

**PROCEDIMIENTOS DE IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS CAUSANTES DE LA  
MASTITIS EN BOVINOS Y PRUEBAS DE SENSIBILIDAD: PASANTÍA EN EL  
LABORATORIO DE CIENCIAS BÁSICAS DE LA UNIVERSIDAD ANTONIO NARIÑO,  
BOGOTÁ**



**Laura Yohana Rodríguez Pulido**

**Universidad Antonio Nariño**

**Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

**Sede (Bogotá), Colombia**

**2022**

**PROCEDIMIENTOS DE IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS CAUSANTES DE LA  
MASTITIS EN BOVINOS Y PRUEBAS DE SENSIBILIDAD: PASANTÍA EN EL  
LABORATORIO DE CIENCIAS BASICAS DE LA UNIVERSIDAD ANTONIO NARIÑO,  
BOGOTÁ**



**Laura Yohana Rodríguez Pulido**

**Código estudiantil UAN 10511422239**

**Trabajo de grado (Modalidad de pasantía) presentado como requisito para optar al título de;**

**Médico Veterinario**

**Director**

**Francisco Javier Vargas. Médico Veterinario, MSc, PhD**

**Universidad Antonio Nariño**

**Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

**Sede (Bogotá), Colombia**

**2022**

**PROCEDIMIENTOS DE IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS CAUSANTES DE LA  
MASTITIS EN BOVINOS Y PRUEBAS DE SENSIBILIDAD: PASANTÍA EN EL  
LABORATORIO DE CIENCIAS BASICAS DE LA UNIVERSIDAD ANTONIO NARIÑO,  
BOGOTÁ**

**Laura Yohana Rodriguez Pulido**

**TRABAJO DE GRADO APROBADO**

Jurado 1

Jurado 2

Jurado 3

**Universidad Antonio Nariño**

**Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

**Sede (Bogotá), Colombia**

**2022**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecimiento primero que todo a mi tutor Francisco Javier Vargas Ortiz, Médico veterinario y zootecnista, por su compromiso y guía durante todos los trabajos de grados en sus diferentes modalidades, siempre siendo un apoyo para poder lograr la aceptación en el laboratorio de la universidad.

Agradezco a la docente Yuly Bernal del departamento de biología, por la oportunidad de entrar al laboratorio y brindarme su conocimiento y paciencia dentro del laboratorio de la universidad ya que me brindo conceptos importantes a la hora de realizar las diferentes actividades del laboratorio con más detalle de las muestras.

## RESUMEN

La mastitis se define como la inflamación de la glándula mamaria y es considerada como una enfermedad infecciosa de las vacas lecheras de mayor impacto económico en la explotación láctea mundial. Existe diferentes medidas de control de este problema, pero en la actualidad la aplicación intramamaria de antibióticos es la medida más utilizada para prevenir y tratar el problema, esto con lleva al uso indiscriminado de estos, Sin embargo, el principal inconveniente de usar antibióticos es que favorece la selección de cepas resistentes en la población microbiana influyendo negativamente en el tratamiento de la enfermedad. Uno de los mayores desafíos en la industria lechera es reducir el uso de antibióticos en los animales productores de alimentos para el consumo humano.

Ante este panorama, es necesario buscar nuevos métodos de control alternativos como el propóleo, lisozima y nanopartículas metálicas específicamente la de plata, teniendo un enfoque innovador para controlar las infecciones y generando una alternativa al tratamiento con antibióticos en las ganaderías de leche que están siendo afectadas por mastitis. Para el desarrollo de los diferentes tratamientos alternativos como propóleo, lisozima y nanopartículas usados durante la prueba del montaje en placa fueron obtenidos mediante diferentes procesos en cada uno de los laboratorios para así ser utilizado invitro en bacterias previamente aisladas de vacas con mastitis, ya que estas poseen características antibacterianas ya que intervienen en procesos moleculares dentro de los microorganismos.

La importancia del laboratorio como ayuda fundamental para identificar el microorganismo causal de la patología que presenta la glándula mamaria debería ser una de las primeras medidas para elegir el tratamiento a seguir y así evitar la resistencia a antibióticos, esto genera la pregunta de si hay suficientes lugares y personas capacitadas para el procesamiento de estas muestras, por este problema debería haber más lugares y gente capacitada para el procesamiento, antes de la pasantía me comentaron sobre esta problemática, pensé en formarme y capacitarme en la parte del laboratorio, algunos de los microorganismos aislados en el laboratorio, se evidencio que predominaron las bacterias cocos gram positivas, estos resultados coinciden con lo señalado por algunos autores en Colombia que señalan que las bacterias predominantes son: *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*.

Finalmente se concluye que se debe concientizar tanto a los ganaderos como a los médicos veterinarios que el uso indiscriminado de los antibióticos genera resistencia, si no se toma conciencia de usar alguna de las nuevas alternativas o por lo menos realizar la caracterización de

las bacterias causantes de mastitis mediante pruebas de laboratorio ya que es una excelente opción para los hatos que inciden sin saber cuál es el patógeno de base para combatir.

### **PALABRAS CLAVE**

Mastitis, Bacterias, Tratamiento alternativo (propóleo, Lisozima y Nanopartículas), Agares, Tinción de gram, Antibiograma, Prueba catalasa, coagulasa, Pruebas de sensibilidad.

### **ABSTRACT**

Mastitis is defined as inflammation of the mammary gland and is considered an infectious disease of dairy cows with the greatest economic impact on global dairy farming. There are different control measures for this problem, but currently the intramammary application of antibiotics is the most widely used measure to prevent and treat the problem, which leads to their indiscriminate use. However, the main drawback of using antibiotics is that favors the selection of resistant strains in the microbial population, negatively influencing the treatment of the disease. One of the biggest challenges in the dairy industry is to reduce the use of antibiotics in animals that produce food for human consumption.

Given this panorama, it is necessary to look for new alternative control methods such as propolis, lysozyme and metallic nanoparticles, specifically silver, having an innovative approach to control infections and generating an alternative to antibiotic treatment in dairy farms that are being affected. For the development of the different alternative treatments such as propolis, lysozyme and nanoparticles used during the plate assembly test, they were obtained through different processes in each of the laboratories in order to be used in vitro in bacteria previously isolated from cows with mastitis, since these They have antibacterial characteristics since they intervene in molecular processes within microorganisms.

The importance of the laboratory as a fundamental aid to identify the causal microorganism of the pathology presented by the mammary gland should be one of the first measures to choose the treatment to follow and thus avoid antibiotic resistance, this raises the question of whether there are enough places and people trained to process these samples, because of this problem there should be more places and people trained for processing, before the internship they told me about this problem, I thought about training myself in the laboratory, some of the isolated microorganisms in the laboratory, it was evidenced that gram-positive cocci bacteria predominated, these results coincide with what has been indicated by some authors in

Colombia who indicate that the predominant bacteria are: *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*.

Finally, it is concluded that both farmers and veterinarians should be made aware that the indiscriminate use of antibiotics generates resistance, if they are not aware of using any of the new alternatives or at least characterizing the bacteria that cause antibiotics. mastitis through laboratory tests, since it is an excellent option for herds that have an incidence without knowing what the basic pathogen to combat is.

### **KEYWORDS**

Mastitis, Bacteria, Alternative treatment (propolis, Lysozyme and Nanoparticles), Agars, Gram stain, Antibioqram, Catalase, coagulase test, Sensitivity tests.

## INTRODUCCIÓN

El laboratorio de ciencias básicas de la Universidad Antonio Nariño es un lugar utilizado por los colaboradores para desarrollar proyectos aprobados a través de convocatorias internas y externas o en proyectos colaboradores, ofrecen diferentes servicios como consultoría especializada, préstamo de instalaciones, productos generalizados a partir de los proyectos de investigación y servicios especializados, Además cuenta con diferentes equipos que permiten desarrollar procesos investigativos o académicos que aportan continuamente al conocimiento científico del país y espacios físicos para las diferentes áreas de investigación.

La UAN cuenta con laboratorio de Cultivo Celular, Genética Molecular, Microbiología, Química, Registros electrofisiológicos, Microbiología Veterinaria, Genética Molecular Veterinaria, ingeniería Ambiental, Equipos Robustos, Nanomateriales, Física de fluidos, Detectores, Captura y análisis de movimiento, Inteligencia Computacional, ingeniería de rehabilitación, ingeniería Civil, corrosión y ensayos mecánicos.

Dentro de las instalaciones del laboratorio de la universidad Antonio Nariño cuenta con espacios especializados que permiten desarrollar proyectos de investigación en diferentes tópicos del conocimiento. Las locaciones están dotadas con equipos de última tecnología, lo cual asegura nuestro aporte en diferentes áreas del conocimiento como: Ciencias Naturales, Exactas y aplicadas, Ciencias de la salud y ciencias humanas.

En esta pasantía se plantearon diferentes objetivos en los cuales queríamos determinar el tratamiento alternativo *invitro* más efectivo para vacas con mastitis, para ello realizamos primero la identificación de las bacterias que afectan la glándula mamaria de las vacas mediante diferentes pruebas como: tinción de gram, siembra en diferentes agares y caldos, antibiograma, catalasa, coagulasa y recuento en placa, estas pruebas nos arrojan diferentes resultados que son recopilados en tablas para organizar los datos para lograr identificar si es una bacteria gram negativa o gram positiva y así identificar cual tratamiento es el más adecuado para dichas bacterias, La iniciación de este proyecto se dio al ver la resistencia bacteriana que presentan los casos de mastitis en vacas debido al uso indiscriminado de los antibióticos.



## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La mastitis bovina es la inflamación de la glándula mamaria, es uno de los problemas más comunes que afecta al ganado bovino y la producción de la vaca, esta inflamación se presenta en varios grados y se desarrolla en uno o en todos los cuartos, esta inflamación puede ser ocasionada por diferentes factores como físicos, bacteriológicos, de manejo, en la rutina del ordeño, por la higiene en los materiales usados durante el ordeño; también están involucrados los factores biológicos en la vaca como raza, edad, número de partos, producción de leche entre otros (Oliver y Almeida, 2001).

La leche es uno de los alimentos de mayor consumo a nivel mundial, pero su calidad puede variar principalmente por animales que presentan daños en la ubre como en la mastitis, este problema genera pérdidas económicas a los ganaderos. Existen gran variedad de tratamientos para la mastitis del ganado bovino, a pesar de ello, la poca efectividad de ciertos productos usados para este problema y el fenómeno mundial que existe de la resistencia a antibióticos, bajo estas condiciones es difícil controlar el problema. (Andrade M., et al 2017).

En Colombia la cadena láctea contribuye a establecer mecanismos que permiten regular el mercado de manera estructural de la leche cruda, que contribuyan y faciliten las actividades de producción y comercialización, con sostenibilidad ambiental, económica y social, minimizando la reducción en la producción y cambios en la posición que reducen la calidad de esta. Sobre la calidad microbiológica es importante remarcar que la presencia de mastitis subclínica involucra la producción de leche con características no deseadas y a eso se le suma el uso indiscriminado de antibióticos esto muestra que día a día se presenta incremento en los factores de resistencia por parte de las bacterias que causan la inflamación de la glándula mamaria y además de un alto grado de residualidad que tiene un relevante impacto en la salud pública (Andrade M., et al 2017).

Los fármacos antimicrobianos han sido utilizados en la producción lechera por más de cinco décadas. Se usan principalmente para tratar o prevenir infecciones en la ubre, pero también se aplica para el tratamiento de otras enfermedades (Hillerton H. 1999).

El uso indiscriminado de los antibióticos, especialmente cuando no es aplicado en el momento y elección adecuado por un profesional veterinario, determina la aparición en la leche, con consecuencias graves en la salud del consumidor, por factores como falta de conocimiento sobre los fármacos (vías de excreción, duración, acción y farmacocinética) o bien por seguir percibiendo los beneficios que se obtienen de la leche o subproductos, no siguen las sugerencias del producto como el tiempo de retiro (Kabir et al., 2004).

Ocasionando la contaminación de toda la leche acopiada en el momento de almacenarla en los contenedores a la temperatura adecuada. Esto interpreta un problema de salud pública, porque los residuos farmacológicos en la leche no desaparecen completamente ni con tratamientos térmicos, ni con fermentación. Por lo que si se fabrican productos lácteos o leche tratada térmicamente a partir de leches que tengan residuos farmacológicos, los consumidores ingieren los mismos medicamentos generando problemas en la salud (Kabir et al., 2004).

El problema de la resistencia bacteriana es más grave ya que si se considera en investigaciones, tanto epidemiológicas como clínicas, han demostrado que cada vez son menos las barreras para la transferencia de genes resistentes entre microorganismos patógenos, incluso entre bacterias de familias y géneros diferentes como también para la transferencia horizontal de bacterias resistentes de los animales al hombre y viceversa (Heisig y col., 1995; Molbaky col.,1999). El tema de la multi resistencia ha sido preocupación en la mayoría de los países, en algunos de ellos han iniciado programas de monitoreo de resistencia bacteriana ya que estas ayudan a fomentar el uso racional de antibióticos en animales de producción (Altreuther y col., 1997; Bager, 2000; Martel y col., 2000).

Para ello existen diferentes alternativas como enzimas (endolisinas y lisozimas), extractos de plantas, péptidos antimicrobianos, ácidos orgánicos, inmunomoduladores, vacunas, propóleo y nanopartículas de plata (Cheng et al, 2014 and The Pew Charitable Trust, 2017).

De esta forma, se realiza la pregunta si los tratamientos alternativos son la opción más adecuada y eficaz para tratar la mastitis, esto genera un espacio para incursionar en la búsqueda de alternativas de tratamiento antibacteriano para el control de esta enfermedad infecto-contagiosa con los beneficios que esto con lleva para el bolsillo del ganadero, en la sanidad animal y en la salud pública.

Aportando en mi aprendizaje sobre técnicas de laboratorio durante el tiempo de la pasantía se establecieron protocolos para agilizar el paso a paso de las pruebas necesarias para la llegada de la muestra, estos protocolos ayudan a capacitar personal para realizar dichas pruebas que nos ayudan a identificar microorganismos, exponiéndolos a pruebas de sensibilidad para probar otros productos como propóleo, lisozima, nanopartículas.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

- Adquirir destrezas en técnicas de laboratorio para identificar bacterias causantes de mastitis en bovinos y pruebas de sensibilidad de diferentes productos que pueden ser usados como alternativa a los antibióticos.

### **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Preparar de manera adecuada los diferentes materiales que son necesarios para las pruebas que se llevaron a cabo durante la pasantía.
- Aprender y estandarizar los procesos para la identificación de bacterias causantes de la mastitis en muestras de leche de vacas y pruebas de antibiograma.
- Aprender a realizar de manera correcta un montaje en placa para medir la sensibilidad de las bacterias a diferentes productos. (Propóleo, lisozima y nanopartículas).
- Interpretar resultados de las pruebas de laboratorio.

## **JUSTIFICACIÓN**

Es muy importante formar al personal en el laboratorio para realizar este tipo de procesos y estandarizar las técnicas de laboratorio y procedimientos para realizar las pruebas de sensibilidad ya que esto nos ayuda a realizar las pruebas de una manera más rápida, eficaz y sin contratiempos. La mastitis es una de las patologías que afecta a la glándula mamaria comprometiendo uno o todos los cuartos de la vaca, esto genera deficiencia en la calidad de la leche, disminución en la producción, un costo adicional para el ganadero en la compra de productos que son usados como tratamiento para esta patología, los más usados son los antibióticos debido al uso indiscriminado los microorganismos se han vuelto resistentes a la mayoría de dichos productos, para esto incursionamos en tratamientos alternativos como propóleo, lisozima y nanopartículas.

La universidad Antonio Nariño cuenta con equipos, espacios especializados y profesionales altamente capacitados, la cual la hace un lugar muy completo para el procesamiento de las pruebas de este proyecto, además de todo cuenta con diferentes áreas que se complementan unas con otras para lograr objetivos de diferentes proyectos y obtener mejores resultados, en esta pasantía de investigación amplíe mi conocimiento de cómo se procesa desde cero una muestra de leche de una vaca con mastitis, como identificar una colonia pura o no de una bacteria, como preparar los diferentes agares que usamos, identificar lo que nos indica si una colonia crece, si es negativa o positiva en los diferentes agares, de cómo se ve positivo o negativo en caldo, diferentes tipos de pases que realizamos en los agares, realizar una prueba de gram e identificar si es gram negativa o gram positiva, realizar un antibiograma y realizar la medida del alo, realizar un conteo bacteriológico, planear e identificar todo lo que se requiere para un montaje en placa, aprender a utilizar los equipos del laboratorio, entre otras cosas realizadas durante el laboratorio de ciencias básicas de la UAN.

## **DESCRIPCIÓN DE LA ENTIDAD O LA INSTITUCIÓN**

La universidad Antonio Nariño es una entidad privada de educación superior de Colombia con sede principal en Bogotá, cuenta con diferentes sedes a nivel nacional, pertenece al sector de trabajo y maneja la actividad económica principal educación, el objetivo que maneja la UAN es estimular el talento para la innovación en los miembros de la comunidad universitaria y dinamizar la estructura organizacional y los procesos de gestión, administración y evaluación, acorde con el dimensionamiento, la naturaleza y la complejidad de la institución, la Universidad Antonio Nariño tiene como misión formar ciudadanos idóneos y competitivos, éticos y humanistas, con pensamiento autónomo y crítico y personas altamente calificadas y comprometidas con los procesos de transformación positiva del país, fundamentados en la incorporación, difusión, generación e

innovación del conocimiento universal. La visión de la UAN es posicionarse como una de las mejores universidades del país, con pensamiento crítico, autónomo y global, acreditada nacional e internacionalmente, al estar a la vanguardia del conocimiento, contribuye a la competitividad nacional en ciencias, artes y tecnología, es el reto de la universidad. Dentro de los valores la universidad Antonio Nariño se encuentra la lealtad (Es el cumplimiento de deberes y acciones con fidelidad, honor y buena voluntad, confianza (El respeto y la credibilidad establecidos a partir del principio de la buena fe indispensable para el buen ejercicio de la vida en comunidad. En cuanto a la estructura organizacional de la UAN. La estructura organizacional de la UAN encontramos de primer lugar la vicerrectoría administrativa ,debajo de esta posición encontramos la oficina de gestión administrativa de sedes, oficina de logística, oficina de calidad y procesos y por ultimo esta la oficina de infra estructura física, estas se ramifican en tres grandes grupos el primero de ellos es la dirección financiera que se compone del departamento de contabilidad, crédito y cartera, inventarios, tesorería, el segundo es la dirección de gestión humana que se compone con el departamento de administración recurso humano y departamento de desarrollo humano y por último encontramos la dirección TIC que se compone del departamento del centro de apoyo a la educación virtual, depto. servicios administrativos y financieros, depto. servicios de hardware y software, depto. servicios de redes y comunicaciones e infraestructura, depto. sistemas de información para la investigación y el depto. universidad virtual.

#### **PROFESIONAL RESPONSABLE**

- Francisco Javier Vargas. Médico Veterinario, MSc, PhD.
- Yuly Elien Bernal Rosas. Bacterióloga, MSc.

## MARCO TEORICO

La inflamación de la ubre es llamada mastitis, esta puede tener dos presentaciones, la clínica en donde se observan cambios en la ubre y la leche como grumos, cambios de color, material purulento e inflamación de la ubre y la otra es la mastitis subclínica, la leche y la ubre no presentan cambios, pero las células somáticas en leche se encuentran aumentadas, pero esta solo puede ser detectada con pruebas especiales. (Andresen S, Hans. 2001).

La mastitis clínica se clasifica en varios subtipos (Heeschen,2012):

**Mastitis per-aguda:** Es caracterizada por estos signos clínicos como inflamación en la ubre, reducción en la producción de leche y cambios en la composición de la leche, acompañado de signos sistémicos como fiebre, depresión, anorexia y signos de toxemia que pueden llegar a producir la muerte del animal.

**Mastitis aguda:** Tiene cierta similitud con la per aguda, ya que los signos inflamatorios en la glándula mamaria y cambios en las características de la leche, pero sin signos sistémicos o signos muy leves como fiebre, anorexia y depresión.

**Mastitis subaguda:** Se presentan cambios en las características de la leche, sin signos de inflamación en la ubre ni signos sistémicos.

**Mastitis crónica:** Es un proceso inflamatorio que llega a prolongarse hasta por varios meses e incluso varias lactancias y de manera periódica el animal muestra signos agudos. Estas mastitis llegan hasta la formación de procesos purulentos o fibrosis que pueden causar la pérdida completa del cuarto afectado.

**Mastitis de verano (mastitis en novillas y vacas secas):** Es una enfermedad aguda que afecta a las novillas y vacas en el periodo seco y que causa dolor en la ubre con inflamación, daño extensivo y fibrosis que generalmente producen la pérdida completa del cuarto afectado llevando al descarte temprano del animal. Este tipo de mastitis principalmente es causado por *Staphylococcus aureus*, está relacionada con la presencia de una población muy alta de moscas que son vectores que ayudan para la transmisión del agente causal. Estas mastitis están relacionadas con un manejo deficiente de los animales por el uso de leche de vacas con mastitis en la lactancia que favorece a la transmisión de patógenos desde la cavidad oral a los pezones de animales jóvenes.

La mastitis subclínica está asociada a la presencia de una infección intramamaria (IIM) por algún patógeno causante de mastitis, esta se caracteriza por cambios en la composición de la leche,

con un aumento en el conteo de células somáticas (CCS) con valores mayores a 100.000 cel/ml, logrando alcanzar valores mayores a 1.000.000 cel/ml.

En la mastitis subclínica la calidad de la leche disminuye (Wustemberg, 2018, Barbano y Santos, 2006) y produce pérdidas económicas, el 70% son debidas a la reducción en la producción de leche y el 30% sobrante es debido al descarte de animales por mastitis crónicas, leche rechazada a nivel de plantas, en tratamientos y gastos veterinarios.

Para lograr aumentar la producción y calidad de leche comercializada es necesario instaurar un adecuado control de la mastitis en la finca, que conlleva principalmente a un control de la mastitis subclínica. No es suficiente usar antibióticos en las vacas con mastitis; aspectos como la rutina de ordeño, la higiene de la sala y equipo de ordeño, el buen funcionamiento del equipo de ordeño, el manejo adecuado de las vacas secas y una supervisión permanente del programa y de las vacas en producción a través de una prueba de CMT (California Mastitis Test) periódica y evaluación del equipo de ordeño y de la rutina de ordeño son fundamentales. (Philpot y Nickerson, 2002).

La mastitis bovina es una de las enfermedades más importantes en ganaderías de leche que demanda un uso importante de productos antibacterianos y también es una de las causas más comunes de la presencia ilegal de residuos de antibióticos en leche (Erskine, 1996).

Con base a su etiología infecciosa, la mastitis bovina se clasifica en contagiosa y ambiental (Philpot N, Nickerson S. 2002). La mastitis contagiosa es causada por microorganismos como: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis*, *Mycoplasma spp*; y su reservorio es la glándula mamaria y la leche de vacas infectadas. Su transmisión puede ocurrir durante el ordeño por realizar prácticas como el uso compartido de toallas usadas en el momento del lavado y secado de las ubres o por medio de manos del ordeñador que están contaminadas o por el uso de pezoneras no desinfectadas entre vacas durante los ordeños mecánicos (Blowey R, Edmonton P. 1999; Philpot N, Nickerson S. 2002). La mastitis ambiental se produce por microorganismos, gram negativos, habitantes normales del ambiente como *Escherichia coli*, *Klebsiella spp*, *Enterobacter spp*, *Serratia spp*, *Pseudomonas spp* y *Proteus spp* y algunas bacterias gram positivas como: *Streptococcus uberis* y *Streptococcus dysgalactiae* (Smith KL., Hogan JS. 1993).

El microorganismo más relevante en la mastitis infecciosa es el *Staph. aureus* y su importancia radica en que no es un patógeno obligado de la ubre, ya que se puede encontrar también en lesiones de la piel de los pezones, en las camas, manos de los ordeñadores, en los

equipos de ordeño y en la mayoría de las ocasiones, las prácticas de manejo pueden hacer que este agente etiológico llegue hasta el conducto del pezón reaccionando con inflamación en esa área. Este microorganismo cuenta con diferentes factores de virulencia como: leucocidina, proteína A, capsula, formas L, enzimas como la coagulasa y la resistencia a los antibióticos es por ganancia cromosomal o de plásmidos, dando como respuesta que el tratamiento con antibióticos es reducido (Roberson JR, et al 1996; Vestweber JG, Leipold HW. 1993). El género *Staphylococcus* comprende 36 especies, nueve de las cuales contienen subdivisiones; la mayoría de estas son coagulasa negativa, con excepción de *Staph. aureus*, *Staph. intermedius* y *Staph. hyicus* (Miller G, Bartlett P. 2004); microorganismos que han sido aislados de esta enfermedad, aunque hace falta más información acerca de la incidencia y prevalencia (Gentilini E, Denamile G, Godaly MS. 1995; Chaves E, Rojas JA, Rivera P, Hernández F. 2000; Timms LL, Shultz LH. 1997).

Los *Staphylococcus* coagulasa negativos pertenece el *Staph. simulans*, *Staph. xylosus*, *Staph. Warnery* y *Staph. Epidermis*, que hacen parte de la flora normal en la piel de los pezones y usualmente pueden ocasionar formas subclínicas de mastitis (Gentilini E, Denamile G, Godaly MS. 1995; Roberson JR, et al 1996; Timms LL, Shultz LH. 1997).

Algunos otros organismos causantes de la mastitis contagiosa es el *Strep. Agalactiae*, *Mycoplasmas spp* y *Corynebacterium bovis*; La transmisión de estos microorganismos sucede durante el ordeño. *Strep. agalactiae*, es un patógeno obligado de la ubre, que se localiza en la parte superficial de los tejidos y muy sensible a los antibióticos, lo que hace fácil su control e incluso su erradicación (Sandholm M, Honkanen-Busalsaki T, Kaartinen L Pyorala S. 1995). Dentro del grupo de *Mycoplasma* pertenecen el *M. bovis* y el *M. californicum* como los microorganismos más importantes en mastitis clínicas que pasan a formas crónicas de recurrencias periódicas. Estos agentes también se han logrado aislar de las mucosas y de secreciones del tracto reproductivo y urinario (Philpot N., et al 2002).

Las mastitis ambientales son producidas por *Strep. uberis* y *Strep. dysgalactiae*, que ocasionan mastitis de leves a moderadas, la mayoría de los casos ocurren durante el periodo seco. Estos microorganismos se han logrado aislar de diferentes partes como de los genitales externos, de las ubres, de lesiones en la piel de los pezones de las vacas y hasta de las heces fecales (Almeida RA, Mathews KR, Cifrian E, Guidry AJ, Oliver SP. 1996; Blowey R, Edmonton P. 1999; Rebhun WC, Guard C, Richardas CM. 1995). Los coliforms como *Escherichia coli* (*E. coli*), *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), *Enterobacter aerogenes* (*E. aerogenes*) y *Corynebacterium pyogenes* (*C. pyogenes*), también causan mastitis ambientales y son habitantes normales del tracto digestivo de los animales o también se encuentran en el suelo. La infección con estos



microorganismos se produce por la utilización de cánulas, sondas contaminadas y el descuido en las medidas profilácticas como la pobre higiene de los pezones en el lavado y pre sellado y no sellado de los pezones, la aplicación de la terapia de la vaca seca sin una correcta desinfección del esfínter del pezón y la introducción total de la cánula. Las malas prácticas ganaderas en las medidas profilácticas, facilita que algunos de estos microorganismos logran desarrollar signos sistémicos en la vaca y provocar hasta la muerte (Philpot N, Nickerson S. 2002).

El tratamiento de la mastitis ha evolucionado en el tiempo existiendo en la actualidad múltiples antibióticos, aunque no se han desarrollado nuevas moléculas en los últimos años. Sin embargo, las bacterias también han evolucionado y se han hecho más resistentes a múltiples antibióticos, hasta el punto de que muchas se han convertido en súper bacterias multi-resistentes a antibióticos, lo cual se ha convertido en un verdadero problema de salud pública a nivel mundial, ya que muchas de estas bacterias se han originado en los animales y han pasado a los humanos a través de la cadena alimentaria, causando severa enfermedad y muerte en personas, generando alerta a los servicios encargados de la salud pública en todo el mundo (World Health Organization, 2014).

En Montería (Colombia), se encontraron cepas de *S. aureus* resistentes a tetraciclinas y eritromicina, pero sensibles a oxacilina (Calderón et al., 2011). Estudios de resistencia realizados de *E. coli*, en vacas aisladas de vacas con mastitis, muestran resistencia de 92% contra tetraciclina, 90% contra estreptomina, 88% contra ácido nadilixico, 86% contra amikacina y 84% contra cefalotina; así mismo, se identifican 65% de casos de resistencia múltiples fármacos (Momtaz et al., 2012; Idres et al., 2010; Srinivasan et al., 2007).

En los últimos años, el tratamiento de los casos de mastitis clínica ha cambiado, basado en los estudios que se han realizado y por las presiones que han hecho las instituciones internacionales y las plantas de procesamiento de leche para reducir el uso de los antibióticos en ganadería. Muchos casos de mastitis clínicas leves no requieren antibióticos y pueden ser resueltos solo con una terapia anti-inflamatoria. Sin embargo, muchas fincas en Latinoamérica continúan usando la terapia de antibióticos intramamaria y parenteral como la primera opción de tratamiento de la mastitis, causando una alta proporción de casos de violación a las leyes por la presencia de residuos de antibióticos en la leche que va a consumo humano y estimulando a la aparición de cepas multi-resistentes a antibióticos.

La preocupación actual por la emergencia de nuevas cepas bacterianas resistentes a la gran mayoría de antibióticos, ciertos procesos buscan determinar nuevas alternativas para el uso de los

antibióticos en ganaderías, tratando de reducir el uso de estos en los animales y usándolos de forma mucho más consiente. No existe ninguna alternativa a los antibióticos que cumpla con todos los requerimientos, pero se pueden explorar algunas alternativas que cumplan con la mayoría de ellos. Algunas alternativas serán mencionadas a continuación (Cheng et al, 2014 and The Pew Charitable Trust, 2017):

- Endolisinas: Son enzimas hidrolíticas usadas por los macrófagos y células del sistema inmune para eliminar bacterias, actuando en la degradación del peptidoglicano de la pared celular de las bacterias causando lisis y destrucción, estas enzimas se encuentran en forma natural en el organismo de los mamíferos y están presentes en secreciones como saliva, orina, leche y otras secreciones. Las enzimas involucradas en este proceso son la lisozima, lactoferrina, lactoperoxidas, xilanasas, glucanasas, entre otras. La lisozima ha sido usada con buenos resultados para el tratamiento de infecciones en animales y como inmunoestimulante e incluso en productos antimastíticos (Vargas et al., 2018).
- Extractos de plantas (aceites esenciales): Son una mezcla de derivados de plantas, tales como aceites o taninos ya que poseen un efecto antibacterial o promotor de crecimiento como por ejemplo la canela, el pimiento, la camelia, el orégano, el ajo, entre otros
- Péptidos antimicrobianos: son moléculas cortas con actividad antimicrobiana. Estas moléculas son usadas por el sistema de defensa del organismo, algunos de los péptidos poseen niacina que ha sido utilizada para el tratamiento y prevención de la mastitis en bovinos y en especial para el periodo seco (Pieterse and Todorov, 2010).
- Ácidos orgánicos: Algunos de estos incluyen el ácido cítrico y acético (vinagre), que limitan el crecimiento bacteriano y poseen efecto bactericida (Parra R, 2010).
- Inmunomoduladores: Estimulan la respuesta del sistema inmune innata (inespecífica) y tienen efecto indirecto sobre patógenos. Existen algunas sustancias como citoquinas, lipopolisacáridos, segmentos de ADN y anticuerpos. Algunas citoquinas aprobadas en estados unidos para el control de mastitis en bovinos (Food and Drug Administración, 2015). Algunas vitaminas actúan como inmunomoduladores como la vitamina C y el

levimasol a baja concentración, la lisozima entre otras. Algunos minerales han demostrado tener efecto para incrementar la respuesta inmune de los animales, en los cuales podríamos encontrar el cobre, zinc y selenio.

- Vacunas: Las vacunas también tienen un efecto en el sistema inmune del animal, pero en forma específica. Las vacunas han sido probadas con éxito en el control de la mastitis en bovinos. Una vacuna comercial que existe de forma comercial es la elaborada a base de *Escherichia coli* (J5), esta funciona para la prevención de mastitis causada por coliformes en fincas que tienen problemas con patógenos ambientales y en especial con este patógeno que puede llegar hasta causar una mastitis hiperaguda con alta mortalidad. En las fincas en las cuales se usó esta vacuna se ha demostrado que esta ayuda a prevenir estos casos y reduce la severidad de estos (Sears and Wilson, 2003). Se han intentado hacer vacunas contra *Staphylococcus aureus*, pero estas no han sido muy eficientes. Otras vacunas contra *Streptococcus* ambientales como *Streptococcus uberis* ya están disponibles comercialmente y han dado buenos resultados (Kibebe, 2017).
- Nanopartículas de plata: Han tomado importancia en el área biomédica, así como en otras aplicaciones de la ciencia, son utilizadas como agentes antimicrobianos y antivirales, aplicación en el tratamiento de agua, la industria de pinturas, dispositivos médicos, entre otros usos. La tendencia de la síntesis de nanopartículas de plata se ha enfocado recientemente en la utilización de la "Química verde" ya que es una técnica amigable con el medio ambiente (Sreelakshmy et al., 2016)

La CMI, o concentración mínima inhibitoria, es la concentración más baja (en  $\mu\text{g/ml}$ ) de un antibiótico que inhibe el crecimiento de una determinada cepa bacteriana. Es un método que ayuda a determinar qué clase de antibiótico es más eficaz. Esta información puede conducir a la elección adecuada de un antibiótico, lo que aumentará las probabilidades de éxito del tratamiento y ayudará en la lucha para frenar la resistencia a antibióticos.

Al lado de cada antibiótico se indica la interpretación de la sensibilidad: S (sensible), I (intermedia) o R (resistente), seguido de la CMI en  $\mu\text{g/ml}$ . "Sensible" significa que el crecimiento del microorganismo está inhibido a la concentración sérica del fármaco que se alcanza utilizando la dosis habitual; "intermedia" significa que el crecimiento del microorganismo está inhibido solamente a la dosis máxima recomendada y "resistente" significa que el microorganismo es

resistente a los niveles séricos del fármaco que se alcanzan normalmente. Estas normas de interpretación las ha establecido el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

La CMI no se determina cuando:

- Los requisitos de crecimiento de ciertos organismos exigen que la prueba de sensibilidad se realice por otro método.
- El CLSI no dispone de criterios interpretativos. En tales casos, los antibióticos recomendados se basarán normalmente en estudios de eficacia clínica.
- Se trata de antibióticos que no están comercialmente disponibles.
- Se sabe que el fármaco es clínicamente ineficaz contra el microorganismo, con independencia de los resultados in vitro.

La CMI se utiliza por dos términos como el valor crítico y el intervalo de dilución son distintos en función del fármaco y la especie bacteriana. Por tanto, la comparación entre las CMI de diferentes antibióticos no debe basarse solo en el valor numérico, sino en la diferencia que hay entre la CMI y el valor crítico. Por ejemplo: Una cepa de *Escherichia coli* tiene una CMI de 2 µg/ml para ampicilina y para ceftiofur. Considerando las diluciones para la ampicilina, a 2 µg/ml, esta cepa de *E. coli* está a cuatro diluciones de diferencia del valor crítico. En el caso del ceftiofur, la misma cepa de *E. coli* a una CMI de 2 µg/ml está a dos diluciones de diferencia del valor crítico. Por consiguiente, basándose en sus CMI, esta cepa de *E. coli* es más sensible a ampicilina que a ceftiofur. El valor crítico de un antibiótico es la dilución a la cual la bacteria comienza a mostrar resistencia. (IDEXX 2018)

Las técnicas de dilución en caldo o agar se pueden utilizar para medir cuantitativamente la actividad "in vitro" de un antimicrobiano frente a un cultivo bacteriano. Estos métodos se basan en la preparación de una serie de tubos o placas con caldo o agar, respectivamente, a los cuales se les agrega el antibiótico otras sustancias que tengan características similares (ATB) en distintas concentraciones. Luego se inoculan cada uno de los tubos o placas con una suspensión estandarizada del microorganismo en estudio. Las pruebas se examinan después de incubar "overnight" a  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  y se determina la concentración inhibitoria mínima (CIM) del antimicrobiano frente al microorganismo ensayado. El resultado final depende significativamente de la metodología empleada. Por ello, para obtener valores reproducibles intra e interlaboratorios, cada detalle técnico debe ser cuidadosamente controlado.

Categoría de interpretación de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos: Clasificación basada en la respuesta in vitro de un microorganismo a un antibiótico en los niveles que éste alcanza en sangre o tejidos con una dosificación habitual; 1) Categoría de interpretación SENSIBLE: Esta categoría implica que una infección dada por la cepa en estudio puede ser tratada apropiadamente con la dosis de antibiótico recomendada para el tipo de infección y la especie infectante, a menos que hubieran contraindicaciones; 2) Categoría de interpretación INTERMEDIO: Esta categoría incluye cepas que pueden ser inhibidas por concentraciones de antibiótico más elevadas, siempre que se pueda aumentar la dosis. (Ej.  $\beta$ -lactámicos) o que la droga concentre fisiológicamente en el tejido infectado (Ej. quinolonas y  $\beta$ -lactámicos en orina). También nos indica una "zona buffer" que debería evitar que pequeños factores técnicos difíciles de controlar causen mayores discrepancias de interpretación; 3) Categoría de interpretación RESISTENTE: Las cepas resistentes no son inhibidas por las concentraciones séricas normalmente alcanzadas a dosis habituales y/o caen en el rango donde son comunes mecanismos específicos de resistencia microbiana (por ejemplo  $\beta$ lactamasas) y la eficacia clínica no ha sido comprobada; 4) Categoría de interpretación NO SENSIBLE: esta categoría se utiliza para microorganismos que sólo tienen categoría de interpretación sensible, debido a la ausencia o a la rara aparición de cepas resistentes. Aquellos aislamientos con CIMs mayores o halos de inhibición menores al punto de corte de sensible, se denominan "no sensibles"; NOTA 1: Esta designación no implica necesariamente que exista un mecanismo de resistencia en el microorganismo. Puede suceder que, posteriormente al establecimiento del punto de corte de sensibilidad, se encuentren aislamientos con CIMs mayores al punto de corte de sensibilidad, que no posean un mecanismo de resistencia, y que estén dentro de la distribución "wild-type". NOTA 2: para cepas con resultados en la categoría de no sensible se debe confirmar la identificación y la sensibilidad antimicrobiana. (Carlos G.2012).

### **Medios de cultivo**

Es un conjunto de nutrientes, factores de crecimiento y otros componentes que juntos estos factores sumados crean las condiciones necesarias para el desarrollo de los microorganismos. La variedad metabólica de estos es tan grande que la diversidad de medios de cultivo es enorme. (Laura B. 2016).

Para ello son usadas las cajas de Petri que junto con agares nutritivos específicos (según el microorganismo que se desea aislar), poseen diferentes características que hacen más ameno el crecimiento del microorganismo, aunque también existen medios de cultivo en tubos que son usados para pruebas bioquímicas más específicas, cabe mencionar que no todos los microorganismos son cultivables en el laboratorio, pero si una gran cantidad de ellos. (Laura B.2016).

## Componentes de un medio de cultivo

Los medios de cultivo se componen de:

- Una fuente de carbono: normalmente son azúcares sencillos como por ejemplo glucosa, lactosa, entre otros, pero existen también algunos organismos que usan CO<sub>2</sub> (en este caso serían autótrofos).
- Una fuente de nitrógeno: Se suelen usar proteínas parcialmente hidrolizadas, peptonas
- Otros componentes como Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, vitaminas, entre otros.
- Amortiguadores de pH (Soluciones tampón o Buffer): Son sustancias que ayudan a mantener el pH del medio de cultivo dentro de un rango adecuado para el crecimiento de los microorganismos. Como fosfatos disódicos o monosódicos.

Un componente importante que permite elaborar medios de cultivo sólidos es el agar, un polisacárido y gelificar alrededor de 40° C.

Si se tiene en cuenta que los microorganismos cultivados en clínica crecen en torno a 37°C, es necesario que el agente gelificante se mantenga sólido a esa temperatura.

Otra ventaja que ha hecho del agar el gelificante más adecuado en el cultivo de microorganismos es el escaso número de organismos que tienen capacidad para degradarlo.

## Tipos de medios de cultivo

Según la proporción de agar, existen tres tipos:

- Líquidos (Caldos): No contienen ningún agente gelificante, por lo que los microorganismos crecen por todo el medio. El crecimiento en este tipo de medios es más rápido puesto que la movilidad permite acceder de una forma más fácil a los nutrientes.
- Sólidos: Tienen una proporción de agar aproximado de 1,5%. El crecimiento se desarrolla en la superficie del medio. Estos medios pueden depositarse en cajas de Petri o en tubos de ensayo.
- Semisólidos: Son aquellos que contienen una proporción de agar inferior al 0,5%. Se utilizan para pruebas bioquímicas y de movilidad.

En microbiología diagnóstica existen cuatro tipos, según su utilidad:

- **Nutritivos:** Permiten el crecimiento de la mayoría de los microorganismos, por ser muy generales. Como el caldo de Trypticase-soja.
- **De enriquecimiento:** Contienen componentes adicionales (además de los básicos) para permitir el desarrollo de microorganismos exigentes, que no crecerían en un medio general.
- **Selectivos:** Presentan algún componente que impide el desarrollo de microorganismos no deseados. Esto hace que el microorganismo que se desea cultivar lo haga con mayor facilidad. Como el agar MacConkey contiene cristal violeta, que inhibe el crecimiento de bacterias grampositivas y hongos, facilitando el desarrollo de bacterias gramnegativas.
- **Diferenciales:** Contienen sustancias que ponen de manifiesto alguna característica de la especie o grupo de microorganismos, como en el agar MacConkey contiene lactosa y rojo neutro (como indicador); las bacterias fermentadoras de lactosa (lactosas positivas) aparecen de color rosa intenso, mientras que las que no fermentadoras de lactosa son incoloras.

Por lo tanto, el agar MacConkey es un medio selectivo y diferencial a la vez.

El formato en el que se presentan los medios de cultivo puede ser:

- **Sólido en placas:** Son medios con agar envasados en cajas de Petri.
- **Sólido en tubo:** En este caso suele ser agar inclinado (se deja enfriar en esta posición para que la superficie del medio sea mayor).
- **Líquido en tubo:** Como el agua de peptona.
- **Semisólido:** En tubo como caldo de tioglicolato.

#### Preparación de medios de cultivo

Los medios de cultivo actualmente pueden adquirirse comercialmente listos para su uso; normalmente bajo la forma de liofilizados a los que es preciso rehidratar (el cual contiene los componentes necesarios para elaborar cada uno de los tipos de medios existentes).

Para la elaboración del producto hay que seguir las instrucciones dadas por el fabricante, que se especifican en la etiqueta del envase, esta consiste en disolver el medio deshidratado con agua destilada, esto también es llamado como reconstitución. La cantidad de agua será la que el fabricante lo indica.

En estos casos la preparación del medio de cultivo se reduce sencillamente a pesar de la cantidad deseada del mismo y disolverla en agua destilada. Las sustancias termolábiles, se esterilizan por filtración y se añaden al resto de los componentes después de que estos hayan sido previamente esterilizados en la autoclave y enfriados a temperatura ambiente o a 40-50°C si se trata de medios con agar.

En el caso de medios que contienen agar como agente gelificante, hay que disolver agitando y calentado a la vez, debido a que el agar funde en torno a 100 °C. Para ello se puede utilizar un termo agitador magnético (que evita una ebullición prolongada) o de manera manual teniendo precaución con la temperatura.

Una vez reconstituido el medio de cultivo, hay que esterilizarlo para asegurarse de que no crecerá ningún microorganismo presente en muestras clínicas para su posterior identificación. La esterilización se realiza en una autoclave a 121°C durante 15- 20 minutos.

Una vez finaliza la esterilización los medios se servirán en sus respectivas cajas de Petri (previamente esterilizadas) cerca al mechero para posteriormente dejarlas enfriar a temperatura ambiente y en el caso de medios solidos contenidos en tubos deberán ser colocados de manera que el recipiente quede inclinado para que al solidificarse tomen la forma de agar inclinado o pico de flauta (slant) si tal es su finalidad.

Los medios de cultivo en tubo se fraccionan antes de esterilizar y se introducen en la autoclave a medio tapar.

Sin embargo, los medios solidos en placa se suelen esterilizar en recipientes grandes como un matraz de Erlenmeyer con tapón de aluminio y posteriormente se recomienda esperar a que la temperatura baje a unos 45- 50 °C para fraccionarlo en placas, siempre cerca al mechero para evitar contaminación ambiental. El fraccionamiento consiste en depositar una pequeña cantidad en la placa (caja grande aproximadamente 20 ml y caja pequeña aproximadamente 10ml), hasta que alcance unos 4 mm de altura. Dejar enfriar a temperatura ambiente hasta que solidifique por completo cerca al mechero. Una vez sólido, se invierte (de tal forma que la superficie de apoyo sea la tapa de la placa) y se almacena refrigerado a 4°C preferiblemente envuelto en papel vinipel.

Los medios de cultivo que incluyen en su composición sustancias termolábiles, es decir, que se alterarían tras someterse a un tratamiento con calor, necesitan un procedimiento alternativo para su esterilización. Generalmente se realiza filtración con membranas de un diámetro de poro de 0,2 a 0,45 µm. Los virus no se eliminan, pero si las bacterias y hongos que pudieran contaminar el medio. Serian ejemplos de sustancias termolábiles el suero y de terminados antibióticos.



## Medios de cultivo utilizados habitualmente en un laboratorio

- **Agar sangre:** Este permite el crecimiento de la mayoría de las bacterias, este medio es rico en nutrientes más un suplemento de sangre desfibrilada animal que por lo general es de cordero, en una porción del 5- 10%, este medio permite comprobar si las bacterias son hemolíticas, es decir, si tienen capacidad para romper los glóbulos rojos.

Existen tres tipos de hemolisis:

Betahemolisis	Alfahemolisis	Gammahemolisis
Consiste en la lisis o eliminación total de los glóbulos rojos, lo que genera un halo transparente en la zona donde crece este tipo de bacteria, este tipo de bacterias son llamadas betahemolíticas.	Lisis parcial de los glóbulos rojos, generando un halo verdoso en las zonas donde crecen estas bacterias, estas se denominan alfahemolíticas.	Ausencia de hemolisis.

La sangre que es utilizada para la preparación del agar sangre suele ser de cordero aunque también se podría utilizar sangre de caballo o de conejo ya que todas estas permiten buenas reacciones hemolíticas, también puede llegar a usarse sangre humana que sea negativa para ciertos virus como el VIH o hepatitis B, esta sangre es menos recomendada ya que contiene anticoagulantes, anticuerpos y otros factores que pueden afectar el crecimiento microbiano y la actividad hemolítica, aunque en esta pasantía en ocasiones utilizamos sangre humana ya que la sangre de cordero está agotada al usarla hemos tenido muy buenos resultados con dicha sangre. (Laura B. 2016).

- **Agar MacConkey:** Es un medio diferencial y selectivo muy utilizado para el aislamiento e identificación de enterobacterias (bacilos gramnegativos), este se compone de sales biliares y cristal violeta que inhiben el crecimiento de grampositivas y hongos, Contienen también lactosa y rojo neutro como indicador de pH. Las bacterias fermentadoras de lactosa son llamadas lactosa+ ya que son capaces

de acidificar el medio y toman una tonalidad rosa un ejemplo claro de esto ocurre con la *Escherichia coli*, mientras que las bacterias no fermentadoras de lactosa son llamadas lactosas - y no presentan ninguna tonalidad (incoloras) un ejemplo de esto es la *Salmonella*.

- **Agar manitol salado:** Este contiene además de nutrientes una concentración de sal al 7,5% esta impide el crecimiento de la mayoría de las bacterias, ya que es un medio selectivo para el aislamiento y enumeración de *staphylococcus* en alimentos y muestras clínicas.

Este medio ayuda en la detección y enumeración de *estafilococos* coagulasa-positivos alimentos, es recomendado realizar la incubación en una temperatura de 36°C a 37°C y examinar las placas después de 18-24 y 48 horas para comprobar la extensión del crecimiento, el tamaño de las colonias, pigmentación y la selectividad, el agar salado manitol contiene peptonas y extractos de carne bovina que suministran los nutrientes esenciales, la fermentación de manitol indicada por el cambio del indicador de rojo fenol facilitando la diferenciación de la especie de estafilococos.

Los estafilococos positivos a la coagulasa por ejemplo (*Staphylococcus aureus*) producen colonias de color amarillo y un medio circundante de color amarillo, mientras que los estafilococos negativos a la coagulasa producen colonias de color rojo y no producen cambio de color en el indicador de rojo fenol.

- **Agar bilis esculina:** Es un medio selectivo recomendado para el aislamiento y la identificación presuntiva de enterococos intestinales, se recomienda incubar a una temperatura de 36°C – 37°C y observar tras 18- 24 horas, se consideran positivas a las colonias que tornan de color negro completamente en el medio y este resultado se considera enterococos intestinales circundante, esta reacción se debe a los iones de hierro (III) que forman un compuesto negro que se difunde por el medio.
- **Agar Muller-Hilton:** Es un medio líquido nutritivo que es utilizado para el estudio de la sensibilidad de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas frente a agentes antimicrobianos, se utiliza para pruebas de sensibilidad a antibióticos esto es llamado antibiograma en medio sólido, esto es debido a que presenta buena replicación del microorganismo en las pruebas de sensibilidad, el contenido de este agar posee inhibidores de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclina es bajo, la mayoría de los microorganismos crece satisfactoriamente, para este agar son utilizados los sensidiscos estos están impregnados de antibióticos según la bacteria que se sembró previamente, se colocan los sensidiscos en el agar y posteriormente se introduce en

la incubadora con la temperatura adecuada esta oscila entre 36°C -37°C durante 24 horas, esto se realiza para determinar qué tan sensible es esa bacteria al antibiótico usado ante la exposición.

**Agar Dnasa:** Es un medio de cultivo utilizado para la detección de enzimas desoxirribonucleicas, este agar es útil para la diferenciación entre especies de estafilococos, así como para la diferenciación de *serratia spp* de especies de klebsiella y enterobacter, Este medio de cultivo permite diferenciar bacterias que poseen el enzima desoxirribonucleico de aquellas que no la poseen, El ácido desoxirribonucleico (DNA) se encuentra polimerizado y es el sustrato de las enzimas como la desoxirribonucleasa (DNA asa), la cual lo hidroliza. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el agar es el agente solidificante, el ácido desoxirribonucleico hidrolizado presenta transparencia mientras que el acidodesoxirribonucleico polimerizado, precipita y torna opacidad al medio de cultivo, La incubación se debe hacer dentro de 36 -37°C Durante 18-48 horas, para la interpretación se debe observar el crecimiento microbiano y se cubre la placa con ácido clorhídrico, se deja por 5 minutos teniendo precaución de no realizar esta técnica cerca de algún objeto inflamable y colocarle un fondo oscuro para leerlo, si este es positivo se observa un halo claro, transparente alrededor del crecimiento bacteriano, pero si es negativo el medio se observa opaco.

- **Agar citrato de Simons:** Es utilizado para diferenciar bacilos entéricos gran negativos en base al citrato de sodio como fuente de nitrógeno, el cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico, el fosfato dipotásico actúa como sistema de tapón, el azul de bromotidol es un indicador de pH, el dihidrogenofosfato de amonio es la única fuente de nitrógeno, el citrato de sodio es la única fuente de carbono y el agar bacteriológico es el agente solidificante.

Solo los microorganismos capaces de utilizar citrato como fuente de carbono crecen y producen un cambio de color de verde a azul (alcalino), mientras que cuando no se utiliza citrato (la prueba es negativa) y el color no cambia.

- **Agar nutritivo:** Es un medio de cultivo enriquecido sin aditivos preparado para la recuperación y aislamiento de toda clase de microorganismos gran negativos y gran positivos, hongos y levaduras ya que estas no requieren elementos especiales para su crecimiento, usado principalmente para el mantenimiento de cepas, realización de subcultivos para confirmar la pureza de los aislamientos. Es importante trabajar con las mayores condiciones de asepsia ya que por ser un agar o un medio enriquecido

permitirá el crecimiento de bacterias tanto saprofíticas como patógenas si este microorganismo crece puede ocasionar un resultado erróneo.

- **Agar triple azúcar hierro BD (TSI Agar):** Es un medio de diferenciación para organismos entéricos gram negativos basada en su capacidad para fermentar dextrosa y sacarosa para producir sulfuro, TSI contiene tres azúcares (dextrosa, lactosa y sucrosa), rojo fenol para detectar la fermentación de carbohidratos y sulfato ferroso para la detección de producción de ácido sulfhídrico (lo indica el color que torna el tubo).
- **E.M.B Agar (con Eosina y azul de metileno):** Este medio es utilizado para el aislamiento selectivo de bacilos gram negativos de rápido desarrollo y escasas exigencias nutricionales, permitiendo el desarrollo de todas las especies de enterobacterias.

### Tinción de gram

La tinción de Gram es una prueba utilizada para diferenciar dos grandes grupos de microorganismos los cuales son Gram positivos y Gram negativos, esta tinción puede ayudar a proporcionar información rápida para diagnósticos de infecciones, podría revelar los agentes causales incluso con una toma de muestra que no fue tomada de la manera más adecuada, también hace posible distinguir entre contaminación de la muestra y una verdadera infección. (Laura B.2016)

Gram positivas	Gram negativo
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pared gruesa compuesta de peptidoglucanos y polímeros e impermeable, que hace que resista la decoloración.</li> <li>• El color que torna es violeta</li> <li>• Posee una pared celular gruesa.</li> <li>• Ausencia de lipopolisacáridos en pared celular.</li> <li>• Presencia de ácidos lipoteicoicos y teicoicos en pared celular.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Poseen una capa delgada de peptidoglucanos más una bicapa de lipoproteínas que se puede deshacer con la coloración.</li> <li>• El color que torna es rojo.</li> <li>• Posee una pared celular delgada.</li> <li>• Presencia de lipopolisacáridos en pared celular.</li> <li>• Ausencia de ácidos lipoteicoicos y teicoicos en la pared celular</li> </ul>

### Antibiograma

Es la reacción in vitro de un antibiótico frente a un microorganismo determinado y refleja su capacidad para inhibir el crecimiento de una bacteria o población de una bacteria, su desarrollo es mediante pruebas de sensibilidad, en donde su principal objetivo es evaluar en el laboratorio la respuesta de un microorganismo a uno o a varios antimicrobianos indicándonos el grado de resistencia de a ese antibiótico para medir que tan eficaz es usar o no ese antibiótico. (Laura B.2016)

El antibiograma disco-placa consiste en depositar, en la superficie de agar de una placa de Petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde el agar. El antibiótico difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración, transcurridas 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición, la concentración del antibiótico en la interfase entre bacterias de crecimiento y bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se aproxima a la concentración mínima inhibitoria (CMI) obtenida por métodos de dilución. Se mide el diámetro de la zona de inhibición obtenida por cada una de las bacterias, existen unos diámetros de inhibición, expresados en milímetros para cada antimicrobiano. La lectura de los halos de inhibición debe interpretarse como sensible(S), intermedia(I) o resistente (R ). (Laura B.2016).

El antibiograma está indicado cuando se aísla una bacteria responsable de un proceso infeccioso y no se sabe a ciencia cierta su sensibilidad, ya que en ocasiones se cree que existe resistencia a los antimicrobianos más usados.

El medio de cultivo más usado es el agar Müller Hilton ya que las bacterias patógenas crecen bien y además no contiene timina o timidina que son inhibidores de sulfamidas y del trimetropin, el pH de este medio debe estar entre 7,2-7,4, debe almacenarse entre 2-8° C y utilizarse dentro de los siguientes 7 días después de la preparación. Este medio debe de sacarse de la nevera por lo menos una hora antes de ser usado y dejarlo cerca al mechero.

Los discos de antibióticos se guardan en una nevera en una temperatura entre 3°C-4° y antes de ser usados sacarlos de la nevera para que la temperatura baje y torne a la del ambiente 1 hora antes de utilizarlos.

### **Catalasa**

Es una prueba usada para determinar la presencia de la enzima catalasa en microorganismos para diferenciar los estreptococos (catalasa negativa) de estafilococos (catalasa positiva), para esto usamos el peróxido de hidrogeno. (Adelaida D. 2003).

### **Propóleo**

Este posee efectos bactericida y antiinflamatorio frente a hongos bacterias, virus y hongos. Se usaron los propóleos de la sede de Usme ya que su composición se basa de glicerol (1,2%), fructosa (0,4%), ácidos grasos (29,5%), di terpenos (15,4%), flavonoides (2,2%), triterpenos (22,1%), cumarato de eicosano (3,4%).

### **Lisozima**

Es una enzima natural que se encuentra en la clara del huevo esta actúa en la pared de las bacterias ya que realiza una ruptura en unos enlaces llamados péptido glicano debido a esto ocurre una ruptura entre N acetil glucosamina y N acetil muranico.

### **Nanopartículas**

Posee un efecto bactericida ya que generan radicales libres estos interactúan con la pared de la célula bacteriana ocasionando una extrusión del contenido intracelular debido al daño oxidativo que ocurre adentro de proteínas y lípidos originando así un efecto antibacteriano.

## **Metodología**

### **Materiales y Métodos**

#### **Trabajo en el laboratorio**

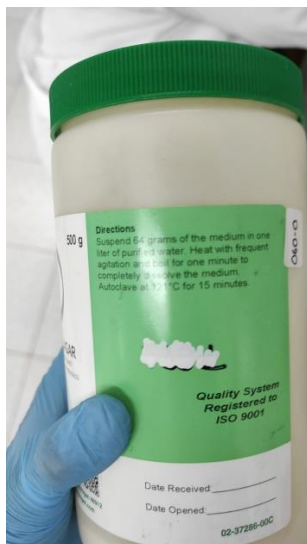
##### Materiales

- Micropipetas 200µL-1000µL, 20µL-200µL Y 20µL-50µL
- Puntas para micropipetas (Azul y Amarillas)
- Pipetas de 1ml y 10ml
- Espátula
- Agares como:
  - Mac Conkey
  - Sangre
  - Nutritivo
  - DNasa
  - Manitol
  - Bilis esculina
  - Müller Hilton
  - EMB
  - TSI
  - Citrato de Simmons
  - Nutriente de broth
- Caldo nutritivo
- Matraz de Erlenmeyer
- Espátulas de Drigalsky
- Cajas de Petri
- Tubos como:
  - Tubos de ensayo de 10 y 20 ml
  - Tapa de caucho
  - Tapa rosca pequeños, medianos y grandes
  - Pobretones
- Cajas de Petri
- Incubadora
- Plancha de calentamiento con agitación

- Imán de agitador magnético
- Papel film
- Sharpie
- Agua destilada
- Muestras de leche
- Preparacion del medio de cultivo



- Seguir las instrucciones del rotulo del recipiente del medio de acuerdo con la cantidad a preparar



Se agrega la mitad de agua destilada y luego se transfiere el medio a un Erlenmeyer para posteriormente completar los ml a preparar, con la precaución de primero colocar una pequeña



cantidad del líquido, luego se le adiciona el polvo y por último se completan los ml de la cantidad que se desea preparar.

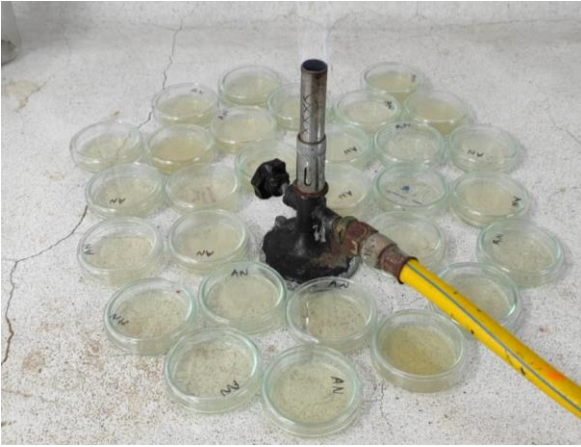
Se utiliza una plancha de calentamiento con agitación para colocarla con la temperatura adecuada esta aparece en el rotulo, se introduce el imán de agitador magnético para que los grumos se disuelvan y se deja el tiempo que sea necesario hasta que empiece a burbujear para luego tornarse un poco más claro.



Se cubre el Erlenmeyer con un tapón de papel aluminio para posteriormente esterilizarlo en la autoclave a una temperatura de  $121^{\circ}\text{C}$  durante el tiempo mencionado en el rotulo (Aproximadamente 15 minutos).



Después de que termina la autoclave se sirve en las cajas de Petri (previamente estériles y secas) y se deja enfriar cerca del mechero.



Luego se tapan, se marcan con el tipo de agar y la fecha de preparación.



Posteriormente se envuelve en papel film, se marcan con nombre del agar y se introduce dentro de una nevera a una temperatura adecuada.



Si no se utiliza de inmediato, se deja enfriar en el Erlenmeyer a temperatura alrededor de 45°C, se marca con nombre del agar y la fecha en la que se preparó, para luego dejarlo dentro de una nevera.



En el caso de necesitarlo después de que este gelificado el medio dentro del Erlenmeyer se debe sacarlo de la nevera para que se atempere y volverlo a calentar en la plancha hasta que esté completamente líquido.



**Tinción de gram**

## Materiales necesarios

- Asa bacteriológica
- Portaobjetos
- Mechero busen con manguera
- Piseta
- Goteros para cada reactivo
- Encendedor
- Gradilla

## Aparatos y equipos

- Microscopio
- Cronometro digital

## Reactivos

- Solución de cristal violeta
- Solución de Lugol
- Solución de alcohol de acetona
- Fushina
- Aceite de inmersión
- Agua

## Pasos en la técnica de tinción de gram

1. Esterilizar el asa en el mechero dejar enfriar



2. Tomar la bacteria con el asa.
3. Tomamos una lámina, colocamos una gota de solución salina y marcamos la lámina por ambos lados teniendo precaución de que no se borre la marca.



4. Pasamos la bacteriana a la lámina en la gota de solución salina.
5. Esparcir bastante bacteria en la gota con el asa.
6. Dejar secar cerca al mechero.
7. Flamear de 2 a 3 veces cuando se seque, esto se realiza para fijar la bacteria a la lámina.

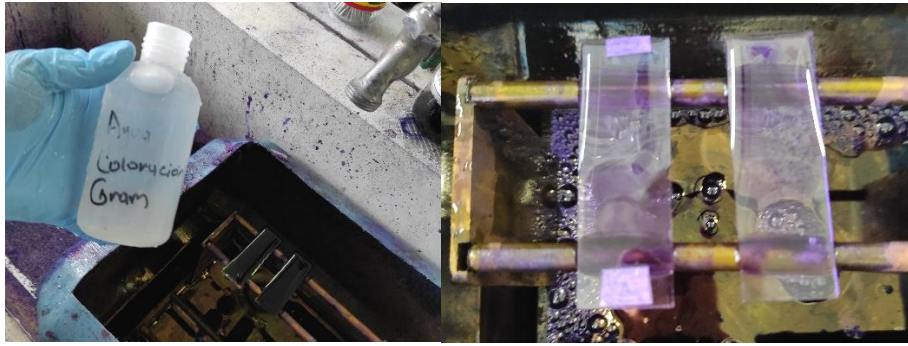


8. Se coloca cristal de violeta en la totalidad de la lámina se deja por 1 minuto.

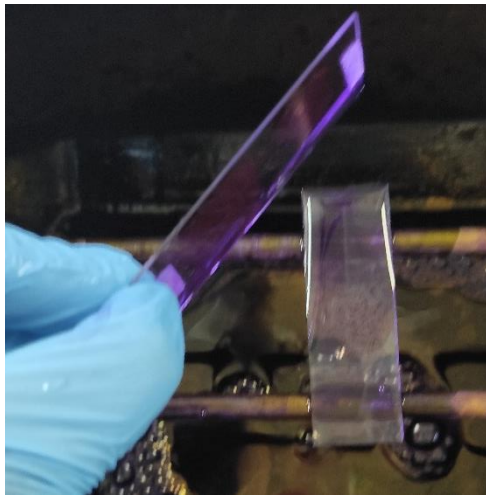


9. Luego se aplica agua para juagar completamente la lámina.





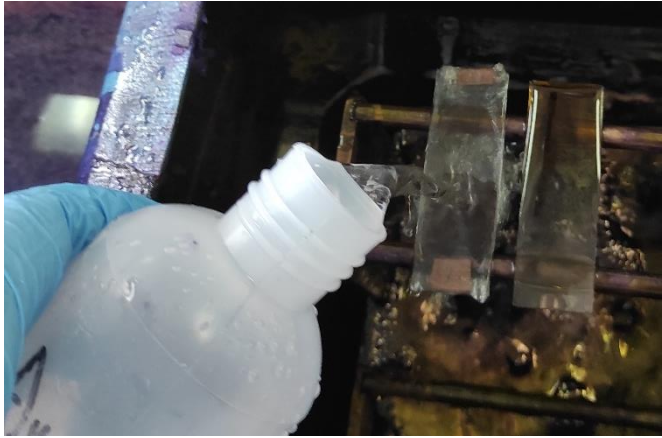
10. Escurrimos bien la lámina.



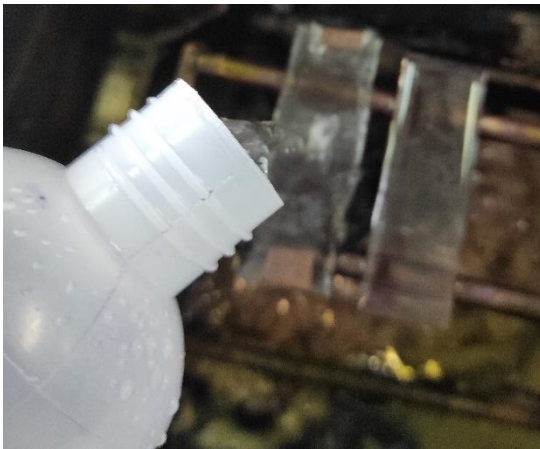
11. Procedemos a utilizar Lugol aplicándolo sobre toda la lámina para dejarlo actuar por 1 minuto.



12. Aplicamos agua para lavar completamente la lámina.



13. Luego utilizamos alcohol de acetona sobre la lámina durante 40 segundos.



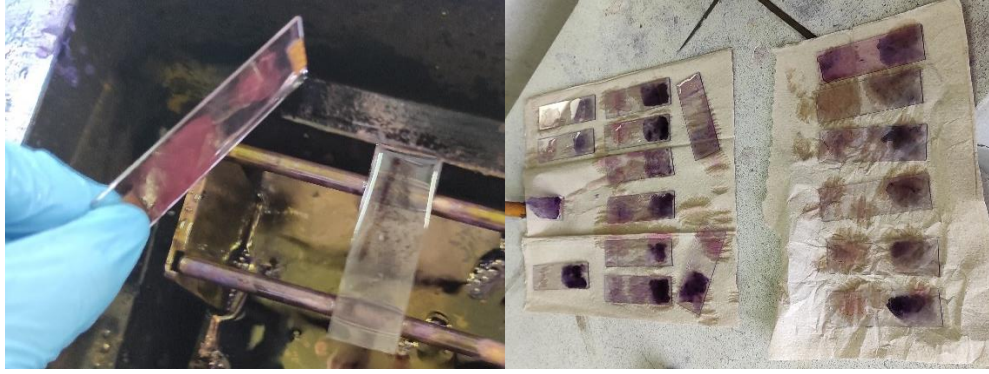
14. Por último, aplicamos fucsina sobre la lámina durante 1 minuto.



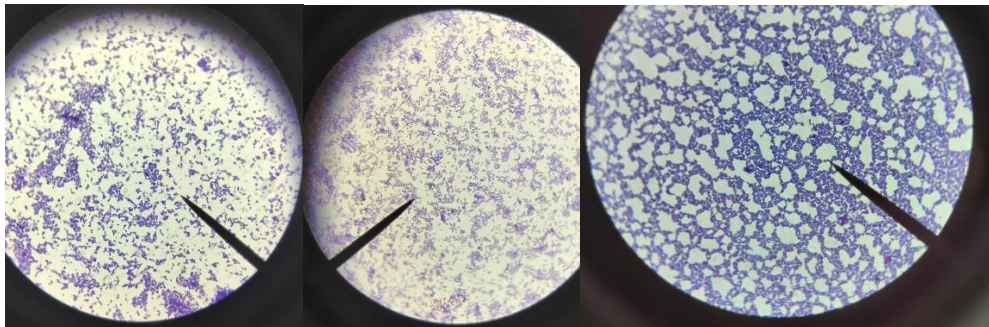
15. Aplicamos agua para lavar completamente la lámina.

16. Escurremos muy bien y dejamos secar.

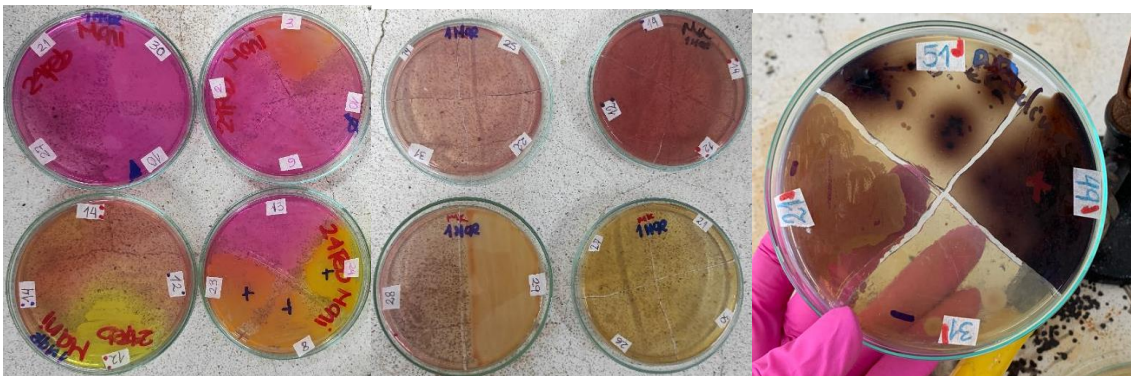




17. Luego la observamos al microscopio en las diferentes vistas para así lograr identificar las estructuras de una bacteria gram positiva y negativa.



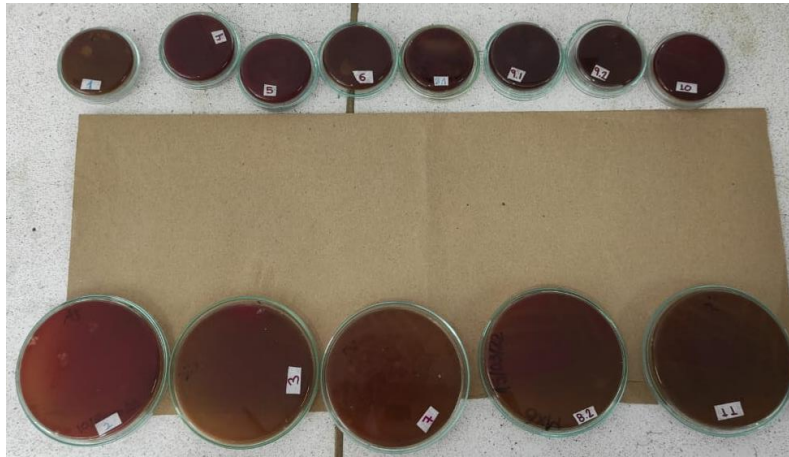
Se procede a preparar los siguientes agares Mac conkey, salado manitol y bilis esculina, para esto usamos un Erlenmeyer teniendo en cuenta la etiqueta del producto realizamos una regla de tres para calcular según los ml que se van a preparar cuanta cantidad de producto se necesita.



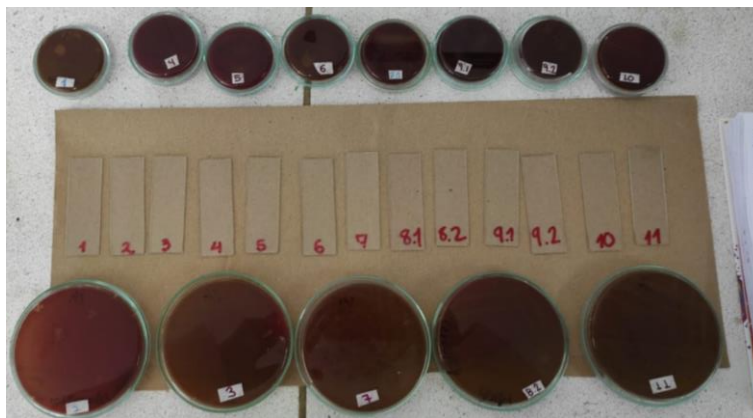
#### Técnica para realizar la prueba de catalasa:

- Sacamos las muestras que se van a ser procesadas.

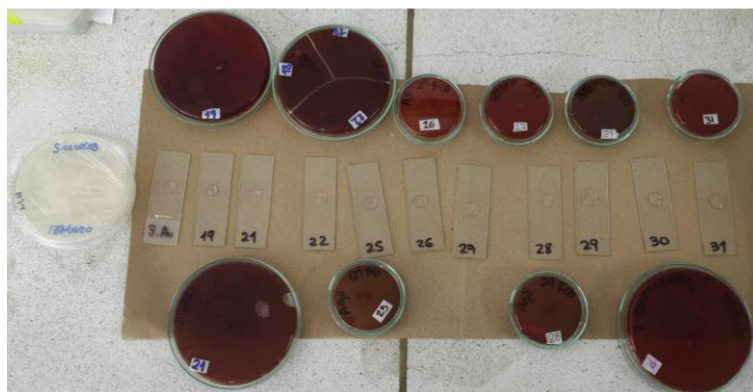




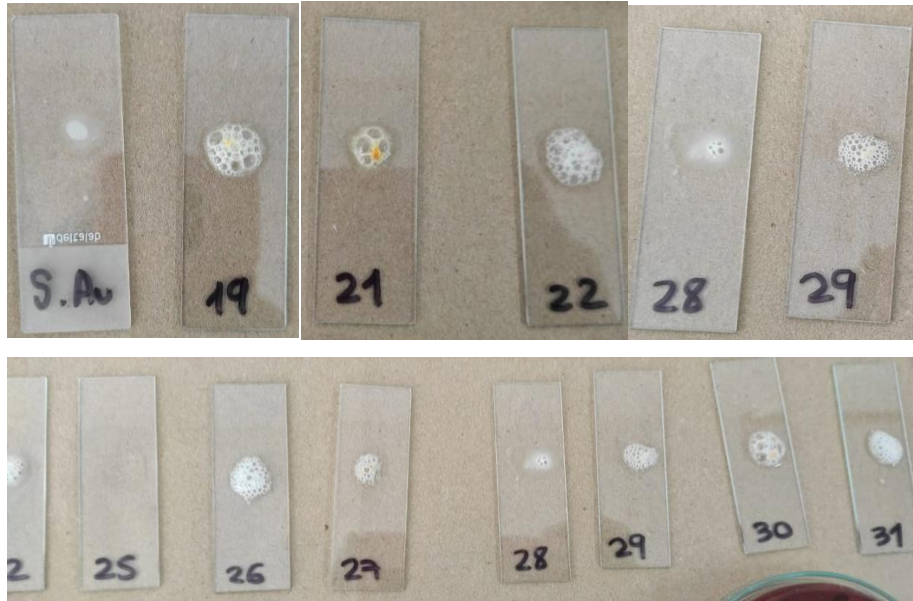
- Alistamos el peróxido y las láminas.
- Marcamos las láminas con el numero de la bacteria.



- Colocamos una gota de peróxido.



- Tomamos con el asa redonda del centro de una colonia pura un poco de bacteria.
- Colocamos sobre la gota la muestra de bacteria y debe burbujear de inmediato para que sea positivo, si tarda en burbujear o no hay reacción es negativa.



- Siempre utilizamos un control para confirmar que el reactivo esté funcionando para evitar errores.

### Montaje en placa

#### Materiales necesarios

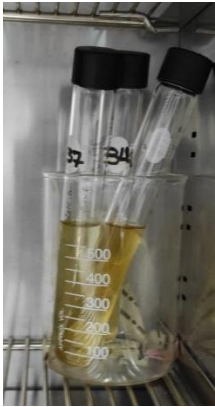
- Placa Elisa estéril
- Puntas azules y amarillas
- Cajas
- Agar nutritivo
- Hisopos
- Tubos ependorf o tapa rosca
- Bacteria incubada en caldo nutritivo según escala de
- Tratamientos
  - propóleo
  - Lizoenzima
  - Gentamicina
  - Nano 1 y nano 2

Empezamos alistando los materiales necesarios

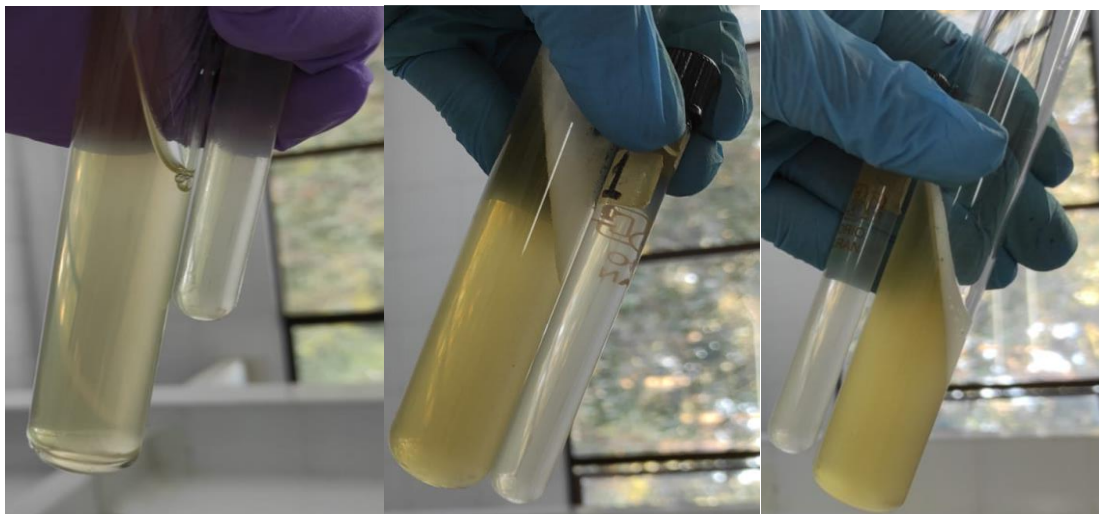




El día anterior al montaje alistamos la bacteria en un tubo grande tapa rosca con caldo nutritivo y la dejamos 24 horas en la incubadora



Al día siguiente sacamos los tubos endorff según la escala de Mac farland comparamos y si hay la necesidad se le adiciona más caldo para que quede lo más exacto a la escala



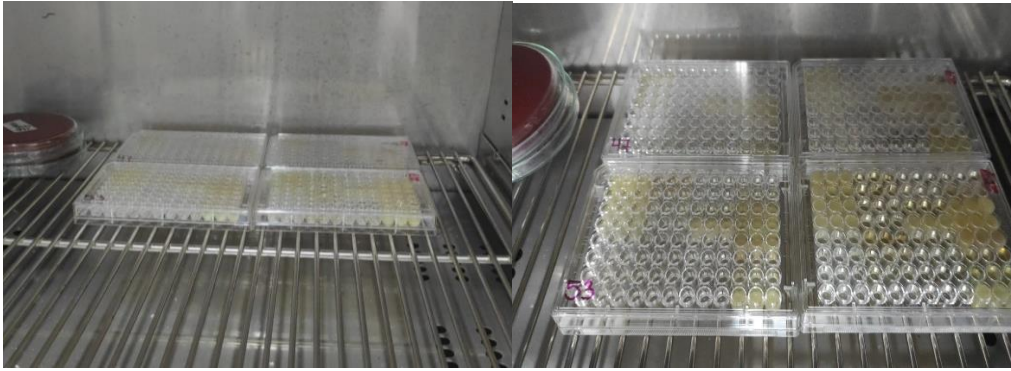
Luego limpiamos la superficie con alcohol en donde vamos a trabajar, encendemos el mechero y alistamos los materiales para realizar el montaje en la placa.



Procedemos a seguir el mapa aplicando los líquidos más limpios y estériles para posteriormente colocar las bacterias



Después de terminar tapamos la placa y la colocamos dentro de la incubadora



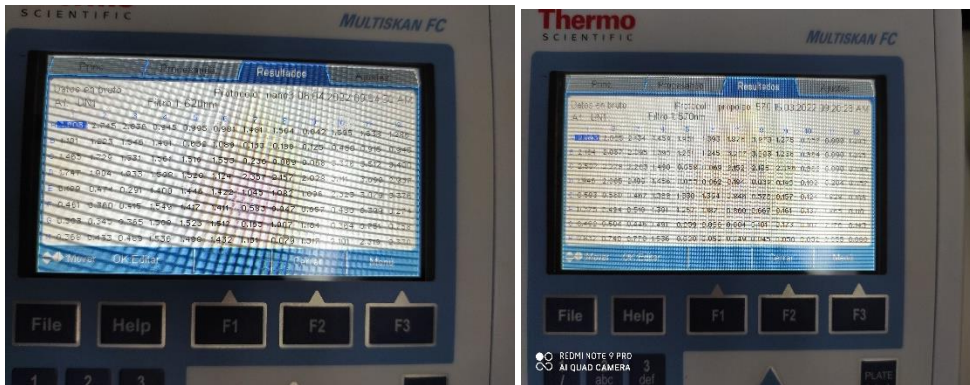
Al día siguiente después de haber transcurrido 18 horas nos dirigimos al lector de placa



Configuramos el lector, destapamos la placa y la colocamos en la posición adecuada



Se cierra la tapa del lector y arroja resultados



Luego procedemos a sembrar en agar nutritivo algunas de las celdas seleccionados, con una micropipeta tomamos 100 microlitros y se esparce en su totalidad con un hisopo estéril



Se deja cerca del mechero con la tapa arriba hasta que se seque en su totalidad para posteriormente colocarlo dentro de la incubadora hasta que complete 24 horas





Luego se leen los resultados y se diligencia la tabla

### **Resultados**

Un total de 71 cepas bacterianas se aislaron de las cuales 63 fueron coco gram positivos (CGP), 4 bacilos gram negativos (BGN) y 4 cocobacilos gram negativos (CBGN), algunas bacterias que se lograron identificar fueron:

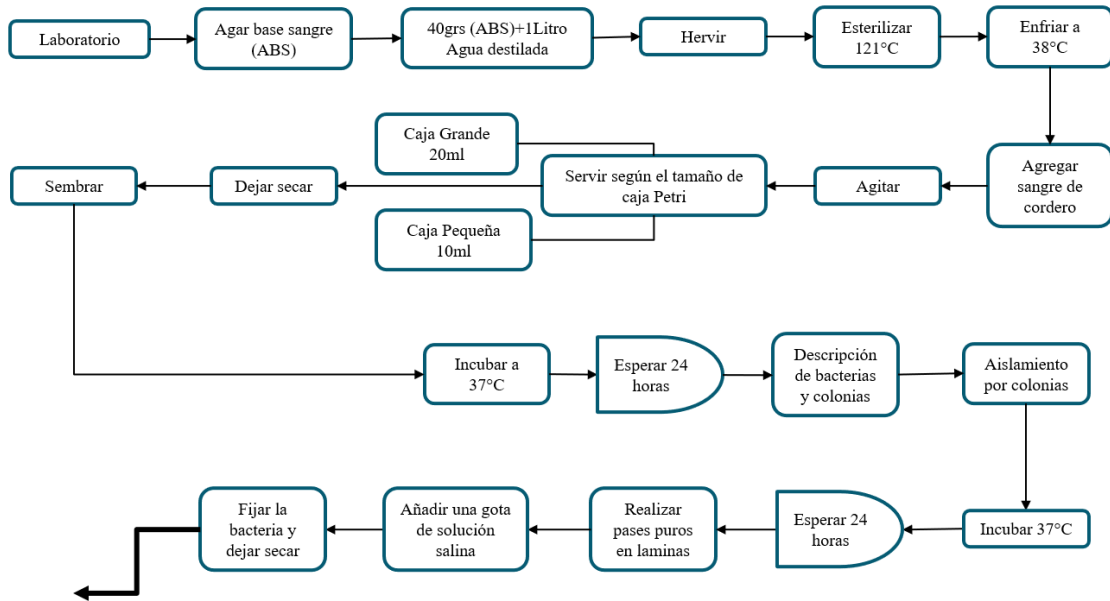
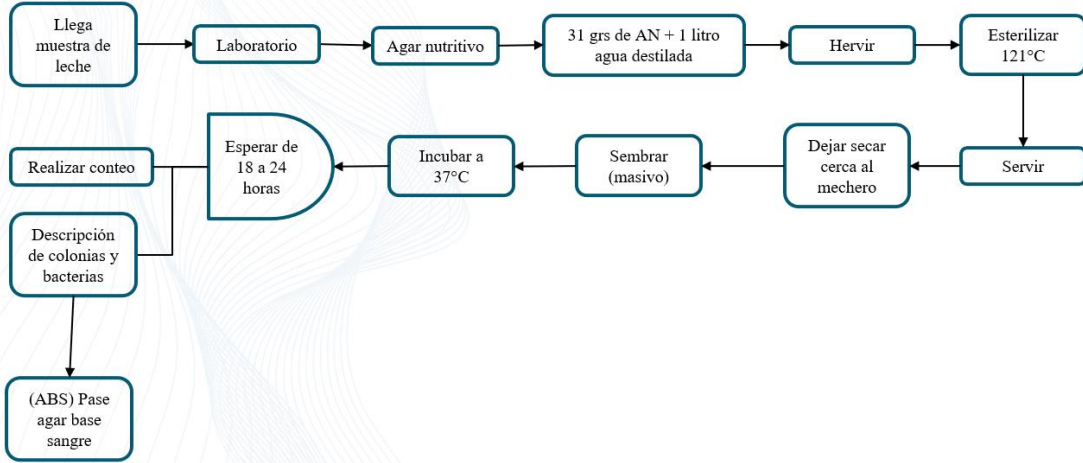
- *Staphylococcus Aureus*
- *Streptococcus Agalactiae*
- *Echerichia Coli*
- *Streptococcus Uberis*
- *Pseudomona Aeroginosa*
- *Otros streptococcus*
- *Staphylococcus no Aureos*

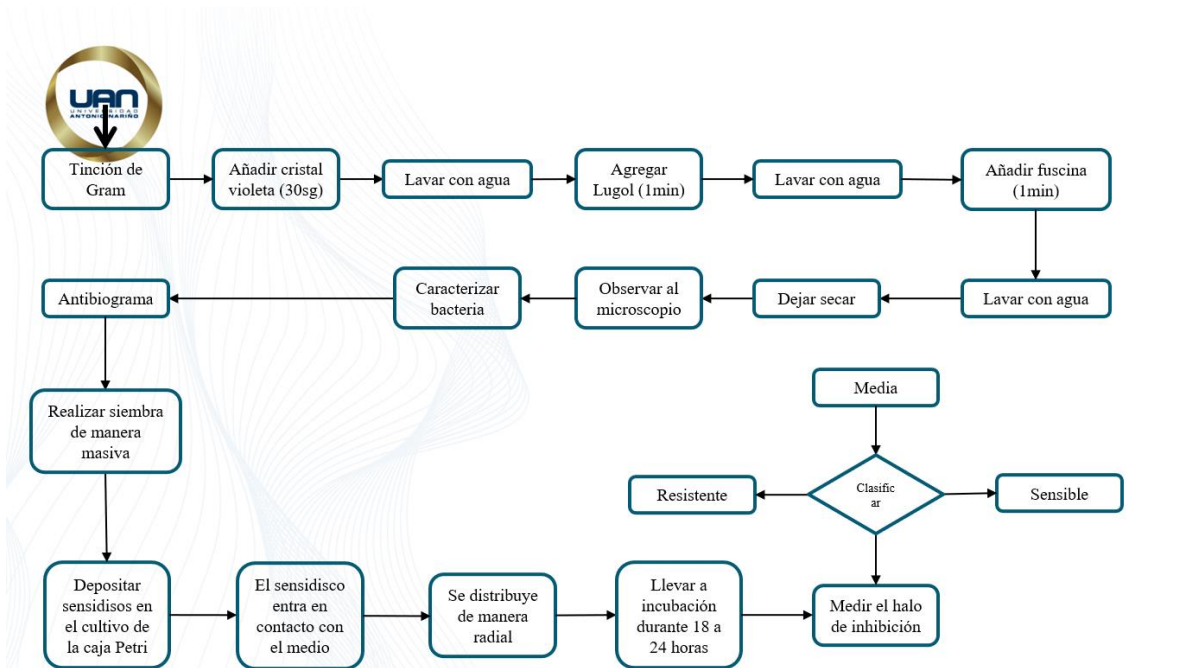
### **Flujograma**





# Flujograma





## Discusión

Varios estudios han reportado una alta actividad antibacteriana del propóleo contra bacterias Gram positivas en comparación a la actividad sobre bacterias gram negativas. (Mauri et al 2012; serra y la calle, 2012 siripatrawon et al, 2013).

Algunos autores han señalado la efectividad de un producto base de lisozima intramamario para el control de mastitis clínica y en el secado de vacas de producción de leche. (Vargas et al 2015 y Vargas et al 2019)

Es importante resaltar que la mastitis es un problema a nivel mundial y el uso indiscriminado de los antibióticos ha generado resistencia, hoy en día se buscan diferentes alternativas para su tratamiento por eso se decide realizar pruebas invitro con el propóleo, la lisozima y las nanopartículas ya que estas poseen diferentes propiedades antibacterianas.

Estandarizar los protocolos ayudan a disminuir los errores durante la preparación de los diferentes productos, procesos de manipulación de bacterias, siembra por agotamiento o masivo, la correcta desinfección y limpieza de los materiales reutilizables en el laboratorio, proceso de materiales antes de realizar la placa, realizar el montaje de la placa de la manera más organizada y estandarizada para lograr mejores resultados o evitar la contaminación durante el proceso.

## **Conclusiones y recomendaciones**

Se estandarizaron todos los procedimientos para la preparación de los medios, identificación de bacterias y pruebas de sensibilidad.

Me enteré y aprendí sobre los diferentes manejos dentro del laboratorio.

La parte del laboratorio juega un papel muy importante para realizar diferentes procedimientos para identificar, medir la resistencia y sensibilidad bacteriana en la leche de vaca.

En el país existen muy pocos laboratorios especializados en identificar bacterias causantes de la mastitis en vacas y en pruebas de sensibilidad, se recomienda seguir entrenando personal y realizar protocolos estandarizados para este tipo de trabajo

En la aplicación de los tratamientos alternativos utilizados frente a la placa obtuvimos diferentes resultados que podrían tener muy buenos efectos frente a las bacterias expuestas causantes de mastitis, los resultados al inicio variaron desde la primera placa hasta la última ya que existen factores como la preparación del propóleo, el tiempo de duración de las nanopartículas que varían el efecto bactericida que poseen. El resultado obtenido en las últimas placas mostró mejor efecto bactericida ya que las colonias bacterianas se logran contar, hay muy pocas o no hay.

Durante el tiempo de la pasantía en el laboratorio se concluye que los tratamientos invitro expuestos frente a las bacterias de muestras de leche de vacas con mastitis son viables para proseguir con las pruebas invivo con un producto adecuado para el mercado.

Realizar todas las pruebas dentro del laboratorio desinfectando muy bien el área de trabajo rotando los productos usados, encendiendo el mechero cada vez que se manipula algún microorganismo, con el uso correcto de los implementos de seguridad como guantes, tapa bocas, gorro, bata.

Se recomienda seguir con la investigación de estos productos alternativos para así lograr patentar un producto adecuado, que cumpla con todas las características tanto para el tratamiento del animal como el bolsillo del ganadero.

Generar conciencia de la realidad frente a tratamientos para bacterias ya que en pocos años no funcionarían los tratamientos comerciales como los antibióticos debido al uso indiscriminado de ellos, para esto se está implementando múltiples estrategias como educar a los ganaderos de mejorar las rutinas de ordeño, de realizar el California Mastitis Test, de no automedicar a sus animales y que existen otras alternativas de tratamiento para las mastitis en vacas.

## Bibliografía

1. Ferreyra Maillard, Anike Paula Virginia; Pellegrino, Matias Santiago; Dalmasso, Pablo Roberto; Estudio del efecto antibacteriano de bio(nano)materiales contra microorganismos patógenos productores de mastitis bovina; 28-6-2019.
2. OLIVER, S. y ALMEIDA, R. 2001. Control de mastitis, seguridad de alimentos y producción de leche de calidad. Temario, (125).
3. Mera andrade, R. Muñoz Espinosa, M. Artieda Rojas, J. R., Ortiz Tirado, P, Gonzalez Salas, R., Vega Falcon, V. (2017) Mastitis bovina y su repercusión en la calidad de la leche Vol18 (11), 1695-7504. Recuperado el 15 de diciembre de 2021 <https://www.redalyc.org/pdf/636/63653574004.pdf>.
4. Hillerton, J., Halley, B., Neaves, P., Rose, M. (1999) Detection of antimicrobial substances in individual cow and quarter milk samples using Delvotest® microbial inhibitor tests. *Journal of Dairy Science*, 82(4): 704–711.
5. Kabir, J., Umoh, V., Audu-okoh, E., Umoh, U., Kwaga, P. (2004). Veterinary drug use in poultry farms and determination of antimicrobial drug residues in commercial eggs and slaughtered chicken in kaduna State, Nigeria. *Food Control*, 15(2): 99-105.
6. HEISIG, P., B. KRATZ, E. HALLE, Y. GRASER, M. ALTWEGG, W. RABSCH, J. P. FABER. 1995. Identification of DNA gyrase A mutations in ciprofloxacin-resistant isolates of *Salmonella typhimurium* from men and cattle in Germany. *Microb. Drug Res.* 1: 211-218.
7. ALTREUTHER, P., A. BOTTNER, M. SCHEER, P. SCHMID, W. TRAEDER, S. WEISKOPF. 1997. Observations on resistance monitoring in animal health. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 110: 418-421.
8. Cheng Guyue, Hao Haihong, Xie Shuyu, Wang Xu, Dai Menghong, Huang Lingli and Yuan Zonghui. (2014). Antibiotic alternatives: the substitution of antibiotics in animal husbandry?. *Frontiers in Microbiology*, Volume 5: 1-15. Recuperado el 17 de diciembre de <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2014.00217/full>.
9. Andresen S, Hans. (2001). Mastitis: prevención y Control. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 12(2), 55-64. Recuperado en 117 de diciembre del 2021, de [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1609-91172001000200010&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172001000200010&lng=es&tlng=es).
10. Heeschen, W.H. (2012): Monograph on the Significance of Microorganism in Raw Milk. International dairy federation. Wolf passing, Austria. Pp. 19-26.

11. Philpot N, Nickerson S. Ganando la lucha contra la mastitis. Naperville, USA y Oelde, Germany, 2002.
12. Erskine Ron, Cullor Jim, Schaellibaum Mel, Yancey Bob and Zecconi Alfonso. (2004). Research committee report bovine mastitis pathogens and trends in resistance to antibacterial drugs. National mastitis council. Subcommittee of NMC Research Committee, pp 1-16.
13. Smith KL., Hogan JS. Environmental mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1993; 9:489-498.
14. Roberson JR, Lawrence K, Hancock DD, Gay JM, Besser T. Prevalence of coagulase positive Staphylococci, other than *Staphylococcus aureus*, in bovine mastitis *AJVR* 1996;57(Suppl):54-58.
15. Miller G, Bartlett P. Economic effects of mastitis prevention strategies for dairy producers. *J Am Vet Med Associ.* 2004; 198:227-231.
16. Gentilini E, Denamile G, Godaly MS. Mastitis bovina: Tipificación del género *Staphylococcus*. *Vet Arg* 1995; 12:384-386.
17. Sandholm M, Honkanen-Busalsaki T, Kaartinen L, Pyyorala S. The bovine udder and mastitis. Faculty of Veterinary Medicine. University of Helsinki. Helsinki. 1995.
18. World Health Organization (2014). Antimicrobial resistance: global report on surveillance. WHO, 20 avenue, Appia 1211 Geneva 27 – Switzerland.
19. Momtaz, H., Farhad Safarpour D., Taghi, T, Rezvani, A. &Yarali, S. 2012. Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated from Bovine Mastitic Milk: Serogroups, Virulence Factors, and Antibiotic Resistance Properties. *Scientific World Journal.* 618-709.
20. Vargas F; Torres O; Bernal Y; Linárez N, Quevedo L, Lucena Y. 2018. In vitro assay with products based on lisozima against antibiotic multiresistent bacteria. Research Congress of Veterinary Medicine. University Centroccidental Lisandro Alvarado, Barquisimeto, Venezuela.
21. Pieterse R;Todorov D . 2010.Bacteriocins- exploring alternatives to antibiotics in mastitis treatment recuperado el día 15 de noviembre del 2021 de [https://pdfs.semanticscholar.org/9c74/1fd1edfe1c62b11eac59f2c456275098504.pdf?\\_ga=2.198844844.200380088.1664401070-140059300.1664401070](https://pdfs.semanticscholar.org/9c74/1fd1edfe1c62b11eac59f2c456275098504.pdf?_ga=2.198844844.200380088.1664401070-140059300.1664401070).
22. Sreelakshmy, V., Deepa, M. K. y Muridula, P. (2016). Green synthesis of silver nanoparticles from *Glycyrrhiza glabra* root extract for the treatment of gastric ulcer. *J Develop Drugs*, 5: 152. Recuperado de <https://doi.org/10.4172/2329-6631.1000152>.

23. IDEXX 2018. Guía microbiológica para interpretar la concentración mínima inhibitoria (CMI) Recuperado de <https://www.idexx.es/files/mic-gui%CC%81a-microbiolo%CC%81gica-es.pdf>.
24. Carlos G. 2012. Método de determinación de sensibilidad antimicrobiana por dilución. Recuperado de <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/04-DETERMINACION-DE-LA-SENSIBILIDAD-METODO-DE-DILUCION-2012.pdf>.
25. Laura Barrero Cuevas. Microbiología Clínica.
26. Díaz Adelaida 2003 La Estructura de las Catalasas. REB 22 (2): 76-84.
27. D.sham. The role of clinical microbiology in the control and surveillance of antimicrobial resistance. ASM News., 62 (1996), pp.25-29.