



Universidad  
Nacional  
de Loja

# Universidad Nacional de Loja

Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables

Maestría en Sanidad Animal

## Aislamiento e identificación de bacterias causantes de mastitis bovina y evaluación de la actividad antimicrobiana de sangre de drago como opción terapéutica

Trabajo de Titulación, previo a la obtención del título de Magister en Sanidad animal

**AUTORA:**

Jhuliana Gabriela Arciniega Cuenca

**DIRECTORA:**

Bqf. Jessica Ilenia Valdivieso Tituana, MSc.

Loja – Ecuador

2023

## Certificación

Loja, 14 de agosto del 2022

Bqf. Jessica Ilenia Valdivieso Tituana, MSc.

**DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**

### CERTIFICO:

Que he revisado y orientado todo el proceso de elaboración del Trabajo de Titulación denominado: **Aislamiento e identificación de bacterias causantes de mastitis bovina y evaluación de la actividad antimicrobiana de sangre de drago como opción terapéutica**, previo a la obtención del título de **Magíster en Sanidad Animal**, de la autoría de la estudiante **Jhuliana Gabriela Arciniega Cuenca**, con **cédula de identidad Nro. 1106091653**, una vez que el trabajo cumple con todos los requisitos exigidos por la Universidad Nacional de Loja, para el efecto, autorizo la presentación del mismo para su respectiva sustentación y defensa.



Bqf. Jessica Ilenia Valdivieso Tituana, MSc.

**DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**

## **Autoría**

Yo, **Jhuliana Gabriela Arciniega Cuenca**, declaro ser autora del presente Trabajo de Titulación y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos, de posibles reclamos y acciones legales, por el contenido del mismo. Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja la publicación de mi Trabajo de Titulación, en el Repositorio Digital Institucional – Biblioteca Virtual.

**Firma:** 

**Cédula de identidad:** 1106091653

**Fecha:** 2 de enero del 2024

**Correo electrónico:** [jhuliana.arciniega@unl.edu.ec](mailto:jhuliana.arciniega@unl.edu.ec)

**Teléfono:** 0939991535

**Carta de autorización por parte de la autora, para consulta, reproducción parcial o total y/o publicación electrónica del texto completo del Trabajo de Titulación**

Yo, **Jhuliana Gabriela Arciniega Cuenca**, declaro ser autora del Trabajo de Titulación denominado: **Aislamiento e identificación de bacterias causantes de mastitis bovina y evaluación de la actividad antimicrobiana de sangre de drago como opción terapéutica**, como requisito para optar por el título de **Magíster en Sanidad Animal**, autorizo al sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que, con fines académicos, muestre la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido en el Repositorio Institucional.

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo en el Repositorio Institucional, en las redes de información del país y del exterior con las cuales tenga convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja, no se responsabiliza por el plagio o copia del Trabajo de Titulación que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, suscribo, en la ciudad de Loja, a los dos días del mes de enero del dos mil veinte y cuatro.

**Firma:** 

**Autora:** Jhuliana Gabriela Arciniega Cuenca

**Cédula:** 1106091653

**Dirección:** Balcón universitario

**Correo electrónico:** jhuliana.arciniega@unl.edu.ec

**Teléfono:** 0939991535

**DATOS COMPLEMENTARIOS:**

**Directora del Trabajo de Titulación:** Bqf. Jessica Ilenia Valdivieso Tituana, MSc

## **Dedicatoria**

Dedico este Trabajo primeramente a Dios y a la virgen del Cisne por darme sus bendiciones, por guiarme y darme la fortaleza para llegar a mi objetivo venciendo los obstáculos presentes en el trayecto del camino.

A mis padres Galo Arciniega y Carmen Cuenca por ser mi ejemplo, mi mayor inspiración, por ser el pilar fundamental de mi vida, por brindarme sus consejos y apoyo incondicional en cada momento.

A mis hermanos Rodrigo, Juan José y Luis Fernando por ser un ejemplo para mí y por darme su apoyo, sus consejos y por su paciencia. A mis sobrinos Josué, Jean Fernando, Matías, Emily y Liam, por llenar mis días de alegría.

A Jordy Alvarado por brindarme siempre su cariño y apoyo.

A mis 3 abuelitos que me cuidan desde el cielo y a mi abuelita Lelia Aguilar por siempre tenerme en sus oraciones.

*Jhuliana Gabriela Arciniega Cuenca*

## **Agradecimiento**

Mis gracias infinitas a Dios y la Virgen del Cisne, por iluminar siempre mi camino y permitirme cumplir una meta más al finalizar mi Maestría.

Mis más sinceros agradecimientos a mis padres Carmen Cuenca y Galo Arciniega por brindarme su amor, por su paciencia, por ser mi guía y estar conmigo en cada momento apoyándome e incentivándome a ser cada vez mejor en todo lo que hago.

Agradezco a mis hermanos Rodrigo, Juan José y Luis Fernando por su apoyo incondicional en todo lo que realizo.

Agradezco a la universidad Nacional de Loja por dar la oportunidad a profesionales de continuar los estudios de cuarto nivel.

De manera especial agradezco a mi directora de tesis la Bqf. Jessica Valdivieso Tituana, por su importantísimo apoyo y orientación de manera responsable en todo el desarrollo de esta investigación. Asimismo, agradezco al Dr. Roberto Bustillos por orientarme con la parte estadística de esta investigación.

También agradezco a la Dra Melania Uchuari por guiarme en la parte de laboratorio y agradezco a los dueños de las ganaderías que me permitieron tomar las muestras para llevar a cabo mi investigación.

*Jhuliana Gabriela Arciniega Cuenca*

## Índice de contenidos

Portada .....	i
Certificación.....	ii
Autoría .....	iii
Carta de autorización.....	iv
Dedicatoria .....	v
Agradecimiento.....	vi
Índice de contenidos.....	vii
Índice de tablas.....	ix
Índice de figuras.....	x
Índice de anexos.....	xi
<b>1. Título .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Resumen.....</b>	<b>2</b>
Abstract .....	3
<b>3. Introducción.....</b>	<b>4</b>
<b>4. Marco Teórico .....</b>	<b>6</b>
<b>4.1. Agentes Causales.....</b>	<b>6</b>
4.1.1. <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	7
4.1.2. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	7
4.1.3. <i>Escherichia coli</i> .....	8
<b>4.2. Métodos de Detección.....</b>	<b>8</b>
4.2.1. <i>California Mastitis Test (CMT)</i> .....	8
4.2.2. <i>Cultivo Bacteriano</i> .....	9
4.2.3. <i>Antibiograma</i> .....	9
<b>4.3. Tratamiento.....</b>	<b>10</b>
<b>4.4. Sangre de Drago (<i>Croton lechleri</i>) .....</b>	<b>11</b>
4.4.1. <i>Principios Activos</i> .....	11

4.4.2. <i>Actividad Antimicrobiana</i> .....	12
5. Metodología.....	13
5.1. Área de estudio.....	13
5.2. Procedimiento .....	13
5.2.1. <i>Enfoque metodológico</i> .....	13
5.2.2. <i>Diseño de la investigación</i> .....	14
5.2.3. <i>Tamaño muestral y tipo de muestreo</i> .....	14
5.2.4. <i>Técnicas</i> .....	14
5.2.5. <i>Variables de estudio</i> .....	16
5.2.6. <i>Procesamiento y análisis de la información</i> .....	17
6. Resultados.....	18
6.1. Aislamiento de bacterias asociadas mastitis.....	18
6.2. Evaluación de la Actividad Inhibitoria de Sangre de Drago .....	19
6.3. Evaluación Antimicrobiana de bacterias aisladas de vacas con mastitis .....	21
7. Discusión.....	24
8. Conclusiones.....	34
9. Recomendaciones .....	35
10. Bibliografía.....	36
11. Anexos. ....	43

## **Índice de tablas**

<b>Tabla 1.</b> Características de los animales que entraron en el estudio .....	<b>14</b>
<b>Tabla 2.</b> Interpretación de la Prueba CMT de Mastitis Bovina .....	<b>15</b>
<b>Tabla 3.</b> Agares selectivos para realizar cultivos puros .....	<b>15</b>
<b>Tabla 4.</b> Detección de mastitis bovina a través de la prueba CMT en leche bovina .....	<b>18</b>
<b>Tabla 5.</b> Crecimiento bacteriano en cultivo con muestras de leche positivas a CMT .....	<b>18</b>
<b>Tabla 6.</b> Bacterias aisladas en laboratorio mediante cultivo .....	<b>19</b>
<b>Tabla 7.</b> Efectividad de la sangre de drago en distintas concentraciones.....	<b>21</b>

## **Índice de figuras**

<b>Figura 1.</b> Localización de las ganaderías lecheras en estudio .....	<b>13</b>
<b>Figura 2.</b> Representación del mejor método con relación al halo de inhibición .....	<b>19</b>
<b>Figura 3.</b> Representación de la mejor concentración con relación al halo de inhibición .....	<b>20</b>
<b>Figura 4.</b> Representación de la mejor cantidad con relación al halo .....	<b>20</b>
<b>Figura 5.</b> Pruebas de susceptibilidad de bacterias Gram positivas en muestras de leche .....	<b>22</b>
<b>Figura 6.</b> Prueba de susceptibilidad de bacterias Gram negativas en muestras de leche .....	<b>23</b>

## **Índice de anexos**

<b>Anexo 1.</b> Resultados de la prueba California Mastitis Test .....	<b>43</b>
<b>Anexo 2.</b> Crecimiento bacteriano en medios de cultivo .....	<b>44</b>
<b>Anexo 3.</b> Efectividad de la sangre de drago de acuerdo al método .....	<b>45</b>
<b>Anexo 4.</b> Efectividad de la sangre de drago en relación a la cantidad de producto.....	<b>45</b>
<b>Anexo 5.</b> Antibiograma de bacterias Gram positivas.....	<b>46</b>
<b>Anexo 6.</b> Sensibilidad y resistencia de la cepa control (Staphylococcus aureus ATCC) .....	<b>46</b>
<b>Anexo 7.</b> Antibiograma de bacterias Gram negativos .....	<b>47</b>
<b>Anexo 8.</b> Fotografías del desarrollo de la investigación .....	<b>48</b>
<b>Anexo 9.</b> Certificado de traducción .....	<b>50</b>

## **1. Título**

Aislamiento e identificación de bacterias causantes de mastitis bovina y evaluación de la actividad antimicrobiana de sangre de drago como opción terapéutica.

## 2. Resumen

La mastitis bovina es un problema sanitario dentro de las ganaderías que se asocia a la presencia de bacterias y el uso inadecuado de antibióticos para su tratamiento puede causar resistencia antimicrobiana, generando pérdidas económicas en los productores, por tal razón se evaluó el potencial antimicrobiano de la sangre de drago (*Croton lechleri*) en bacterias causantes de mastitis bovina y la resistencia antibiótica a las mismas, en este estudio se utilizó un diseño observacional transversal y experimental completamente aleatorio para evaluar diferentes métodos, concentraciones y cantidades de sangre de drago. Las muestras positivas a CMT se cultivaron para el aislamiento e identificación bacteriana mediante el uso de kits comerciales, la susceptibilidad a antibióticos y la evaluación de la actividad antimicrobiana de la sangre de drago en diferentes concentraciones (50%, 75% y 100%) se la determinó mediante la técnica de Kirby-Bauer y agujero en agar. Para el análisis estadístico se trabajó con un ANOVA utilizando R (versión 4.3.1) como resultado se aisló 32 bacterias, siendo el 53,14 % de Gram positivos y el 46,88 % de Gram negativos, los Gram positivos presentaron una resistencia a la mayoría de antibióticos excepto cefuroxima y en los Gram negativos obtuvieron resistencia general, excepto en *E. coli* y *Morganella morganii* sensibles a cefuroxima y estreptomina respectivamente. Finalmente, *Croton lechleri* fue eficaz en todas las bacterias aisladas al emplearse 100 ul del producto al 100 %, mediante el método de agujero en agar por lo que presentó mayor inhibición de los antibióticos en las bacterias causantes de mastitis bovina, por lo que se consideraría como una posible opción terapéutica para el tratamiento de mastitis bovina.

**Palabras clave:** Mastitis bovina, CMT, *Croton lechleri*, Resistencia.

## **Abstract**

Bovine mastitis is a sanitary problem inside the cattle farms which is associated with the presence of bacteria and the misuse of antibiotics for therapies, it can cause microbial resistance that generates economic losses to the producers, for that reason, in bacteria that cause bovine mastitis, its antibiotic resistance and “sangre de drago” (*Crotón Lechleri*) antimicrobial potential was evaluated, in this analysis, a cross-sectional observational and experimental, completely random design was used to assess the distinct methods, concentrations and quantities of “sangre de drago”. The positive samples to CMT were cultivated for bacterial isolation and bacterial identification by using commercial kits, antibiotic susceptibility and the antimicrobial activity of “sangre de drago” in different concentrations (50 %, 75% y 100%) evaluation, was determined by means the Kirby-Bauer and agujero en agar techniques. For Statistical analysis we worked with an ANOVA by using R (version 4.3.1), as a result, 32 bacteria were isolated and the 53.14% of them were Gram, positive and the 46.88% Gram negatives; The positive Gram were resistant to most antibiotics except cefuroxime and in the negative Gram they got a general resistance, except in *E. coli* y *Morganella morganii* that were sensitive to cefuroxime and streptomycin respectively. Finally, *Croton lechleri* was effective in all the isolated bacteria when 100 ul of the product at 100 percent concentration was used by means the “agujero en agar” method, achieving greater inhibition of antibiotics on bacteria that causes bovine mastitis. As a result, it would be considered as a possible therapeutic option for bovine mastitis.

**Keywords:** Bovine mastitis, CMT, *Croton lechlery*, Resistance.

### 3. Introducción

La mastitis bovina es una inflamación de la ubre en vacas productoras de leche causada por distintos factores como: mal manejo de los animales en el trayecto de las actividades de ordeño, así como a la higiene de las instalaciones (Aguilar & Álvarez, 2019). Esta patología se considera un gran desafío sanitario a nivel global dentro de la explotación lechera de pequeña y mediana escala, provocando una disminución en la producción de leche y generando altas pérdidas económicas (Ashraf & Imran, 2020).

Para el tratamiento se utiliza distintos antibióticos (estreptomomicina, ampicilina, cloxacilina, penicilina y tetraciclina) los mismos que se administran mediante punción intramamaria, intramuscular o intravenosa Kovačević et al., (2021). Su uso indiscriminado crea un problema a futuro debido al rápido aumento de patógenos resistentes a los antibióticos (Yang *et al.*, 2019). Según la OMS (Organización mundial de la salud) la resistencia de los antibióticos es una preocupación mundial y es una amenaza principal de salud pública (OMS, 2021).

El mal uso de los antibióticos utilizados en el tratamiento de dicha patología es una preocupación industrial y de salud pública importante ya que afecta significativamente a la industria láctea en toda su integridad. Por lo que para evitar este problema se puede utilizar un tratamiento alternativo a base de plantas medicinales ya que han sido empleadas en la medicina durante varios milenios como el componente central de los enfoques médicos tradicionales, incluso la OMS presenta un programa de Medicina Tradicional (Gallardo & Barboza, 2015).

El extracto de sangre de drago puede ser una opción ya que desde tiempos antiguos se ha usado el látex de los árboles amazónicos del género *Croton lechleri* y en los tiempos más recientes ya se han demostrado sus propiedades medicinales (Gallardo & Barboza, 2015).

Esta planta en Latinoamérica actualmente se está empezando a usar para el tratamiento terapéutico de infecciones bacterianas con cepas multirresistentes, en estudios se ha evidenciado que posee propiedades antimicrobianas debido a la acción de sus metabolitos secundarios (terpenoides, flavonoides, leptinas, entre otros) pudiendo llegar a concentraciones adecuadas al sitio de acción y así tener buenos resultados (Montalva, 2019), así mismo hay un estudio en donde han probado su acción antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* con resultados satisfactorios a concentraciones de 50, 70 y 100% (Jherlits & Cisneros, 2018).

En base a estas evidencias y en busca de una solución, el objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana de sangre de drago y la resistencia contra bacterias aisladas de mastitis bovina de las ganaderías de producción de leche en el cantón Loja. Para ello se aisló e identificó

bacterias presentes en vacas con mastitis, se evaluó la actividad inhibitoria de sangre de drago y también se evaluó la resistencia antimicrobiana de estas bacterias.

## 4. Marco Teórico

La mastitis bovina se produce cuando se inflama la glándula mamaria a causa de un daño físico, irritación química o una infecciones en la misma (Ashraf & Imran, 2020), produce síntomas como dolor, incomodidad y estrés en las hembras bovinas y como consecuencia afecta la producción y la calidad físico-química de la leche alterando su sabor, su olor e incrementando la carga bacteriana (Aguilar & Álvarez, 2019).

Esta enfermedad es un problema a nivel mundial debido a que afecta a la salud del animal, así mismo es una de las enfermedades causantes de un fuerte impacto económico (Kher et al., 2018), porque afecta los ingresos de los agricultores como del sector lácteo afectando el bienestar animal, disminución en la producción y calidad de la leche (Sánchez et al., 2018). También por el descarte de leche post tratamiento, costo de servicio veterinario, y sacrificio prematuro de los animales (Kher et al., 2018). La mastitis se clasifica en clínica y subclínica:

**-Mastitis Clínica:** su característica principal es la presencia de manifestaciones clínicas como grumos en la leche, tamaño, textura y temperatura de la glándula mamaria, y con regularidad reacción sistémica. Esta a su vez puede ser: Sobreaguda: inflamación severa de uno de los cuartos mamarios con reacción sistémica intensa; Aguda: inflamación grave sin reacción sistémica; Subaguda: inflamación ligera con anormalidades constantes de la leche; Crónica: inflamación frecuente con poco cambio en la leche (Aguilar & Álvarez, 2019).

**-Mastitis Subclínica:** en este caso no se aprecia signos inflamatorios, se la diagnostica mediante pruebas de campo. Esta clase de mastitis subclínica es más común que la clínica y ocasiona pérdidas económicas mayores. A simple vista a la vaca se la observa saludable, no se observa ningún cambio anormal en la ubre ni en la leche. Pero al realizar pruebas se observa una elevación de los microorganismos y células blancas en la leche. Este tipo de mastitis tiene una alta probabilidad de contagio al resto de animales en el trayecto del ordeño. Cuando hay un resultado positivo a los cultivos microbiológicos de la leche se trata de una mastitis infecciosa pero si el resultado es negativo es una mastitis no infecciosa (Fierro et al., 2016).

### 4.1. Agentes Causales

La infección de la glándula mamaria es principalmente causada por bacterias como: *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Pseudomonas* spp. (Díaz et al., 2019), y también por microorganismos, aunque se encuentran en el medio ambiente y no se retienen en el pezón, dentro de estos son: *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli* y otros coliformes. Estos microorganismos penetran a la ubre de las vacas mediante el conducto del pezón, donde

establecen su presencia, se multiplican y producen toxinas, que causan daño a las células de las glándulas mamarias (Yang *et al.*, 2019)

#### **4.1.1. *Streptococcus agalactiae***

Estos están situados en los conductos galactóforos, de la glándula mamaria conduciéndola a una mastitis crónica y puede llegar a mastitis clínica. La vía principal de difusión de estas cepas es durante el proceso de ordeño ya sea mecánico o manual. Cuando realizan un ordeño manual y no hay una correcta higiene estas bacterias se transportan de una ubre infectada a una sana por medio de la persona que realiza el ordeño y en el caso de ordeño mecánico si el equipo de ordeño no está en condiciones adecuadas de higiene, se convierte en un medio de transmisión de bacterias de un animal a otro (Abril *et al.*, 2020).

La infección por *Streptococcus agalactiae* se la determina en ya sea en etapa subclínica o en etapa clínica. En el primer caso se evidencia de manera aguda ya que hay un daño del tejido mamario (Tong *et al.*, 2020).

Los *Streptococcus agalactiae* tienden a establecerse a nivel superficial de los epitelios glandulares, por ello los mecanismos de defensa actúan en esta área. Cuando han ingresado dentro de la glándula, se localizan en los conductos galactóforos y luego en la pared epitelial. Luego de que las bacterias se han asentado comienza a fermentar la lactosa generando ácido láctico lo cual provoca una reacción inflamatoria. Además, se puede apreciar fibrina, células epiteliales descamadas leucocitos y factores plasmáticos. Estos componentes, cuando se acumulan, pueden bloquear el paso de la leche y a su vez puede resultar en una disminución de la función de los alveolos y probablemente en el desarrollo de tejido cicatricial. (Díaz *et al.*, 2019).

#### **4.1.2. *Staphylococcus aureus***

Debido a su capacidad para proporcionar una amplia gama de factores de virulencia que contribuyen a la invasión bacteriana, *Staphylococcus aureus* todavía se considera uno de los agentes etiológicos más comunes y puede estar asociada con casos subclínicos, agudos, crónicos y tóxicos de infecciones intramamarias bovinas, lo que lleva a pérdidas económicas considerables. *Staphylococcus aureus* es considerado el microorganismo de mayor importancia relacionado con la mastitis. Las infecciones intramamarias causadas por este patógeno son difíciles de curar y son particularmente desafiantes, ya que son propensas a la cronicidad y al resurgimiento (Lopes *et al.*, 2020).

### **4.1.3. *Escherichia coli***

Estas Bacterias pertenecen a la familia enterobacteriaceae y forman parte de los coliformes, están localizadas en el tracto digestivo de los animales de sangre caliente. Constituye una de las principales causas de mastitis clínica en el ganado lechero, siendo responsables de más del 80% de los casos persistencia de esta enfermedad. Esta especie es ampliamente prevalente en explotaciones lecheras cuya característica principal es provocar infecciones de corta duración, pero con síntomas clínicos notables, como un elevado recuento de células somáticas. Posee una notable capacidad de reproducción en el organismo y la habilidad de dañar las estructuras celulares. La gravedad de esta enfermedad está influida por diversos factores, como el huésped, el entorno ambiental y el agente infeccioso en sí. (Ríos, 2020).

La mastitis bovina ocasionada por *Escherichia coli* puede variar en gravedad, desde una forma leve hasta una más severa. Hasta la actualidad, no se han identificado factores de virulencia específicos asociados a estas bacterias como causantes de la enfermedad. De hecho, se ha propuesto que la gravedad de la infección depende más de las características del ganado que de los propios microorganismos. Algunas evidencias sugieren que cualquier cepa de *Escherichia coli* podría ser responsable de las infecciones mamarias, aunque otras investigaciones han demostrado que no todas las variantes de *Escherichia coli* tienen la capacidad de inducir la mastitis en modelos animales. (Cruz et al., 2020).

## **4.2. Métodos de Detección**

En la mastitis subclínica, no se manifiestan síntomas evidentes, dando una impresión de que tanto la glándula mamaria como la leche son normales. Sin embargo, sí existe una infección leve en el interior. Por otro lado, en la mastitis clínica, se pueden notar cambios físicos notorios en la leche, como la presencia de pus, grumos, además de una sintomatología notoria. En este caso de la mastitis, se palpa la ubre para detectar alteraciones en la temperatura, dolor, y enrojecimiento en el cuarto afectado. (Oyola & Urrea, 2021).

### **4.2.1. *California Mastitis Test (CMT)***

Esta prueba es utilizada para identificar casos de mastitis al evaluar la cantidad de células leucocitarias y polimorfonucleares (Zuñiga Vivanco, 2023). Su capacidad de detección es alta, con una sensibilidad del 97% y una especificidad del 93%. En el proceso, se agrega detergente, específicamente alquil-lauril sulfonato de sodio, a la leche. Esto libera el ADN contenido en las células presentes en la leche, y cuando se combina con ciertos componentes

proteicos de la leche, se transforma en una gelatina. La formación de esta gelatina se correlaciona con el grado más alto de inflamación presente. El procedimiento implica tomar 2 ml de leche de cada pezón y colocarlos en los compartimentos individuales de la paleta CMT. Luego, se añaden 2 ml del reactivo CMT a cada muestra, se mezcla el reactivo y la leche durante 10 a 20 segundos con movimientos circulares, y se realiza la lectura basándose en la reacción de gelificación resultante (Camacho, 2018).

#### **4.2.2. Cultivo Bacteriano**

Es un punto clave en el diagnóstico de mastitis. Por lo general el agar sangre es el medio de cultivo que se utiliza de forma general para el primer aislamiento de bacterias ya que permite crecer la mayor parte de especies de los microorganismos. Para la identificación primeramente se realiza una caracterización morfológica de colonia y se observa la hemólisis que presente, después se realiza el cultivo en medios selectivos. Por ejemplo, el agar McConkey, es selectivo para que crezcan bacterias Gram-negativas. Ciertos géneros como *Escherichia coli*, que utilizan lactosa presentan colonias rosadas a rojizas, por otro lado, los géneros que no tienen la capacidad de usar lactosa presentan colonias de distinto color dependiendo de las condiciones de incubación. Para el crecimiento de especies de *Staphylococcus* se utiliza el medio diferencial sal manitol. *Staphylococcus aureus* produce colonias amarillas ya que usa el manitol en cambio *Staphylococcus epidermidis* genera colonias rosadas a rojizas porque no fermenta el manitol. El cultivo bacteriológico de Edward maneja una identificación bioquímica, entre ellas la evaluación de la respuesta en el medio triple azúcar-hierro (TSI), generación de gas, empleo de citrato, evaluación de la actividad enzimática de catalasa y coagulasa, y la prueba de movilidad (Aguilar & Álvarez, 2019).

#### **4.2.3. Antibiograma**

Esta prueba se la realiza con el fin de evaluar la susceptibilidad de ciertas bacterias responsables de infecciones frente a los distintos antibióticos (Águila, 2016).

Los criterios que se utilizan para la interpretación de esta prueba se basan en la definición de la International Organization for Standardization (ISO,2013).

- Sensible: cuando un microorganismo aislado se ve afectado de manera efectiva por una concentración de un agente antimicrobiano en pruebas de laboratorio, lo que sugiere una alta probabilidad de que el tratamiento resulte exitoso.

- Intermedio: se utiliza para describir la situación en la que un microorganismo aislado es influenciado in vitro por una concentración de un agente antimicrobiano, pero la relación con el efecto terapéutico es incierta
- Resistente: se aplica cuando un microorganismo aislado es inhibido in vitro por una concentración de un agente antimicrobiano, pero esto se asocia con una alta probabilidad de fracaso en el tratamiento terapéutico (Ballesteros & Valdiviezo, 2018).

### 4.3. Tratamiento

La prevención es la opción más factible e importante. Sin embargo, cuando hay presencia de mastitis es aconsejable manejar un tratamiento farmacológico enfocado a la causa bacteriana subyacente. Siempre con un previo análisis bacteriológico para conocer el comportamiento de las bacterias frente a los distintos grupos de antibióticos y seleccionar los más apropiados. El tratamiento y prescripción de los medicamentos adecuados debe ser realizado por los veterinarios que atiendan cada establo (Aguilar & Álvarez, 2019).

Para llevar a cabo un protocolo de tratamiento efectivo es fundamental considerar ciertos factores tales como el estado reproductivo de la vaca, la edad, el nivel de producción, el registro detallado de la presentación del caso clínico y los resultados de las pruebas bacteriológicas para identificar los agentes infecciosos involucrados. En lo que respecta a la terapia con antibióticos para tratar la mastitis, los medicamentos más comúnmente empleados son aquellos pertenecientes al grupo de los betalactámicos, dentro de los cuales se incluyen las cefalosporinas, macrólidos, tetraciclinas, sulfonamidas y aminoglucósidos. (Oyola & Urrea, 2021).

En un estudio realizado por Saavedra et al., (2022) observaron resultados de la eficacia de varios antibióticos como la penicilina, fosfomicina, ampicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, cefalotina y cefalozina que presentaron una mayor efectividad contra las bacterias responsables de la mastitis bovina. Les siguieron en efectividad la eritromicina, gentamicina, tetraciclina, y sulfametoxazol/trimetoprim. En otro estudio que se centró en los patógenos más comunes asociados a la mastitis, como *Streptococcus* spp., *Escherichia coli*, *Cronobacter sakazakii*, *Klebsiella oxitoca*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulasa negativa*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus* spp. y *Streptococcus uberis*, determinaron que todos estos patógenos eran resistentes tanto a la penicilina como a la cloxacilina, excepto el *Streptococcus* spp., para el cual la estreptomina resultó ser efectiva (Kovačević et al., 2021).

Los resultados obtenidos en un estudio a través del antibiograma indican que *Streptococcus agalactiae* demostró resistencia frente a la penicilina, cefalexina y sulfatrimetoprima, por otro lado, mostró una sensibilidad del 100% tanto a la tetraciclina como a la amoxicilina combinada con ácido clavulánico. *Staphylococcus aureus* se reveló resistente a la penicilina y a la amoxicilina con ácido clavulánico, pero presentó una sensibilidad del 100% a la cefalexina, tetraciclina y sulfatrimetoprima (Quispe *et al.*, 2021).

En otro estudio que evaluó la susceptibilidad antimicrobiana utilizando discos de ampicilina, clindamicina, doxiciclina, eritromicina, estreptomina, gentamicina, oxacilina y rifampicina, se informó que *Pseudomonas aeruginosa* mostró resistencia a la mayoría de los antibióticos, a excepción de la eritromicina, para la cual mostró una susceptibilidad intermedia. *Escherichia coli* exhibió susceptibilidad intermedia a la eritromicina y resistencia a la oxacilina y rifampicina. En cuanto a *Staphylococcus aureus*, se detectó susceptibilidad intermedia a la clindamicina y eritromicina, mientras que se evidenció resistencia a la ampicilina. (Rodríguez & Muñoz, 2017).

#### **4.4. Sangre de Drago (*Croton lechleri*)**

De acuerdo a lo señalado por Iglesias, (2019) la sangre de drago es una resina o látex de tonalidad rojiza que se extrae de diversas especies de árboles conocidos científicamente como *Croton lechleri*. El látex de sangre de drago se produce naturalmente y se almacena en estructuras anatómicas específicas, como conductos laticíferos o resinosos, y cumple la función de proteger al árbol. Este recurso se encuentra en regiones tropicales y subtropicales, desde el sur de México hasta América del Sur, y es propio de países como Bolivia, Colombia, Ecuador, Perú y Brasil. En el caso de Ecuador, se localiza en la región amazónica. Cabe mencionar que la terminología utilizada para referirse a la sangre de drago es diversa y varía según la región geográfica y los grupos étnicos; algunos de los nombres populares incluyen palo de grado, sangre de palo, huampo, topa roja, sangre del árbol, sangrado y palo sangriento, entre otros, dependiendo del lugar (Ramírez, 2019).

##### **4.4.1. Principios Activos**

En el látex, se encuentran diversos componentes activos que pertenecen a diferentes categorías de metabolitos secundarios, como fenoles, terpenoides, alcaloides, leptinas y polipéptidos. Entre estos componentes, se destacan la taspina, que desempeña un papel importante en el proceso de cicatrización de heridas y también muestra propiedades antiinflamatorias. Asimismo, se encuentra la proantocianidina SP-303, que exhibe actividad

antiviral, ciertos compuestos fenólicos como el ácido clorequínico y las coberinas A y B, cuyas funciones desempeñadas son antisépticas y antimicrobianas (Gallardo & Barboza, 2015).

#### **4.4.2. Actividad Antimicrobiana**

Se ha verificado que la Sangre de Drago muestra efectos antimicrobianos contra bacterias como *Staphylococcus aureus*, *MRSA*, *Escherichia coli* y *E. fecalis* (Silva et al., 2022 & García et al., 2019). Además cuando se encuentra en concentraciones elevadas, también tiene la capacidad de inhibir el crecimiento del *Helicobacter pylori* (Tamariz et al., 2003).

## 5. Metodología

### 5.1. Área de estudio

El presente estudio se llevó a cabo en dos ganaderías bovinas productoras de leche (Sector Capulí y Paraíso), en donde se recolectaron muestras de leche de 80 vacas (Tabla 1). Los análisis de laboratorio se realizaron en el laboratorio de microbiología animal del Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja. Estas ganaderías y laboratorio están ubicados en el cantón Loja provincia de Loja, cuyas características son: longitud de - 79.2042200, latitud de - 3.9931300, altitud de 2060 metros sobre el nivel del mar, una temperatura que fluctúa entre 16 °C a 18 °C, Precipitación promedio de 700 mm y un promedio de humedad relativa del 70 %.

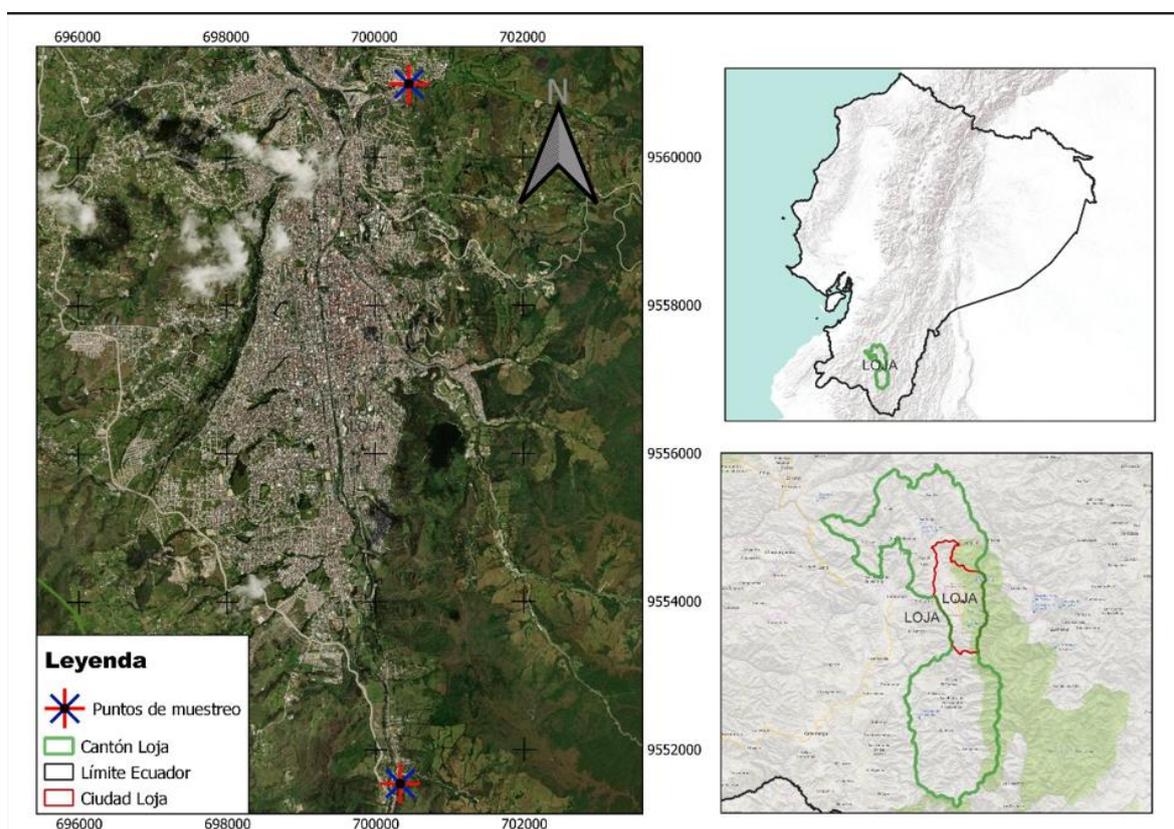


Figura 1. Localización de las ganaderías lecheras en estudio

### 5.2. Procedimiento

#### 5.2.1. Enfoque metodológico

Se trabajó con un enfoque cuantitativo porque se llevó a cabo una serie de procesos de manera ordenada para recolectar datos que nos permitieron llegar a medir numéricamente las

variables con el fin de probar la efectividad de la sangre de drago frente a bacterias causantes de mastitis bovina mediante un análisis estadístico (Hernández *et al.*, 2016) .

### 5.2.2. *Diseño de la investigación*

Para el primer objetivo se realizó un estudio observacional transversal en el que se tomaron muestras de leche para identificar la presencia de mastitis bovina.

Para el segundo objetivo se trabajó con un diseño experimental completamente aleatorio con tres tratamientos (concentraciones al 50 %, 75 % y 100 % de sangre de drago), 2 métodos (discos en blanco y agujero en agar) y 2 cantidades de cada concentración (50  $\mu$ l y 100  $\mu$ l), se realizaron tres repeticiones por cada concentración, método y cantidad.

### 5.2.3. *Tamaño muestral y tipo de muestreo*

Para el primer objetivo se utilizaron 80 animales de 2 fincas productoras de leche, se hizo un muestreo no probabilístico por conveniencia, el tamaño de la muestra se determinó en base a información bibliográfica sobre estudios similares (Hayashi *et al.*, 2023 & Kovačević *et al.*, 2021). Los animales a los que se les realizó la prueba de campo CMT cumplieron ciertas características (Tabla 1). Para el segundo y tercer objetivo se trabajó con 32 aislados positivos.

**Tabla 1.** *Características de los animales que entraron en el estudio*

<b>Condiciones</b>	<b>Animal</b>
Edad	Hasta 7 años
Fase de lactancia	Segunda fase
Tratamiento antibiótico	Sin recibir 2 meses antes del muestreo
Mastitis bovina	Por lo menos en uno de sus cuartos

### 5.2.4. *Técnicas*

**5.2.4.1. Prueba de Campo California Mastitis Test (CMT).** Esta prueba se realizó para detectar mastitis bovina en campo, previamente se limpió y desinfectó la ubre y pezones, luego se colocó en cada uno de los pocillos de la paleta CMT aproximadamente 2 ml de leche de cada cuarto de la glándula mamaria y 2 ml del reactivo CMT. Se homogenizó con movimientos circulares durante 20 segundos y por último se realizó la interpretación (Tabla 2). Se tomó en cuenta como un animal positivo a aquel que presento en uno o más cuartos una reacción desde trazas hasta tres cruces.

**Tabla 2.** Interpretación de la Prueba CMT de Mastitis Bovina

Aspecto de la combinación	Puntaje CMT	Número de células somáticas
Mezcla del líquido, sin formación de sedimentos.	Negativo	0 – 200 000
Poco sedimento, al mover la paleta desaparece.	Trazas	200 000 – 400 000
Sedimento claramente visible, sin formación de gel.	+	400 000 – 1 200 000
Presencia de gel claramente visible, grumoso.	++	1 200 000 – 5 000 000
Gel adherido a la paleta, pico central bien marcado.	+++	> 5 000 000

*Fuente:* (Mellenberger, 2004)

**5.2.4.2. Toma y Recolección de Muestras Para el Análisis de Laboratorio.** A aquellas vacas positivas para mastitis bovina con la prueba CMT se les tomó una muestra de leche de 10 ml en un recipiente estéril, las cuales fueron transportadas a laboratorio en un cooler antes de las 24 horas para realizar el cultivo bacteriano, siguiendo la normativa de recolección y transporte de muestras (Agrocalidad, 2020).

**5.2.4.3. Cultivo Bacteriano.** Se realizó el cultivo de las 32 vacas positivas a mastitis bovina mediante la prueba de campo CMT. Para ello se tomó una muestra del inóculo (9 ml de caldo tripticasa soya + 1 ml de muestra de leche incubado a 37° C por 2 horas) y se procedió a sembrar mediante la técnica de estriado por agotamiento, en los medios selectivos (agar MacConkey para gramnegativos, sal manitol para grampositivos) y medios generales (agar sangre, y agar nutritivo), luego se incubó por 24 horas.

Finalmente se caracterizó morfológicamente en base al crecimiento de las colonias en los medios de cultivo selectivos y aislar en cultivos puros (tabla 3), para su confirmación.

**Tabla 3.** Agares selectivos para realizar cultivos puros

Cultivos puros	
Bacterias	Agares
	Sangre
Gram positivos	Manitol salado
	Baird Parker
Gram negativos	MacConkey
	EMB

#### 5.2.4.4. Pruebas Confirmatorias e Identificación Bacteriana

**5.2.4.4.1. Gram positivos.** - Se realizó una tinción Gram para confirmar Gram positivos y para diferenciar *Staphylococcus aureus* de *Staphylococcus coagulasa negativa* se

realizó la prueba de coagulasa y para confirmar *Staphylococcus aureus* se realizó la prueba de catalasa y oxidasa. En el caso de *Streptococcus agalactiae* se identificó mediante el test Streptex rapid Latex Agglutination, guiándonos en el manual respectivo.

**5.2.4.4.2. Gram negativos.** - Se realizó una tinción Gram para confirmar Gram negativos, se hizo pruebas bioquímicas y se identificó el tipo de bacteria con el test de RapiD One System (Se fundamentan en la descomposición microbiana de sustratos particulares que son identificados mediante diversos sistemas de señalización) con la guía de su respectivo manual.

**5.2.4.5. Susceptibilidad Antibiótica.** - Se determinó por medio de un antibiograma utilizando agar Müller Hilton con la técnica de difusión en disco de Kirby-Bauer (Jherlits & Cisneros, 2018).

De acuerdo a la información aportada por los ganaderos con respecto al uso de antibióticos para el tratamiento de mastitis bovina se analizó la sensibilidad y resistencia de los distintos aislados de bacterias encontradas en este estudio utilizando discos de antibióticos de Penicilillin G (P) 10 units, Amoxycilin (AML) 10 µg, Gentamicin (CN) 30 µg, Streptomycin (S) 10 µg, cefuroxime sodium (CXM) 30 µg, (OXOID).

Se realizó el ajuste del inóculo al 0.5 en la escala de McFarland y se sembró el microorganismo, se procedió a colocar los discos de antibióticos, y se incubó a 37 °C en condiciones aeróbicas por 24 horas. Transcurrido este tiempo se procedió a la lectura de acuerdo a los mm de diámetro de inhibición de cada antibiótico y clasificándolos como susceptibles o resistentes, según lo establecido por el EUCAST y CLSI (CLSI, 2023).

**5.2.4.6. Ensayo con *Croton lechleri* (Sangre de Drago).**- Para analizar la actividad antimicrobiana de *Croton lechleri*, se evaluó tres concentraciones del compuesto (50 %, 75 % y 100 %), por dos métodos (impregnando discos en blanco y por el método de agujero en agar) y dos cantidades (50 µl y 100 µl de cada concentración) basándonos en la metodología de Huapaya et al., (2003), esto se hizo con cada una de las bacterias aisladas por triplicado, además se colocó un control negativo. Las placas se incubaron a 37 °C por 24 horas y la interpretación se la realizó de acuerdo a los mm de diámetro del halo de inhibición.

### 5.2.5. Variables de estudio

**Variable dependiente:** Halo de inhibición en mm. Se utilizó una regla para medir toda la zona clara que se formó alrededor del disco.

**Variables independientes:** Concentraciones de sangre de drago (50 %, 75 % y 100 %), tipo de método (impregnación de discos y agujero en agar) y cantidad de cada concentración (50  $\mu$ l y 100  $\mu$ l).

#### **5.2.6. *Procesamiento y análisis de la información***

Se utilizó estadística descriptiva a través de tablas de frecuencias absolutas y relativas. También se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) para comparar los tratamientos, cuando hubo diferencia estadística se emplearon pruebas a posteriori Tukey al 95 %. Para todos los análisis se consideró un nivel de significancia del 5 % y se empleó el programa estadístico R versión 4.3.1.

## 6. Resultados

De las 80 vacas a las que se les realizó la prueba de CMT, el 28,12 % dieron positivos con tres cruces, el 56,25 % con dos cruces seguido del 15,62 % con una cruz, obteniendo un resultado total de 32 animales positivos (Tabla 4).

**Tabla 4.** Detección de mastitis bovina a través de la prueba CMT en leche bovina

Positivas a CMT	N	%
1 +	5	15,62
2 ++	18	56,25
3 +++	9	28,12
<b>Total</b>	<b>32</b>	<b>100,00</b>

### 6.1. Aislamiento de bacterias asociadas mastitis

A los 32 animales se les realizó un cultivo bacteriano, obteniendo un 84,38 % obteniendo un crecimiento de más de la tercera parte (84,38 %) (Tabla 5).

**Tabla 5.** Crecimiento bacteriano en cultivo con muestras de leche positivas a CMT

Crecimiento bacteriano	N	%
No	5	15,62
Si	27	84,38
<b>Total</b>	<b>32</b>	<b>100,00</b>

De las 27 muestras analizadas con crecimiento positivo se logró aislar 32 cepas bacterianas, de las cuales cinco individuos se obtuvo el crecimiento de dos cepas diferentes (Anexo 1).

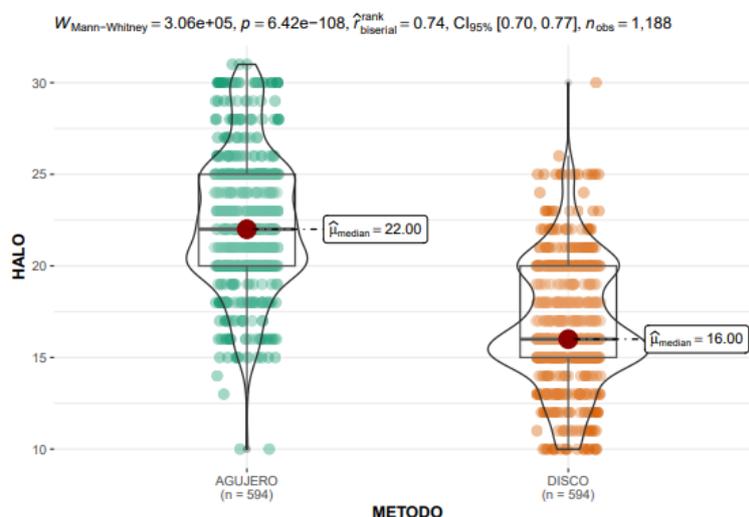
En base a los aislamientos se obtuvo un 53,14 % de bacterias Gram positivas y un 46,88 % de bacterias Gram negativas. Se identificó 3 géneros de organismos Gram positivos, distribuidos en un 28,13 % de *Staphylococcus aureus*, 15,63 % de *Staphylococcus coagulasa negativa* y el 9,38 % de *Streptococcus agalactiae*. Para microorganismos Gram negativos se logró identificar 5 géneros de los cuales el 12,5 % fue *Escherichia coli*, *Pseudomonas maltophilia* y *Shigella* spp., el 6,25 % de *Klebsiella pneumoniae* y un 3,13 % de *Morganella morganii* (Tabla 6).

**Tabla 6.** Bacterias aisladas en laboratorio mediante cultivo

Bacterias	N	%
<b>Gram positivos</b>		
<i>Staphylococcus coagulasa negativo</i>	5	15,63
<i>Staphylococcus aureus</i>	9	28,13
<i>Streptococcus agalactiae</i>	3	9,38
<b>TOTAL</b>	<b>17</b>	<b>53,14</b>
<b>Gram negativos</b>		
<i>Escherichia coli</i>	4	12,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	6,25
<i>Pseudomonas maltophilia</i>	4	12,5
<i>Shigella</i> spp.	4	12,5
<i>Morganella morganii</i>	1	3,13
<b>TOTAL</b>	<b>15</b>	<b>46,88</b>

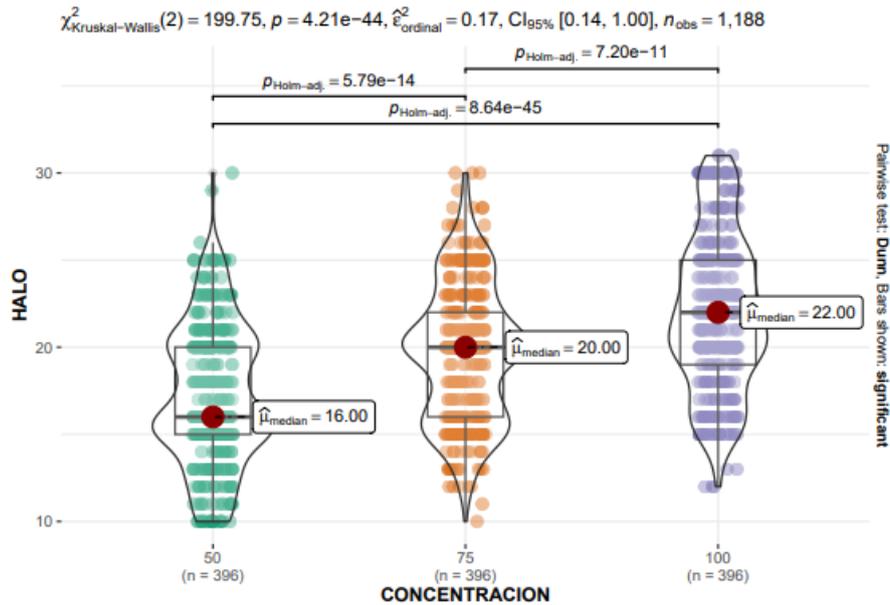
## 6.2. Evaluación de la Actividad Inhibitoria de Sangre de Drago

Para medir la eficacia de la sangre de drago sobre el crecimiento de bacterias se obtuvieron los resultados de la actividad inhibitoria de la planta según el método de evaluación (agujero y difusión de disco Kirby-Bauer), concentración del extracto de la planta (50, 75 y 100 %) y cantidad del producto (50 y 100  $\mu$ l). Se determinó que hay diferencia estadística significativa ( $p < 0,001$ ) en el método de evaluación, presentando mejor inhibición el método de agujero (Figura 2).



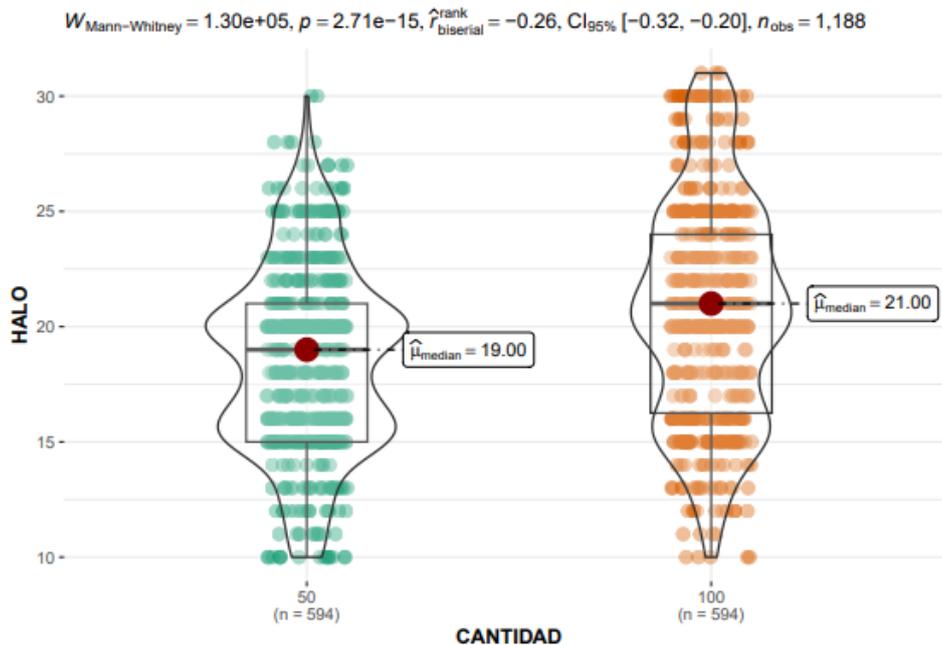
**Figura 2.** Representación del mejor método con relación al halo de inhibición

También se encontró diferencia estadística significativa ( $p < 0,001$ ) en el nivel de concentración de sangre de drago, sin embargo, el mejor fue el del 100 % (Figura 3).



**Figura 3.** Representación de la mejor concentración con relación al halo de inhibición

En base a la cantidad se demostró una mejor inhibición de bacterias en una cantidad de 100  $\mu\text{l}$  presentando una diferencia estadística significativa ( $p < 0,001$ ) (Figura 4).



**Figura 4.** Representación de la mejor cantidad con relación al halo

Al comparar el efecto de la sangre de drago, frente a las distintas cepas bacterianas aisladas en el estudio se observó un mayor halo de inhibición por el método de agujero, al igual que la concentración 100 % tanto para bacterias Gram positivas como Gram negativos, así como para la cepa control (Anexo 2) y la cantidad de 100  $\mu\text{l}$  fue la que presentó mayor inhibición

para todas las bacterias aisladas (Anexo 3).

*Staphylococcus coagulasa negativa* tuvo una media del halo de inhibición de 23,83 mm, *Staphylococcus aureus* de 23,16 mm y la cepa comercial de 23,42 mm. *Streptococcus agalactiae* tuvo una media de 20,89 mm.

Para Gram negativos *Morganella morganii* presento un promedio en el halo de inhibición de 23,58 mm, *Klebsiella pneumoniae* 22 mm, *Escherichia coli* 20,90 mm, *Shigella* spp. 20,77 mm y *Pseudomonas maltophilia* 19,19 mm. (Tabla 7).

**Tabla 7.** Efectividad de la sangre de drago en distintas concentraciones

Bacteria	Concentración						p valor
	50%		75%		100%		
	Media	de	Media	de	Media	De	
<b>Gram positivos</b>							
<i>Staphylococcus coagulasa negativa</i>	18,20 <sup>c</sup>	4,47	21,15 <sup>b</sup>	3,91	23,83 <sup>a</sup>	4,17	< 0,001
<i>Staphylococcus aureus</i>	17,95 <sup>c</sup>	3,55	20,25 <sup>b</sup>	3,81	23,16 <sup>a</sup>	4,09	< 0,001
<i>Streptococcus agalactiae</i>	16,53 <sup>c</sup>	3,95	19,14 <sup>b</sup>	3,63	20,89 <sup>a</sup>	4,45	< 0,001
<b>Cepa Control</b>							
<i>Staphylococcus aureus ATCC</i>	18,58 <sup>b</sup>	3,94	20,25 <sup>b</sup>	3,72	23,42 <sup>a</sup>	4,74	< 0,001
<b>Gram negativos</b>							
<i>Escherichia coli</i>	16,63 <sup>c</sup>	3,42	19,15 <sup>b</sup>	3,77	20,90 <sup>a</sup>	4,14	< 0,001
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	17,88 <sup>c</sup>	3,58	20,08 <sup>b</sup>	3,52	22,00 <sup>a</sup>	3,32	< 0,001
<i>Pseudomonas maltophilia</i>	15,21 <sup>c</sup>	3,95	17,75 <sup>b</sup>	3,66	19,19 <sup>a</sup>	3,67	< 0,001
<i>Shigella</i> spp.	16,31 <sup>c</sup>	4,43	18,67 <sup>b</sup>	4,00	20,77 <sup>a</sup>	4,98	< 0,001
<i>Morganella morganii</i>	18,75 <sup>c</sup>	3,67	21,08 <sup>b</sup>	2,43	23,58 <sup>a</sup>	4,34	< 0,001

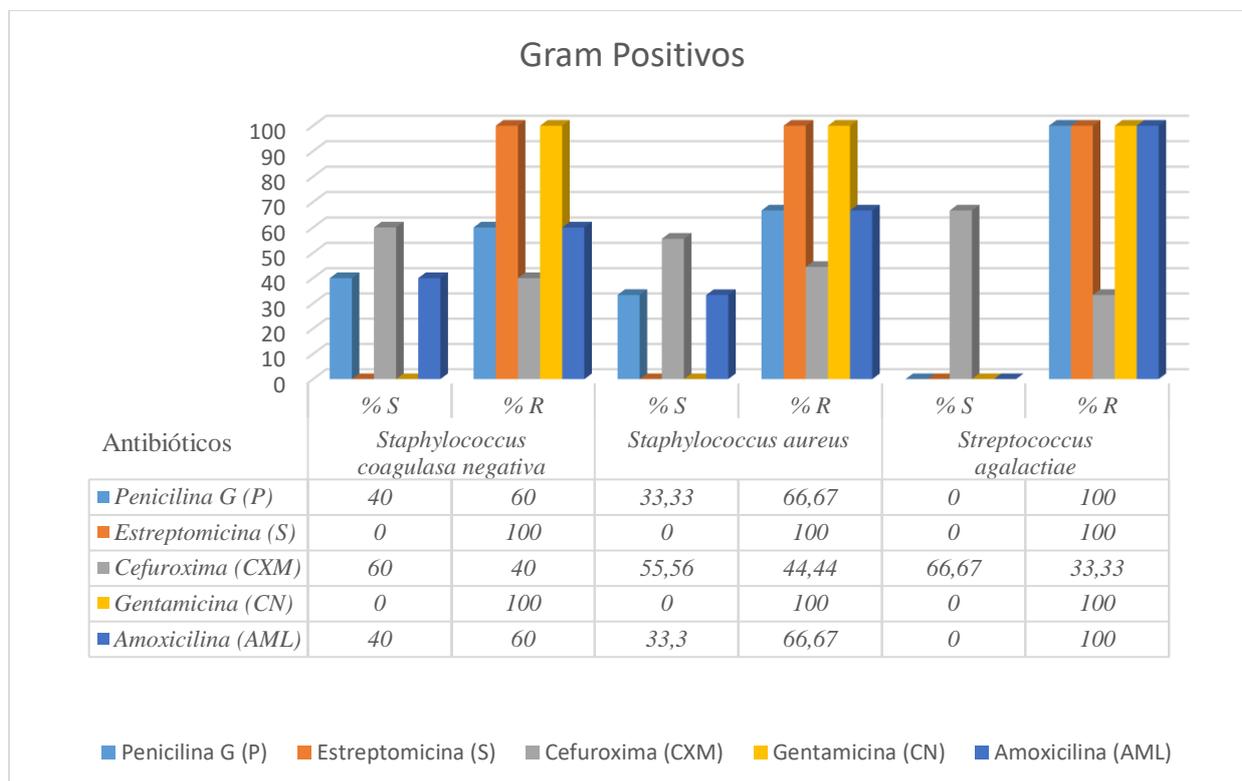
de: desviación estándar; p < 0,001: estadísticamente significativo

### 6.3. Evaluación Antimicrobiana de bacterias aisladas de vacas con mastitis

Se realizaron pruebas de antibiograma con un inóculo ajustado a 0,5 de McFarland. En las cepas de bacterias Gram positivas, *Staphylococcus coagulasa negativa* (SCN) mostró resistencia al 100 % a la estreptomicina y a la gentamicina, un 60 % a la penicilina y amoxicilina, y un 40 % a la cefuroxima. En *Staphylococcus aureus*, hubo resistencia del 100 % a la estreptomicina y gentamicina, mientras que la resistencia a penicilina y amoxicilina fue del 66,67 %; en cuanto a cefuroxima, la resistencia alcanzó el 44,44 % (Figura 5).

*Streptococcus agalactiae* presentó resistencia del 100 % a penicilina, estreptomicina, gentamicina y amoxicilina, y una resistencia del 33,33 % a cefuroxima (Anexo 4). Los

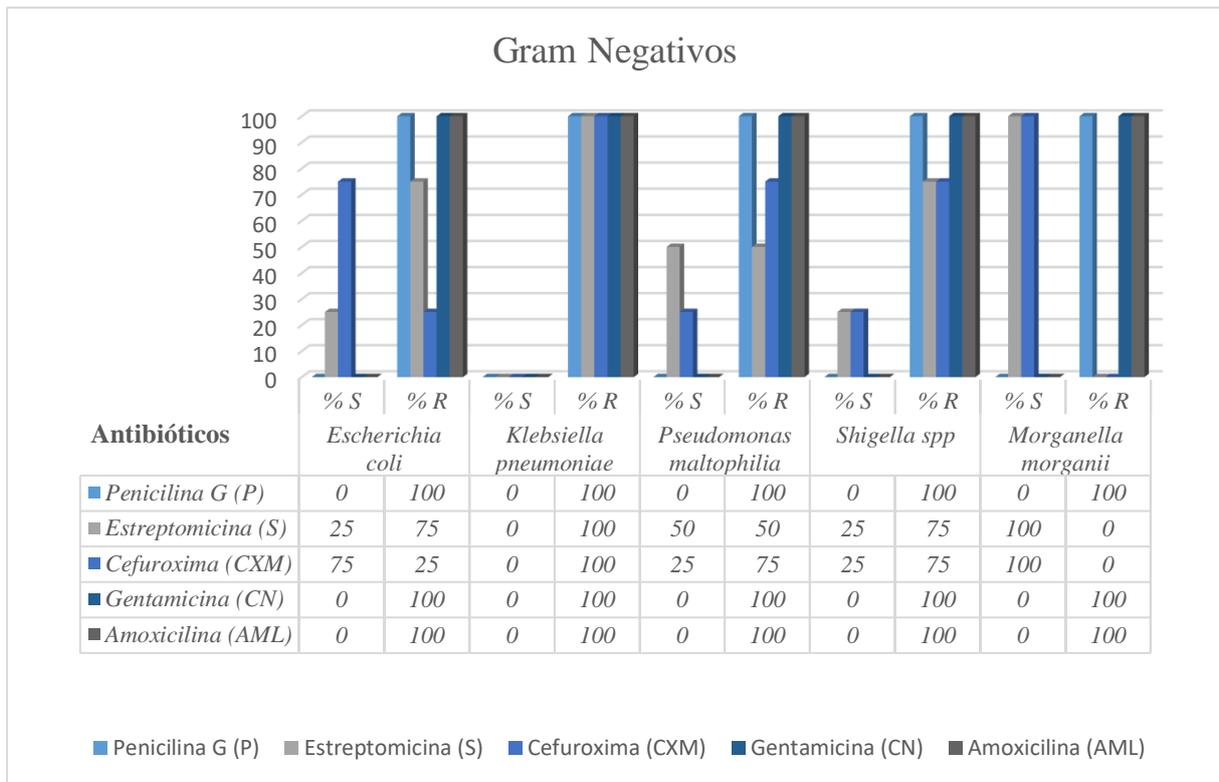
resultados del antibiograma indicaron que la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC mostró 100 % de resistencia a estreptomicina y gentamicina, pero demostró sensibilidad al 100 % para penicilina, cefuroxima y amoxicilina (Anexo 5).



**Figura 5.** Pruebas de susceptibilidad de bacterias Gram positivas en muestras de leche

S: Sensibilidad y R: Resistencia.

En las bacterias Gram negativas, *Klebsiella pneumoniae* exhibió resistencia al 100 % a todos los antimicrobianos evaluados. *Escherichia coli* demostró ser resistente al 100 % a penicilina, gentamicina y amoxicilina, mientras que tuvo un 75 % de resistencia a estreptomicina y un 25 % a cefuroxima. *Pseudomonas matophilia* mostró resistencia del 100 % a penicilina, gentamicina y amoxicilina, con un 75 % de resistencia a cefuroxima y un 50 % de resistencia a estreptomicina, *Shigella* spp. fue resistente al 100 % a penicilina, gentamicina y amoxicilina, pero tuvo una resistencia del 75 % a estreptomicina y cefuroxima. En cuanto a *Morganella morganii*, presentó una resistencia del 100 % a penicilina, gentamicina y amoxicilina, pero fue completamente sensible al 100 % a estreptomicina y cefuroxima (Figura 6).



**Figura 6.** Prueba de susceptibilidad de bacterias Gram negativas en muestras de leche

S: Sensibilidad y R: Resistencia.

## 7. Discusión

En el presente estudio, mediante la prueba CMT se analizaron un total de 80 vacas en producción de leche, resultando 32 vacas positivas a mastitis bovina de las cuales 27 de las muestras revelaron crecimiento en el cultivo bacteriano, lo que representa un 84,38% de las muestras. Estos resultados concuerdan con un estudio realizado por Kovačević et al., (2021) quienes lograron aislar patógenos únicamente en 21 muestras (67,74%), con un estudio realizado por Lopes et al., (2022) en donde se obtuvo un 47,7 % de crecimiento bacteriano y una investigación llevada a cabo por Tsugami et al., (2022) los cuales revelaron el 47,9 % de crecimiento bacteriano.

Para el diagnóstico de mastitis a través de la prueba de CMT en campo es necesario tener en cuenta la sensibilidad y especificidad que son del 97 y 93 % respectivamente (Camacho, 2018). La prueba de CMT proporciona información relevante sobre la salud de la ubre y la calidad de la leche (Ríos, 2020). Esta prueba brinda beneficios como realizar una detección temprana de mastitis subclínica, de tal manera que el tratamiento pueda ser más rápido, también ayuda a que el personal de ordeño pueda separar las vacas con mastitis para ordeñarlas a parte y de esa manera evitar una mastitis contagiosa.

Cabe destacar que la mastitis bovina, principalmente, surge por la infección intramamaria originada por bacterias patógenas, tales como *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. y *Pseudomonas* spp. (Díaz et al., 2019). Adicionalmente, también pueden contribuir microorganismos del entorno que no se retienen en el pezón, como *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli* y otros coliformes. (Yang et al., 2019). Entonces para conocer el tipo de microorganismo causante de mastitis se debe realizar cultivos bacterianos de la leche de aquellas vacas que resultaron positivas en la prueba de campo CMT.

Por lo cual se realizó pruebas microbiológicas en donde se observó que los aislados Gram positivos fueron predominantes (53,14 %) siendo *Staphylococcus aureus* el más prevalente con un 28,13%. Resultados similares son los obtenidos por Maldonado et al. (2022), ya que encontraron a *Staphylococcus aureus* (51,4 %) como el agente etiológico principal de la mastitis subclínica en el rebaño de la Estación Experimental Tunshi, Jiménez et al., (2019) revelan el aislamiento del 65 % de *S. aureus*., al igual que Sánchez et al. (2018), detectaron en su investigación la presencia de un 31,1 %.

Los datos recopilados por Quispe et al., (2021) demostraron un 35,2 % de *Staphylococcus aureus*, Rodríguez & Muñoz, (2017) aislaron el 16 % y Santos et al., (2022) detectaron el 81,25 % en muestras de leche.

La prevalencia de *Staphylococcus aureus* puede atribuirse al hecho de que es el microorganismo más importante y es considerado mundialmente como uno de los principales causantes de infecciones en las glándulas mamarias de las vacas lecheras (Lopes et al., 2020 & Monistero et al., 2018).

Es fundamental señalar que en las ganaderías evaluadas realizaban un ordeño manual, en donde se pudo apreciar un manejo inadecuado en la manipulación de los utensilios con una carencia de higiene, razón por la cual se asocia una mastitis contagiosa con presencia de *Staphylococcus aureus* debido a que no había un correcto protocolo de manejo durante el ordeño, además los ordeñadores no realizaban un lavado de manos después de cada ordeño y usaban la misma toalla de limpieza para cada vaca. Todo lo mencionado se considera puesto que *Staphylococcus aureus* está presente frecuentemente en el entorno, así como también en la piel y mucosas de las vacas, facilitando de tal manera su capacidad para entrar al pezón y la glándula mamaria de forma sencilla (Deogo et al., 2002).

Dentro de los Gram positivos en este estudio también se identificó la presencia de *Staphylococcus coagulasa negativa (SCN)* en un 15,63 %. Jiménez et al., (2019) en su estudio reportaron un 35 %. Sánchez et al. (2018) observaron en un 46,7 %. Hallazgos similares por Santos et al., (2022) identificaron en un 18,75 %.

En una evaluación realizada en la India por Bhavana & Chaitanya, (2022) presenciaron un 64,4 % de *Staphylococcus coagulasa negativa*, Alfonso et al., (2020) señalan el 9,3 % y (Chehabi et al., 2019) señalaron en su trabajo investigativo la existencia del 16,4 % en muestras de leche.

Según lo que manifiesta Navarro, (2011) sobre los SCN (*S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. saprophyticus* y *S. chromogenes*) que suelen estar en la piel sana del pezón o en las manos del ordeñador y teniendo en cuenta que es microorganismos oportunistas (es decir, que viven en áreas propicias para establecerse en la vía del pezón y adentrarse en los tejidos glandulares), se refleja su presencia en estas ganaderías, debido a la falta de limpieza en las áreas donde realizan el ordeño.

*S. agalactiae* fue otro aislado Gram positivo que se identificó con un 9,38 % siendo uno de los agentes asociados a la presencia de mastitis bovina en los animales evaluados. Quispe et al., (2021) obtuvieron un 12,7 % de *S. agalactiae*. Resultados semejantes presentados por Díaz Herrera et al., (2019) quienes aislaron el 9,93 % de cepas con características referentes a *S. agalactiae*.

Rodríguez et al., (2020) identificaron mediante cultivos microbiológicos el 26 % de colonias correspondientes a *S. agalactiae* y Campos et al., (2022) reportaron la existencia del 53 % de *S. agalactiae* en muestras de leche cruda. Sánchez et al. (2018), aislaron un 20,7 % de *Streptococcus* spp., Rodríguez & Muñoz, (2017) evaluaron la presencia en un 8 % de *Streptococcus* spp. en muestras de leche. *Streptococcus* spp. considera especies diferentes alfa, beta y gamma hemolíticos (Wicaksana & Rachman, 2018).

En detalle, *S. agalactiae* es un patógeno contagioso y se encuentra principalmente dentro de la ubre de la vaca en donde puede sobrevivir indefinidamente formando biopelículas y está fuertemente asociada con la mastitis subclínica (Kabelitz *et al.*, 2021). Sin embargo, investigaciones recientes demostraron que el tracto gastrointestinal bovino y el entorno de las vacas (suelos, camas y agua de bebida) son reservorios adicionales de *S. agalactiae* (Cheng & Han, 2020). La existencia de este microorganismo patógeno en las ganaderías analizadas podría tener un impacto ya que no cuentan con las condiciones de higiene favorables durante el ordeño, facilitando de esa manera el transporte de los microorganismos de una vaca a otra a través de las manos del ordeñador.

Cabe señalar que tanto bacterias Gram positivas como Gram negativas pueden ser responsables de la mastitis Ashraf & Imran, (2020). En nuestro estudio también se identificó aislados Gram negativos con un porcentaje del 46,88 %.

Dentro de estos hubo una mayor prevalencia de *E. Coli*, *Pseudomonas maltophilia* y *Shigella* spp. en un 12,5 %.

Rodríguez & Muñoz, (2017) realizaron un estudio en un establo de Conache Trujillo (Perú) con vacas en producción de leche en donde aislaron el 5 % de *Shigella* spp. y Sosa et al., (2022) en su investigación llevada a cabo en México en vacas con mastitis identificaron un 8,76 % dentro de las muestras de leche.

Martínez et al., (2021) en Honduras determinaron un 5,53 % de *E. Coli* en los cultivos bacterianos de muestras de leche de vacas con mastitis. Rodríguez & Muñoz, (2017)

encontraron la presencia del 28 % y Campos et al., (2022) la existencia 12 % de *E. Coli* en muestras de leche.

Hallazgos similares fueron los de Chehabi et al., (2019) identificaron un 20,7 % de *Escherichia coli* en muestras de leche analizadas. Abegewi et al., (2022) aislaron el 7 % en leche de vacas con mastitis, mientras que Ormaza et al., (2022) detectaron el 64 % de *E. coli* con previo resultado positivo por CMT en leche de vacas.

En este contexto *Escherichia coli* constituye una de las bacterias ambientales que con frecuencia ha sido asociada con infecciones en la glándula mamaria de las vacas principalmente de mastitis clínica según lo que manifiesta Cruz et al., (2020). Su presencia en los animales en estudio son el reflejo de las condiciones sanitarias del lugar de ordeño siendo así que este microorganismo se encuentra en las heces de los animales, en el suelo en el caso de establos o en la tierra en el caso de potreros o incluso presentarse en el agua empleada para el lavado de ubres ya que no era potable, lo que puede contribuir para la infección durante el proceso de ordeño, además de que no realizaban un sellado de pezones permitiendo de esa manera en ingreso de microorganismos patógenos al interior de la ubre.

En los estudios de comparación no se muestra presencia de *Pseudomonas maltophilia* razón por la cual no es una bacteria frecuente en mastitis bovina, sin embargo, la presencia de *Pseudomonas maltophilia* así como de *Shigella* spp. puede asociarse a la ausencia de las correctas medidas de higiene en las instalaciones y procesos de ordeño. Ya que *Pseudomonas* spp. son consideradas como patógenos oportunistas (Bedolla, 2017).

Rodríguez & Muñoz, (2017) encontraron la presencia del 24 % de *Klebsiella* spp., Martínez et al., (2021) en Honduras determinaron el 2,13 % de *Klebsiella* spp. en los cultivos bacterianos de muestras de leche. Investigaciones similares de Chehabi et al., (2019) que reportaron un 6 % de *Klebsiella pneumoniae* y Abegewi et al., (2022) aislaron en muestras de leche de vacas con mastitis el 2,4 % de *K. pneumoniae*.

*Klebsiella pneumoniae* es causa frecuente de mastitis bovina ambiental y se encuentra en el agua, suelo y animales, según lo que afirma Loeza et al., (2022), por lo tanto, es posible que la presencia de este microorganismo en las muestras de leche positivas a CMT en nuestro estudio esté relacionada, identificando un 6,25 % de esta bacteria.

En menor proporción se aisló *Morganella morganii* con un 3,13 % Rahman et al., (2020) afirma que *Morganella morganii* es un patógeno oportunista, aunque no se han

registrado datos para la misma a pesar de su presencia continua en la naturaleza y de estar presente en varios huéspedes animales, Li et al., (2018) concuerda que no hay evidencia de que *M. morganii* cause enfermedad en el ganado, sin embargo en su investigación realizada en China identificaron ganado infectado con *M. morganii* por primera vez, infección originada a partir de la leche de ganado importado.

Luego de la identificación bacteriana, para brindar un tratamiento que sea eficaz es fundamental realizar pruebas de resistencia y sensibilidad de cada uno de los microorganismos aislados frente a distintos antibióticos que se han utilizado. Las bacterias crean resistencia usando instrucciones de su ADN, a menudo almacenadas en plásmidos, pequeñas piezas de ADN que transmiten información genética entre bacterias, lo que permite compartir resistencia entre ellas (Guevara *et al.*, 2021).

En la susceptibilidad y resistencia antimicrobiana de esta investigación, se encontró que *Staphylococcus coagulasa negativa* tuvo una resistencia para estreptomina, gentamicina del 100% y penicilina G, amoxicilina el 60 %, sin embargo para cefuroxima la resistencia fue del 40 %.

Sánchez et al., (2018) reportaron en su estudio que el 58 % de las cepas positivas a *staphylococcus coagulasa negativa* fueron resistentes a la penicilina. Lopes et al. (2022) determinaron que *Staphylococcus coagulasa negativa* presentó resistencia en un 44,4 % para penicilina, y 30 % para amoxicilina, resultados diferentes a los obtenidos en este estudio. En cuanto a la gentamicina alcanzó una sensibilidad del 100 %, estos autores evaluaron a ceftiofur como cefalosporina de tercera generación la cual fue sensible al 100 % para las cepas bacterianas, en nuestro estudio se evaluó una cefalosporina de segunda generación como cefuroxima observando una sensibilidad del 60 %.

Jiménez et al.(2019) mencionan en su estudio que *Staphylococcus coagulasa negativa* tuvo una resistencia a penicilina del 38,9 %, y una sensibilidad de cefoxitina al 100 % Kovačević et al. (2021) establecieron que estas bacterias presentaron 100 % de sensibilidad a amoxicilina, estreptomina y gentamicina, mientras que evidenciaron una resistencia intermedia del 100 % a ceftriaxona y una resistencia total a penicilina.

*Staphylococcus aureus* fue resistente a estreptomina y gentamicina en un 100 % a penicilina G y amoxicilina en un 66,67 % y a cefuroxima 44,44 %. Quispe et al.,(2021) mencionan que *Staphylococcus aureus* presentó una resistencia del 52 % para penicilina mientras que para cefalexina fue sensible al 100 %. Reportes similares a los nuestros fueron los

de Sánchez et al., (2018) quienes observaron una resistencia del 74 % de *Staphylococcus aureus* para penicilina.

Rodríguez & Muñoz Ganoza (2017), en su investigación observaron que el 100 % de *Staphylococcus aureus* fueron resistentes a la ampicilina (penicilina) aunque notaron que presentaba una sensibilidad intermedia del 100 % a estreptomycinina y el 100 % de sensibilidad a gentamicina.

En un estudio realizado en Brasil por los investigadores Lopes et al. (2022) identificaron que *Staphylococcus aureus* fue resistente en un 43 % para penicilina y amoxicilina pero presentó una sensibilidad del 100 % para gentamicina y ceftiofur, mientras que en nuestro estudio se observó que la penicilina G y amoxicilina fueron resistentes en un 66,67 %.

Jiménez et al. (2019) informaron que *Staphylococcus aureus* tuvo una resistencia a penicilina del 23,1 % por otro lado la cefoxitina presentó una sensibilidad del 95,4 %.

Kovačević et al. (2021) reportaron que *Staphylococcus aureus* fue resistente en un 100 % a penicilina, 100% resistencia intermedia a amoxicilina, aunque sensible al 100% a gentamicina, estreptomycinina y ceftriaxona.

Los *Staphylococcus* pueden ser sensibles a la influencia de diversos medicamentos que funcionan contra bacterias Gram positivas, como penicilinas, cefalosporinas, eritromicina, aminoglucósidos, tetraciclinas y cloranfenicol. Sin embargo, a pesar de esta susceptibilidad, también son conocidos por su notable habilidad para desarrollar resistencia frente a todos estos tratamientos (Cussolim et al., 2021).

*Streptococcus agalactiae* en nuestro estudio demostró ser 100 % resistente a la penicilina G, amoxicilina, gentamicina y estreptomycinina, y un 33,33 % a cefuroxima. Quispe et al.,(2021) detectaron que *Streptococcus agalactiae* presentó una resistencia del 22 % a la penicilina y a la cefalexina.

El estudio realizado por Rodríguez & Muñoz Ganoza (2017) informan en sus resultados una resistencia del 100 % *Streptococcus spp.* a la estreptomycinina y la gentamicina y una sensibilidad del 100 % a ampicilina. Kovačević et al. (2021) revelaron que *Streptococcus spp. β hemoliticus* fue completamente resistente para penicilina, 33,33 % resistente a amoxicilina y gentamicina y 100 % sensible para estreptomycinina y ceftriaxona.

Como primera opción de tratamiento para manejar *Streptococcus agalactiae* implica el uso de antimicrobianos pertenecientes al grupo de los betalactámicos. No obstante, se ha observado la presencia de cepas de *Streptococcus agalactiae* que muestran resistencia o una

menor susceptibilidad hacia los antimicrobianos empleados para su control, tanto en entornos humanos como bovinos (Jaramillo *et al.*, 2018).

Los genes responsables de la resistencia a aminoglucósidos son *aac(6')*/*aph(2')*, *aph(3')*-IIIa y *ant(4')*-Ia que codifican enzimas modificadoras de aminoglucósidos (AME): acetiltransferasa (AAC), fosfotransferasa (APH) y nucleotidiltransferasa (ANT). La resistencia a los antibióticos betalactámicos se basa en modificaciones en el sitio de acción que se encuentran en las proteínas de unión a la penicilina (PBPs). Estas proteínas son indispensables para la construcción de la pared celular de las bacterias y conforman el sitio al que los betalactámicos se dirigen para su efecto, la resistencia a penicilina se produce debido a la presencia del gen *bla<sub>Z</sub>*, el cual produce  $\beta$ -lactamasas que descomponen el anillo  $\beta$ -lactámico. Otro mecanismo es el gen *mecA* (es parte de un elemento genético móvil denominado casete cromosómico estafilocócico), que codifica PBP2a, una proteína de baja afinidad por penicilina. *Staphylococcus* spp. con gen *mecA* se llaman meticilino-resistentes (SMR) (Jaramillo *et al.*, 2018 & Jiménez Velásquez *et al.*, 2019).

En el presente estudio con respecto a los Gram negativos se detectó el 100 % de resistencia de *Escherichia coli* a penicilina, gentamicina y amoxicilina, el 75 % a estreptomycinina y una resistencia del 25 % a cefuroxima.

Kovačević *et al.* (2021), reportaron que *E. coli* se mostró resistente al 100 % a penicilina y 66.6 % resistente a amoxicilina y a ceftriaxona pero hubo una sensibilidad del 100 % para estreptomycinina. Rodríguez & Muñoz (2017) obtuvieron una sensibilidad al 100 % de *E. coli* para gentamicina y estreptomycinina. Abegewi *et al.*, (2022) establecieron que el 73,3 % de *Escherichia coli* fue resistente para amoxicilina, el 73 % para cefalosporina (cefalotina), el 48,6 % para estreptomycinina y el 2,7 % para gentamicina. En un estudio realizado en Australia por Schabauer *et al.* (2018), hallaron que las enterobacterias (*E. Coli*) aisladas en su estudio mostraron una resistencia del 2% para gentamicina.

*Shigella* spp. en este estudio presentó el 100 % de resistencia a estreptomycinina, gentamicina y amoxicilina y el 75 % fue resistente a estreptomycinina y cefuroxima. En el estudio de Rodríguez & Muñoz (2017) obtuvieron que shigella fue el 100 % resistente a estreptomycinina y gentamicina.

*Pseudomonas maltophilia* en nuestro estudio el 100 % fue resistente a penicilina, amoxicilina y gentamicina, el 75 % a cefuroxima y el 50 % a estreptomycinina. *Stenotrophomonas maltophilia* presenta diversos mecanismos de resistencia a los antimicrobianos, como la

alteración de antibióticos y la resistencia que es transmitida por medio de plásmidos. Estos mecanismos le confieren a *Stenotrophomonas* una resistencia natural a una amplia variedad de antibióticos, como los carbapenémicos, los  $\beta$  lactámicos y los aminoglucósidos (Agri *et al.*, 2022).

*Klebsiella pneumoniae* fue resistente el 100 % para todos los antibióticos utilizados en este estudio, de acuerdo a lo que afirma Guevara *et al.*, (2021) *Klebsiella pneumoniae* genera enzimas conocidas como carbapenemasas, las cuales tienen la capacidad de descomponer tanto los medicamentos carbapenémicos como la mayoría de los otros fármacos betalactámicos. Rodríguez & Muñoz (2017) en su investigación mencionan que *Klebsiella* spp. fue 100 % sensible para gentamicina y presentó 100 % resistencia intermedia para estreptomycin. Abegewi *et al.*, (2022) observaron que *Klebsiella pneumoniae* tuvo una resistencia del 100 % a amoxicilina, el 73,3 % a estreptomycin, 26,7 % a cefalotina pero el 100 % de sensibilidad para gentamicina.

*Morganella morganii* presentó el 100 % resistencia a penicilina, gentamicina y amoxicilina y el 100 % sensibilidad a cefuroxima y estreptomycin. Los resultados obtenidos por Li *et al.* (2018) mostraron que *M. morganii* era resistente a la penicilina en un 100 % y tenía una sensibilidad intermedia del 100 % a la gentamicina.

La resistencia de las bacterias Gram negativas puede relacionarse con la estructura de las mismas ya que su membrana externa actúa como un escudo protector que de manera selectiva evitando la entrada de los antibióticos (Guevara *et al.*, 2021).

La resistencia total a la penicilina G en todas las cepas bacterianas Gram negativas se debe a que la bencilpenicilina carece de actividad clínicamente útil contra enterobacteriaceae debido a la producción de betalactamasas. Además la resistencia a la bencilpenicilina también puede ser causada por modificaciones en las proteínas que se unen a la penicilina (PBP) (EUCAST, 2023).

Finalmente de manera general la elevada resistencia de las bacterias aisladas tanto Gram positivas como Gram negativas frente a los antimicrobianos es preocupante generando un impacto significativo ya que dificultan el tratamiento, de igual manera la mastitis puede tener un impacto negativo en la salud humana al promover el desarrollo de patógenos resistentes a los antibióticos, los cuales pueden diseminarse, representando así una amenaza significativa. (Ashraf & Imran, 2020).

Por otro lado la alta resistencia se da por el uso indiscriminado y mal manejo de estos antibióticos en el tratamiento de mastitis bovina así como otras enfermedades dentro de las ganaderías utilizadas para la investigación sin antes realizar pruebas de sensibilidad in vitro, con respecto a la cefalosporina evaluada mostró una mejor sensibilidad que el resto de antibióticos, por lo cual puede ser tomado como opción terapéutica de primera línea para combatir la mastitis bovina.

Es necesario resaltar que de acuerdo a la OMS la resistencia a los antimicrobianos es una preocupación mundial y una amenaza principal de salud pública debido a que en el año 2050 estima un incremento de muertes provocadas por este factor, por esta razón se ha buscado otra opción terapéutica que tenga información bibliográfica como el uso de *Croton lechleri* para inhibición de bacterias, en virtud de esto se evaluó diferentes concentraciones de sangre de drago por dos métodos diferentes y dos cantidades distintas.

Los resultados en la evaluación antimicrobiana de la sangre de drago frente a las cepas aisladas mostraron una diferencia significativa a 100  $\mu$ l de sangre de drago a una concentración del 100 % por el método de agujero.

Se observó una mayor efectividad de la sangre de drago frente a las cepas bacterianas analizadas, lo cual se encuentra asociado a la composición química de la sangre de drago en la que presenta compuestos como la taspina, que desempeña un papel importante en el proceso de cicatrización de heridas y también muestra propiedades antiinflamatorias. Asimismo, se encuentra la proantocianidina SP-303, que exhibe actividad antiviral, y ciertos compuestos fenólicos como el ácido clorequínico, así como las coberinas A y B, cuyas funciones desempeñadas son antisépticas y antimicrobianas (Gallardo & Barboza, 2015). Aunque, hay escasa información sobre el componente al que realmente se le puede atribuir la actividad antibacteriana.

Nuestros resultados mostraron un halo de inhibición mayor en las cepas: *Staphylococcus coagulasa negativa* (23,83 mm), *Staphylococcus aureus* (23,16 mm), *Morganella morganni* (23,58 mm), y para *Pseudomona maltophilia* (19,19 mm).

El estudio realizado por Jherlits & Cisneros (2018) evaluaron la actividad antibacteriana de *Croton lechleri* contra la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. empleando el método de impregnación en discos con concentraciones al 50 %, 70 % y 100 %. resultados similares a los obtenidos en este estudio, ya que el tratamiento con látex al 100% tuvo un mayor promedio de inhibición con un efecto antibacteriano in vitro del 54,75 %. Además, manifestaron que

*Croton lechleri* puede tener un efecto bactericida y bacteriostático, debido a los diversos componentes de la sangre de drago.

Huapaya *et al.*(2003) evaluaron la actividad antimicrobiana in vitro de la sangre de drago en cepas ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, en concentraciones del 10 %, 25 % y 100 % utilizando el método de excavación en placa o agujero colocando 100 µl de cada concentración, obteniendo resultados de una mayor actividad antibacteriana en concentraciones del 50 % y 100 % para *Staphylococcus aureus*, en menor grado *Pseudomona aeruginosa* y no presento actividad para *Escherichia coli*.

En un estudio se analizó la capacidad de la sangre de drago para inhibir el crecimiento bacteriano en ensayos de laboratorio utilizando cepas bacterianas ATCC a diferentes concentraciones (1 %, 2 %, 4 %, 6 %, 8 %, 16 %, 80 %, 90 % y 100 %) por el método de impregnación en discos por triplicado para cada tratamiento y no observaron ningún halo de inhibición por lo que consideran que las cepas bacterianas ATCC, específicamente *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, muestran resistencia a los efectos de la sangre de drago (*crotón lechleri*) (Tualombo & Castillo, 2023).

Finalmente, en esta investigación se apreció que hubo efectividad de la sangre de drago en bacterias Gram positivas y negativas a pesar de la estructura de la pared celular, ya que se observó halos de inhibición mayor al de los antibióticos evaluados, esta efectividad se le atribuye a los compuestos químicos de la sangre de drago que permiten inhibir las bacterias causantes de mastitis bovina, por lo tanto se puede considerar como una opción terapéutica coadyuvante al tratamiento de mastitis bovina provocada por bacterias.

## 8. Conclusiones

Una vez finalizada nuestra investigación, se llegó a las siguientes conclusiones:

- Se aislaron 32 cepas bacterianas en base a 27 animales evaluados y se obtuvo el 53,14 % en Gram positivos y el 46,88 % en Gram negativos.
- La sangre de drago (*Croton lechleri*) fue efectiva en Gram positivos como Gram negativos a una concentración del 100 % por el método de agujero en agar y una cantidad de 100  $\mu$ l.
- En los Gram positivos se observó una resistencia para la mayoría de los antibióticos a excepción de la cefuroxima que tuvo una sensibilidad en todos los aislados. En los Gram negativos la resistencia fue para todos los antimicrobianos a excepción de *E. coli* que presento sensibilidad para cefuroxima y *Morganella morganii* que fue sensible para estreptomicina y cefuroxima.
- Se observó una mayor inhibición de la sangre de drago a 100  $\mu$ l y una concentración al 100 %, mostrándose así mejores resultados con la sangre de drago que los antibióticos usados en esta investigación.

## 9. Recomendaciones

- Hacer un análisis exhaustivo de la composición química de la sangre de drago con el fin de identificar el componente responsable de su actividad antibacteriana.
- Realizar un análisis para determinar la concentración mínima inhibitoria de la sangre de drago, utilizando tanto cepas comerciales como cepas aisladas de ganaderías en un rango más amplio.
- Llevar a cabo nuevos estudios que analicen la composición de diversas plantas con el potencial de ser combinadas con *Croton lechleri* para brindar opciones terapéuticas alternativas que aborden de manera efectiva el desafío de la resistencia.

## 10. Bibliografía

- Abegewi, U., Esemu, S., Ndip, R., & Ndip, L. (2022). *Prevalence and risk factors of coliform-associated mastitis and antibiotic resistance of coliforms from lactating dairy cows in North West Cameroon. PLoS ONE, 17(7 July), 1–18.*  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0268247>
- Abril, A. G., Carrera, M., Böhme, K., Barros-Velázquez, J., Rama, J. L. R., Calo-Mata, P., Sánchez-Pérez, A., & Villa, T. G. (2020). *Proteomic characterization of antibiotic resistance, and production of antimicrobial and virulence factors in streptococcus species associated with bovine mastitis. Could enzybiotics represent novel therapeutic agents against these pathogens? Antibiotics (Basel), 9(6), 1–24.*  
<https://doi.org/10.3390/antibiotics9060302>
- Agri, H., Karthikeyan, R., Kiranmayee, B., Jayakumar, V., Yadav, A., OR, V. K., Sinha, D. K., & Singh, B. R. (2022). *Stenotrophomonas maltophilia: An Overlooked Enemy Disguised as a Friend. Acta Scientific Microbiology, 5(11), 68–80.*  
<https://doi.org/10.31080/asmi.2022.05.1165>
- Agrocalidad. (2020). *Laboratorio Control de Calidad de Leche. NstructivoInt/CI/010, 7, 1–18.*  
<http://www.agrocalidad.gob.ec/coord-gral-laboratorios/laboratorios-de-diagnostico-de-inocuidad-de-los-alimentos-y-control-de-insumos-agropecuarios/laboratorio-control-de-calidad-de-leche/>
- Águila, A. (2016). *Antibiograma.* <https://docplayer.es/79037153-Antibiograma-que-es-y-como-interpretarlo-facultad-de-medicina-universidad-de-panama.html>
- Aguilar, F., & Álvarez, C. (2019). *Mastitis bovina (UTMACH (ed.); Primera).*
- Ashraf, A., & Imran, M. (2020). *Causes, types, etiological agents, prevalence, diagnosis, treatment, prevention, effects on human health and future aspects of bovine mastitis. En Animal Health Research Reviews (Vol. 21, Número 1, pp. 36–49).*

<https://doi.org/10.1017/S1466252319000094>

Ballesteros, J., & Valdiviezo, A. (2018). *Estudio de la problemática epidemiológica de la mastitis bovina en el Cantón Cayambe. [Trabajo de titulación previo a la obtención del título de: Ingenieras en Biotecnología de los Recursos Naturales. Universidad Politécnica Salesiana]. Repositorio Institucional.* <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/15261>

Camacho, M. (2018). *Prevalencia de mastitis subclínica mediante la prueba california mastitis test en ganado criollo lechero- distrito de Imaza. setiembre –diciembre 2017 [Tesis para optar el título profesional de médico veterinario. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo]. Repositorio Institucional.*

<https://repositorio.unprg.edu.pe/handle/20.500.12893/3159>

CLSI. (2023). *M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. En Clinical and Laboratory Standards Institute (33rd ed., Vol. 40, Número 1).*

Cruz, A., Toro, V., Munguía, C., Torres, J., Florez, L., Loeza, P., & Jiménez, R. (2020). *Relación genética, formación de biopelículas, movilidad y virulencia de Escherichia coli aislada de mastitis bovina. Rev. mex. de cienc. pecuarias [online], 11(1), 167–182.* <https://doi.org/https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i1.4998>.

Díaz Herrera, D. F., Remón Díaz, D., Riverón Alemán, Y., Ribot, A., Ledesma Rodríguez, A., Martínez Vasallo, A., & Uffo Reinoso, O. (2019). *Identificación de Streptococcus agalactiae en leche de bovinos afectados por mastitis en el occidente de Cuba. Revista de Salud Animal, 41(3), 1–12.*

[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0253-570X2019000300003](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2019000300003)

EUCAST. (2023). *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.0, 2023.* <http://www.eucast.org>."

[http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_5](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_5).

0\_Breakpoint\_Table\_01.pdf,

0–77.

[http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_5.](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_5.0_Breakpoint_Table_01.pdf)

0\_Breakpoint\_Table\_01.pdf

Fierro, N., Carrera, R., & Ordoñez, J. (2016). *Prevenir Es Mejor Que Curar Manual De Mastitis*. [https://www.researchgate.net/publication/304825982\\_Manual\\_de\\_mastitis](https://www.researchgate.net/publication/304825982_Manual_de_mastitis)

Gallardo, G., & Barboza, L. (2015). Efecto cicatrizante del gel elaborado del látex de *Croton lechleri* “Sangre de Drago”. *Revista Científica Ciencia Medica*, 18(1), 10–16.

Guevara, J., Maldonado, M., Valadez, D., Muro, R., & Matsumoto, I. (2021). Resistencia bacteriana: organismos del grupo ESKAPE. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 41(3), 111–117.

Hayashi, M., Shinozuka, Y., Kurumisawa, T., Yagisawa, T., Suenaga, N., Shimizu, Y., Suzuki, N., & Kawai, K. (2023). Effects of Intramammary Antimicrobial Treatment on the Milk Microbiota Composition in Mild Clinical Bovine Mastitis Caused by Gram-Positive Bacteria. *animals*, 13(713), 13–21. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ani13040713>

Hernández, R., Fernández, C., & Baptista, P. (2016). Guía de elaboración de un proyecto de investigación. Segunda parte. En *Revista de enfermería (Barcelona, Spain)* (Vol. 39, Número 2).

Huapaya, J., Flórez, M., & Larrea, H. (2003). Control microbiológico y evaluación de la actividad antibacteriana en vitro de *Croton lechleri* “Sangre de grado”. *Horizonte médico*, 3(December 2003), 1–2.

<http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=677686&indexSearch=ID>

Iglesias Moreno, P. (2019). *Sangre de drago. Evaluación farmacológica basada en usos tradicionales, beneficios y riesgos*. [Trabajo fin de grado. Universidad Complutense]. [http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/Paula\\_Iglesias\\_Moreno.pdf](http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/Paula_Iglesias_Moreno.pdf)

- Jherlits, C., & Cisneros, C. (2018). *Evaluación del efecto antibacteriano in vitro del látex de Croton lechleri “sangre de grado” frente a Staphylococcus aureus atcc 25923.* <https://doi.org/Retrieved> from <https://revista.usanpedro.edu.pe/index.php/CPD/article/view/302>
- Kher, M. N., Sheth, N. R., & Bhatt, V. D. (2018). *In Vitro Antibacterial Evaluation of Terminalia chebula as an Alternative of Antibiotics against Bovine Subclinical Mastitis.* *Animal Biotechnology.* <https://doi.org/10.1080/10495398.2018.1451752>
- Kovačević, Z., Radinović, M., Čabarkapa, I., Kladar, N., & Božin, B. (2021). *Natural agents against bovine mastitis pathogens.* *Antibiotics, 10(2), 1–16.* <https://doi.org/10.3390/antibiotics10020205>
- Li, G., Niu, X., Yuan, S., Liang, L., Liu, Y., Hu, L., Liu, J., & Cheng, Z. (2018). *Emergence of Morganella morganii subsp. morganii in dairy calves, China.* *Emerging Microbes and Infections, 7(1), 4–6.* <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0173-3>
- Lopes, T., Fussieger, C., Rizzo, F., Silveira, S., Lunge, V., & Streck, F. (2022). *Species identification and antimicrobial susceptibility profile of bacteria associated with cow mastitis in southern Brazil.* *Pesquisa Veterinária Brasileira, 42(e06958).* <https://doi.org/10.1590/1678>
- Lopes, T. S., Fontoura, P. S., Oliveira, A., Rizzo, F. A., Silveira, S., & Streck, A. F. (2020). *Use of plant extracts and essential oils in the control of bovine mastitis.* *Research in veterinary science, 131, 186–193.* <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.04.025>
- Mellenberger, R. (2004). *Hoja de Información de la Prueba de Mastitis California (CMT).* Universidad de Wisconsin-Mádison, 3. [http://milkquality.wisc.edu/wp-content/uploads/2011/09/hoja-de-informacion-de-la-pruebe-de-mastitis-california\\_spanish.pdf](http://milkquality.wisc.edu/wp-content/uploads/2011/09/hoja-de-informacion-de-la-pruebe-de-mastitis-california_spanish.pdf)
- Montalva, E. P. (2019). *Efecto antibacteriano del extracto puro de croton lechleri mull arg.*

- (sangre de dragón) sobre la cepa bacteriana de staphylococcus ATCC 43300 [Tesis para obtener el Título Profesional de Médica Veterinaria. Universidad Ricardo Palma]. Repositorio institucional. <https://repositorio.urp.edu.pe/handle/20.500.14138/2392>
- OMS. (2021). Resistencia a los antimicrobianos. Organización Mundial de la Salud.
- Oyola, L., & Urrea, M. (2021). Conceptos generales y métodos establecidos para el diagnóstico y tratamiento de la mastitis bovina. [Modalidad de grado para obtener el título en Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Cooperativa de Colombia]. Repositorio Institucional. <https://repository.ucc.edu.co/server/api/core/bitstreams/fbd7a4f2-8f59-45fb-8816-c0f7ad3736ed/content>.
- Quispe, R., Peña, G., & Andia V. (2021). Resistencia antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* aislados de leche de vacas con mastitis. *Revista Veterinaria*, 32(1), 79–83. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.30972/vet.3215640>
- Ramírez, S. (2019). Comparación de los extractos naturales de sangre de drago (*Croton lechleri*) frente a la uña de gato (*Uncaria tomentosa*) para la valoración de mayor capacidad antioxidante [Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales. Universidad Politécnica Salesiana Sede Cuenca]. Repositorio Institucional. <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/17508>
- Ríos, C. (2020). Resistencia a antibióticos en bacterias causantes de mastitis bovina [Trabajo de grado - opción Monografía. Presentado como requisito para obtener el título de Zootecnista. Universidad de Cundinamarca]. Repositorio Institucional. <https://repositorio.cucundinamarca.edu.co/handle/20.500.12558/3458>
- Rodríguez Pérez, R., & Muñoz Ganoza, E. (2017). Frequency and antimicrobial susceptibility of bacteria causing mastitis in a dairy farm in trujillo, Peru. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru*, 28(4), 994–1001. <https://doi.org/10.15381/rivep.v28i4.13874>
- Saavedra, A. P., Perez-Morales, R., González-Rios, H., & Amavizca-Nazar, A. (2022).

- Prevalencia y relación de mastitis con niveles séricos de vitaminas E y A y estatus microbiológico en vacas criollas doble propósito, en época de verano. Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud, 24(1), 79–86. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v24i1.1552>*
- Sánchez Bonilla, M. del P., Gutiérrez Murillo, N. P., & Posada Almanza, I. J. (2018). *Prevalencia de mastitis bovina en el Cañón de Anaimé, región lechera de Colombia, incluyendo etiología y resistencia antimicrobiana. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, 29(1), 226–239. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i1.14084>*
- Schabauer, A., Pinior, B., Gruber, C. M., Firth, C. L., Käsbohrer, A., Wagner, M., Rychli, K., & Obritzhauser, W. (2018). *The relationship between clinical signs and microbiological species, spa type, and antimicrobial resistance in bovine mastitis cases in Austria. Veterinary Microbiology, 227(August), 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.10.024>*
- Silva, A. L. do N., Silva, K. A. da, Magalhães, T. N., Sá, M. K. S. de, Ramos, R. A., Gomes, Y. R. M. dos S., Militão, J. S. L. T., Casseb, A. A., Matos, N. B., & Mesquita, E. A. de. (2022). *Avaliação da ação antimicrobiana do látex de Croton lechleri Müll. Arg. (Euphorbiaceae) em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Research, Society and Development, 11(16), e84111637750. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i16.37750>*
- Tamariz Ortíz, J. H., Capcha Mendoza, R., Palomino Cadenas, E. J., & Aguilar Olano, J. (2003). *Actividad antibacteriana de la Sangre de Grado (Croton lechleri) frente al Helicobacter pylori. Revista Medica Herediana, 14(2), 81–88. <https://doi.org/10.20453/rmh.v14i2.760>*
- Tong, J., Sun, M., Zhang, H., Yang, D., Zhang, Y., Xiong, B., & Jiang, L. (2020). *Proteomic analysis of bovine mammary epithelial cells after in vitro incubation with S. agalactiae: Potential biomarkers. Veterinary Research, 51(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13567-020-00808-7>*

- Tualombo Masabanda, V. Á., & Castillo Hidalgo, E. P. (2023). Efecto antibacteriano de la sangre de drago en cultivos in vitro en cepas bacterianas ATCC. *Anatomía Digital*, 6(1), 104–124. <https://doi.org/10.33262/anatomiadigital.v6i1.2491>
- Wicaksana, A., & Rachman, T. (2018). *Streptococcus spp.* *Angewandte Chemie International Edition*, 6(11), 951–952., 3(1), 10–27. <https://medium.com/@arifwicaksanaa/pengertian-use-case-a7e576e1b6bf>
- Yang, W. T., Ke, C. Y., Wu, W. T., Lee, R. P., & Tseng, Y. H. (2019). Effective treatment of bovine mastitis with intramammary infusion of angelica dahurica and rheum officinale extracts. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2019/7242705>.
- Zuñiga Vivanco, W. A. (2023). Evaluación comparativa de tres métodos de diagnóstico en mastitis bovina subclínica: California mastitis test, recuento de células somáticas y conductividad eléctrica en la Hacienda Pucate [Trabajo de titulación modalidad Proyecto de Investigación previo a la obtención del título de Médico Veterinario y Zootecnista. Universidad Central del Ecuador]. Repositorio Institucional. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/30288>

## 11. Anexos.

### Anexo 1. Resultados de la prueba California Mastitis Test

Finca	Animal	CMT (N° de cruce s)	Finca	Animal	CMT (N° de cruce s)	Finca	Animal	CMT (N° de cruce s)	Finca	Animal	CMT (N° de cruce s)
	1	2		21	0		41	2		61	0
	2	2		22	0		42	2		62	0
	3	2		23	0		43	3		63	0
	4	2		24	0		44	2		64	0
	5	2		25	0		45	1		65	0
	6	3	Capulí	26	0		46	2		66	0
	7	1		27	0		47	1		67	0
	8	1		28	0		48	3		68	0
	9	2		29	0		49	2		69	0
	10	1		30	0	El Paraíso	50	2	El Paraíso	70	0
Capulí	11	3		31	2		51	0		71	0
	12	0		32	3		52	0		72	0
	13	0		33	2		53	0		73	0
	14	0		34	3		54	0		74	0
	15	0	El Paraíso	35	3		55	0		75	0
	16	0		36	2		56	0		76	0
	17	0		37	2		57	0		77	0
	18	0		38	2		58	0		78	0
	19	0		39	2		59	0		79	0
	20	0		40	3		60	0		80	0
<b>Total positivos</b>											<b>32</b>
<b>Total Negativos (0)</b>											<b>48</b>

## Anexo 2. Crecimiento bacteriano en medios de cultivo

<b>Individuos</b>	<b>Bacteria aislada</b>
1	<i>Staphylococcus coagulasa negativa</i>
2	<i>Staphylococcus aureus</i>
3	<i>Staphylococcus aureus</i>
4	<i>Staphylococcus aureus</i>
5	<i>Streptococcus agalactiae</i>
6	<i>Streptococcus agalactiae</i>
7	<i>Escherichia coli</i>
8	<i>Escherichia coli</i>
9	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
10	<i>Pseudomonas maltophilia</i>
11	<i>Shigella spp.</i>
12	<i>Pseudomonas maltophilia</i>
13	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
14	<i>Pseudomonas maltophilia</i>
15	<i>Shigella spp.</i>
16	<i>Staphylococcus coagulasa negativa</i>
17	<i>Escherichia coli</i>
18	<i>Pseudomonas maltophilia</i>
19	<i>Staphylococcus aureus</i>
20	<i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Staphylococcus coagulasa negativa</i>
21	<i>Staphylococcus aureus</i>
22	<i>Staphylococcus coagulasa negativa</i>
23	<i>Shigella spp.</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>
24	<i>Escherichia coli</i> y <i>Streptococcus agalactiae</i>
25	<i>Shigella spp.</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>
26	<i>Morganella morganii</i> y <i>Staphylococcus coagulasa negativa</i>
27	<i>Staphylococcus aureus</i>

### Anexo 3. Efectividad de la sangre de drago de acuerdo al método

Bacteria	Método				p valor
	Media	de	Media	De	
<b>Gram positivas</b>					
<i>Staphylococcus coagulasa negativa</i>	23,91	3,91	18,21	3,72	≤ 0,05
<i>Staphylococcus aureus</i>	23,14	3,64	17,77	3,25	≤ 0,05
<i>Streptococcus agalactiae</i>	21,41	3,63	16,30	3,48	≤ 0,05
<b>Cepa Control</b>					
<i>Staphylococcus aureus ATCC</i>	24,17	3,40	17,33	2,40	≤ 0,05
<b>Gram negativas</b>					
<i>Escherichia coli</i>	21,75	3,40	16,03	2,56	≤ 0,05
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	22,50	2,91	17,47	2,86	≤ 0,05
<i>Pseudomonas maltophilia</i>	20,38	3,15	14,39	2,35	≤ 0,05
<i>Shigella spp.</i>	21,72	3,97	15,44	3,32	≤ 0,05
<i>Morganella morganii</i>	23,94	3,37	18,33	2,22	≤ 0,05

Nota: de: desviación estándar; p < 0,001: estadísticamente significativo

### Anexo 4. Efectividad de la sangre de drago en relación a la cantidad de producto

Bacteria	Cantidad				p valor
	Media	de	Media	De	
<b>Gampositivos</b>					
<i>Staphylococcus coagulasa negativa</i>	19,78	4,25	22,34	4,92	< 0,001
<i>Staphylococcus aureus</i>	19,62	3,72	21,29	4,79	< 0,001
<i>Streptococcus agalactiae</i>	17,56	3,91	20,15	4,46	< 0,001
<b>Cepa Control</b>					
<i>Staphylococcus aureus ATCC</i>	19,56	3,93	21,94	4,86	< 0,001
<b>Gramnegativos</b>					
<i>Escherichia coli</i>	17,46	3,44	20,32	4,33	< 0,001
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	18,83	3,68	21,14	3,66	< 0,001
<i>Pseudomonas maltophilia</i>	16,32	3,71	18,44	4,19	< 0,001
<i>Shigella spp.</i>	17,60	4,07	19,57	5,31	< 0,001
<i>Morganella morganii</i>	20,00	3,27	22,28	4,42	< 0,001

de: desviación estándar; p < 0,001: estadísticamente significativo

## Anexo 5. Antibiograma de bacterias Gram positivas

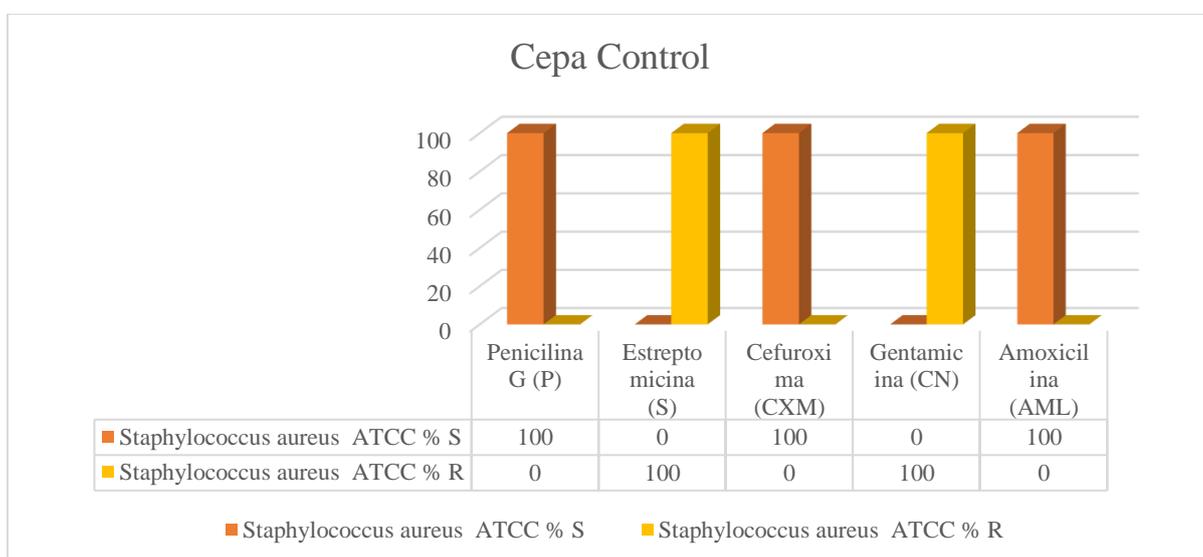
Resistencia Antimicrobiana para <i>Staphylococcus aureus</i>											
Antibióticos	Valores de referencia		Muestras								
	S	R	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Penicilina (10 units)	≥ 26	< 26	0 R	0 R	0 R	22 R	0 R	40 S	40 S	40 S	15 R
Estreptomicina (10 ug)	-	-	23 R	23 R	23 R	24 R	18 R	25 R	20 R	18 R	10 R
Cefuroxima (30 ug)	≥ 22	< 22	0 R	0 R	0 R	35 S	0 R	30 S	28 S	30 S	35 S
Gentamicina (30 ug)	≥ 54	< 54	25 R	26 R	26 R	40 R	29 R	35 R	30 R	28 R	35 R
Amoxicilina (10 ug)	≥ 26	< 26	0 R	0 R	0 R	22 R	0 R	34 S	35 S	36 S	15 R

Resistencia Antimicrobiana para <i>Staphylococcus coagulasa negativa</i>							
Antibióticos	Valores de referencia		Muestras				
	S	R	1	2	3	4	5
Penicilina (10 units)	≥ 26	< 26	0 R	10 R	15 R	40 S	40 S
Estreptomicina (10 ug)	-	-	22 R	0 R	19 R	25 R	21 R
Cefuroxima (30 ug)	≥ 22	< 22	0 R	16 R	30 S	40 S	28 S
Gentamicina (30 ug)	≥ 66	< 66	26 R	15 R	30 R	30 R	32 R
Amoxicilina (10 ug)	≥ 26	< 26	0 R	0 R	17 R	40 S	35 S

Resistencia Antimicrobiana para <i>Streptococcus agalactiae</i>					
Antibióticos	Valores de referencia		Muestras		
	S	R	1	2	3
Penicilina (10 units)	≥ 19	< 19	7 R	13 R	0 R
Estreptomicina (10 ug)	-	-	22 R	19 R	21 R
Cefuroxima (30 ug)	≥ 19	< 19	0 R	28 S	20 S
Gentamicina (30 ug)	-	-	28 R	23 R	17 R
Amoxicilina (10 ug)	≥ 19	< 19	8 R	15 R	0 R

**Nota:** El guion indica que no se recomienda el ensayo de sensibilidad ya que la especie es una mala diana para el tratamiento con el antibiótico. Los aislamientos deben ser informados como resistentes sin hacer el ensayo (EUCAST, 2023).

## Anexo 6. Sensibilidad y resistencia de la cepa control (*Staphylococcus aureus* ATCC)



## Anexo 7. Antibiograma de bacterias Gram negativos

Resistencia Antimicrobiana para <i>Escherichia coli</i>						
Antibióticos	Valores de referencia		Muestras			
	S	R	1	2	3	4
Penicilina (10 units)	-	-	0 R	0 R	0 R	0 R
Estreptomicina (10 ug)	≥ 15	≤ 11	8 R	8 R	18 S	0 R
Cefuroxima (30 ug)	≥ 18	≤ 14	22 S	13 R	20 S	18 S
Gentamicina (30 ug)	≥ 45	≤ 36	21 R	15 R	20 R	9 R
Amoxicilina (10 ug)	≥ 14	≤ 13	0 R	0 R	0 R	0 R

Resistencia Antimicrobiana para <i>Shigella spp</i>						
Antibióticos	Valores de referencia		Muestras			
	S	R	1	2	3	4
Penicilina (10 units)	-	-	0 R	0 R	0 R	0 R
Estreptomicina (10 ug)	≥ 15	≤ 11	10 R	21 S	0 R	0 R
Cefuroxima (30 ug)	≥ 18	≤ 14	25 S	14 R	0 R	0 R
Gentamicina (30 ug)	≥ 45	≤ 36	13 R	19 R	15 R	15 R
Amoxicilina (10 ug)	≥ 14	≤ 13	0 R	0 R	0 R	0 R

Resistencia Antimicrobiana para <i>Pseudomonas maltophilia</i>						
Antibióticos	Valores de referencia		Muestras			
	S	R	1	2	3	4
Penicilina (10 units)	-	-	0 R	0 R	0 R	0 R
Estreptomicina (10 ug)	≥ 15	≤ 11	15 S	0 R	10 R	18 S
Cefuroxima (30 ug)	≥ 18	≤ 14	9 R	14 R	14 R	32 S
Gentamicina (30 ug)	≥ 45	≤ 36	28 R	16 R	23 R	25 R
Amoxicilina (10 ug)	≥ 14	≤ 13	0 R	0 R	0 R	0 R

Resistencia Antimicrobiana para <i>Klebsiella pneumoniae</i>				
Antibióticos	Valores de referencia		Muestras	
	S	R	1	2
Penicilina (10 units)	-	-	0 R	1 R
Estreptomicina (10 ug)	≥ 15	≤ 11	0 R	1 R
Cefuroxima (30 ug)	≥ 18	≤ 14	0 R	1 R
Gentamicina (30 ug)	≥ 45	≤ 36	0 R	20 R
Amoxicilina (10 ug)	≥ 14	≤ 13	0 R	1 R

Resistencia Antimicrobiana para <i>Mmorganella morgani</i>			
Antibióticos	Valores de referencia		Muestras
	S	R	1
Penicilina (10 units)	-	-	0 R
Estreptomicina (10 ug)	≥ 15	≤ 11	18 S
Cefuroxima (30 ug)	≥ 18	≤ 14	26 S
Gentamicina (30 ug)	≥ 45	≤ 36	16 R
Amoxicilina (10 ug)	≥ 14	≤ 13	0 R

**Nota:** Valores de referencia (CLSI, 2023)

**Anexo 8.** Fotografías del desarrollo de la investigación

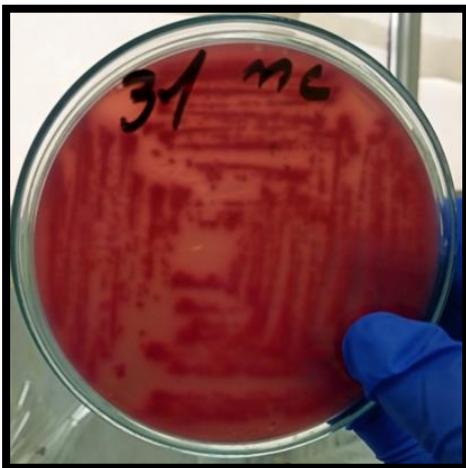
A



B



C



D



E



F



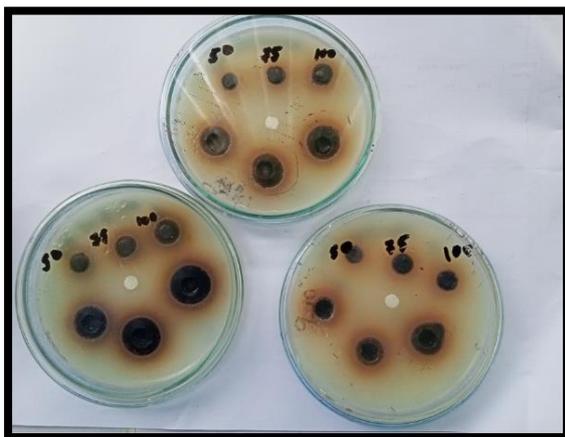
G



H



I



J



### Descripción:

A: Prueba de campo CMT

B: Transporte de muestras de campo a laboratorio

C: Crecimiento bacteriano

D: Prueba de oxidasa

E: Prueba de catalasa

F: Prueba de coagulasa

G: Test Streptex rapid Latex Agglutination

H: Test RapiD One System

I: Antibiograma sangre de drago

J: Antibiograma antibióticos

**Anexo 9.** Certificado de traducción



## CERTIFICADO DE TRADUCCIÓN

Loja 23 de noviembre de 2023

Lic.  
Nancy Correa Martínez.  
CC.EE. Idioma Inglés.

### CERTIFICA:

Haber traducido del Idioma Español al Idioma Inglés, EL RESUMEN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN: Aislamiento e identificación de bacterias causantes de mastitis bovina y evaluación de la actividad antimicrobiana de sangre de drago como opción terapéutica. Elaborado por: La Médica Veterinaria Zootecnista. Jhuliana Gabriela Arciniega Cuenca, con cédula de identidad

No. 1106091653

La técnica de traducción utilizada fue: Traducción Literal.

Lo certifico.

Atentamente

  
  
Lic. Nancy Correa Martínez  
C.I. 1101706602