animales libremente, de igual forma la mayoría de los hatos son de doble proposito se dedican a la produccion de carne y leche. Según Carnicarne (2021) “la industria carnica en el año 2020 fue de 336.0 millones de libras, 3% superior al año 2019, y en el acumulado de los últimos 14 años representa un crecimiento de 65%”.

Nicaragua ha venido desarrollando capacidades para ser un país con alta producciones de leche produciendo alrededor de 5.2 millones de litros diarios y únicamente se acopian entre el 35 y 40% en el mercado formal CANISLAC (2019).

Según Chasi (2015) la mastitis bovina es un problema importante en la producción de leche en todo el mundo y se considera el mayor problema en la industria láctea. La mastitis es la enfermedad que causa la mayor pérdida económica en los hatos lecheros. Esta ocasiona daño en el tejido excretor de la vaca ocasionando una menor produccion de leche, descarte de las mismas porque no responden al tratamiento o pérdida de uno o más cuartos debido a la enfermedad, imposibilidad de comercializar leche de vacas tratadas, costos de medicamentos y cambios en el comportamiento reproductivo (p. 19).

3.3 Mastitis

La mastitis es una inflamación en la ubre que generalmente es causada por una infección de la glándula mamaria. Como plantea Reyes y Sánchez (2015) la mastitis “Se presenta como una respuesta a la invasión por microorganismos y se caracteriza por daños en el epitelio glandular, seguido por una inflamación clínica o subclínica, pudiendo presentarse con cambios patológicos localizados o generalizados” (p. 3).

3.3.1 Patógenos que provocan mastitis

Como menciona Chasi (2015), por su etiología, la mastitis bovina se divide en contagiosa y ambiental. La mastitis contagiosa es causada por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis* y *Mycoplasma spp*. Los cuales, son organismos que se transmite entre vacas a través de paños utilizados para limpiar las ubres, residuos de leche en pezoneras y equipo de ordeño inadecuado, siendo el principal reservorio del patógeno el animal infectado.

Según Chasi (2015) la mastitis ambiental es causada por *Escherichia coli*, *Klebsiella spp*, *Enterobacter spp*, *Serratia spp*, *Pseudomonas spp*, *Proteus spp*, *Streptococcus uberis* y *Streptococcus dysgalactiae*. La fuente de trasmisión de estos patógenos es el ambiente en que se encuentra la vaca, es decir por un manejo inadecuado. Algunos ejemplos son cama húmeda, terrenos sucios, ubres empapadas de leche, preparación inadecuada de ubres y pezones antes del ordeño. Estas infecciones son esporádicas.

3.3.2 Tipos de mastitis

En términos generales, según su forma de presentación, la mastitis se divide en clínica y sub-clínica.

Mastitis clínica

La mastitis clínica es aquella que causa anomalías tanto en glándula mamaria, así como en la leche. Como expresa Rivera (2014), “El área afectada en general se inflama y en algunas vacas se encuentra adolorido al tocarlo, la leche es visiblemente alterada por la presencia de coágulos, descamaciones, o suero descolorido y algunas veces sangre” (p. 8).

La clasificación de la mastitis clínica se divide en 4 tipos, los cuales son:

- ✓ **Mastitis moderadamente aguda (MMA):** La infección tiene más de 24 horas, en la leche se observa natillas o grumos que pueden ser detectados al realizar la prueba del tazón oscuro obligatoria antes de ordeñar a cada vaca. Se reduce en un 30 % la producción.
- ✓ **Mastitis severamente aguda (MSA):** La infección tiene más de 72 horas. La leche sale con mayor cantidad de grumos, se puede apreciar cierta inflamación en la glándula, la misma está dura y caliente. Se pierde el 40% de producción.
- ✓ **Mastitis crónica (MC):** La infección tiene más de 5 días, toda la leche sale con grumos, la ubre está severamente inflamada, endurecida y caliente, la vaca tiene fiebre, taquicardia, atonía.
- ✓ **Mastitis con glándula improductiva o glándula ciega (MI):** La infección tiene en ocasiones semanas, la glándula se ve pequeña, está flácida y fría, no se obtiene leche sino exudados (Rivera, 2014).

Mastitis subclínica

En la mastitis subclínica los bovinos no presentan ningún tipo de síntoma siendo más complicado al productor poder diagnosticarla sintomáticamente y teniendo que recurrir a pruebas especiales. Como señala Mendoza *et al.* (2017), la mastitis subclínica “Su efecto se ve reflejado en los bajos niveles de producción y en leches que presentan malas condiciones, tanto sanitarias como organolépticas, incluso pueden presentar limitaciones para su uso en la obtención de productos” (p. 9).

Esta enfermedad es la causante de las mayores pérdidas económicas dentro de un hato dado que tiene una alta incidencia en los rebaños lecheros de todo el mundo, estimándose que por cada vaca con mastitis clínica existen aproximadamente de 20 a 40 vacas con mastitis subclínica (Rivera, 2014, p. 19).

Al existir un incremento electrolítico del sodio (Na) y cloro (Cl), en la glándula mamaria ya afectada causa congestión capilar, edematización del tejido secretor y obstrucción de los conductos intralobulares. También existe alteración de la permeabilidad capilar que produce cambios en la composición de la leche, algunos de ellos son:

- ✓ Disminuye la Cantidad y la Calidad de caseína sintetizada
- ✓ Disminuye la grasa butirosa
- ✓ Disminuye la lactosa
- ✓ Aumenta la concentración de sodio
- ✓ Aumentan los cloruros
- ✓ Aumentan las proteínas del suero sanguíneo
- ✓ Aumentan enzimas
- ✓ Aumentan las Células Somáticas (Reyes y Arguello, 2015, p. 15)

3.3.3 Factores que predisponen a la aparición de mastitis en el ganado

Factor físico

Los bovinos son mamíferos rumiantes los cuales deben tener un buen manejo, para lograr buenos resultados tanto productivos como reproductivos así mismo se evita la presencia de enfermedades en el hato ganadero. Según Reyes y Arguello (2015) menciona que “los organismos que causan la mastitis viven en diferentes ambientes (materia fecal, piel, etc.). La limpieza general de las vacas y su alojamiento, como también buenos procedimientos de manejo son formas efectivas de controlar la difusión de la mastitis” (p. 3).

Factor higiene

La higiene es de vital importancia para evitar la multiplicación y propagación de bacterias en el ganado, hay diversas causas para el desarrollo de mastitis. Como plantea Chamba (2019)“ la falta de higiene de los ordeñadores, manos y ropa sucia, utilización de agua de mala calidad, el lavado de los materiales y equipo de ordeño, falta de lavado y desinfección de la ubre en el ordeño y post-ordeño, la presencia de moscas en la sala de ordeño”(p. 15).

Factor genético

Algunas vacas tienen una mayor probabilidad de presentar mastitis que otras. La estructura del canal del pezón son importantes en la regulación de la entrada de microorganismos. El tono de las estructuras anatómicas de la apertura del pezón es reducido (carácter heredable), la resistencia a la entrada de los microorganismos será menor. Se seleccionará genéticamente vacas con diámetro pequeño del canal del pezón, lo que hará que la frecuencia de mastitis disminuya (Reyes y Argüello, 2015, p. 4).

Factor nutricional

La Nutrición en el ganado bovino es primordial para que haya una mayor producción, lo que conlleva que estas sobrelleven una mayor tensión fisiológica, que pueden llegar a producir mastitis. La mala nutrición también producen animales con sistema inmunológico deficiente, lo que las hace mucho más propensas a una infección en la glándula mamaria (Coronel y Espinosa, 2016).

3.4 Diagnóstico de mastitis a nivel de campo

3.4.1 California Mastitis Test

Para Reyes y Argüello (2015) California Mastitis Test es una prueba sencilla que es útil para detectar la mastitis subclínica por valorar groseramente el recuento de células somáticas de la leche (células epiteliales y leucocitos).

No proporciona un resultado numérico, sino más bien una indicación de si el recuento es elevado o bajo, por lo que todo resultado por encima de una reacción vestigial se considera sospechoso (p. 8).

Según Camacho (2019) la prueba de California Mastitis Test posee una sensibilidad del 97% y una especificidad del 93% y una de sus principales ventajas es que esta técnica se puede utilizar en una muestra de cuartos y en una de tanque. La prueba consiste en el agregado de un detergente a la leche, el alquil- lauril sulfato de sodio causando la liberación del ADN de las células presentes y este se convierte en combinación con agentes proteicos de la leche en una gelatina, traduciéndose en una interpretación del resultado como el grado más elevado de inflamación (p. 22).

Como menciona Moriano (2018) la prueba de California Mastitis Test solo estima el número de células somáticas, la leche de una vaca tiene menos de 100 000 células somáticas/ml de las cuales menos de 10% son polimorfonucleares, de 66-88% macrófagos, de 10-27% linfocitos y menos de 7% son células epiteliales, pero cuando se presenta la enfermedad los neutrófilos se incrementan exponencialmente dependiendo de grado de infección como mecanismo de defensa, se fundamentada en la capacidad que tiene el reactivo Lauril Sulfato de Sodio de formar el gel en presencia de ADN celular convirtiéndose en un recuento celular indirecto de células somáticas

3.4.2 Draminski detector de mastitis 4Q

Para Mamani (2014) el detector de mastitis subclínica Draminski: Se concentra principalmente en el contenido de cloruro y la conductividad eléctrica (p. 19).

Según Draminski (2015) el detector mide los cambios de la resistencia eléctrica de la leche, debido que el desarrollo de la inflamación subclínica de la úbre (la fase sin síntomas) está acompañado por el aumento de la sal en la leche lo que influye en el cambio de su resistencia. Esta regla se considera como la prueba indirecta más segura en el diagnóstico de Mastitis Subclínica.

Meza (2020) menciona que en el manejo integral de las MC y MSC se incluye el uso de antimicrobianos, administrados vía sistémica e intramamaria respectivamente. Dentro de los grupos farmacológicos más utilizados se destacan betalactámicos (penicilinas, cefalosporinas), nuevos betalactámicos, macrólidos y algunos aminoglucósidos. Sin embargo, algunos de estos antimicrobianos también son utilizados con fines profilácticos, durante el periodo de secado para reducir la mastitis en la siguiente lactancia. Esto significa que, a modo de uso indiscriminado y errores en la dosificación, las cepas causantes de mastitis han venido creando cierta resistencia frente a un buen grupo de antibióticos a los que antes eran sensibles.

3.5 Resistencia microbiana

Giono *et al* (2020) agrega que la resistencia antimicrobiana se define como la capacidad de un microorganismo para resistir los efectos de los antibióticos; es una característica inherente de la bacteria o puede ser una capacidad adquirida durante el proceso infeccioso (p. 173).

3.5.1 Mecanismos de resistencia bacteriana

Según Mulato (2018) la resistencia de los microorganismos frente a los antibióticos puede ser natural o intrínseca, mutacional o adquirida. Los mecanismos de resistencia a los agentes antimicrobianos incluyen: producción de enzimas inactivantes, alteraciones en el sitio de acción y modificaciones en el ingreso o el flujo del antibiótico.

Para Rojas y Ulate (2017) la resistencia natural o intrínseca es una propiedad específica de las bacterias, su aparición es anterior al uso de los antibióticos y tiene la característica de ser inherente a una especie en particular (p. 759).

Acosta y Vargas (2018) mencionan que estas bacterias con resistencia natural producen enzimas que inactivan al antibiótico; las más importantes son las betalactamasas y muchas bacterias son capaces de producirlas. Actualmente no solamente las betalactamasas de espectro extendido son las más frecuentes sino también las Carbapenemasas (Metalobetalactamasas, KPC *Klebsiella* productora de carbapenemasas y Oxacilinasas) (p. 82).

Según Bisso (2018) la resistencia adquirida es una consecuencia natural de microorganismos genéticamente adaptables que responden a la presión selectiva de los agentes antimicrobianos (p. 51).

Rojas y Ulate (2017) argumentan que las bacterias pueden presentar resistencia a los antibióticos como resultado de mutaciones cromosomales e intercambio de material genético de otras bacterias o fagos (virus que utilizan bacterias para su desarrollo y reproducción), a través de mecanismos como transformación, transducción transposición y conjugación (p. 758 - 759).

3.5.2 Diagnóstico de resistencia

Para Pertejo (2020) las pruebas de sensibilidad o antibiogramas determinan la susceptibilidad de un microorganismo frente a los medicamentos antimicrobianos, a partir de la exposición de una concentración estandarizada del germen a estos fármacos. Las pruebas de sensibilidad pueden hacerse para bacterias, hongos o virus. Para algunos microorganismos, los resultados obtenidos con un fármaco permiten predecir los resultados que se obtendrán con fármacos similares. Así, no todos los medicamentos potencialmente útiles necesitan probarse.

Pertejo (2020) aclara que las pruebas de sensibilidad se realizan *in vitro*, y no tienen en cuenta numerosos factores que afectan al fármaco *in vivo* (p. ej., la farmacodinamia y la farmacocinética, las concentraciones del medicamento en el sitio de acción, el estado inmunitario del huésped, las defensas específicas de sitio) y que influyen en el éxito de un tratamiento. Por ello, las pruebas de sensibilidad no siempre predicen los resultados de la terapia.

3.5.3 Métodos para determinar resistencia microbiana

Método del Epsilon test (E-Test)

Según Noriega (2022) este método combina los principios del procedimiento de difusión de disco y de dilución en agar para decidir la susceptibilidad antimicrobiana en vitro con datos cuantitativos, por lo cual se usa para una extensa variedad de microorganismos bacterianos. Este procedimiento está formado de una tira sólida, con una escala o gradiente del fármaco antimicrobiano problema en la cara inferior y en la preeminente una escala de lectura. Esta tira ayuda a decidir la concentración mínima inhibitoria del fármaco antimicrobiano impregnado en esta, por lo cual se habla de una medición directa de la susceptibilidad de la bacteria frente al fármaco.

Citometría de flujo

Para March-Rosselló (2017) la citometría de flujo es una técnica basada en la formación de un flujo de partículas (generalmente células) ordenadas en fila con una intensidad de 500-4.000 partículas/segundo. Gracias a este alineamiento, la técnica permite medir simultáneamente múltiples características de una sola célula de tal forma que es posible caracterizar, separar y cuantificar las diferentes subpoblaciones celulares que se engloban en un conjunto. Además, utilizando diversos fluorocromos se pueden estudiar diversos parámetros bacterianos (potencial de membrana, tamaño celular, actividad enzimática, integridad de la membrana celular y concentración microbiana) que aportan información acerca de la sensibilidad de los microorganismos a los antibióticos.

Métodos de lisis bacteriana

March-Rosselló (2017) agrega que otra metodología para la determinación de la sensibilidad consiste en la detección de la lisis bacteriana. Para ello, la bacteria es incubada en presencia del antibiótico a la concentración deseada; seguidamente la bacteria se inmoviliza en un microgel de agarosa y es expuesta a una solución de lisis que produce la liberación del ADN.

Posteriormente, la preparación es incubada con el fluorocromo SYBR Gold y mediante observación al microscopio de fluorescencia es posible estudiar la integridad del ADN. Esta metodología proporciona un antibiograma en menos de 2 h.

Método del antibiograma disco-placa o Kirby-Bauer

Para Noriega (2022) este método es el procedimiento que el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) propone para la decisión de la sensibilidad o resistencia bacteriana a los antimicrobianos, esta técnica posee varias ventajas, bajo costo, no necesita equipo particular, resultado de forma sencilla interpretables por los clínicos, simple de realizar, de enorme reproducibilidad y flexible en el momento de seleccionar los antibióticos para revisar su efectividad (p. 21).

Mulato (2018) detalla que este método consiste en la inoculación de una cantidad de la bacteria aislada, sembrándola de forma pareja sobre la superficie de una placa de agar Müller-Hinton. El principio consiste que, al colocar los discos de papel de filtro impregnados con concentraciones conocidas de los diferentes antibióticos, sobre la placa ya inoculada; luego de 24 – 48 horas de incubación a 37 °C se formará por difusión, un gradiente de concentración de antimicrobiano alrededor de los discos y la sensibilidad del microorganismo estará indicada por el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento bacteriano (halo) (p. 52)

Esto se interpreta de acuerdo a tablas confeccionadas previamente. Los resultados se expresan como: Sensible (S), Intermedio o Moderadamente sensible (I) y Resistente (R). Sensibles: un microorganismo se considera sensible a un antibiótico cuando el mismo responde al tratamiento con dicho fármaco a la dosis recomendada. Resistente: este término indica que no es probable que la infección causada por el microorganismo responda al antibiótico en cuestión, cualesquiera que sean las dosis y la localización de la infección (Mulato 2018, p. 52-53).

IV. MATERIALES Y METODOS

4.1 Ubicación del estudio

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de bromatología ubicado en el recinto universitario Tania Beteta en la Facultad de Ciencia Animal de la Universidad Nacional Agraria, ubicada al norte de la ciudad de Managua Km 12 ½ carretera, de la zona franca las Mercedes 3km al sur, con las coordenadas 12° 13' 7477 latitud norte, 86° 16' 5924 latitud sur.

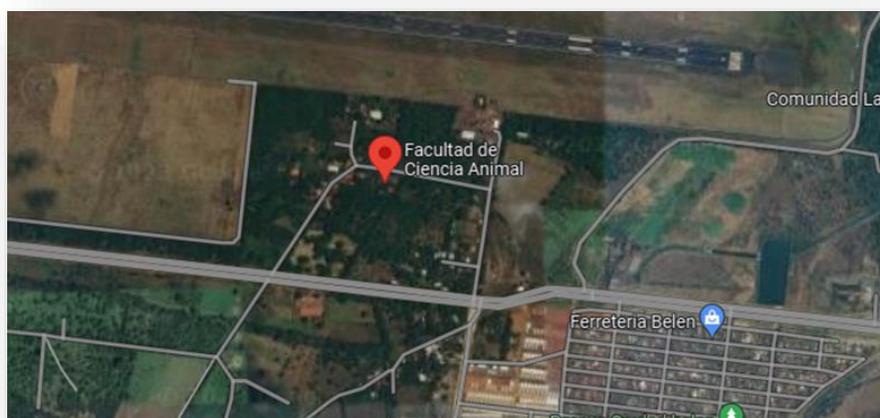


Figura 1. Vista satelital de la Facultad de Ciencia Animal.

Fuente: (Google maps, 2023)

4.2 Diseño metodológico

Se llevó a cabo un estudio de tipo descriptivo con corte transversal, con el fin de determinar la resistencia bacteriana y mecanismos de resistencia en bacterias aisladas de vacas con mastitis clínica y subclínica del CAFoP bovino UNA-FACA. Las bacterias se obtuvieron a partir de vacas positivas a mastitis, estas se aislaron y se identificaron en el laboratorio de bromatología de la Facultad de Ciencia Animal (FACA).

Para la determinación de resistencia a los antibióticos, se utilizó el método Kirby-Bauer o método de difusión en agar descrito en Mulato (2018), este método consiste en la inoculación de una cantidad de la bacteria aislada, sembrándola sobre la superficie de una placa de agar Müller-Hinton. El principio consiste que, al colocar los discos (Liofilchem®) de papel filtro impregnados con concentraciones conocidas de los diferentes antibióticos se forme por difusión un gradiente de concentración de antimicrobiano alrededor de los discos y la sensibilidad del microorganismo estará indicada por el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento bacteriano (halo).

Para la detección fenotípica de BLEE se utilizó la prueba de sinergia de doble disco, esta prueba consiste en situar un disco con ceftriaxona a una distancia de 20-25 mm de un disco con amoxicilina + ácido clavulánico, y después se incubó a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 16-20 horas (Berrios y Martínez, 2018). En el caso de las Cefalosporinas Mediadas Cromosómicamente (AmpC), se utilizó la prueba de discos combinados con inhibidor.

Para determinar las bacterias con hetero resistencia se siguió el método estándar para la realización de un antibiograma con el método Kirby-Bauer, luego se colocaron discos de antibióticos a los cuales se expuso la población bacteriana y por último se incubó a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 16-20 horas según lo descrito por (Berrios y Martínez, 2018).

4.3 Metodología

Para la determinación de la resistencia bacteriana a diferentes antibióticos se realizó antibiograma a las bacterias proporcionadas por el laboratorio de Bromatología, provenientes de aislamientos realizados de muestras de leche de las vacas del CAFoP Bovino, se utilizó el método Kirby-Bauer, los antibióticos utilizados fueron: Tetraciclina, amoxicilina + ácido clavulánico, ampicilina + sulbactam, ceftriaxona, gentamicina, penicilina, eritromicina, ciprofloxacina, además se determinaron los mecanismos de resistencia (BLLE y AmpC).

Los resultados se integraron a tablas y fichas pre-estructuradas (anexo 1) con la finalidad de poseer una mejor organización y que esto ayudará a tener facilidad de comprensión a la hora de analizar los datos obtenidos en el estudio.

4.3.1 Fase de laboratorio

Preparación del medio: Se utilizó como base Agar Mueller-Hinton para la elaboración del antibiograma

1. Se realizó un preparado de 500 ml que equivale a:

$$\begin{array}{rcl} 38 \text{ g Muller-Hinton} & 1000 \text{ ml agua destilada} & \\ X & 500 \text{ ml agua destilada} & = 19 \text{ g de Agar Mueller-Hinton} \end{array}$$

2. Luego se calentó el medio mientras se agita para ayudar a su disolución y lograr la ebullición.

3. Posteriormente se llevó a la autoclave para esterilizar a 121°C por 15 minutos. Al sacar del autoclave, se colocó el matraz en un baño de maría a 50°C.

4. Se vertieron 25 a 30 ml en placas de Petri estériles de 10 cm de diámetro. Las placas quedaron con un grosor promedio de 4 mm de alto y con un pH final entre 7.2 a 7.4.

5. Al terminar la preparación las placas se invirtieron y se almacenaron a una temperatura de 7 °C hasta su uso. El color del medio preparado fue beige claro (Berrios y Martinez, 2018).

Preparación del inóculo

Método de suspensión directa de colonias

A partir de una placa de cultivo de 18 horas se cogieron varias colonias con ayuda de un asa redonda y se disolvieron en el tubo que contenía solución de suero fisiológico ajustándose el inóculo a una turbidez equivalente al 0.5 de la escala de MacFarland. Luego se agitó durante 15-20 segundos.

Inoculación de las placas

Antes de que transcurrieran 15 minutos de haber ajustado el inóculo, se introdujo un hisopo estéril dentro de la suspensión y al retirarlo se rotó varias veces contra la pared del tubo por encima del nivel del líquido con la finalidad de eliminar el exceso de inóculo.

Se inocularon las placas de Mueller-Hinton completamente, sin dejar ninguna zona libre. Esto se consiguió deslizando el hisopo por la superficie del agar tres veces, rotando la placa unos 60° cada vez y pasándola por último por la periferia del agar para conseguir una siembra uniforme. Se dejó secar 3 minutos antes de colocar los discos.

Siembra y colocación de discos

1. Antes de realizar el antibiograma se preparó una solución bacteriana equivalente a 1.5×10^8 UFC por ml.
2. Para ello, se tomaron colonias del cultivo puro y se suspendieron en 3 ml de solución salina, se ajustó la concentración con solución salina estéril, comparándolo con un patrón de escala de MacFarland de 0.5%.
3. Posteriormente, se sembró la placa de Müeller-Hinton con un hisopo impregnado con la solución bacteriana preparada. Para ello, se sumergió el hisopo en la solución y luego se quitó el exceso de líquido haciendo presión contra las paredes del tubo. Inmediatamente después se pasó el hisopo por toda la superficie, sin dejar sitios sin tocar, luego se giró levemente la placa y se volvió a sembrar. La operación se repitió 2 veces más, luego se tapó la placa y dejó secar por 5 minutos.
4. Al pasar los 5 minutos se colocaron los discos de antibióticos con una pinza estéril, dejando un espacio de 24 mm entre ellos y 15 mm entre ellos y la pared de la placa. Después de colocar cada disco sobre el agar se presionaron levemente cada uno con la pinza para asegurar que queden bien adheridos.
5. Finalizado el proceso, se invirtió la placa y se incubó a 35-37 °C en aerobiosis por 16 a 18 horas.

Medición de grados de sensibilidad y resistencia

Una vez finalizado el periodo de incubación, se midió el diámetro del halo formado; para medir el diámetro de cada halo se utilizó una regla milimétrica. Los resultados se anotaron en mm. Posteriormente se correlacionaron los valores obtenidos con las tablas de puntos de cortes publicadas por el manual de la CLSI vigente (ver anexo 10). Los resultados se reportaron como sensible (S), intermedio (I), o resistente (R), según fue el caso.

4.4 Variables a evaluar

Cuadro 1. Variables evaluadas

Variable	Concepto	Operacionalización
Sensibilidad	Es la capacidad de una bacteria de ser afectada por un antibiótico. Es decir, si una bacteria es sensible a un antibiótico, significa que el antibiótico puede matarla o inhibir su crecimiento.	Se mide el diámetro del halo formado, es en proporción nivel de sensibilidad del microorganismo. Utilizando la lista de halos de inhibición del CLSI, se compara el diámetro obtenido del antibiograma con los parámetros de la lista. Sensible (S), intermedio (I), o resistente (R)
Betalactamasa de espectro extendido (BLEE)	Son enzimas que se caracterizan por conferir resistencia a penicilinas y cefalosporinas, incluyendo las de tercera y cuarta generación. Pueden ser inhibidas por el ácido clavulánico u otros inhibidores de β -lactamasas como el tazobactam y el sulbactam.	1. Positivo: Ampliación del halo de inhibición de ceftriaxona en la zona próxima al disco con amoxicilina ácido clavulánico (sinergia) 2. Negativo: No ampliación de los halos de inhibición de ceftriaxona.

Cefalosporina medidas cromosómicamente (AmpC)	Están codificados por cromosomas y algunos por plásmidos. Por lo general, resistente a la inhibición por el ácido clavulánico y más activo frente a las cefalosporinas.	1. Positivo: Achatamiento del halo de cefalexina en la zona próxima al disco con amoxicilina y ácido clavulánico. 2. Negativo: No achatamiento de los halos por inhibición de la cefalosporina
Hetero resistencia	Población bacteriana que muestran resistencia a cierto antibiótico dentro de la misma población de bacterias	1. Positivo: Presencia de colonias dentro de los halos de inhibición. 2. Negativo: Ausencia de colonias dentro de los halos de inhibición.

4.5 Análisis de datos

Todos los datos recopilados se archivaron en una tabla en Excel. Los resultados se presentaron en cuadros una vez que fueron interpretados.

4.6 Materiales y equipos

Cuadro 2. Materiales y equipos utilizados en el laboratorio

Materiales		
Agar Mueller Hinton	Matraz	Solución salina
Placas Petri	Mecheros	Tubo de ensayo
Agua destilada	Gabachas	Discos de antibiótico
Tapa bocas	Temporizador	Guantes
Papel aluminio	Papel craft	Papel toalla
Autoclave	Hotplate	Alcohol
Asas bacteriológicas	Regla milimétrica	
Hisopo estéril	Pinza estéril	

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las bacterias obtenidas de los aislamientos realizados en el laboratorio de Bromatología se identificaron tres géneros; *S. aureus*, *Klebsiella spp* y *Corynebacterium spp*, de las cuales *S. aureus* fue la bacteria de mayor porcentaje de aislamiento.

5.1 Sensibilidad y resistencia en las bacterias causantes de mastitis

Cuadro 3. Resultados de sensibilidad y resistencia en *S. aureu*

Antibióticos	<i>Staphylococcus aureus</i>		
	Sensible	Intermedio	Resistente
Penicilina	100%	0%	0%
Tetraciclina	100%	0%	0%
Ampicilina + sulbactam	100%	0%	0%
Ciprofloxacina	100%	0%	0%
Amoxicilina + ácido clavulánico	100%	0%	0%
Gentamicina	100%	0%	0%
Ceftriaxona	100%	0%	0%
Eritromicina	100%	0%	0%

En el cuadro anterior se observa el comportamiento de la bacteria *Staphylococcus aureus* que presentó 100% de sensibilidad a los antibióticos Tetraciclina, Amoxicilina + ácido clavulánico, Ampicilina + sulbactam, Ceftriaxona, Gentamicina, Penicilina, Eritromicina, Ciprofloxacina y Tetraciclina.

En relación a la bacteria *S. aureus*, Campos y Meléndez (2012) reportaron en su estudio esta, fue sensible a Oxitetraciclina en un 88.9%, 80% para Ciprofloxacina, en un 52.9% a Eritromicina, 44.4% a Gentamicina, 18.8% para Cefalexina, un 11.1% a Amoxicilina + ácido Clavulánico y 5.6% a Vancomicina, estos resultados difieren a los encontrados en nuestro estudio, en relación a Eritromicina, Gentamicina y Amoxicilina + ácido Clavulánico al encontrarse un bajo porcentaje de esta bacterias sensible a estos antibióticos, pero en relación a Ciprofloxacina es muy similar debido a que el porcentaje de bacterias sensibles a este antibiótico fue de un 100%.

A diferencia de Trujillo (2016) que en su estudio reportó que la bacteria *S. aureus* presentó sensibilidad en un 24% a Penicilina, 100% a Gentamicina, 53% a Ampicilina, 100% a Estreptomina y un 94% a Amoxicilina, la sensibilidad de la mayoría de los antibióticos se asemeja a los resultados encontrados en nuestro estudio a excepción de Penicilina que en su estudio mostró un porcentaje muy bajo.

A su vez Chavarría y Meléndez (2012) en su estudio determinó que *S. aureus* es sensible en un 85% a Gentamicina, el 60% es sensible a Ciprofloxacina, el 45% es sensible a Amoxicilina + ácido clavulánico y un 12.5% frente a Eritromicina, el porcentaje de bacterias sensibles frente a Gentamicina y Ciprofloxacina, es similar al de nuestro estudio donde se encontró que la sensibilidad las bacterias fue de un 100%.

Difiriendo de Rivera y Tórrez (2012) que reportaron a *S. aureus* con resistencia de 100% a vancomicina, 50% a Cefalexina, Eritromicina, Oxitetraciclina y Ciprofloxacina, 30% a Amoxicilina + ácido clavulánico y 0% a Gentamicina difiriendo significativamente a nuestros resultados mencionados anteriormente, al encontrarse que *S. aureus* fue 100% sensible a Eritromicina, Ciprofloxacina y Amoxicilina + ácido clavulánico.

Cuadro 4. Resultados de sensibilidad y resistencia en *Klebsiella spp*

Antibióticos	<i>Klebsiella spp</i>		
	Sensible	Intermedio	Resistente
Penicilina			*
Tetraciclina	*		
Ampicilina + sulbactam	*		
Ciprofloxacina	*		
Amoxicilina + ácido clavulánico	*		
Gentamicina		*	
Ceftriaxona	*		
Eritromicina			*

En relación a las bacterias *Klebsiella spp* y *Corynebacterium spp* solo se realizó un aislamiento por cada una, por lo que no se puede expresar en porcentaje su comportamiento, pero cualitativamente se determinó que *Klebsiella spp* fue sensible a Tetraciclina, Amoxicilina + ácido clavulánico, Ampicilina + Sulbactam, Ceftriaxona, Ciprofloxacina y Tetraciclina, además que presentó sensibilidad intermedia a Gentamicina y resistencia a Eritromicina y Penicilina.

Chavarría y Meléndez (2012) determinaron en su estudio que *Klebsiella spp* presentó sensibilidad a Ciprofloxacina y Gentamicina, para Amoxicilina + ácido clavulánico no presentaron sensibilidad, esto contrasta con respecto a Gentamicina que en nuestro estudio la bacteria presentó sensibilidad intermedia a este antibiótico, de igual forma para amoxicilina + ácido clavulánico que en nuestro estudio si presentó sensibilidad frente a este antibiótico.

Martínez-Pacheco *et al.* (2015) reportaron en su estudio que, *Klebsiella spp* fue sensible frente a Penicilina y Ciprofloxacina, difiriendo a los resultados de nuestro estudio en el que mostró resistencia a Penicilina, y similar respecto a Ciprofloxacina que ambos estudios mostraron sensibilidad, en cuanto a Gentamicina difiere debido a que su estudio presentó resistencia y en nuestro estudio presentó sensibilidad intermedia.

Cuadro 5. Resultados de sensibilidad y resistencia en *Corynebacterium spp*

Antibióticos	<i>Corynebacterium spp</i>		
	Sensible	Intermedio	Resistente
Penicilina	*		
Tetraciclina	*		
Ampicilina + sulbactam	*		
Ciprofloxacina	*		
Amoxicilina + ácido clavulánico			*
Gentamicina		*	
Ceftriaxona	*		
Eritromicina	*		

Como se muestra en el cuadro anterior, se encontró que *Corynebacterium spp* fue sensible a Tetraciclina, Ampicilina + Sulbactam, Ceftriaxona, Ciprofloxacina y Tetraciclina. Presentó sensibilidad intermedia a Gentamicina y resistencia a Amoxicilina + ácido clavulánico.

En el estudio hecho por Florentín (2007) donde analizó el perfil de resistencia *in vitro* a antimicrobianos de cepas causantes de mastitis encontró que, *Corynebacterium spp* expresó resistencia frente a Tetraciclina, Gentamicina y Penicilina, caso contrario en nuestro estudio donde *Corynebacterium spp* expresó sensibilidad a Tetraciclina, Penicilina y mostró sensibilidad intermedia frente a Gentamicina.

Molina y Espinosa (2008) en su estudio encontraron que *Corynebacterium spp* expresó sensibilidad a Tetraciclina y Amoxicilina + ácido clavulánico y sensibilidad intermedia a Penicilina, contrario en nuestro estudio donde *Corynebacterium spp* fue resistente ante Amoxicilina + ácido clavulánico y fue sensible a Penicilina.

Por lo tanto, se puede considerar que el comportamiento bacteriano frente a los antibióticos puede variar dependiendo de cada región, manejos realizados en las explotaciones pecuarias y factores intrínsecos de los microorganismos.

5.2 Mecanismos de resistencia BLEE y AmpC en bacterias aisladas de vacas con mastitis clínica y subclínica

La producción de enzimas betalactamasas es uno de los cuatro mecanismos de resistencia que utilizan las bacterias para contrarrestar el efecto de los antimicrobianos, de especial importancia las BLEE y AmpC que son enzimas capaces de inhibir el efecto de la mayoría de los betalactámicos, este tipo de betalactamasas es expresada por bacterias gramnegativas principalmente por las enterobacterias, en las que se encuentra *Klebsiella*. Según el manual de la CLSI (2023) a este tipo de bacterias se les puede realizar la prueba de doble disco para la detección de BLEE.

Cuadro 6. Enzimas betalactámicas en *Klebsiella spp* y hetero resistencia

Bacteria	Enzimas betalactámicas		Hetero resistencia
	BLLE	AmpC	
<i>Kelbsiella spp</i>	0	0	0

Como se muestra en el cuadro anterior, la bacteria estudiada no expresó ninguno de los mecanismos de resistencia (BLEE y AmcP), por lo que se clasifican como bacterias no productoras de betalactamasas. Los resultados encontrados concuerdan entre si ya que la bacteria estudiada presentó un alto grado de sensibilidad frente a la mayoría de los antibióticos.

En cambio, Vázquez (2016) realizó un estudio donde determinó la prevalencia de enterobacterias productoras de BLEE en muestras de tanques de leche, encontrando que, la prevalencia de enterobacterias productoras de BLEE fue de un 3,3%, estos resultados no concuerdan con los encontrados en nuestro estudio, por lo que deja claro que necesario seguir investigando más sobre este tipo de mecanismo de resistencia.

En el caso de *S. aureus* el manual de la CLSI (2023) recomienda la prueba de borde de zona de penicilina para la detección de betalactamasa, esta prueba consiste en utilizar el mismo método de difusión en disco estándar y utilizar un disco de penicilina de 10 unidades. Los resultados se confirman como positivo borde de zona pronunciado (“acantilado”) y negativo borde se zona borrosa (“playa”).

VI. CONCLUSIONES

Se logró determinar la resistencia de las bacterias, encontrándose que *Klebsiella spp* resultó ser resistente frente a Penicilina y Eritromicina, además expresó sensibilidad intermedia a Gentamicina y fue sensible a los demás antibióticos, en el caso de *Corynebacterium spp* expresó resistencia a Amoxicilina + ácido clavulánico y sensibilidad intermedia a Gentamicina y fue sensible al resto de los antibióticos utilizados.

Solo las bacterias de *S. aureus* presentaron sensibilidad en un 100% frente a los ocho antibióticos elegidos para el estudio (Tetraciclina, Amoxicilina + ácido clavulánico, Ampicilina + sulbactam, Ceftriaxona, Gentamicina, Penicilina, Eritromicina, Ciprofloxacina) esto nos indica que para *S. aureus* se puede emplear cualquiera de los antibióticos utilizados, pero no para las demás bacterias.

Los mecanismos de resistencia BLEE y AmpC no fueron expresados por las bacterias estudiadas (*Klebsiella spp*), esto indica que los antibióticos elegidos comúnmente para la terapia de mastitis clínica pueden en cierto grado ser efectivos, pero es necesario recalcar que el uso inadecuado de estos fármacos en el tratamiento de esta enfermedad y en el secado de vacas al final de la lactancia, puede a corto o a largo plazo inducir resistencia en las bacterias causantes de mastitis.

La mastitis bovina es una enfermedad de mucha relevancia y que genera grandes costos al sector lácteo, su prevención y control depende en gran medida de cómo se actúe frente a ella, se deben adoptar prácticas que conlleven a dirigir un tratamiento muy efectivo, como es el caso de identificación bacteriana y antibiogramas que ayuden a determinar con precisión que antibióticos son los más adecuados para la terapia.

VII. RECOMENDACIONES

Se recomienda desarrollar programas terapéuticos con base a estudios de laboratorio (antibiogramas), que vayan dirigidos a un específico grupo de bacterias, utilizando un selecto número de antibióticos, esto para evitar la aparición de bacterias resistentes.

Realizar de forma frecuente la prueba de California Mastitis (CMT) Test o Draminski, para conocer y llevar un mejor control sobre el nivel de infección del hato lechero. De esta forma se podrá mejorar las condiciones sanitarias y se logrará así una mejor producción.

Establecer y poner en práctica un protocolo de ordeño dirigido a las buenas prácticas de higiene para lograr entregar al público consumidor un producto de calidad, libre de cualquier agente patógeno que pueda causar daño a la salud.

Mejorar las prácticas de bioseguridad en el CAFoP bovino con el objetivo de asegurar la sanidad animal y contribuir de esta forma con el bienestar animal.

Es necesario seguir realizando estudios similares para conocer los posibles cambios en la expresión de resistencia bacteriana a los antibióticos.

VIII. LITERATURA CITADA

- Berrios Fuentes, K. E., y Martínez Payan, J. Y. (2018). *Bacterias aisladas en muestras de otitis en caninos (Canis lupus Familiaris) remitidos al Laboratorio Veterinario (LABVET) en el período de enero 2015-febrero* [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Agraria]. Repositorio institucional. <https://repositorio.una.edu.ni/3693/1/tnl73b533.pdf>
- Bisso-Andrade, A. (2018). Resistencia a los antimicrobianos. *Revista de la Sociedad Peruana de Medicina Interna*, 31(2), 50-59. <http://51.79.48.69/index.php/spmi/article/view/32/31>
- Calderón Rojas, G., y Aguilar Ulate, L. (2017). Resistencia antimicrobiana: Microorganismos más resistentes y antibióticos con menor actividad. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*, 73(621), 757-763. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revmedcoscen/rmc-2016/rmc164c.pdf>
- Camacho Chimoy, M. D. (2019). *Prevalencia de mastitis subclínica mediante la prueba california mastitis test en ganado criollo lechero-distrito de Imaza. setiembre-diciembre 2017* [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo]. Repositorio institucional. <https://repositorio.unprg.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12893/3159/BC-TES-TMP-1946.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Cámara Nicaragüense del Sector Lácteo (CANISLAC). (2019, 3 de marzo). *¿Cómo se encuentra el sector lácteo de Nicaragua?* <https://canislac.com/como-se-encuentra-el-sector-lacteo-de-nicaragua/#:~:text=%E2%80%9CHace%205%20a%C3%B1os%2C%20ten%C3%ADamos%20vol%C3%BAmenes,cifras%20altas%20para%20cada%20a%C3%B1o>
- Chamba Infante, D. J. (2019). *“Prevalencia de mastitis subclínica en vacas de la asociación de ganaderos de pueblo nuevo de colán - provincia de paita – piura - Perú 2018”*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional de Piura]. Repositorio institucional. <http://repositorio.unp.edu.pe/handle/UNP/1802>

- Campos Lacayo, N. S., y Meléndez Orozco, W. A. (2012). *Agentes bacterianos implicados en mastitis subclínica de las fincas que abastecen los Acopios ASOGANA de Nagarote y Santo Tomas de El Viejo, septiembre a noviembre 2011* [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-León]. Archivo digital. <http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/bitstream/123456789/5658/1/221119.pdf>
- Chasi Rodríguez, E. S. (2015). *Prevalencia de mastitis mediante la prueba de california mastitis test con identificación del agente etiológico, en el centro de acopio de leche de la comunidad de muyurco, Cayambe-Ecuador, 2014* [Tesis de pregrado, Universidad Politécnica Salesiana sede Quito]. Archivo digital. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/9839/1/UPS-YT00309.pdf>
- Chavarría Narváez, S. E., y Meléndez Martínez, L. M. (2012). *Identificación de agentes bacterianos implicados en mastitis subclínica y perfil de resistencia en vacas que abastecen los centros de acopio Tecuaname y El Sauce en el departamento de León. Septiembre Noviembre 2011* [Tesis de pregrado, Universidad Autónoma de León]. Archivo digital. <http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/bitstream/123456789/5929/1/221118.pdf>
- Coronel Samaniego, D. I., y Espinosa Suárez, M. I. (2016). *Prevalencia de mastitis subclínica en la región oriental de la provincia del Azuay, mediante la prueba California Mastitis Test.* [Tesis de pregrado, Universidad de Cuenca]. Archivo digital. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/25537>
- Díaz Barrera, K. M., y Pérez Matamoros, M. d. (2013). *Comparación de índice productivo y reproductivo bovino en ocho fincas ganaderas, Departamento de Matagalpa, segundo semestre 2012.* [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua]. Repositorio institucional. <http://repositorio.unan.edu.ni/id/eprint/7003>
- DRAMINIŃSKI. (2015, 6 de Junio). *DRAMINSKI*. <https://www.draminski.es/agri/detectores-de-mastitis/draminski-detector-de-mastitis-4x4q/>
- El19digital. (2021, 12 de Mayo). *Plan Nacional de Producción de Carne de Res y Leche 2020-2021 en Nicaragua.* el19digital: <https://www.el19digital.com/articulos/ver/titulo:115936-plan-nacional-de-produccion-de-carne-de-res-y-leche-2020-2021-en-nicaragua>

- Florentín Aponte, C. C. (2007). Perfil de resistencia in vitro a antimicrobianos de cepas causantes de mastitis aisladas de leche cruda bovina en establecimientos de pequeña y mediana producción. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, 5(1), 19-25. http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1812-95282007000100005
- Gastelo Acosta, R., y Maguiña Vargas, C. (2018). Mecanismos de resistencia bacteriana. *DIAGNÓSTICO*, 57(2), 82-86. <http://142.44.242.51/index.php/diagnostico/article/view/82/92>
- Giono-Cerezo, S., Santos-Preciado, J. I., Morfín-Otero, M. d., Torres-López, F. j., y Alcántar-Curie, M. D. (2020). Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzos por contenerla. *Gaceta medica de Mexico*, 156(2), 172-180. <https://doi.org/10.24875/gmm.20005624>
- Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI). (2023, 5 de marzo). *CLSI eclipse*. <http://em100.edaptivedocs.net/Login.aspx>
- Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). (s.f.). *IICA* https://iica.int/es/prensa/noticias?combine=SECTOR+LACTEO&field_topics_target_id=All&field_country_target_id=29
- Mamani Quispe, R. E. (2014). *Prevalencia y factores de riesgo de mastitis subclínica en vacunas brown swiss del Distrito de Cupi-Melgar* [Tesis de pregrado, Universidad Arturo Prat]. Repositorio institucional. <http://repositorio.unap.edu.pe/handle/UNAP/2173>
- Molina, V., y Espinosa, A. (2008). Aislamiento, identificación y antibiograma de patógenos presentes en leche con mastitis en ganaderías bovinas de la provincia de Pichincha. *Universidad de las Fuerzas Armadas*, 34-49. <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/2553/1/T-ESPE-IASA%20I-003435.pdf>
- March-Rosselló, G. A. (2017). Métodos rápidos para la detección de la resistencia bacteriana a antibióticos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 35(3), 182-188. <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-metodos-rapidos-deteccion-resistencia-bacteriana-S0213005X16303986>

- Meza Robleto, A. N., y Flores Garcia , E. N. (2019). *Determinación de la prevalencia de mastitis bovina a través del método de conductividad eléctrica (Draminski Mastitis Detector) en cuatro fincas de la comarca panamericana, Camoapa , departamento de Boaco , Noviembre 2018* (Tesis doctoral, Universidad Nacional Agraria). Repositorio institucional.
<https://repositorio.una.edu.ni/4055/1/tnl73m617.pdf>
- Martínez-Pacheco, D., Cruz-Carrillo, A., Millán A., y Moreno-Figueredo, G. (2015). Evaluación del estado de resistencia de agentes etiológicos de mastitis clínica y subclínica frente a algunos antimicrobianos utilizados en hembras bovinas del municipio de Sotaquirá (Boyacá-Colombia). *Revista Científica*, 25(3), 223-231.
[file:///C:/Users/USER/Downloads/95939206006%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/USER/Downloads/95939206006%20(1).pdf)
- Mendoza, J. A., Vera, Y., y Peña, L. C. (2017). Prevalencia de mastitis subclínica,. *Med VetZoot*, 64(2), 14. doi:Doi: 10.15446/rfmvz.v64n2.67209.
- Meza, F., y F. C. (2020). *Prevalencia y perfil de resistencia antimicrobiana de bacterias causantes de mastitis aisladas en leche cruda bovina en un establecimiento de la localidad de Shoenweide del Departamento de Presidente Hayes – Paraguay* [Tesis doctoral, Universidad Nacional de La Plata]. Archivo digital.
<http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/124897>
- Moriano Flores, C. Y. (2018). *Prevalencia de mastitis subclinica en bovinos criollos(Bos taurus) en el distrito de pocobamba,Andahuaylas,Apurimac* [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Micaela Bastidas de APURIMAC]. Repositorio institucional.
<http://repositorio.unamba.edu.pe/handle/UNAMBA/594>
- Mulato Sánchez , J. (2018). *Resistencia antibiotica a los agentes causantes de mastitis en vacas* [Tesis de pregrado, Universidad Nacional de Huancavelica]. Repositorio institucional.
<http://repositorio.unh.edu.pe/handle/UNH/1913>
- Noriega Bravo, J. D. (2022). *Determinación de resistencia bacteriana en enterobacterias aisladas de cobayos de producción mediante antibiogramas* [Tesis de pregrado, Universidad Politécnica Salesiana]. Archivo digital.
<http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/22333>

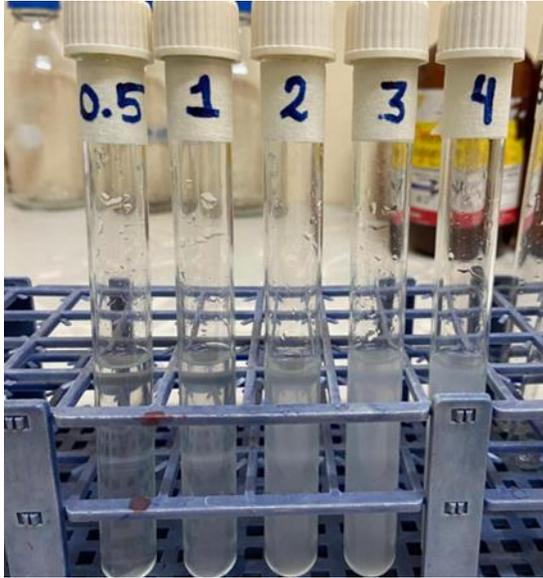
- Pertejo, M. T. (2020, 8 de Junio). *MANUAL MSD*.
<https://www.msmanuals.com/es/professional/enfermedades-infecciosas/diagn%C3%B3stico-de-laboratorio-de-las-enfermedades-infecciosas/pruebas-de-sensibilidad-o-antibiogramas>
- Reyes Sánchez, E. A., y Arguello Sánchez, J. S. (2015). *Estudio comparativo entre los métodos diagnósticos para mastitis Subclínica, California test y DRAMINSKI 4Q en vacas Jersey, Diriamba-Carazo, Agosto-Octubre* [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Agraria]. Repositorio institucional. <http://repositorio.una.edu.ni/3214/1/tnl73r457.pdf>
- Rivera Suarez, A. M. (2014). *Determinación de la Prevalencia de Mastitis Subclínica en ganado Reyna, Rancho Los Peiranos, Nandaimé, Granada* [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Agraria]. Repositorio institucional. <https://repositorio.una.edu.ni/id/eprint/2741>
- Rivera Valera, M. I., y Torrez Calix, M. A. (2012). *Resistencia antimicrobianas de bacterias aisladas en leche de vacas con mastitis subclínica, en fincas que abastecen los centros de acopio de Achuapa y Larreynaga, Septiembre-Noviembre 2011* [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-León]. Archivo digital <http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/bitstream/123456789/5659/1/221120.pdf>
- Trujillo Chávez, C. E. (2016). *Análisis microbiológico y resistencia a antimicrobianos de la leche cruda que se expende en el mercado de Santa Rosa, Ciudad de Riobamba* [Tesis de pregrado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. Repositorio institucional. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/6328>
- Vásquez Jaramillo, L. (2016). *Prevalencia de Enterobacteriaceae productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en muestras de tanques de leche de hatos lecheros del municipio de Entreríos, Antioquia, Colombia* [Tesis de maestría, Universidad de Antioquia]. Archivo digital. <https://bibliotecadigital.udea.edu.co/handle/10495/5638>

IX. ANEXOS

Anexo 1. Formato de hoja de registro de resultados

Fecha	Identificación	Raza	Bacteria Aislada	Diámetro del halo en mm	Sensible	Intermedio	Resistente

Anexo 2. Escala de MacFarland de 0.5%



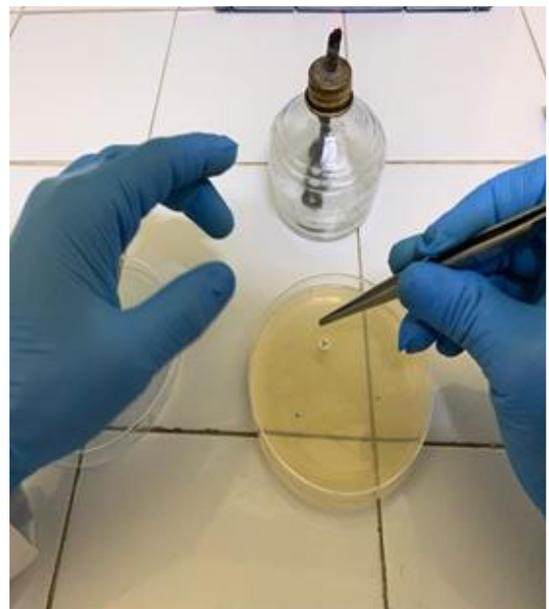
Anexo 3. Preparación del inoculo



Anexo 4. Siembra bacteriana en agar Müeller Hinton



Anexo 5. Colocación de disco



Anexo 6. Antibiograma de *Corynebacterium spp*



Anexo 7. Antibiograma de *Klebsiella spp*



Anexo 8. Antibiograma de *S. aureus*



Anexo 9. Medición de halos para determinación de sensibilidad y resistencia



Anexo 10. Lista de halos de inhibición de la CLSI para determinación de resistencia bacteriana



-  Hogar
-  Relacionado
-  página por página
-  TOC
-  Arriba
-  Abajo
-  Vista completa

Agente antimicrobiano	Staphylococcus spp. Indicaciones	Contenido del disco	Categorías interpretativas y puntos de corte de diámetro de zona, mm entero más cercano				Categorías interpretativas y puntos de corte de CIM, µg/mL				Comentarios
			S	SDD	I	R	S	SDD	I	R	
PENICILINAS LÁBILES A LA PENICILINASA											
<p>(10) Los estafilococos sensibles a la penicilina son susceptibles a otros agentes β-lactámicos con eficacia clínica establecida para las infecciones estafilocócicas (incluidos los agentes lábiles a la penicilinas y estables a la penicilinas; consulte el Glosario I). Los estafilococos resistentes a la penicilina son resistentes a las penicilinas lábiles a la penicilinas.</p> <p>(11) La penicilina debe usarse para probar la susceptibilidad de todos los estafilococos a las penicilinas lábiles a la penicilinas (ver Glosario I). Las cepas de estafilococos resistentes a la penicilina producen β-lactamasa. Realice una(s) prueba(s) para detectar la producción de β-lactamasa en estafilococos para los cuales las CMI de penicilina son ≤ 0,12 µg/mL o diámetros de zona ≥ 29 mm antes de informar el aislado como sensible a la penicilina. Aislados raros de estafilococos que contienen genes para la producción de β-lactamasas pueden parecer negativos en las pruebas de β-lactamasas. En consecuencia, para las infecciones graves que requieren terapia con penicilina, los laboratorios deben realizar pruebas de MIC y pruebas de β-lactamasa en todos los aislamientos subsiguientes del mismo paciente. Se puede considerar la prueba de PCR del aislado para el gen de la β-lactamasa <i>bla</i> Z. Consulte la Tabla 3F.</p>											
Penicilina	Todos los estafilococos	10 unidades	≥ 29	-	-	≤ 28	≤ 0,12	-	-	≥ 0,25	(12) Para MRS, informe como resistente a la penicilina o no informe.
PENICILINAS ESTABLES A LA PENICILINASA											
<p>(13) La cefoxitina se prueba como sustituto de la oxacilina para algunas especies de <i>estafilococo</i>. Los aislados que resulten resistentes a la cefoxitina o la oxacilina, cuando se utilice el método de prueba adecuado para la especie, deben informarse como resistentes a la metilicina (oxacilina). Si prueba solo cefoxitina, informe como susceptible o resistente a la metilicina (oxacilina) según el resultado de cefoxitina.</p> <p>(14) Los resultados de oxacilina (o cefoxitina) se pueden aplicar a las otras penicilinas estables a la penicilinas (cloxacilina, dicloxacilina, metilicina y nafcilina). Para agentes con eficacia clínica establecida y teniendo en cuenta el sitio de infección y la dosificación adecuada, los estafilococos sensibles a la metilicina (oxacilina) pueden considerarse sensibles a:</p>											

• Agentes combinados de β-lactámicos (amoxicilina-clavulanato, ampicilina-sulbactam, piperacilina-tazobactam)

Usted está aquí: CLSI M100 ED33:2023 TABLA 2C PARA 2 [Datos de la tabla]

Condiciones de uso

Soporte/Comentarios | Cerrar sesión