

**UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO**

**ESCUELA DE POSTGRADO**

**MAESTRIA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN MICROBIOLOGIA**



**TESIS**

**Factores de virulencia y susceptibilidad a penicilina y ceftiofur en *staphylococcus aureus* aislado de mastitis bovina, Chiclayo- 2022**

Presentada para obtener el grado académico de Maestra en Ciencias con  
mención en Microbiología

Investigador:

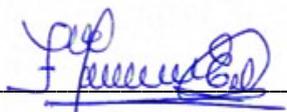
Zully Genoveva Montenegro Esquivel

Asesora:

Dra. Margarita Hormecinda Torres Malca

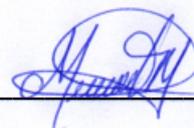
Lambayeque, 2024

Factores de virulencia y susceptibilidad a penicilina y ceftiofur en *staphylococcus aureus* aislado de mastitis bovina, Chiclayo- 2022.



---

Zully Genoveva Montenegro Esquivel  
Autora



---

Dra. Margarita Hormecinda Torres Malca  
Asesora

Tesis presentada a la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo para obtener el Grado Académico de Maestra en Ciencias con mención en Microbiología.

Aprobado por:



---

Dra. Martha Arminda Vergara Espinoza  
Presidenta



---

Dra. Ana María del Socorro Vásquez de Cumpa  
Secretaria



---

Dra. Gianina Llontop Barandiaran  
Vocal

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

067

Siendo las 11:30 horas del día 25 de enero del año Dos Mil veinticuatro, en la Sala de Sustentación de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo de Lambayeque, se reunieron los miembros del Jurado, designados mediante Resolución N° 387-2023 de fecha 20 de abril 2023, conformado por:

- Dra. Martha Armiada Jazayr Espinoza PRESIDENTE (A)
Dra. Ana María del Socorro Trigueros de Cumpa SECRETARIO (A)
Dra. Graciana Floriof Barondiarán VOCAL
Dra. Margarita Torres Males ASESOR (A)

Con la finalidad de evaluar la tesis titulada Factores de virulencia y susceptibilidad a penicilina y ceftiofur en Staphylococcus aureus aislado de Emastilis bobina, Chiclayo - 2022.

presentado por el (la) Tesista Lelly Genoveva Montenegro Esquivel sustentación que es autorizada mediante Resolución N° 007-2024-1-EPG de fecha 23 de enero de 2024

El Presidente del jurado autorizó del acto académico y después de la sustentación, los señores miembros del jurado formularon las observaciones y preguntas correspondientes, las mismas que fueron absueltas por el (la) sustentante, quien obtuvo 18 puntos que equivale al calificativo de Muy bueno

En consecuencia el (la) sustentante queda apto (a) para obtener el Grado Académico de: Maestro en Ciencias con Mención en Microbiología

Siendo las 13:22 horas del mismo día, se da por concluido el acto académico, firmando la presente acta.

Signature of Martha Armiada Jazayr Espinoza, PRESIDENTE

Signature of Ana María del Socorro Trigueros de Cumpa, SECRETARIO

Signature of Graciana Floriof Barondiarán, VOCAL

Signature of Margarita Torres Males, ASESOR

### Declaración jurada de originalidad

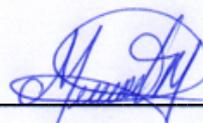
Yo Zully Genoveva Montenegro Esquivel investigador principal y Margarita Hormecinda Torres Malca, asesora del trabajo de investigación “FACTORES DE VIRULENCIA Y SUSCEPTIBILIDAD PENICILINA Y CEFTIOFUR EN Staphylococcus aureus AISLADO DE MASTITIS BOVINA, CHICLAYO- 2022”, declaramos bajo juramento que este trabajo no ha sido plagiado, ni contiene datos falsos. En caso se demostrará lo contrario, asumo responsablemente la anulación de este informe y por ende el proceso administrativo a que hubiere lugar. Que puede conducir a la anulación del título emitido como consecuencia de este informe.

Lambayeque, 18 de octubre, del 2023



---

Zully Genoveva Montenegro Esquivel  
Autora



---

Dra. Margarita Hormecinda Torres Malca  
Asesora

## **Dedicatoria**

### **CON GRATITUD A DIOS SUPREMO**

Por darme salud, sabiduría y estar presente en todo momento recibiendo su luz, protección y orientación, permitiendo que cumpla con mis objetivos.

### **A MIS HIJAS: PRISCILLA NILDA Y MARIA ALEJANDRA**

Por su comprensión y ser mi fuente de motivación.

### **A MI MADRE NILDA**

Por su apoyo incondicional para lograr mis metas trazadas.

### **A LA MEMORIA DE:**

#### **MI PADRE EDUARDO**

Por su comprensión, apoyo y sabios consejos.

#### **MI ABUELITA GENOVEVA**

Por el amor y cariño que siempre me brindó

#### **MI PROFESORA NILDA DELGADO**

Por su amistad y conocimientos impartidos.

## **Agradecimiento**

Mi más sincero agradecimiento a la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo Facultad de Ciencias Biológicas por haberme admitido en el programa de maestría.

A los diferentes propietarios de los establos lecheros del distrito de Chiclayo por permitirme realizar la toma de muestras de leche de vacas con mastitis.

Mi más sincero agradecimiento a mi gran amiga y compañera de trabajo Dra. M.V. Margarita Hormecinda Torres Malca asesora de la presente investigación por su constante apoyo incondicional y ayuda brindada para la realización y culminación de la presente tesis.

A mi querida amiga y compañera de trabajo Dra. Martha Vergara Espinoza por su constante apoyo en el desarrollo y revisión del presente trabajo.

## Índice General

<b>Dedicatoria</b> .....	v
<b>Agradecimiento</b> .....	vi
<b>Índice General</b> .....	vii
<b>Índice de tablas</b> .....	viii
<b>Índice de figuras</b> .....	ix
<b>Resumen</b> .....	x
<b>Abstract</b> .....	xi
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>II. Diseño Teórico</b> .....	5
2.1 Antecedentes de la Investigación .....	5
Antecedentes Internacionales .....	5
Antecedentes Nacionales .....	9
2.2 Base Teórica .....	12
2.3 Definiciones conceptuales .....	14
2.4 Hipótesis .....	15
<b>III. Métodos y Materiales</b> .....	15
3.1 Tipo de Investigación .....	15
3.2 Método de Investigación .....	15
3.3 Diseño de Contrastación .....	15
3.4 Ubicación .....	15
3.5 Población, Muestra y Muestreo .....	16
3.6 Técnicas, instrumentos, equipos y materiales de recolección de datos .....	17
<b>IV. Resultados</b> .....	23
<b>4.1 <i>Staphylococcus aureus</i> aislados de establos lecheros</b> .....	23
4.2 Aislamiento e identificación de <i>S. aureus</i> .....	23
4.3 Factores de virulencia .....	24
4.4 Susceptibilidad antimicrobiana de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	30
<b>V. Discusión</b> .....	33
<b>VI. Conclusiones</b> .....	39
<b>VII. Propuestas</b> .....	40
<b>Apéndice</b> .....	48

## Índice de tablas

Tabla 1 . Interpretación de la medida de los diámetros de los halos e inhibición.....	22
Tabla 2. <i>Staphylococcus aureus</i> aislado de mastitis bovina distrito de Chiclayo. ....	23
Tabla 3. Factores de virulencia. Producción de coagulasa en horas e intensidad por <i>S. aureus</i> aislados de Mastitis bovina, distrito de Chiclayo. Septiembre2022 – Diciembre 2022.....	24
Tabla 4. Producción de hemolisina $\alpha$ (mm de diámetro) por <i>Staphylococcus aureus</i> aislados de Mastitis bovina, distrito de Chiclayo. Septiembre 2022 – Diciembre 2022 .....	25
Tabla 5. Producción de hemolisina $\alpha\beta$ (mm de diámetro) por <i>S.aureus</i> aislados de Mastitis bovina, distrito de Chiclayo. Septiembre 2022 – Diciembre 2022.....	26
Tabla 6. Factores de virulencia. Producción de leucocidina por <i>Staphylococcus aureus</i> aislados de Mastitis bovina, distrito de Chiclayo. Septiembre 2022 – Diciembre 2022 .....	28
Tabla 7. Factores de virulencia. Producción de fibrinolisisina por <i>Staphylococcus aureus</i> aislados de Mastitis bovina, distrito de Chiclayo. Septiembre 2022 – Diciembre 2022. ....	28
Tabla 8. Susceptibilidad a Penicilina y Ceftiofur de <i>Staphylococcus aureus</i> aislados de Mastitis bovina, distrito de Chiclayo. Septiembre 2022 – Diciembre 2022. ....	30
Tabla 9. Susceptibilidad a Penicilina y número de factores de virulencia de <i>S. aureus</i> aislada de Mastitis bovina. Distrito de Chiclayo. Septiembre 2022 – Diciembre 2022. ....	32
Tabla 10. Factores de Virulencia de <i>Staphylococcus aureus</i> aislados de Mastitis bovina asociados a cepas resistentes a Ceftiofur. Distrito de Chiclayo. Septiembre 2022 - Diciembre 2022 .....	32

## Índice de figuras

Figura 1. Distrito de Chiclayo, departamento de Lambayeque .....	16
Figura 2. Toma de muestra de leche de vaca con mastitis .....	17
Figura 3. <i>S. aureus</i> aislado de mastitis bovina. A. En agar sangre. B. En agar Chapmanmanitol ....	23
Figura 4.A,B,C,D. Intensidad de la Prueba de coagulasa positiva en cruces de <i>S. aureus</i> aislados de mastitis bovina, distrito de Chiclayo. Septiembre 2022- Diciembre 2022 .....	24
Figura 5. Producción de hemolisina $\alpha$ por <i>S. aureus</i> aislados de mastitis bovina, distrito de Chiclayo. Septiembre 2022-Diciembre 2022.....	26
Figura 6. Producción de hemolisina $\alpha \beta$ por <i>Staphylococcus aureus</i> aislados de mastitis bovina, distrito de Chiclayo. Septiembre 2022 -Diciembre - 2022 .....	27
Figura 7 A,B. Producción de Leucocidina por <i>S.aureus</i> aislados de mastitis bovina, distrito de Chiclayo. Septiembre 2022 – Diciembre 2022.....	28
Figura 8. Producción de cápsula por <i>S.aureus</i> aislados de mastitis bovina, distrito de Chiclayo.Septiembre 2022 – Diciembre 2022.....	29
Figura 9. <i>S. aureus</i> sensible a penicilina aislados de mastitis bovina, distrito de Chiclayo. Septiembre 2022 – Diciembre 2022. ....	30
Figura 10. <i>S. aureus</i> sensible a penicilina aislados de mastitis bovina, distrito de Chiclayo. Septiembre 2022 – Diciembre 2022 .....	31

## Resumen

El objetivo de estudio fue determinar los factores de virulencia y susceptibilidad a Penicilina y Ceftiofur en *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina del distrito de Chiclayo de Septiembre 2022 a Diciembre 2022. En el laboratorio de Microbiología de la facultad de Medicina Veterinaria - UNPRG se aislaron 300 cepas de muestras de leche de cuartos mamarios de 75 vacas con mastitis, de las cuales, se identificaron 191 cepas (63.67%) de *S. aureus*. Se investigaron seis factores de virulencia, 145 (75.92 %), 37 (19.37%) y 9 (4.71%) de cepas produjeron seis, cinco y cuatro factores. Todas produjeron catalasa, coagulasa, leucocidina y cápsula; 2.62%, hemolisina  $\alpha\beta$ , 92.67% hemolisina  $\alpha$  y 75.92% Fibrinolisisina. Fueron resistentes a Penicilina, 32 (76.19%) cepas productores de seis factores de virulencia, 7 (16.67%) y 3 (7.14%) cepas productoras de cinco y cuatro factores respectivamente, 98 (74.24%) de cepas fueron sensibles a Penicilina y produjeron seis factores de virulencia. En cuanto a la sensibilidad a Ceftiofur las cepas fueron resistentes, 19 (82.61%) y 4 (17.39%) productoras de seis y cinco factores de virulencia, la mayoría de las cepas fueron sensibles a Ceftiofur con 121 (74.69%) productoras de seis factores de virulencia.

*Palabras clave:* *S. aureus*, factores de virulencia, penicilina, ceftiofur, mastitis bovina.

## Abstract

The objective of the study was to determine the virulence factors, and the susceptibility of *S.aureus* to penicillin and ceftiofur, of *S.aureus* isolated from bovine mastitis from Chiclayo district from September 2022. to December 2022. In the Microbiology laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine of the National University Pedro Ruiz Gallo 300 strains were isolated from milk samples from the mammary quarters of 75 cows with mastitis, of which 191 strains (63.67%) of *S. aureus* were identified. Six virulence factors were investigated, 145 (75.92%), 37 (19.37%) and 9 (4.71%) strains produced six, five and four factors. All produced catalase, coagulase, leucocidin and capsule; 2.62% hemolysin  $\alpha\beta$ , 92.67% hemolysin  $\alpha$  and 75.92% Fibrinolysin. 32 (76.19%), 7 (16.67%) and 3 (7.14%) strains producers of six, five and four virulence factors respectively showed Penicillin resistance, 98 (74.24) strains were sensitive to Penicillin and produced six virulence factors. Regarding sensitivity to Ceftiofur strains of *Staphylococcus aureus* were resistant, 19 (82.61%) and 4 (17.39%) producers of six and five virulence factors, most of the strains were sensitive to Ceftiofur with 121 (74.69%) producers of six virulence factors.

*Keywords:* *S. aureus*, virulence factors, penicillin, ceftiofur, bovine mastitis.

## I. INTRODUCCIÓN

La Mastitis Bovina es la inflamación de la glándula mamaria provocadas por lesiones físicas, desinfección incorrecta de la ubre en el ordeño, equipo de ordeño mal utilizadas, deficiente sellado post ordeño, mal estado de camas, alteraciones de la microbiota normal de la glándula mamaria, y otros factores que facilitan el ingreso de microorganismos patógenos, tales como *Staphylococcus aureus* *Staphylococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysagalactiae* (1); produciendo microabscesos limitando la producción láctea (2).

La mastitis tiene una gran importancia económica en la industria láctea debido a las causas como disminución de la producción y calidad de la leche. También tiene un grave potencial zoonótico debido a la distribución de bacterias y toxinas a través de la leche (3).

Las infecciones por *Staphylococcus aureus* son de mayor importancia en Veterinaria, por ser miembro de la microbiota normal de superficies, está permanentemente en el medio ambiente de la vaca, coloniza eficientemente y codifica muchas proteínas que actúan como factores de virulencia como, cápsula, coagulasa, catalasa, leucocidina, fibrinolisisina y hemolisinas, en las distintas etapas de la infección mamaria(4); éstos y otras características, facilitan en *S. aureus* su penetración al interior de la ubre y la invasión de los tejidos; además de ello, la formación de tejido cicatrizal, la evasión de la respuesta inmune, sobrevivencia y multiplicación en el huésped favoreciendo su patogenicidad (5); así mismo el mecanismo de resistencia de la bacteria a las penicilinas, implica resistencia a todos los beta- lactámicos frecuentemente usados en el tratamiento de mastitis(6).

A nivel mundial la mastitis en el ganado bovino ocasiona grandes pérdidas económicas, en algunos efectivos ganaderos se estima pérdidas desde 100 a 500 g/vaca/lactación, siendo que las pérdidas por la mastitis subclínica es mayor que la que causa la mastitis clínica, evidentemente porque al no manifestarse las alteraciones en la glándula o en la ubre, no se toman las medidas correctivas para superarla (5); estima que las pérdidas por mastitis es mayor que las causadas por infertilidad u otros problemas reproductivos, y para el productor son directas, tales como: eliminación de vacas enfermas, eliminación de leche con mastitis, tratamiento de la enfermedad, secreción de leche con antibiótico, baja producción, variación de la composición de leche, disminución de calcio,

fósforo, proteína y grasa e incremento de cloro y sodio) lo que reduce su calidad nutritiva (1).

Se considera que el 90% de casos de mastitis es causado por agentes infecciosos, de ellos, las especies bacterianas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *agalactiae* y *dysgalactiae* son responsables de un elevado porcentaje de las infecciones intramamaria (7), pudiendo estar involucrados también *Escherichia coli* y *Mycoplasma*) Los microorganismos mencionados son considerados como los “mayores” o más frecuentes, entre los “menores” se encuentra *Corynebacterium bovis*. En resumen, de todo lo mencionado, la mastitis es el resultado final de la interacción de microorganismos como (8) agentes causales, la vaca como huésped y el medio ambiente.

Estudios evidencian que *S. aureus* se aísla con frecuencia de casos de Mastitis Bovina, así por ejemplo se reportó su aislamiento en el 31.1% de casos de mastitis en vacas del Cañon Aneime en Colombia (9); también en Etiopía se identificó 21.0 % de cepas de *S. aureus de leche de vaca con mastitis* (10).

En el departamento de Lambayeque la incidencia de mastitis bovina por *Staphylococcus aureus*, es de 51% (11); afectando la economía del ganadero y en aquellos dedicados a la industria de productos derivados de la leche; en el caso del ganadero, por la pérdida gradual de la ubre, pérdida del potencial genético, gastos económicos para el diagnóstico y tratamiento del animal y por los miles de litros de leche que dejan de producirse o de venderse por su mala calidad, entre otros. En la industria lechera el impacto anivel regional es significativo ya que de toda la producción de Leche en Lambayeque, el 90% se destina a Lima y el 10% queda para el consumo directo o para derivados (12); así la falta del principal insumo (leche) repercute en el avance socioeconómico dependiente de la elaboración de productos lácteos como los quesos y dulces de la región, como el King Kong, de gran aceptación de propios y extraños(13), dicha realidad se refleja en los indicadores socioeconómicos de Lambayeque de los años 2016, 2017 y 2018.

Así mismo, se identificó a *S. aureus* en el 34.8% de vacas mastíticas, identificando como principal bacteria productora de mastitis subclínica (39,04%) (13), se reportó que en el 2010 la mastitis bovina bacteriana tuvo un índice del 86%, de ésta, la mastitis sólo por

coliformes se encontró en el orden del 33.33% y que los casos que tuvieron como único agente bacteriano a los *Staphylococcus* alcanzaron el 19,44% (14). En el establo lechero de la Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo de Lambayeque en el año 2009, se identificó *S. aureus* en el 62.5%, de casos de mastitis subclínica (15), y en el sector Gallito- distrito de San José, la prevalencia de mastitis subclínica fue de 94.12% (16).

La resistencia de los agentes etiológicos de mastitis bovina ha sido estudiada en diferentes países del mundo particularizando la resistencia a penicilina de cepas de *S. aureus*, pudiendo afectar el tratamiento terapéutico, por todos los factores de virulencia que posee. En Lima Martínez encontraron que el 52.1 % fueron resistentes a meticilina (17), en Venezuela que el 59.56% fueron resistentes a la oxacilina. (18), en Colombia (19) reportaron que de 46 cepas el 100% fueron resistentes a meticilina y en Boyacá – Colombia reportó una alta sensibilidad a los antibióticos betalactámicos en el 20,6 % de bacterias Gram positivas, mientras que *Staphylococcus* spp fue resistente a penicilina .

El estudio realizado en vacas con mastitis de Piura (20), se evidenció que *S. aureus* fue sensible a cloxacilina y cefalosporina (ceftiofur) y de sensibilidad intermedia a penicilina y gentamicina. En Satipo, se identificó como agentes etiológicos de mastitis a: *Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp. y *Escherichia coli* todos sensibles a Tetraciclina, Levofloxacin, Ampicilina, Trimetoprim, Eritromicina, Cefaclor y Claritromicina, excepto *Streptococcus* sp. fue resistente a Ampicilina y *E coli* que fue resistente a Cefaclor (21).

*S. aureus* es el más importante ya que muchas cepas poseen factores de virulencia que contribuyen con el desarrollo la duración la presentación y gravedad de la enfermedad, interviniendo en las defensas del huésped (22); además un porcentaje significativo de cepas son resistentes a penicilina.

En Lambayeque, los estudios en el campo de la Medicina Veterinaria, son limitados o no existen, por ello se cuestionó ¿Cuáles son los factores de virulencia predominantes y cuál es la susceptibilidad a Penicilina y Cefotiofur de *S. aureus* aislados de mastitis bovina en establos lecheros del distrito de Chiclayo? Considerando que *S. aureus* aislado de mastitis en los establos lecheros del distrito de Chiclayo, tiene como factores de virulencia predominantes, la coagulasa, la leucocidina y hemolisina  $\alpha$ , y que su susceptibilidad a la

penicilina es significativamente diferente a Ceftiofur, se ejecutó la presente investigación, cuyos objetivos son: Determinar los factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina del distrito de Chiclayo y determinar la susceptibilidad a la Penicilina y al Ceftiofur de *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina del distrito de Chiclayo de septiembre 2022 a diciembre 2022 .

## II. Diseño Teórico

### 2.1 Antecedentes de la Investigación

#### Antecedentes Internacionales

En un estudio en Polonia se investigó a *Staphylococcus aureus* considerando al microorganismo como uno de los agentes más frecuentes en mastitis subclínica del ganado lechero, analizando las muestras de leche se identificó a *Staphylococcus aureus* mediante la prueba de PCR, determinando la sensibilidad de la bacteria por el método de difusión en disco, también se comprobó la resistencia de *Staphylococcus aureus* a antibióticos como penicilina (56%), oxitetraciclina (24%), y tetraciclina (17%), se determinó el genotipo utilizando 2 métodos perfil de fusión PCR y MLVF-PCR, destacando en la presente investigación la importancia del biofilm sobre la resistencia a los antibióticos observando en la mayoría de las cepas de *Staphylococcus* analizados (70%) (23).

Para identificar los agentes etiológicos más relevantes de mastitis bovina y sus patrones de sensibilidad a antibióticos, se ejecutó una investigación en el departamento de Boyacá (Colombia), en el que se encontró una prevalencia de 31 % (n=214) de bacterias causantes de mastitis, siendo *Staphylococcus aureus* el más frecuente con 26%, asimismo se reportó una alta sensibilidad a los antibióticos betalactámicos en 20.6% de aislamientos de bacterias Gram positivas, la resistencia a la penicilina se observó sobre todo en especies de *Staphylococcus* spp (4).

Unos investigadores determinaron la prevalencia de mastitis bovina y su etiología infecciosa en producción de leche, analizaron 528 vacas de 95 establos lecheros, siendo evaluados por la prueba de CMT para detectar mastitis subclínica cultivando 173 muestras de leche de vacas positivas a CMT, aislando *Staphylococcus aureus* en 51.2% de muestras de leche cultivadas, con resultados de una alta prevalencia de mastitis (8), así mismo, se estudió los factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* las hemolisinas que producen lisis de los glóbulos rojos, la toxina  $\alpha$ ,  $\beta$  invaden a la célula huésped afectando a los tejidos(24), Galli et al estudiaron la enzima coagulasa como un marcador

de virulencia de *Staphylococcus aureus* la cual forma una capa de fibrina alrededor de un absceso protegiendo a la bacteria de la fagocitosis también produce o sintetiza hialuronidasa, fibrinolisisina, lipasa, catalasa y penicilinas (25).

En México investigaron las infecciones intramamarias de virulencia de cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis bovina, las cuales eran positivas a catalasa, coagulasa, term nucleasa y manitol; ejecutaron la técnica de la Reacción en Cadena por la Polimerasa para determinar la producción de los factores de virulencia representados por hemolisinas ( $\alpha$  y  $\beta$ ), factor de agregación y cápsula, asimismo estudiaron la sensibilidad de las cepas a oxitetraciclina, penicilina, oxacilina y estreptomicina. De 117 cepas aisladas, la producción de hemolisina y el factor de agregación fueron los expresados por la mayor parte de las cepas aisladas correspondientes a 78% y 83% respectivamente, mientras que la cápsula fue expresada por el 31% de cepas. También encontraron una correlación entre ausencia de cápsula y producción de hemolisinas así de un total de 92 cepas hemolíticas, 72 no mostraron cápsula. En la prueba de sensibilidad de las cepas el 31,6% (37), 30,76% (36), 76,92% (90) y 79,48% fueron sensibles a Penicilina, oxacilina, estreptomicina y oxitetraciclina respectivamente (26).

También se han aislado e identificado fenotípicamente a *Staphylococcus* spp. de muestras de leche de vacas con mastitis se seleccionó 101 cepas determinando la resistencia a diferentes antibióticos por la prueba de Kirby y Bauer y los genes de resistencia por PCR. De las 101 cepas aisladas 65 fueron *Staphylococcus aureus* y 36 *Staphylococcus coagulasa* negativa, el resultado del antibiograma con los 9 antibióticos probados arrojó cepas de *S. aureus* resistentes entre 1.4% a 23.2% a penicilina, en el caso de las cepas *Staphylococcus coagulasa* negativa presentaron resistencia a eritromicina, tetraciclina, penicilina, ampicilina kanamicina y clindamicina en diferentes proporciones (27).

En otro estudio, se propuso determinar la actividad de la toxina  $\beta$  en términos de mortalidad, cambios clínicos y microscópicos y de recuperación de microorganismos de la glándula mamaria. Se evaluó la toxina parcialmente purificada y una cepa de *S. aureus* aislada de mastitis bovina productora solamente de toxina  $\beta$ . Como resultado se comprobó que la toxina parcialmente purificada produjo en la glándula mamaria una leve infiltración de neutrófilos en los alveolos; sin embargo, la inoculación de la cepa de *S. aureus* productora sólo de toxina  $\beta$ , generó en la glándula mamaria lesiones vasculares graves con presencia de bacterias asociadas, sugieren los investigadores que dichos hallazgos podrían estar influenciados por otras enzimas o toxinas que dañan la membrana (28).

Considerando que la toxina  $\beta$  de *S. aureus* también juega papel importante en la patogénesis de la mastitis bovina y que muchas cepas de dicha bacteria poseen las toxinas  $\alpha$  y  $\beta$ , se ejecutaron investigaciones a fin de determinar la codificación de dicha toxina en el genoma de la bacteria. Se sometieron 105 cepas de *S. aureus* aisladas de casos de mastitis bovina al método de la Reacción en Cadena por la Polimerasa (PCR) determinándose que el 96% eran poseedoras del gen de la toxina  $\beta$  y solo el 72% presentaron actividad hemolítica en agar sangre para la toxina  $\beta$ . Asimismo en Europa y Estados Unidos se obtuvo una prevalencia similar, es decir el 97% de cepas de mastitis bovina tuvieron acción hemolítica poseedoras del gen codificante de toxina  $\beta$  (29).

Sin embargo, la ausencia de catalasa en las mutantes afectó la proliferación de la bacteria en las primeras horas (post infección) en la línea epitelial mamaria bovina MAC-T, por lo que dicha enzima contribuye a la defensa de la bacteria durante las primeras horas (post infección). En la doble mutante, se demostró que la catalasa y la  $\beta$  toxina actúan de forma sinérgica durante el ciclo de vida intracelular de *S. aureus*, de manera que la carencia simultánea de ambas enzimas se traduce en el retraso de la proliferación intracelular de *S. aureus* en células epiteliales mamarias bovinas y en un incremento de su persistencia en los dos tipos celulares estudiados por Martínez (30); Usando la Reacción en Cadena por la Polimerasa (PCR) se realizó la caracterización genotípica de cepas de

*Staphylococcus aureus* aisladas de vacas con mastitis a fin de determinar si su genoma tenía la codificación de la toxina  $\alpha$ ; así se serotipificaron 262 cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas e identificadas en Estados Unidos, de dichas cepas, el 93,3% resultaron positivas a la capacidad genética de sintetizar toxina  $\alpha$ . Otras 105 cepas serotipificadas de *Staphylococcus aureus* aisladas en Dinamarca fueron procesadas con el mismo propósito, resultando que 37% de ellas también eran poseedoras del gen codificante de toxina  $\alpha$  (31).

En el presente estudio se evaluó la susceptibilidad de 95 cepas de *Staphylococcus aureus* frente a determinados antibióticos que se utilizan con frecuencia en el tratamiento de mastitis bovina. Las cepas aisladas provienen de 40 establos de producción lechera de Argentina. Al realizar la prueba de sensibilidad se obtuvieron mayor resistencia frente a la penicilina (28%), cefalexina + kanamicina (13) % y frameticina + penicilina (19). El 7% de las cepas fueron resistentes a más de un antibiótico el 3% a eritromicina y penicilina y el 2% ácido clavulánico + amoxicilina y penicilina. Las cepas no fueron resistentes a oxacilina y la mayoría fueron sensibles a ceftiofur y cefalexina (32).

Realizaron un estudio para determinar la resistencia de *Staphylococcus aureus* a meticilina y detectar genes que codifican la leucocidina de Pantón Valentine determinante de patogenicidad de dicho microorganismo, utilizando la técnica molecular PCR. Se analizaron 42 cepas confirmadas resistentes a meticilina con el gen *mecA*, el 50% de las cepas fueron portadoras del gen para PVL, 54.19% con pacientes pediátricos fueron positivos a leucocidina (33).

En Argentina, estudiaron *Staphylococcus aureus* como el patógeno principal de mayor prevalencia de mastitis bovina, estimaron la concentración mínima inhibitoria de las betalactamasas frente a *Staphylococcus* aislados de leche con mastitis, con 161 muestras, identificando 65 cepas de *Staphylococcus aureus*. y 97 cepas de *Staphylococcus* coagulasa negativa. El 33.7% (21/65) de S.a presentó resistencia a penicilina con una

concentración mínima inhibitoria de 0.5µg/ml, el 7.7 (5/65) a eritromicina con una CIM de 1µg/ml, el 61.1% (4/65) a clindamicina con una CIM de 0.12µg/ml. El 30.9% (30/97) de los *Staphylococcus coagulasa* negativa resultando negativa a la penicilina con una concentración mínima inhibitoria de 0.25µg/ml, el 7.2% (7/97) a eritromicina con una concentración mínima de 0.5µg/ml, el 4.1µg/ml (4/97) a clindamicina con CIM de 0.12µg/ml y el 3.1% (3/97) a oxacilina con una CIM 0.38µg/ml. No se observó en *Staphylococcus aureus* resistencia a meticilina (34).

### **Antecedentes Nacionales**

En la región Amazonas (Perú) se ejecutó un estudio para determinar los principales factores que influyen en la prevalencia de mastitis subclínica en la cuenca lechera de Florida, reportándose que los principales factores fueron deficientes prácticas de higiene e inadecuadas instalaciones para su desarrollo, asimismo se reportó que la prevalencia de mvastitis subclínica en la cuenca lechera de Florida es mayor al 50%, siendo los cuartos posteriores los más afectados; no se halló diferencias entre métodos de diagnóstico, ni en prevalencia según la etapa de lactancia, número de partos, edad y nivel de producción (35).

Con el objetivo de evaluar la prevalencia de mastitis subclínica en vacas de la Asociación de Ganaderos de Pueblo Nuevo de Colán – Provincia de Paita – Piura, en los meses de Noviembre – Diciembre 2018, se analizaron 288 cuartos mamarios de 72 vacas, de ellas 49 presentaron mastitis subclínica, representando una prevalencia de 68,1%, En dicho estudio se encontró que solo la edad es un factor de riesgo que influye de manera significativa en la presencia de mastitis subclínica bovina, aun así se presentaron otros factores como el lavado de manos antes del ordeño, falta de higiene, entre otros (2). Así mismo, un trabajo de investigación en Imaza (Bagua) con 276 bovinos, con de leche de las glándulas mamarias de vacas con mastitis subclínica, se evaluaron utilizando la prueba de CMT, obteniendo como resultado 94 (34%) vacas positivas a mastitis subclínica con una prevalencia entre 28.46% y 39.64%, así mismo se aisló *Staphylococcus aureus* en un 34.8% de vacas con mastitis (36).

Un estudio en Ayacucho sobre la resistencia de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* a determinados antimicrobianos, teniendo como referencia el

uso indiscriminado de antibióticos para el tratamiento de mastitis bovina, Evaluaron 94 vacas de producción lechera con la prueba de CMT obteniendo resultados de 35 bovinos con mastitis subclínica, también se realizó el aislamiento de *Staphylococcus aureus* en un (35.1%) y de *Streptococcus agalactiae* (12.6%), a la prueba de sensibilidad in vitro, *Streptococcus agalactiae* resiste a penicilina (21%), a cefalexina (21%) y a sulfatrimetropim (32.2%) y para tetraciclinas, amoxicilina + ácido clavulánico fueron sensibles en un 100%; *Staphylococcus aureus* resultó resistente a penicilina (52%), amoxicilina + ácido clavulánico (28%), tetraciclina y sulfatrimetropim sensible en 100% (37).

Conociendo la implicancia bacteriana en casos clínicos de mastitis, en el distrito de Pátapo provincia de Chiclayo, se realizó una investigación a fin de evaluar el efecto de Amoxicilina y Ceftiofur en el Síndrome Mastitis - Metritis Agalactea en cerdos, se determinó que el producto es absorbido eficazmente alcanzando los niveles terapéuticos en pocos minutos, asimismo, que los niveles de pico en el plasma fueron obtenidos en menos de una hora, concentrándose la droga en un 90% en el lugar infeccioso uniéndose a las proteínas plasmáticas y tejidos uterinos y sus fluidos donde los metabolitos activos de Ceftiofur se concentran (38).

Se llevó a cabo una investigación en la U.N.P.R.G en el Dpto. de Lambayeque, con la finalidad de determinar la Relación entre la producción de toxinas locales y de coagulasa en *S.aureus* productores de mastitis bovina, para ello, se procesaron 136 cepas de *S.aureus* coagulasa positiva productoras de mastitis en bovinos, el 100% de cepas *S.aureus* coagulasa positiva produjeron hemólisis en sangre de conejo, el 77.2%, en sangre de bovino, 74.3%, en sangre de ovino, 64.0% y 33.8% en sangre de humano y equino respectivamente. Del total de cepas de *Staphylococcus* coagulasa positiva, 41 hemolizaron en agar sangre de humano, ovino, bovino y conejo, y 36 hemolizaron eritrocitos de todas las especies; cepas de *S. aureus* no hemolíticas en agar sangre de humano, ovino, bovino y equino son poco frecuentes (39).

El tratamiento de las vacas con mastitis por *Staphylococcus* resultó más eficaz con Ceftiofur en el 91,67% de los casos, con penicilina y tetraciclina la eficacia fue de 89,17% cada uno. En vacas con mastitis por bacterias gramnegativas, el Ceftiofur, tuvo una eficacia

del 89,52%, penicilina de 5.43% y tetraciclina 6,58%. Concluyó el autor que el Conteo de Células Somáticas es el mejor método de diagnóstico de mastitis subclínica bovina y que el antibiótico de mayor eficacia es Ceftiofur (40).

Realizó un estudio en Ayacucho-Perú para evaluar la resistencia antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* agentes productoras de mastitis bovina, evaluando 94 vacas lecheras con la prueba de CMT resultando 35 con mastitis subclínica, aislando e identificando *Staphylococcus aureus* (35.1%), *Streptococcus agalactiae* (12.6%), enfrentándolos a determinados antibióticos, obteniendo resultados en la cual *Streptococcus agalactiae* resultó resistente a penicilina (21%), cefalexina (21%), sulfatrimetroprim (33.2%) pero tetraciclina y amoxicilina + ácido clavulánico sensibles en (100%); *Staphylococcus aureus* resultó resistente a penicilina (52%), amoxicilina + ácido clavulánico (27%) y para cefalexina, tetraciclina y sulfatrimetroprim fueron sensibles (100%) (37).

Se determinó la frecuencia y susceptibilidad antimicrobiana de bacterias que producen mastitis en vacunos de un establo del distrito de Conache, Trujillo, de septiembre a diciembre de 2015. Se obtuvieron muestras de leche de 140 cuartos de 35 vacas a las que se controló mastitis a través de observación directa y taza de fondo negro. Se sembraron las muestras en agar sangre y Mac Conkey incubándose a 37 °C por 24 h. Para determinar las bacterias Gram positivas se realizaron pruebas de catalasa, coagulasa, fermentación de manitol y hemólisis; y para las Gram negativas se realizaron pruebas de agar-hierro-triple azúcar (TSI), agar lisina-hierro (LIA), citrato de Simmons, ureasa, formación de indol, rojo metilo, Voges Proskauer y caldo glutamato. La susceptibilidad antimicrobiana se determinó por el método de Kirby-Bauer con discos de ampicilina, clindamicina, doxiciclina, eritromicina, estreptomina, gentamicina, oxacilina y rifampicina. Se encontró 31 vacas con mastitis bacteriana, de las cuales el 76% presentó bacterias gram negativas y 24% Gram positivas. Las bacterias Gram negativas más frecuentes fueron *E. coli* (28%) y *Klebsiella* sp. (24%), y la bacteria Gram positiva más frecuente fue *Staphylococcus aureus* (16%). *Pseudomonas aeruginosa* fue resistente a la mayoría de antibióticos, excepto a la eritromicina (susceptibilidad intermedia). *E. coli* presentó susceptibilidad intermedia a la eritromicina y resistencia a la oxacilina y rifampicina. *Staphylococcus aureus* presentó susceptibilidad intermedia a la clindamicina

y eritromicina y resistencia a la ampicilina (41).

Se realizó una investigación a fin de determinar los factores de virulencia y la susceptibilidad a oxacilina de *S. aureus* aislado de centros de salud y de la comunidad para ello colectó 143 muestras de pacientes del hospital Las Mercedes de Chiclayo de las que se aisló 98 cepas (68.53%), y 271 muestras nasales de personas de la comunidad del distrito de Lambayeque de las que identificó 98 cepas (36,16%). Todas las cepas aisladas sintetizaron leucocidina, catalasa, coagulasa y cápsula; produjeron hemolisina alfa y fibrinolisisina el 82,65% y 67,35% de cepas del hospital y el 73,47% y 20,41% de cepas de la comunidad respectivamente. En cuanto a la susceptibilidad a oxacilina, de las cepas hospitalarias, el 44,90% fueron sensibles, 6,12% intermedias y 48,98% resistentes; de la comunidad fueron sensibles 81,63%, intermedias 8,16% y resistentes 10,21% (30).

## 2.2 Base Teórica

La primera parte de la presente investigación se fundamenta en uno de los principios de la Microbiología Veterinaria que es la interacción Microorganismo – Huésped (Vaca) la cual depende de cada uno de los organismos involucrados. En el caso de la mastitis estafilocócica, ésta ocurre cuando se produce un desequilibrio con los estafilococos que forman parte de la microbiota normal (MN), que se localizan en la piel y el epitelio de la ubre, y los mecanismos de resistencia de la propia glándula mamaria. Las bacterias en general, y entre ellas los estafilococos, deben estar capacitadas para cumplir con los requisitos de una infección, es decir, adherencia, colonización y acción dañina.

*S. aureus* es la bacteria más importante del microbiota normal de la glándula mamaria, a la cual frecuentemente inflama causando la Mastitis. Puede mantenerse en la superficie de la piel gracias a sus lipasas, colonizar con ayuda de la coagulasa y diseminarse secretando la hialuronidasa; ya en el interior de la glándula secreta toxinas, como la  $\alpha$  y la  $\beta$ , que dañan el tejido; leucocidina, cápsula, catalasa entre otros que le permiten superar los mecanismos de defensa del animal. En resumen, factores propios de la bacteria le permiten instalarse, degradar tejidos locales, evadir la respuesta inmune, sobrevivir y multiplicarse en el huésped desarrollando la patogenicidad (42).

Las bacterias producen sustancias determinantes que favorecen su patogenicidad,

denominados factores de virulencia que son Coagulasa, Leucocidina, Cápsula, Fibrinolisisina, toxina  $\alpha$  (hemolisina  $\alpha$ ), Hemolisina 3, Hemolisina 5: La Coagulasa cataliza la formación de una malla de fibrina alrededor del absceso estafilocócico, limita la infección y protege a la bacteria de la fagocitosis (Roberson et al., 1996). **Leucocidina**, forma poros en la membrana plasmática de monocitos, macrófagos y leucocitos PMN causando lisis. **Cápsula**, antifagocitaria. **Catalasa**: inactiva el peróxido de hidrógeno y los radicales libres tóxicos como los hipohaluros de cloro, bromo y yodo. **Fibrinolisisina**, degrada coágulos de fibrina lo que facilita la diseminación del microorganismo a los tejidos contiguos(33). Otros factores son: **Toxina  $\alpha$**  (hemolisina  $\alpha$ ) Lisis los polimorfonucleares, monocitos, linfocitos, eritrocitos, plaquetas y células. **Hemolisina  $\gamma$**  Afecta a neutrófilos, macrófagos y eritrocitos de mamíferos, **Hemolisina  $\beta$**  Es dermonecrótica y letal en animales de laboratorio a concentraciones elevadas. Actúa como un surfactante disgregando la membrana celular (25).

Aún con los múltiples y variados determinantes de patogenicidad de *S. aureus*, no es suficiente para romper el equilibrio en la interacción microorganismo – huésped, esto ocurre con una gran cantidad de microorganismos capaces de desarrollar la mastitis ya que ésta está condicionada a factores relacionados con la glándula mamaria como el tránsito en la glándula, la integridad de la piel y de la mucosa, los ácidos grasos, la longitud y el diámetro del canal del pezón, la queratina, la fagocitosis, la secreción de defensinas por los neutrófilos, la cantidad adecuada de las células somáticas (7).

En la segunda parte del estudio, cuando el patógeno provoca la infección persistente de la ubre se recurre a la terapia la cual es muy difícil de controlarla, así en el caso de la mastitis, los antimicrobianos más utilizados son los betalactámicos, cefalosporinas, tetraciclinas, macrólidos, aminoglucósidos, sulfonamidas, fluoroquinolonas, que hacen resistencia en especial *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) e incluso a la vancomicina (43).

El tratamiento de la mastitis se sustenta también en criterios que involucran al agente etiológico y en criterios del producto; en el primer caso es evidente la sensibilidad de la bacteria al producto, en el segundo, se encuentran la habilidad del antibiótico para penetrar y persistir en la ubre y distribuirse en el cuarto afectado, que su concentración y tiempo en

la glándula sean suficientes para inhibir el crecimiento o destruir a los microorganismos, eficacia en presencia de leche, propiedades de solubilidad lipídica, unión a las proteínas plasmáticas, nivel de pH en la solución, que su administración intramamaria no cause lesión que predisponga a irritación o lesiones que favorezcan el ingreso de los microorganismos (7).

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, que incluyen las penicilinas, son ampliamente administrados en el tratamiento de mastitis debido a su espectro de actividad, seguridad y eficacia clínica confiable, son efectivos con bacterias grampositivas como los estafilococos y los estreptococos, sin embargo, autores refieren que aproximadamente el 70% de cepas de *Staphylococcus aureus* causantes de mastitis producen  $\beta$ -lactamasa, una enzima codificada por la bacteria transmitida por plásmidos elementos móviles, capaz de hidrolizar la molécula amida del anillo  $\beta$ -lactámico inactivando el antibiótico, por tanto dichas cepas son resistentes a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (43).

Finalmente debe tenerse en cuenta también que el uso de antibióticos no sólo obedece a fines terapéuticos sino también a fines preventivos, en el caso de las vacas, en el periodo de seca, es decir, entre una lactancia y otra, esta práctica (44); favorece la selección de cepas resistentes en la población microbiana e influye negativamente en *el tratamiento de la enfermedad*.

### **2.3 Definiciones conceptuales**

#### ***Mastitis subclínica***

Mastitis que no muestra signos evidentes y la leche es aparentemente normal, puede ser detectada mediante la medición de componentes inflamatorios y agentes patógenos en la leche (45).

#### ***Susceptibilidad***

Prueba en la que se expone a un agente patógeno, a una concentración estándar de un fármaco para evaluar la sensibilidad o resistencia del microorganismo (46).

#### ***Patogenicidad***

Capacidad de un organismo para causar enfermedad en un huésped susceptible (11).

### ***Virulencia***

Grado en que se expresa la patogenicidad(11).

### **2.4 Hipótesis**

Los factores de virulencia predominantes de *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina en el distrito de Chiclayo entre septiembre 2022 a diciembre 2022 son coagulasa, leucocidina, y toxinas alfa (hemolisina alfa) existiendo diferencias significativas entre las cepas.

El grado de susceptibilidad de *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina frente a la penicilina y ceftiofur, Chiclayo – 2022 es bajo.

## **III. Métodos y Materiales**

### **3.1 Tipo de Investigación**

Descriptivo: Se hizo observaciones microscópicas de microorganismos presentados en porcentajes.

Transversal: De un cultivo de leche se aislaron los microorganismos y se observaron.

### **3.2 Método de Investigación**

Método cuantitativo: Se obtuvo datos cuantificables o numéricos correspondientes a número de cepas, número de factores de virulencia y porcentaje de cepas resistente

### **3.3 Diseño de Contrastación**

No experimental, de tipo solo después.

### **3.4 Ubicación**

#### **Macro-localización**

La investigación comprendió cepas de *S. aureus* aisladas de vacas con mastitis del

distrito de Chiclayo, departamento de Lambayeque. El departamento de Lambayeque está situado en la costa norte del Perú, limita con los departamentos de Piura por el norte, Cajamarca por el este y con La Libertad por el sur; al oeste limita con el Océano Pacífico. Ver figura 1

Figura 1. Distrito de Chiclayo, departamento de Lambayeque



### **Micro-localización**

El estudio corresponde al campo de la Salud Pública, las muestras se obtuvieron de 4 establos del distrito de Chiclayo, que se encuentran ubicados carretera Pimentel, Lambayeque, Reque.

### **3.5 Población, Muestra y Muestreo**

#### **Población,**

Constituida por 300 cepas aisladas de cuartos mamarios de 75 vacas, procedentes de 4 establos lecheros de Chiclayo septiembre a diciembre del 2022.

## **Muestra**

La muestra fue 168 cepas de *S. aureus*, que se obtuvo con la fórmula para el cálculo del tamaño muestra muestral para la población. Las muestras se transportaron al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria- UNPRG para su procesamiento.

### **3.6 Técnicas, instrumentos, equipos y materiales de recolección de datos**

#### **3.6.1 Técnicas**

Se aplicó la observación y el análisis

#### **3.6.2 Instrumentos**

Se utilizó ficha de recolección de datos, cuaderno de registros, cámara fotográfica, laptop.

#### **3.6.3 Procedimientos**

Previo a la determinación de los factores de virulencia, las cepas de *S. aureus* fueron aisladas e identificadas siguiendo el procedimiento descrito por Koneman et al.(48) utilizando agar Sangre y agar Chapman Manitol y la prueba de coagulasa. Posteriormente se determinaron los factores de virulencia siguiendo el procedimiento descrito del autor en mención (48).

#### ***Toma de muestras***

Se realizó siguiendo los procedimientos de, Delgado y Vergara (49) fig. 2.

Figura 2. Toma de muestra de leche de vaca con mastitis



### **Aislamiento e identificación de *S.aureus*.**

Las muestras fueron sembradas en agar sangre y en agar Chapman manitol para su aislamiento, y para su identificación se consideraron características culturales, morfológicas, tintoriales y las pruebas de coagulasa y catalasa.

### **Determinación de los factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina**

#### **Determinación de catalasa**

Se determino la prueba de catalasa (50). Sobre una lámina porta objetos, limpia y desengrasada, se colocó una gotade agua oxigenada. Con ayuda de un mondadientes se colocó una pequeña masa de coloniasde un cultivo de *S. aureus* de 18 horas. La masa se homogenizó realizándose la lectura simultáneamente.

Lectura: La prueba es positiva si se observa un burbujeo característico por separación del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno.

#### **Determinación de coagulasa**

Se determino la prueba de coagulasa (50). En un tubo esterilizado se colocó 0.5 ml de plasma de humano. Se añadió 0.5 ml de un cultivo de *S. aureus* desarrollado en caldo nutritivo por 18 horas. Se incubó a 37 °C se realizó la lectura en cada hora hasta la hora sexta. La lectura final se realizó a las 24 horas.

Lectura: Se consideró la intensidad de la reacción, sí la prueba es positiva con 1+ si se

observa pequeños coágulos no organizados; con 2+ si se observa coágulos organizados; con 3+ si se observa gran coágulo organizado y con 4+ si todo el contenido aparece coagulado y se mantiene aun cuando se invierte el tubo.

#### **Determinación de hemolisina $\alpha$ (Toxina $\alpha$ ).**

Se sembró *S. aureus* en agar sangre de ovino. Se incubó a 37 °C por 24 horas.

Lectura: La prueba es positiva si se observa una zona de hemólisis clara alrededor de las colonias. Se mide el diámetro del halo. (51)

#### **Determinación de hemolisina $\beta$ (Toxina $\beta$ )**

Se sembró *S. aureus* en agar sangre de ovino. Se incubó a 37 °C por 24 horas.

Lectura: La prueba de hemolisina  $\beta$  es positiva cuando la bacteria produce doble hemólisis. Observándose una hemólisis clara alrededor de la colonia que corresponde a la hemólisis  $\alpha$ , seguida de una zona parcialmente hemolítica correspondiendo a la hemólisis  $\beta$ . Se mide el diámetro de los halos. (51).

#### **Determinación de leucocidina**

De 1mL de sangre de humano obtenida con anticoagulante ( EDTA) se tomó 20ul y se llevó a un tubo de 6ml, se le agregó 380 ul de solución de Turck mezclando y se dejó reposar 3 minutos luego se realizó el recuento de leucocitos (control) en cámara de Neubauer en un microscopio compuesto a 10X, se hizo el recuento respectivo en los 4 cuadrantes de los extremos y la sumatoria total de los 4 cuadrantes se multiplicó x 50 obteniéndose así el número total de leucocitos. Al ml de sangre control se le agregó el cultivo de *S. aureus* de 18 horas cuya turbidez era semejante, a la opacidad del tubo 0.5 del nefelómetro de McFarland. Se incubó a 37 °C por una hora, luego por dos horas manteniendo la mezcla en agitación moderada y constante. Se hizo el recuento de leucocitos a la hora y a las dos horas de incubación. (33).

Lectura: La prueba es positiva si se observa disminución del número de leucocitos, teniendo en cuenta el recuento control de leucocitos.

#### **Determinación de fibrinolisina**

Se determinó la prueba de fibrinolisina (5). Se extrajo 1 ml de sangre obtenida sin anticoagulante. Se obtuvo el coágulo sanguíneo. Se agregó 0.5 ml de un cultivo de *S. aureus* con una turbidez semejante a la opacidad del tubo 0.5 del nefelómetro de McFarland. Se incubó a 37 °C por 24 horas.

Lectura: La prueba es positiva si se observa lisis.

#### **Producción de cápsula**

**Prueba A:** En un portaobjetos limpio y desengrasado se hizo una extensión de la muestra obtenida y se colocó una pequeña gota del colorante Nigrosina, se dejó secar y se le agregó la gota de Nigrosina, la mezcla se dejó secar y se observó con el objetivo de inmersión. (30).

Lectura: Observación de bacterias en forma de cocos opacos y rodeados de una envoltura refringente (cápsula).

**Prueba B:** De los cultivos obtenidos se realizó un trasplante en medio cápsula. Se incubó a 37 °C por 18 horas. Se realizó la tinción negativa con nigrosina.

Lectura: Observación de bacterias en forma de cocos y rodeados de una envoltura refringente (cápsula)

#### **Determinación de la susceptibilidad a Penicilina y Ceftiofur de Staphylococcus aureus aislados de mastitis bovina**

Se realizó la prueba de difusión por disco (52) (53), pero en la actualidad lo aplicaron

los autores Suarez, Iglesia y Moreno (54). Susceptibilidad antibiótica de *Staphylococcus aureus* de aislados nasales en estudiantes del norte del Perú (54).

**Preparación y estandarización del inóculo.** Se seleccionó entre 3 a 5 colonias de *S. aureus* de un cultivo de 18 a 24 horas de incubación, luego se hizo una suspensión de las colonias en solución salina o caldo Müeller Hinton o en caldo Trypticasa Soya; se ajustó el inóculo a una turbidez equivalente al estándar 0.5 de McFarland.

**Inoculación de la placa.** Se agitó suavemente la suspensión de *S. aureus.*, en la suspensión bacteriana se sumergió un hisopo de algodón esterilizado, se removió el exceso de líquido presionando el hisopo en la pared del tubo, se inoculó en la superficie de la placa con agar Müeller Hinton empezando en la parte superior de la placa, se cubrió toda la placa frotando de ida y vuelta de un borde al otro, se rotó la placa aproximadamente 60° y se repitió el procedimiento de frotado y se rotó otra vez la placa 60° y frotó toda la placa por tercera vez.

**Aplicación del disco de penicilina y de ceftiofur.** Se colocaron los discos de antibióticos dentro de los 15 minutos siguientes a la inoculación en la placa de agar Müeller Hinton y se presionó firmemente los discos para asegurar el contacto completo con la superficie del agar y se vertió la placa y se incubó a 35 °C por 18 a 24 horas.

**Medición de las zonas de inhibición.** Las zonas de inhibición del crecimiento bacteriana por efecto de los antibióticos se midieron con luz transmitida.

**Criterios de interpretación para Difusión de disco de penicilina y ceftiofur (mm)** según Sacsquispe y Velásquez (53), pero en la actualidad lo aplicaron Suarez et al. (54). Susceptibilidad antibiótica de *Staphylococcus aureus* de aislados nasales en estudiantes del norte del Perú.

Tabla 1 . Interpretación de la medida de los diámetros de los halos e inhibición

<b>Antibiótico</b>	<b>Susceptible</b>	<b>Intermedi</b>	<b>Resistent</b>
		<b>O</b>	<b>E</b>
Penicilina	$\geq 25$	-	$\leq 24$
Ceftiofur	$\geq 29$	26 – 28	$\leq 25$

### 3.6.4 Análisis estadístico de los datos

Para la presente investigación, la base de datos se elaboró en el software informático Excel y analizó en el programa estadístico SPP versión 23. Luego los datos se analizaron utilizando la prueba estadística de Chi cuadrado ( $X^2$ ), para determinar la asociación entre los factores de virulencia y la sensibilidad con las cepas ( $\alpha = 0.05$ ).

## IV. Resultados

### 4.1 *Staphylococcus aureus* aislados de establos lecheros

De 75 vacas con mastitis se aislaron 300 cepas microbianas, de las cuales 191 fueron *Staphylococcus aureus* (63.7%) y 109 (36.33) cepas de *Staphylococcus* coagulasa negativa, *Streptococcus spp.*, *Bacillus spp.* y coliformes. Las cepas de *Staphylococcus aureus* en su mayoría se caracterizaron por formar colonias de fase S, productoras de hemolisinas en agar sangre y manitol positivo en agar Chapman manitol (figura 3).

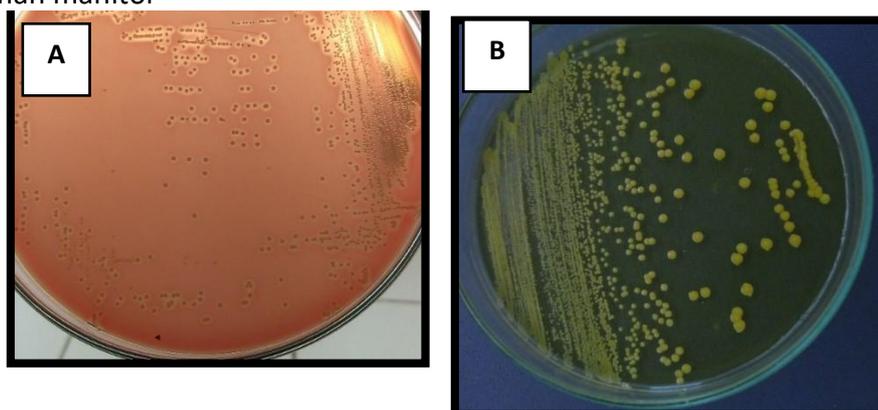
Tabla 2. *Staphylococcus aureus* aislado de mastitis bovina distrito de Chiclayo.

<i>S. aureus</i>	Número de cepas	%
<i>Diciembre 2022.</i>		
Positivo	191	63.67
Negativo	109	36.33
<b>Total</b>	<b>300</b>	<b>100.00</b>

### 4.2 Aislamiento e identificación de *S. aureus*

En el cultivo se observaron colonias pequeñas, pastosas y convexas, manitol positivo en el agar Chapman manitol, en el agar sangre se observaron zonas de hemólisis alrededor de las colonias (figura 3); Microscópicamente se observaron cocos dispuestos en racimos con característica tintoreal gram positivas; coagulasa y catalasa positivos.

Figura 3. *S. aureus* aislado de mastitis bovina. A. En agar sangre. B. En agar Chapman manitol



### 4.3 Factores de virulencia

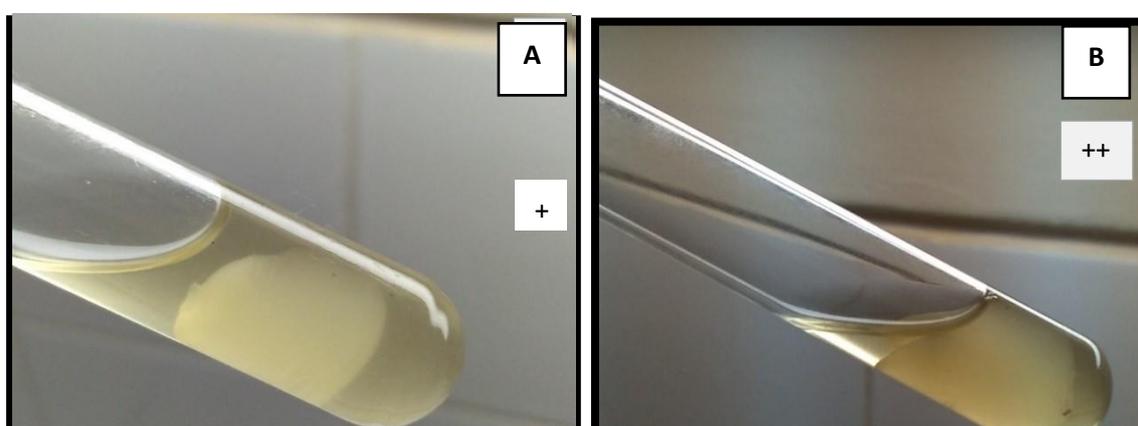
#### *Producción de coagulasa*

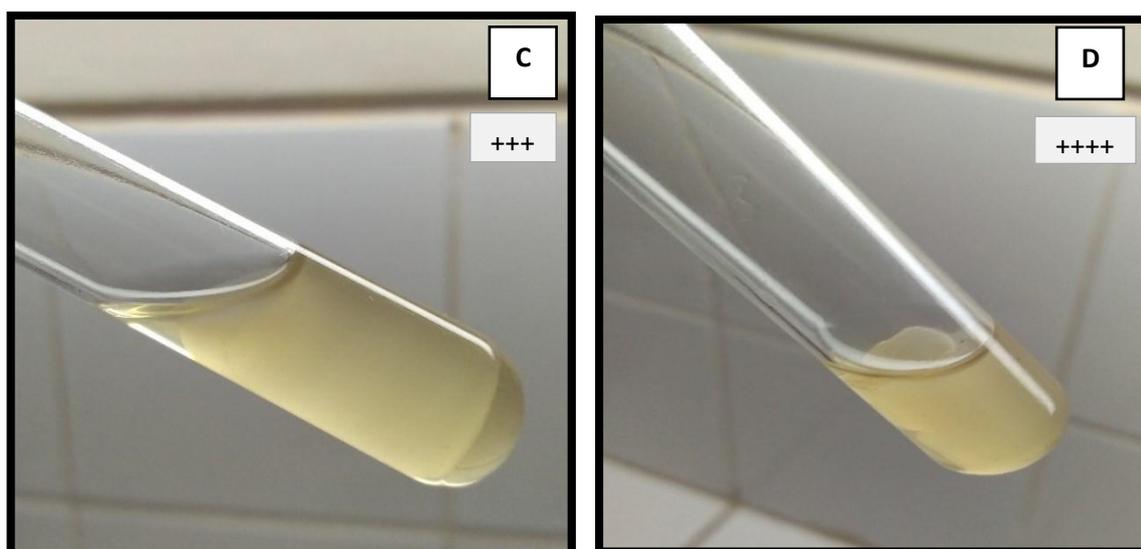
En la tabla 3 y Figs. 4 (A,B,C,D), en la prueba de coagulasa a la hora de lectura, el 15.7 % de cepas de *S.aureus* fueron positivas, el mayor porcentaje de positividad (27.74%) se observó a las 24 horas de incubación y el menor porcentaje (6.30%) a las 2 horas; según intensidad de la prueba en cruces, se mostró que el 43.99% de cepas fueron positivas con 4 cruces y el 10.99% con 1 cruz.

Tabla 3. Factores de virulencia. Producción de coagulasa en horas e intensidad por *S. aureus* aislados de Mastitis bovina, distrito de Chiclayo. Septiembre2022 – Diciembre 2022

Lectura en horas	Intensidad de la prueba de coagulasa en cruces								Total	
	+		++		+++		++++			
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
<b>1</b>	0	0.00	0	0.00	10	5.23	20	10.47	30	<b>15.7</b>
<b>2</b>	0	0.00	0	0.00	4	2.1	8	4.2	12	<b>6.30</b>
<b>3</b>	0	0.00	0	0.00	12	6.28	4	2.1	16	<b>8.38</b>
<b>4</b>	3	1.57	10	5.24	8	4.19	6	3.14	27	<b>14.14</b>
<b>5</b>	8	4.18	5	2.62	5	2.62	0	0.00	18	<b>9.42</b>
<b>6</b>	10	5.23	11	5.75	0	0.00	14	7.32	35	<b>18.32</b>
<b>24</b>	0	0.00	6	3.14	15	7.85	32	16.75	53	<b>27.74</b>
<b>Total</b>	<b>21</b>	<b>10.99</b>	<b>32</b>	<b>16.75</b>	<b>54</b>	<b>28.27</b>	<b>84</b>	<b>43.99</b>	<b>191</b>	<b>100.00</b>

Figura 4.A,B,C,D. Intensidad de la Prueba de coagulasa positiva en cruces de *S. aureus* aislados de mastitis bovina, distrito de Chiclayo. Septiembre 2022- Diciembre 2022





### *Producción de hemolisina $\alpha$*

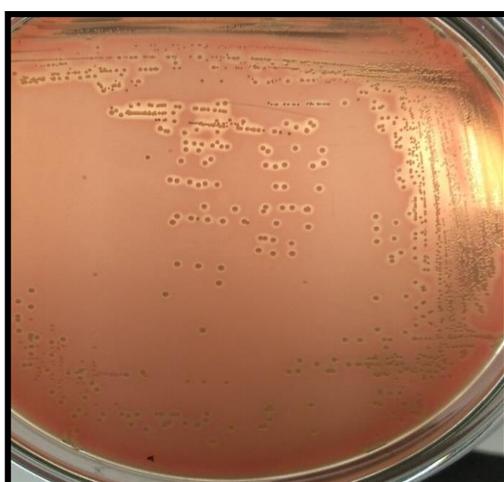
En la tabla 4. (Fig 5) De las 191 cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas, 177 produjeron hemolisina  $\alpha$ , de ellas el 48.02% con un diámetro de 3.5 – 6.0 mm , 9.6 % produjeron hemolisina  $\alpha$  con un diámetro mayor entre 9.6 – 10.4 mm.

Tabla 4. Producción de hemolisina  $\alpha$  (mm de diámetro) por *Staphylococcus aureus* aislados de Mastitis bovina, distrito de Chiclayo. Septiembre 2022 – Diciembre 2022

Diámetro	Hemolisina $\alpha$	
	N°	%
Mm		
3.5 – 6.0	85	48.02
6.1 – 8.6	40	22.60
8.7 – 9.5	35	19.78
9.6 – 10.4	17	9.6

<b>Total</b>	<b>177</b>	<b>100.00</b>
--------------	------------	---------------

Figura 5. Producción de hemolisina  $\alpha$  por *S. aureus* aislados de mastitis bovina, distrito de Chiclayo. Septiembre 2022-Diciembre 2022



### **Producción de hemolisina $\alpha \beta$**

En la tabla 5 (Fig 6), de las 191 cepas estudiadas 05 produjeron hemolisina  $\alpha \beta$ , de ellos el 60% con un diámetro de 10.8 – 11.5 mm.

Tabla 5. Producción de hemolisina  $\alpha \beta$  (mm de diámetro) por *S. aureus* aislados de Mastitis

bovina, distrito de Chiclayo. Septiembre 2022 – Diciembre 2022.

Diámetro	Hemolisina $\alpha$ $\beta$	
	N°	%
Mm		
10.8 – 11.5	03	60
12.2 – 13.1	02	40
<b>Total</b>	<b>05</b>	<b>100.00</b>

Figura 6. Producción de hemolisina  $\alpha$   $\beta$  por *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina, distrito de Chiclayo. Septiembre 2022 -Diciembre - 2022



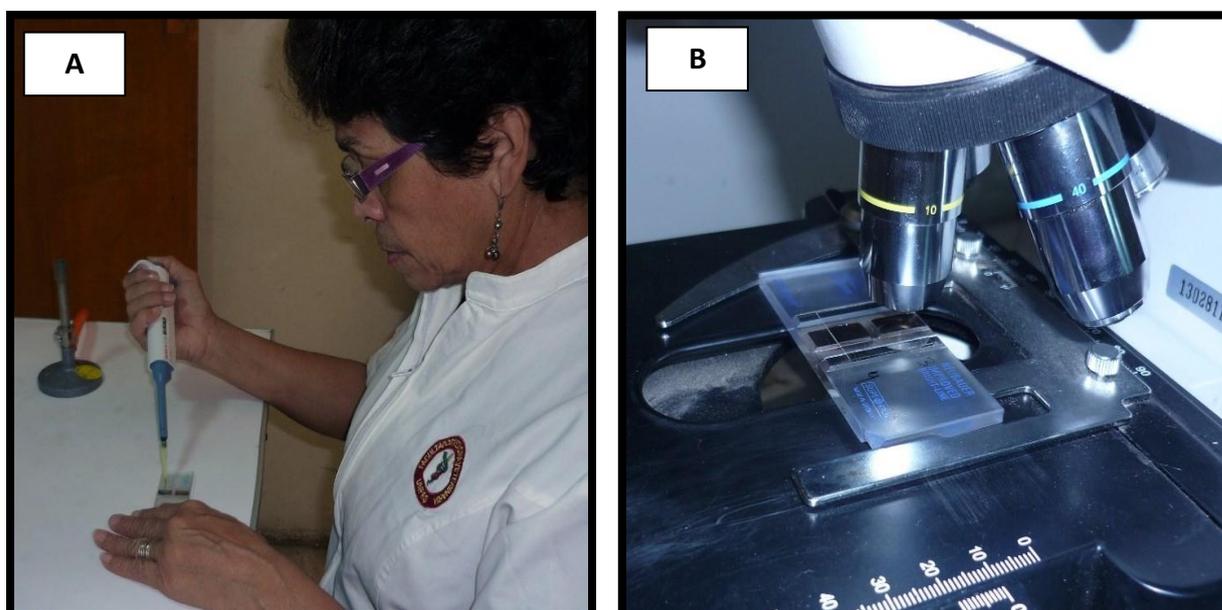
#### Producción de leucocidina

En la tabla 6 (Fig. 7 A, B) En la primera hora de lectura, 28.80% de cepas de *Staphylococcus aureus* produjeron leucocidina con actividad sobre 5,601 – 6,600 leucocitos/mm<sup>3</sup> de sangre y 19.89% produjeron leucocidina con actividad sobre 3,400 – 4600 leucocitos/ mm<sup>3</sup>

Tabla 6. Factores de virulencia. Producción de leucocidina por *Staphylococcus aureus* aislados de Mastitis bovina, distrito de Chiclayo. Septiembre 2022 – Diciembre 2022

Control	Rango de Leucocitos		muertos /mm <sup>3</sup>	
	1 hora	2 hrs	N	%
<b>7,200</b>	3,400 - 4,600	2,900 – 3,500	38	19.89
<b>7,600</b>	4,601 - 5,600	3,501 -4,500	57	29.84
<b>7,950</b>	5,601 - 6,600	4,501- 5,500	55	28,80
<b>8,650</b>	6,601 - 7,600	5,501 - 6,500	41	21.47
<b>Total</b>			<b>191</b>	<b>100.00</b>

Figura 7 A,B. Producción de Leucocidina por *S.aureus* aislados de mastitis bovina, distrito de Chiclayo. Septiembre 2022 – Diciembre 2022



### *Producción de fibrinolisisina*

En la tabla 7, de 145 cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas, 58 produjeron fibrinolisisina (40%) en mayor cantidad calificadas con 2 cruces respectivamente.

Tabla 7. Factores de virulencia. Producción de fibrinolisisina por *Staphylococcus aureus* aislados de Mastitis bovina, distrito de Chiclayo. Septiembre 2022 – Diciembre 2022.

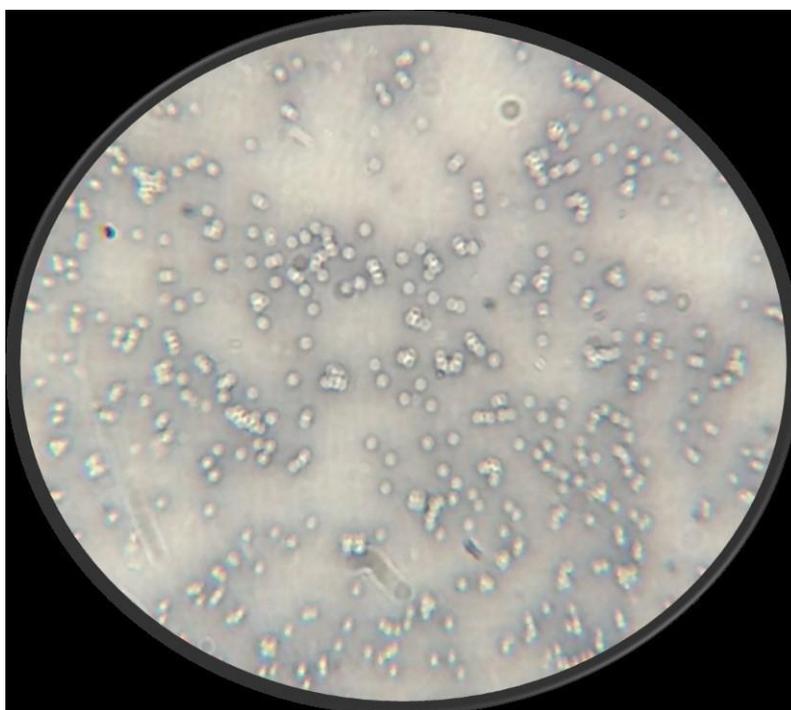
+	2+	3+	Total
---	----	----	-------

N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
49	33.80	58	40.00	38	26.20	<b>145</b>	<b>100</b>

### Producción de Cápsula

En la figura 8. Todas las cepas produjeron cápsula.

Figura 8. Producción de cápsula por *S.aureus* aislados de mastitis bovina, distrito de Chiclayo. Septiembre 2022 – Diciembre 2022



#### 4.4 Susceptibilidad antimicrobiana de *Staphylococcus aureus*

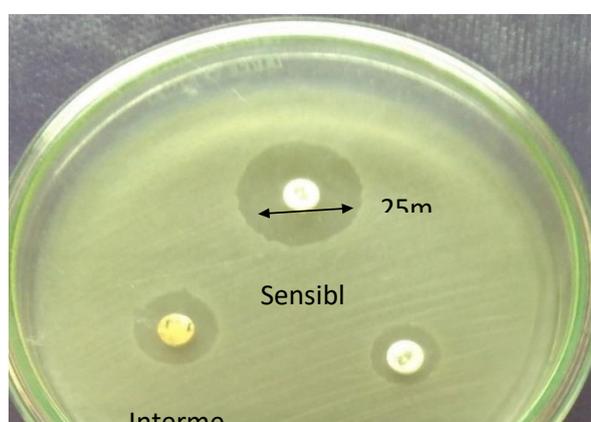
##### Susceptibilidad a penicilina y ceftiofur

En la tabla 8 (Figs 9 y 10), en relación a la susceptibilidad a penicilina, se halló que el 69,10% de cepas (132cepas) fueron sensibles, 8,90% (17cepas) intermedios y 21,98% (42 cepas) fueron resistentes. A ceftiofur 84,81% (162cepas) fueron sensibles, 3,14% (6 cepas)intermedios y 12,04% (23 cepas) fueron resistentes.

Tabla 8. Susceptibilidad a Penicilina y Ceftiofur de *Staphylococcus aureus* aislados de Mastitis bovina, distrito de Chiclayo. Septiembre 2022 – Diciembre 2022.

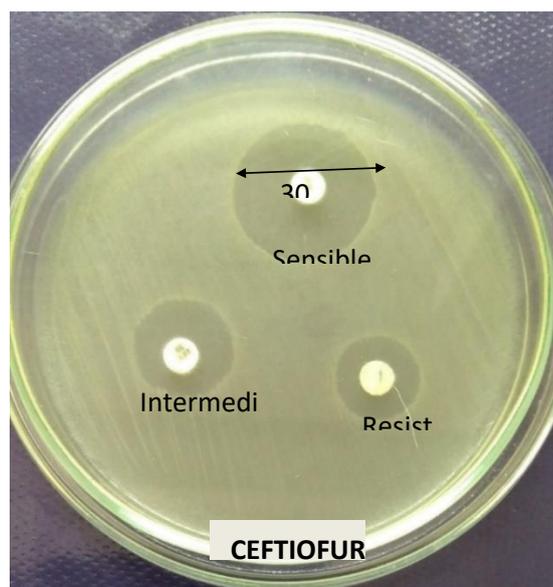
Antibiótico	Susceptibilidad antimicrobiana							
	Sensible		Intermedio		Resistente		Total	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
Penicilina	132	69,10	17	8,90	42	21,98	191	100
Ceftiofur	162	84,81	6	3,14	23	12,04	191	100

Figura 9. *S. aureus* sensible a penicilina aislados de mastitis bovina, distrito de Chiclayo. Septiembre 2022 – Diciembre 2022.



### PENICILINA

Figura 10. *S. aureus* sensible a penicilina aislados de mastitis bovina, distrito de Chiclayo. Septiembre 2022 – Diciembre 2022.



#### ***Factores de virulencia de Staphylococcus aureus sensibles a penicilina***

En la tabla 9, en relación a la susceptibilidad a penicilina y al número de factores

de virulencia de *S. aureus*, 76,19%, 16,67% y 7,14% de las cepas resistentes a penicilina produjeron seis, cinco y cuatro factores de virulencia respectivamente. La mayoría de cepas fueron sensibles a la penicilina (74,24%) productoras de seis factores de virulencia, pocas cepas resultaron con una respuesta intermedia a penicilina.

Tabla 9. Susceptibilidad a Penicilina y número de factores de virulencia de *S. aureus* aislada de Mastitis bovina. Distrito de Chiclayo. Septiembre 2022 – Diciembre 2022.

N° de Factores de Virulencia	Susceptibilidad a Penicilina						Total	
	Sensibles		Intermedios		Resistentes		N°	%
	N°	%	N°	%	N°	%		
6	98	74,24	15	88,24	32	76,19	<b>145</b>	<b>75,92</b>
5	28	21,21	02	11,76	7	16,67	<b>37</b>	<b>19,37</b>
4	06	4,55	-	-	3	7,14	<b>9</b>	<b>4,71</b>
Total	<b>132</b>	<b>100,00</b>	<b>17</b>	<b>100,00</b>	<b>42</b>	<b>100,00</b>	<b>191</b>	<b>100,00</b>

#### **Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* sensibles a ceftiofur**

En la tabla 10, referente a la susceptibilidad al ceftiofur, el 82,61%, y 17,39% de cepas de *S. aureus* resistente a ceftiofur fueron productoras de seis y cinco factores de virulencia respectivamente. La mayoría de las cepas que fueron sensibles a ceftiofur (74,69%) presentaron seis factores de virulencia.

Tabla 10. Factores de Virulencia de *Staphylococcus aureus* aislados de Mastitis bovina asociados a cepas resistentes a Ceftiofur. Distrito de Chiclayo. Septiembre 2022 - Diciembre 2022

N° de factores de virulencia	Susceptibilidad a Ceftiofur						Total	
	Sensibles		Intermedios		Resistentes		N°	%
	N°	%	N°	%	N°	%		
6	121	74,69	05	83,33	19	82,61	<b>145</b>	<b>75,92</b>

5	32	19,75	01	16,67	04	17,39	<b>37</b>	<b>19,37</b>
4	9	5,56	-	-	-	-	<b>9</b>	<b>4,71</b>
Total	<b>162</b>	<b>100,00</b>	<b>06</b>	<b>100,00</b>	<b>23</b>	<b>100,00</b>	<b>191</b>	<b>100,00</b>

## V. Discusión

*Staphylococcus aureus* es uno de los microorganismos de importancia médica que ocasiona una serie de cuadros patológicos, ha sido reconocido como uno de los agentes etiológicos responsable de la mastitis infecciosa bovina, se considera como causa común de infecciones intramamarias en vacas lecheras a nivel mundial, deteriorando la salud y bienestar del animal afectando la producción láctea, costos por asistencia médica, alto índice de descarte e inclusive algunos casos de muerte del animal Alvarado et al (1), Hamdan et al (5).. Dicha bacteria ha sido aislada en más del cincuenta por ciento de casos de mastitis bovina en el departamento de Lambayeque, constituyéndose en un importante agente de la enfermedad con mayor impacto económico en la producción pecuaria.

En los establos de explotación lechera, *Staphylococcus aureus* es un microorganismo muy difundido y contagioso presente en muestras de leche procedentes de cuartos mamarios de vacas con mastitis, lo que se refleja en el 63.67 % de casos hallados en la presente investigación; este resultado es similar a los reportados por Torres (15), Jimenez (27), Abebe (8) y Alvarado (35), esto es debido a la presentación de los principales factores predisponentes de mastitis en los diferentes establos estudiados como la deficiente higiene de las manos del ordeñador y equipo de ordeño mecánico durante la rutina de ordeño, asimismo a la no aplicación de medidas de prevención y control en la mayoría de los establos lecheros.

En este estudio los casos de mastitis en Lambayeque fueron superiores a los hallados por Rodriguez (41), Barrera (4), Camacho (36), Quispe (37), lo que se debe al tipo de mastitis implicada, así en el presente trabajo correspondieron a mastitis severa no así los casos estudiados por los autores mencionados que fueron de mastitis clínica y subclínica, así los

primeros son causados principalmente por *S. aureus* cuyos determinantes de patogenicidad y resistencia a los antimicrobianos de mayor uso en infecciones mastíticas tienen mayor opción de causar las infecciones, a diferencia de los casos de mastitis subclínicas que no sólo son causadas por *S. aureus* sino también por otros microorganismos como *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysagalactiae* y *E. coli*.

Por otro lado, la prevalencia en la presente investigación, es menor a la reportada por Reyes (16), probablemente se debe al tipo de crianza, siendo esta semitecnificada en comparación con la ejecutada por el autor en mención en la que los animales tenían una crianza menos tecnificada caracterizada por el menor seguimiento de medidas de control y prevención de la mastitis. glándula

La mastitis bovina es producida por cepas de *Staphylococcus aureus* que se diferencian por sus propiedades patogénicas las cuales se asocian con la producción de diferentes factores de virulencia, los que están involucrados en la adherencia, colonización e invasión de los tejidos, además de ello en la interferencia con los mecanismos defensivos del huésped; todo esto influye en la gravedad infecciosa de la glándula mamaria Camusone (56). Lo mencionado justifica la identificación en todas las cepas de *Staphylococcus aureus*, la producción de cápsula, coagulasa, catalasa y hialuronidasa, con excepción del primer factor, las enzimas participan en las fases iniciales de la infección por lo que son conocidas como factores de establecimiento en el huésped.

La catalasa es la enzima que protege a las bacterias fagocitadas del efecto oxidante de peróxido de hidrógeno al cual convierte en oxígeno y agua Galli (25), Romero, et al (33) Corrales (50), el compuesto mencionado es producido por los polimorfonucleares por tanto permite la supervivencia de *Staphylococcus aureus* en el huésped constituyéndose en uno de los factores que median la severidad del cuadro patológico, aun así es importante considerar que los polimorfonucleares de la leche son menos eficaces que los séricos por la interferencia de la caseína en el proceso, se compensa esta deficiencia con la participación de los otros

factores de virulencia.

La producción de coagulasa se encuentra con mayor frecuencia entre los patógenos más peligrosos de la piel y mucosas, la enzima es un activador del plasma, su acción es coagular el fibrinógeno hasta fibrina o coagulo de fibrina que cubre las bacterias y que forma parte de los abscesos que frecuentemente se forman en los casos de mastitis clínica, éstos a su vez protegen a la bacteria de la fagocitosis y de los antibióticos utilizados en su tratamiento Delgado et al (39). Particularmente, en los animales evaluados en la presente investigación, los casos clínicos de mastitis produjeron coagulasa en menos de seis horas, más del 50% de cepas de *Staphylococcus aureus* y se han caracterizado por la formación de abscesos en la glándula mamaria lo que limita e incluso anula la secreción láctea .

En el presente estudio todas las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de mastitis bovina presentaron cápsula, en relación con esta estructura, la mayoría de los casos correspondieron a mastitis severas manifestadas también por las características organolépticas no normales de la leche como olor muy desagradable, presencia de motas y en algunos casos con presencia de sangre; estas observaciones guardan relación con los estudios de Calderón y Rodríguez (55), Franco et al. (26) y Aponte (57) en los que se manifiesta que cuadros de mastitis clínica son producidos principalmente por *S. aureus* (productores de cápsula) y cuadros de mastitis subclínica son causados particularmente por *Staphylococcus spp.* coagulasa negativos (SCN).

La producción de hemolisina  $\alpha$  es una característica observada en casi todas las cepas de *Staphylococcus aureus* lo cual coincide con Vásquez (30), Delgado (39), Ote et al. (31); se justifican los hallazgos porque que dicha hemolisina es producida por la mayoría de *Staphylococcus aureus* aislados de casos de mastitis bovina investigados por los autores mencionados, asimismo es responsable de la gravedad de la mastitis tal y como se ha observado en la presente investigación. La hemolisina  $\alpha$  es una proteína tóxica para un amplio rango de células de mamíferos en especial los eritrocitos que al ser destruidos convierten el tejido del huésped en nutrientes para la bacteria; actúa sobre la membrana citoplasmática de la célula produciendo lisis, también lisa neutrófilos con liberación de enzimas lisosómicas que

le permiten sobrevivir en el huésped dañando el tejido, diseminándose y produciendo una serie de infecciones secundarias Prince et al. (58).

En cuanto a las hemolisinas  $\alpha\beta$  de las cepas de *Staphylococcus aureus*, no se encontró referencias que reporten esta característica, sin embargo en este estudio se aislaron cepas de  $\alpha\beta$  hemolítico colonias doradas de doble hemólisis con colonias de dorada indicando una mayor patogenicidad ya que fueron aislados de cuartos mamarios altamente afectados, esto ocurre ya que la toxina  $\beta$  de *Staphylococcus aureus*, es una exoproteína hemolítica que hidroliza la esfingomielina plasmática aumentando la permeabilidad de la superficie celular, estas características juegan un papel importante en la patogenia de la infección mamaria por *S. aureus* (59).

La leucocidina es una exotoxina producida por muchas cepas de *Staphylococcus aureus* que destruye los leucocitos y produce necrosis de los tejidos, actúa en la membrana externa de los leucocitos polimorfonucleares, monocitos y macrófagos, confiriéndole a la bacteria la capacidad de sobrevivir en el huésped, además se liberan mediadores de la inflamación que en el huésped provoca una respuesta inflamatoria severa en la glándula mamaria Hamdan et al. (5). En relación con la producción de leucocidina de las cepas aisladas se observa que a mayor tiempo de exposición de la bacteria en el huésped se produce mayor cantidad de leucocidina, justificándose en la segunda lectura por los porcentajes obtenidos por el efecto acumulado de la primera lectura, estos resultados se dan en procesos infecciosos severos causados por *Staphylococcus aureus* en la glándula mamaria de bovinos.

Todas las cepas de *Staphylococcus aureus* produjeron fibrinolisisina, enzima proteolítica llamada estafilocinasa, la cual aumenta el potencial invasivo de la bacteria al disolver los coágulos de fibrina que se forman a partir del plasminógeno presente en el plasma a fin de evitar la diseminación de la bacteria Vásquez (30). Este factor de virulencia fue secretado por el mayor porcentaje de cepas de *Staphylococcus aureus* estudiadas en el presente trabajo, coincidiendo con algunos autores que no consideran que sea un factor importante sin embargo en las cepas que la producen contribuye con el efecto patogénico de la bacteria actuando como

enzima lítica.

Por otro lado, la resistencia de los microorganismos frente a los antibióticos es uno de los problemas más importantes en medicina veterinaria y salud pública, siendo una herramienta de mucha importancia en contra de los microorganismos patógenos causantes de enfermedades infecciosas, sin embargo, las cepas resistentes en los últimos años han sido reportadas por diferentes autores Russi (59), Medeiros (60). A este problema debe adicionársele que algunos antibióticos son eliminados por la leche llegando de esa manera al consumidor con las posibilidades de provocar resistencia en los microorganismos.

Internacionalmente los antibióticos betalactámicos como cefalosporinas y tetraciclinas son utilizados en el tratamiento de mastitis clínica sin embargo el uso indiscriminado de los fármacos a través de los años han inducido a que los microorganismos patógenos hagan multiresistencia dando lugar a fracasos terapéuticos. En el presente trabajo, el 21.98% de cepas de *Staphylococcus aureus* fueron resistentes a penicilina, porcentaje menor al reportado Quispe (37), Kaczorek, et al (23), Srednik, et al (34), posiblemente la diferencia se deba a que las cepas de *Staphylococcus aureus* en el trabajo de investigación sean no productoras de betalactamasas y sólo en un bajo porcentaje en relación a los autores produzcan ésta enzima que hidroliza la molécula amida del anillo betalactámico inactivando al antibiótico interfiriendo con la síntesis del peptidoglicano.

Así mismo el porcentaje adquirido de 21.98 % de cepas de *Staphylococcus aureus* fueron resistentes a penicilina porcentaje similares reportado por Pellegrino et al. (44), lo cual, puede deberse a que en el presente estudio los establos donde fueron tomados las muestras de leche se orientan a mejorar su productividad con el uso racional de los antimicrobianos, entre ellos la penicilina, en la terapia de mastitis bovina.

El 84.81% de cepas de *Staphylococcus aureus* fueron sensibles a ceftiofur porcentaje que es similar al hallado por, Padilla (40), Neder et al. (32) probablemente por el tipo de

antibiótico, ceftiofur es un antibiótico betalactámico cefalosporínico de tercera generación de amplio espectro que actúa concentrándose en un 90% en el lugar infeccioso alcanzando un buen *nivel* terapéutico en pocos minutos Cieza (38).

## VI. Conclusiones

Los factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina del distrito de Chiclayo entre noviembre 2012 y agosto 2013 fueron, catalasa, coagulasa, leucocidina y cápsula en el 100% de las cepas, hemolisina  $\alpha$  (92.67%), fibrinolisina (75.92%) y hemolisina  $\alpha \beta$  (2,62%).

El 21.98% de cepas de *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina fueron resistentes a penicilina y el 69.10% fueron sensibles; frente a ceftiofur, el 12.04% de cepas resultaron ser resistentes y el 84.81%, sensibles.

## VI. Propuestas

La mastitis es un proceso patológico que ocasiona mayores pérdidas económicas en el ganado lechero, controlando ampliamente los problemas de reproducción e infertilidad, siendo el control de mastitis de mayor importancia en los últimos años. En el Perú consideran a la mastitis Bovina como una infección con etiología contagiosa y ambiental, considerando al *Staphylococcus aureus* el germen más importante en la mastitis infecciosa.

Se ha determinado en la presente investigación que el porcentaje de aislamiento de *Staphylococcus aureus* de casos de mastitis bovina es alto, los tratamientos que se realizan no son orientados por análisis microbiológico para aplicar fármacos específicos y así no crear resistencia en el microorganismo; esta situación constituye un riesgo para la explotación lechera, ya que sus reservorios son las glándulas mamarias y la leche de vacas infectadas.

Por todo lo afirmado se propone:

A los establos del distrito de Chiclayo:

Elaborar un manual de procedimiento de ordeño y medidas profilácticas para cumplir antes y después del ordeño.

Controlar semanalmente a los animales mediante pruebas de detección de mastitis subclínica, registrando la información del número de vacas, cuartos afectados, fecha, productos utilizados, tiempo de tratamiento. De presentarse casos positivos, enviar la muestra al laboratorio para el diagnóstico microbiológico y antibiograma para la aplicación del tratamiento específico.

Revisar frecuentemente el estado de la ubre, palpando en forma individual los pezones para detectar alguna lesión, eliminando las vacas con infecciones crónicas de mastitis que han sido tratadas por periodos largos y no han respondido a los tratamientos.

Realizar campañas de información con diferentes centros de producción referente a las consecuencias de un tratamiento indiscriminado de antibiótico.

Controlar el ingreso de vacas que ingresan al establo, revisando la información individual de mastitis, separando los animales hasta tener la información del laboratorio, así mismo mantener los ambientes de descanso limpios, utilizando los desinfectantes.

A la universidad:

Programar charlas a través de las facultades que involucren las ciencias de la salud, con temas relacionados a la implementación de medidas profilácticas en los diferentes establos lecheros de la ciudad de Chiclayo, con la finalidad de capacitar al personal encargado de las instalaciones.

Establecer, en coordinación con los establos lecheros, campañas de prevención y control acerca de los riesgos de las infecciones estafilocócicas para fortalecer la educación sanitaria en estos casos.

Al Laboratorio de Microbiología Veterinaria y afines

Realizar controles de susceptibilidad antimicrobiana a cepas de *Staphylococcus aureus* para conocer la variabilidad que puede ocurrir a través del tiempo.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alvarado C. W, González M. J, Quilcate P. C, Saucedo U. J, Bardales D. J. Factores de prevalencia de mastitis subclínica en vacas lecheras del distrito de Florida, Región Amazonas, Perú. *Rev investig vet Perú*. 5 de julio de 2019;30(2):923-31.
2. Chamba Infante DJ. Prevalencia de mastitis subclínica en vacas de la Asociación de Ganaderos de Pueblo Nuevo de Colán - Provincia de Paita – Piura - Perú 2018 [Internet] [Tesis para optar el título profesional de Médico Veterinario]. [Piura, Perú]: Universidad Nacional de Piura; 2019. Disponible en: <https://repositorio.unp.edu.pe/bitstream/handle/UNP/1802/ZOO-CHA-INF-2019.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
3. Gulmez Saglam A, Sahin M, Celik E, Celebi O, Akca D, Otlu S. The role of staphylococci in subclinical mastitis of cows and lytic phage isolation against to *Staphylococcus aureus*. *Vet World*. diciembre de 2017;10(12):1481-5.
4. Barrera JCH, Merchán MA, Sánchez DAB, Quiroga CFP. Agentes etiológicos de mastitis bovina en municipios con importante producción lechera del departamento de Boyacá. *Revista Investig Salud Univ Boyacá*. 15 de diciembre de 2015;2(2):162-76.
5. Hamdan-Partida A, González García S, Bustos-Martínez J. Identificación de *Staphylococcus aureus* utilizando como marcadores los genes *nucA* y *femB*. *Ciencias Clínicas*. julio de 2015;16(2):37-41.
6. Giono-Cerezo S, Santos-Preciado JI, Morfín-Otero MDR, Torres-López FJ, Alcántar-Curiel MD. Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzos por contenerla. *GMM*. 19 de febrero de 2020;156(2):3610.
7. Arrasco Rivareneyra JP. “Eficacia de la combinación de la Amoxicilina, Sulbactam y Prednisolona en el tratamiento de Mastitis subclínica grado III en Chiclayo” [Internet] [Tesis para optar el título profesional de Médico Veterinario]. [Lambayeque, Perú]: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo; 2018. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.12893/11206>
8. Abebe R, Hatiya H, Abera M, Megersa B, Asmare K. Bovine mastitis: prevalence, risk factors and isolation of *Staphylococcus aureus* in dairy herds at Hawassa milk shed, South Ethiopia. *BMC Vet Res*. diciembre de 2016;12(1):270.
9. Sánchez Bonilla MDP, Gutiérrez Murillo NP, Posada Almanza IJ. Prevalencia de mastitis bovina en el Cañón de Anaimé, región lechera de Colombia, incluyendo etiología y resistencia antimicrobiana. *Rev investig vet Perú*. 14 de marzo de 2018;29(1):226-39.
10. Tufa TB, Guta A, Tufa TB, Nigussie D, Beyi AF, Gutema FD, et al. Efficacy of Penicillin–Streptomycin Brands against *Staphylococcus aureus*: Concordance between Veterinary Clinicians’ Perception and the Realities. *Antibiotics*. 14 de marzo de 2023;12(3):570.
11. Cárdenas-Perea ME, Cruz y López OR, Gándara-Ramírez JL, Pérez- Hernández MA. Factores de virulencia bacteriana: la «inteligencia» de las bacterias. *Elementos*. 2014;94:35-43.

12. Seminario Expresión. Es la tercera cuenca lechera del país: En Lambayeque se producen más de 200,000 litros de leche fresca al día. Seminario Expresión [Internet]. 1036.<sup>a</sup> ed. 2017; Disponible en: <http://www.semanarioexpresion.com/Presentacion/noticia2.php?noticia=633&categoria=Regional&edicionbuscada=1036>
13. Vergara M, Delgado N, Montenegro Z. Mastitis. Perspectivas de una infección. Centro de Investigación Facultad de Medicina Veterinaria UNPRG. 2005;38 pp.
14. Vergara M, Delgado N, Montenegro Z. Mastitis bovina ambiental por coliformes. Departamento Lambayeque, 2008. Ciencia Tecnología Humanid Revista de Investigación Científica. 2010;1(2):39-50.
15. Torres Malca MH. Bacterias causantes y factores predisponentes de mastitis bovina en el establo lechero de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Lambayeque. [Tesis para optar el grado de Magister]. [Trujillo, Perú]: Universidad Nacional de Magister; 2010.
16. Reyes Peralta E. Prevalencia de mastitis subclínica mediante la prueba de California Mastitis test en vacas de crianza extensora del sector Gallito-Distrito San José [Internet] [Tesis para optar el título profesional de Médico Veterinario]. [Lambayeque, Perú]: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo; 2018. Disponible en: <https://repositorio.unprg.edu.pe/handle/20.500.12893/8020>
17. Martínez Oquendo A, Montes de Oca Rivero M, Alemañy Co JA, Marrero Silva IE, Reyna Reyes RD, Cedeño Morales R. Resistencia antimicrobiana del *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en el Hospital Dr. Gustavo Aldereguía Lima. Medisur. 2017;15(2):210-6.
18. Gómez-Gamboa L, Nuñez\_Chacín D, Perozo\_Mena A, Bermúdez\_González J. *Staphylococcus aureus* con resistencia múltiple a los antibióticos (MDR) en un Hospital de Maracaibo Venezuela. Ksmera. 2016;44(1):53-65.
19. Sánchez Lerma L, Pavas Escobar NC, Rojas Gulloso AR, Pérez Gutiérrez N. Infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina adquirido en la comunidad en pacientes de Villavicencio, Colombia. Revista Cubana de Medicina Tropical. 2016;68(1):40-50.
20. Elera R, Guerra M. Identificación de agentes etiológicos de mastitis en vacas lecheras del centro productivo de UNP. Veterinaria Lambayeque. 2007;5(18):6-8.
21. García Velasquez MI. Diagnóstico bacteriológico y prevalencia de Mastitis bovina del proyecto ganadero de la Municipalidad de Satipo [Internet] [Tesis para optar el Título de Ingeniero en Ciencias Agrarias - Especialidad: Zootecnia]. [Satipo]: Universidad Nacional del Centro del Perú; 2018. Disponible en: URI: <http://hdl.handle.net/20.500.12894/4954>
22. Wójcik-Bojek U, Różalska B, Sadowska B. *Staphylococcus aureus*—A Known Opponent against Host Defense Mechanisms and Vaccine Development—Do We Still Have a Chance to Win? IJMS. 16 de enero de 2022;23(2):948.
23. Kaczorek-Lukowska E, Małaczewska J, Sowińska P, Szymanska M, Agnieszka Wójcik E, Krzysztof Siwicki A. *Staphylococcus aureus* en casos subclínicos de mastitis en ganado lechero en Polonia, ¿qué esconden? Perfil de virulencia y resistencia a los antibióticos.

- PubMed [Internet]. 2022;11(12). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36558738/>
24. Seilie ES, Bubeck Wardenburg J. Staphylococcus aureus pore-forming toxins: The interface of pathogen and host complexity. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. diciembre de 2017;72:101-16.
  25. Galli L, Brusa V, Pellicer K. Staphylococcus aureus, *Microbiología Veterinaria*. Inter-Médica; 2019. 1178-1185 p.
  26. Franco G. JC, Gonzáles V. L, Gómez M. SC, Carrillo G. JM, Ramírez JJ. Análisis de los factores de virulencia de Staphylococcus aureus aisladas de mastitis bovina en México. *e-Gnosis*. 2008;6(7):1-9pp.
  27. Jiménez Velásquez SDC, Torres Higuera LD, Parra Arango JL, Rodríguez Bautista JL, García Castro FE, Patiño Burbano RE. Perfil de resistencia antimicrobiana en aislamientos de Staphylococcus spp. obtenidos de leche bovina en Colombia. *Revista Argentina de Microbiología*. abril de 2020;52(2):121-30.
  28. Huseby M, Shi K, Brown CK, Digre J, Mengistu F, Seo KS, et al. Structure and Biological Activities of Beta Toxin from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. diciembre de 2007;189(23):8719-26.
  29. Larsen HD, Aarestrup FM, Jensen NE. Geographical variation in the presence of genes encoding superantigenic exotoxins and  $\beta$ -hemolysin among Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis in Europe and USA. *Veterinary Microbiology*. febrero de 2002;85(1):61-7.
  30. Vásquez A. Factores de virulencia y susceptibilidad a oxacilina de Staphylococcus aureus aislado de centros de salud y de la comunidad [Tesis Doctoral]. Universidad Nacional de Trujillo; 2010.
  31. Ote I, Taminau B, Duprez JN, Dizier I, Mainil JG. Genotypic characterization by polymerase chain reaction of Staphylococcus aureus isolates associated with bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*. diciembre de 2011;153(3-4):285-92.
  32. Neder V, Araujo L, VR G, Calviño LF. Susceptibilidad antibiótica de Staphylococcus aureus aislado de mastitis bovina en tambos de la zona lechera central de Argentina. *REDVET* [Internet]. 2016;17(9). Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090916.HTM>
  33. Romero A. S, Castellano G. M, Ginestre P. M, Perozo M. A. Leucocidina de Pantón Valentine en cepas SAMR aisladas de pacientes del Hospital Universitario de Maracaibo. *Kasmera*. 2016;44(2):111-20.
  34. Srednik ME, Abate S, Gentilini ER. Susceptibilidad antibiótica de estafilococos aislados de muestras de leche provenientes de mastitis bovina. 2016;18(1):43-48 PP.
  35. Alvarado C. W, González M. J, Quilcate P. C, Saucedo U. J, Bardales D. J. Factores de prevalencia de mastitis subclínica en vacas lecheras del distrito de Florida, Región Amazonas, Perú. *Rev investig vet Perú*. 5 de julio de 2019;30(2):923-31.

36. Camacho Chimoy MDC. Prevalencia de mastitis subclínica mediante la prueba california mastitis test en ganado criollo lechero- distrito de Imaza. setiembre – diciembre 2017. [Internet] [Tesis para optar el grado de Médico Veterinario]. [Lambayeque, Perú]: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo; 2017. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.12893/3159>
37. Quispe R, Peña G, Andía V. Resistencia antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* aislados de leche de vacas con mastitis. *Rev vet.* 5 de noviembre de 2021;32(1):79.
38. Cieza J, Vásquez R. Efecto de la Amoxicilina y Ceftiofur en el Síndrome Mastitis Metritis Agalacteae (MMA) en cerdas en el Distrito de Pátapo- Provincia de Chiclayo- Departamento de Lambayeque-Perú 2016 [Tesis para optar el grado de Magister]. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo; 2016.
39. Delgado N, Montenegro Z, Vergara M. Relación entre la producción de toxinas locales y de coagulasa en *Staphylococcus aureus* productores de mastitis bovina. *Divulgación UNPRG.* 2003;
40. Padilla Barba JE. Evaluación de dos Métodos de Diagnóstico y Tres Tratamientos de la Mastitis Subclínica en Bovinos de la Estación Experimental Tunshi de la FCP [Internet] [Tesis de grado para optar el título de Ingeniero Zootecnista]. [Robamba, Ecuador]: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2012. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/1815>
41. Rodríguez Pérez R, Muñoz Ganoza E. Frecuencia y Susceptibilidad Antimicrobiana de Bacterias Causantes de Mastitis en Bovinos de un Establo de Trujillo, Perú. *Rev investig vet Perú.* 19 de diciembre de 2017;28(4):994-1001.
42. Pasachova Garzón J, Ramirez Martinez S, Munoz Molina L. *Staphylococcus aureus*: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular. *Nova.* 2019;17(32):25-38.
43. Fuentes Baute X. Resistencia a  $\beta$ -lactámico por *Staphylococcus aureus* [Internet] [Trabajo de grado]. [Tenerife, España]: Universidad de La Laguna; 2018. Disponible en: <http://riull.ull.es/xmlui/handle/915/9607>
44. Pellegrino M, Berardo N, Giraudo J, Nader Macías M, Bogni C. Prevención de la mastitis bovina: respuesta humoral y celular de vacas lecheras inoculadas con bacterias del ácido láctico en el período de secado". *Microbios Beneficiosos.* 2017;8(4):589-96.
45. Ruiz-García LF, Sandoval-Monzón RS. Diagnóstico de mastitis subclínica de vacunos lecheros mediante el conteo de células somáticas empleando dos métodos diagnósticos. *Revista Científica.* 2018;28(2):129-135 pp.
46. MINSA M de S. Guía de Inspección de Buenas Prácticas de Laboratorio para el Control de Calidad de Productos farmacéuticos [Internet]. Ministerio de Salud; 2019. Disponible en: [https://www.digemid.minsa.gob.pe/Archivos/Normatividad/2019/RM\\_779-2019-MINSA.pdf](https://www.digemid.minsa.gob.pe/Archivos/Normatividad/2019/RM_779-2019-MINSA.pdf)
47. Mapa de Lambayeque [Internet]. Blog de historia peruana. s.f. [citado 5 de octubre de

- 2023]. Disponible en: <https://diadelaindependenciadelperu.com/mapa-del-peru/mapa-de-lambayeque/>
48. Koneman E, Winn W, Allen S, Janda W, Procop G, Woods G, et al. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Sixth Edition. USA: Ed. Lippincott Williams & Wilkins.; 1535 PP.
  49. Delgado N, Vergara M. Toma de muestras para el análisis microbiológico. Guía de prácticas. Microbiología Veterinaria. Lambayeque, Perú: Facultad Medicina Veterinaria - UNPRG; 2006 p. 6 pp.
  50. Corrales Ramírez LC, Caycedo Lozano L, Quijano Duarte S. Catalisis, enzimas y pruebas rápidas. *nova*. 22 de diciembre de 2022;20(39):121-50.
  51. Sánchez-Neira Y, Angarita-Merchán M. Determinación de hemólisis en cepas de *Staphylococcus* spp causantes de mastitis bovina. *Revista Investig Salud Univ Boyacá*. 5 de enero de 2018;5(1):15-30.
  52. DIFCO. Medios de cultivo deshidratados y reactivos para Microbiología. 10ma ed. Difco laboratorios; 1984.
  53. Sacsquispe Contreras R, Velásquez Pomar J. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión [Internet]. Instituto Nacional de Salud; 2002. Disponible en: [https://antimicrobianos.ins.gob.pe/images/contenido/documentos/nacionales/manua\\_1\\_sensibilidad.pdf](https://antimicrobianos.ins.gob.pe/images/contenido/documentos/nacionales/manua_1_sensibilidad.pdf)
  54. Suárez-Del Aguila UJ, Iglesias\_Osores S, Moreno\_ Mantilla M. Susceptibilidad antibiótica de *Staphylococcus aureus* de aislados nasales en estudiantes del norte de Perú. *Gaceta Medica Bolivia*. 2020;43(1):49-55.
  55. Calderón A, Rodríguez V. Prevalencia de mastitis bovina y su etiología infecciosa en sistemas especializados en producción de leche en el altiplano cundiboyacense (Colombia). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 2008;21:582-9.
  56. Camussone CM, Calvinho LF. Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* asociados con infecciones mamarias en bovinos: relevancia y rol como agentes inmunógenos. *Revista Argentina de Microbiología*. 2013;45(2):119-30.
  57. Aponte F. Perfil de resistencia in vitro a antimicrobianos de cepas causantes de mastitis aisladas de leche cruda bovina en establecimientos de pequeña y mediana producción. *Ciencias Salud*. 2007;5(1):19-25.
  58. Prince LR, Graham KJ, Connolly J, Anwar S, Ridley R, Sabroe I, et al. *Staphylococcus aureus* Induces Eosinophil Cell Death Mediated by  $\alpha$ -hemolysin. *Horsburgh MJ*, editor. *PLoS ONE*. 15 de febrero de 2012;7(2):e31506.
  59. Russi NB, Bantar LF, Calvinho. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis in Argentine dairy herds. *Revista Argentina de Microbiología*. 2008;40:116-9.
  60. Medeiros ES, Mota RA, Santos MV, Freitas MFL, Pinheiro Júnior JW, Teles JAA. Perfil

de sensibilidade microbiana in vitro de linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de vacas com mastite subclínica. *Pesq Vet Bras.* julho de 2009;29(7):569-74.

## Apéndice

### 1. Obtención de muestra

$$n = \frac{Z^2(p \cdot q)}{e^2}$$

Donde:

Z = Unidad de desviación estándar cuyo valor al 95% de confianza es de 1.

p = Tasa de prevalencia asumida (0.51%)

q = Tasa de ausencia (0.49)

e = Error estimado (0.05)

N= Tamaño de la población

n = Tamaño de muestra

$$n = \frac{(1.96)^2(0.51)(0.49)}{(0.05)^2}$$

n= 384 muestras

## 2. Fórmula para el ajuste del tamaño de la muestra:

Conociéndose el tamaño de la población (N= 300 muestras) para calcular el tamaño de muestra se aplicó la siguiente fórmula:

$$n = n / (1 + n/N)$$

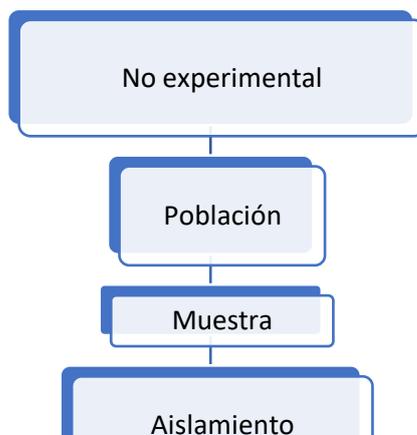
$$n = 384 / (1 + 384/300)$$

n= 168 muestras

Por lo tanto, en esta investigación se trabajó con 168 muestras.

## 3. Diseño de Contrastación

No experimental, de tipo solo después.







#### **4. Operacionalización de Variables**

<b>Variables</b>	<b>Definición conceptual</b>	<b>Dimensión</b>	<b>Indicadores</b>	<b>Instrumento</b>
<b>Variable independiente:</b> Penicilina y Ceftiofur	Betalactámicos y Cefalosporinas que actúan sobre la pared celular de la bacteria	Farmacológica	Disco de sensibilidad Concentraciones de penicilina y ceftiofur Medición en mm de halos de inhibición	Ficha de recolección de datos
<b>Variable dependiente:</b> Factores de virulencia	Hemolisina , coagulasa, cápsula, leucocidina, catalasa, fibrinolisisina, son los que determinan la virulencia	Microbiológica	Medición de halos en mm/grado de hemólisis, recuento de leucocitos, grado de lisis del coagulo de fibrina,formación de burbujas por catalasa,y producción de cápsula	

## 5. Instrumento de recolección de datos

“FACTORES DE VIRULENCIA Y SUSCEPTIBILIDAD A PENICILINA Y CEFTIOFUR EN *Staphylococcus aureus* AISLADO DE MASTITIS BOVINA, CHICLAYO- 2022”

### PARTE I: INFORMACIÓN GENERAL

ESTABLO 1		
N° VISITAS	N° VACAS	N° MUESTRAS

**PARTE II: INFORMACIÓN MICROBIOLÓGICA****PARTE III: FACTORES DE VIRULENCIA**

CEPAS	COAGULASA	HEMOLISINA	CATALASA	FIBRINOLISINA	LEUCOCIDINA
1					
2					
3					
4					
n...(191)					

CEPAS	MEDICIÓN DE HALOS (mm)	GRADO DE RESISTENCIA
1		
2		
3		
4		
n...(191)		



## Cons REPOSITORIO

## CONSTANCIA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Por medio de la presente el Médico Veterinario Julio Montenegro, propietario del establo de vacas de producción lechera "MONTENEGRO", autoriza a la M.V. Zully Montenegro Esquivel con DNI: 16545101, el ingreso a su empresa para hacer la toma de muestras de leche de vacas en producción con problemas de mastitis, que se utilizará en la ejecución del proyecto de investigación: **FACTORES DE VIRULENCIA Y SUSCEPTIBILIDAD A LA PENICILINA Y CEFTIOFUR EN *Staphylococcus aureus* AISLADOS DE MASTITIS BOVINA, CHICLAYO – 2022**, material que se procesará en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria -UNPRG. Los resultados que se obtengan beneficiará a la empresa para mejorar la producción de sus ejemplares y se registrará en el informe final del trabajo de investigación.

Se expide la constancia de consentimiento informado a solicitud de la interesada para los fines que estime conveniente.

  
M.V. Zully Montenegro Esquivel  
Investigador

  
Julio Montenegro Vásquez  
DNI. 16712054  
M.V. Julio Montenegro  
Propietario

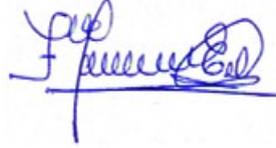
ASESORA

Margarita Hormecinda Torres Malca



AUTORA

Zully Genoveva Montenegro Esquivel



## CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE ORIGINALIDAD DE TESIS

Yo, **MARGARITA HORMECINDA TORRES MALCA**. Docente/Asesora de tesis/Revisor del trabajo de investigación de la estudiante **M.V. ZULLY GENOVEVA MONTENEGRO ESQUIVEL**, Titulada: “ **FACTORES DE VIRULENCIA Y SUSCEPTIBILIDAD A PENICILINA Y CEFTIOFUR EN *Staphylococcus aureus* AISLADO DE MASTITIS BOVINA - CHICLAYO 2022**, luego de la revisión exhaustiva del documento constato que la misma tiene un índice de similitud de 20% verificable en el reporte de similitud del programa Turnitin.

El suscrito analizó dicho reporte y concluyó que cada una de las coincidencias detectadas no constituyen plagio. A mi leal saber y entender la tesis cumple contodas las normas para uso de citas y referencias establecidas por la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

Lambayeque, 20 de octubre del 2023



**ASESORA**

**DRA. MARGARITA HORMECINDA TORRES MALCA**

DNI: 42420542



## Recibo digital

Este recibo confirma que su trabajo ha sido recibido por Turnitin. A continuación podrá ver la información del recibo con respecto a su entrega.

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega: Zully Montenegro Esquivel  
Título del ejercicio: TESIS  
Título de la entrega: " FACTORES DE VIRULENCIA Y SUSCEPTIBILIDAD A PENICILIN...  
Nombre del archivo: TESIS\_MAESTR\_A\_MICROBIOLOG\_A\_MONTENEGRO\_ESQUIVE...  
Tamaño del archivo: 1.92M  
Total páginas: 57  
Total de palabras: 13,819  
Total de caracteres: 78,840  
Fecha de entrega: 20-oct.-2023 01:33a. m. (UTC-0500)  
Identificador de la entre... 2201602934

 UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO  
ESCUELA DE POSTGRADO  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA 

"FACTORES DE VIRULENCIA Y SUSCEPTIBILIDAD A PENICILINA Y  
CEFTIOFUR EN *Staphylococcus aureus* AISLADO DE MASTITIS BOVINA,  
CHICLAYO-2022"

TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRA EN CIENCIAS  
CON MENCIÓN EN MICROBIOLOGÍA

INVESTIGADOR  
BACH. ZULLY GENÓVEVA MONTENEGRO ESQUIVEL

ASESORA:  
DRA. MARGARITA HORMECINDA TORRES MALCA

Lambayeque, 2023

Margarita Hormecinda Torres Malca

# FACTORES DE VIRULENCIA Y SUSCEPTIBILIDAD A PENICILINA Y CEFTIOFUR EN Staphylococcus aureus AISLADO DE MASTITIS BOVINA - CHICLAYO 2022."

## INFORME DE ORIGINALIDAD

20%

INDICE DE SIMILITUD

19%

FUENTES DE INTERNET

7%

PUBLICACIONES

5%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1	<a href="http://www.scielo.org.pe">www.scielo.org.pe</a> Fuente de Internet	2%
2	<a href="http://hdl.handle.net">hdl.handle.net</a> Fuente de Internet	1%
3	<a href="http://ri.uaemex.mx">ri.uaemex.mx</a> Fuente de Internet	1%
4	<a href="http://www.scielo.org.ar">www.scielo.org.ar</a> Fuente de Internet	1%
5	<a href="http://repositorio.unh.edu.pe">repositorio.unh.edu.pe</a> Fuente de Internet	1%
6	<a href="http://biblioteca.ucm.es">biblioteca.ucm.es</a> Fuente de Internet	1%
7	Submitted to Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo Trabajo del estudiante	1%
8	<a href="http://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443">bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443</a> Fuente de Internet	1%

  
Margarita Hormecinda Torres Malca

44

[cathi.uacj.mx](http://cathi.uacj.mx)

Fuente de Internet

< 1%

45

[repositorio.unapiquitos.edu.pe](http://repositorio.unapiquitos.edu.pe)

Fuente de Internet

< 1%

46

Submitted to Universidad San Ignacio de Loyola

Trabajo del estudiante

< 1%

47

[repositorio.unrc.edu.ar](http://repositorio.unrc.edu.ar)

Fuente de Internet

< 1%

48

[repositorio.unap.edu.pe](http://repositorio.unap.edu.pe)

Fuente de Internet

< 1%



Margarita Hormecinda Torres Malca

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias

< 15 words

Excluir bibliografía

Activo