

TÍTULO DEL PROYECTO

RESISTENCIA ANTIBIÓTICA DE BACTERIAS AISLADAS DE MASTITIS BOVINA EN LA PROVINCIA DE TRUJILLO

SIGLAS

REANTIMA

TIPO DE PROYECTO

Basica

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

Zoonosis y salud ambiental

DURACIÓN ESTIMADA

Fecha de inicio: 01/08/2019 Fecha de término: 20/06/2020

PARTICIPANTES

- MENDOZA MENDOCILLA ROXANA MARISOL (COORDINADOR(INV. PRINCIPAL)) — 000081079

INSTITUCIÓN O LUGAR A EJECUCARSE

- UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO. (Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia - Ciencias Agrarias)
- UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO. (Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia - Ciencias Agrarias)
- UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO - UPAO (Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia - Ciencias Agrarias)

I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La resistencia a los antibióticos se encuentra en aumento a nivel mundial de manera peligrosa, nuevos mecanismos de resistencia van apareciendo y propagándose en el mundo, poniendo en riesgo la capacidad para tratar las enfermedades infecciosas comunes (Organización Mundial de la Salud, 2018). La resistencia antibiótica es considerada como un fenómeno progresivo caracterizado por una defensa parcial o completa de los microorganismos al efecto del antibiótico; el origen de esta se deberá principalmente al uso indiscriminado e irracional de los antibióticos, así como la implementación de dosis incorrectas o aplicaciones con una duración inapropiada en las terapias (Villanueva y Morales, 2017).

En el mercado, los antibióticos se pueden adquirir sin receta médica, tanto para uso humano o veterinario, empeorando esta situación y favoreciendo la farmacoresistencia. Perú, es uno de los países que posee una deficiente orientación terapéutica normalizada, el personal de salud en humanos y en veterinaria tiene tendencia a prescribirlos, en tanto que, la población general a consumirlos, en exceso. Si no se detienen estas acciones y no se toman medidas inmediatas, el mundo estará abocado a una era post-antibióticos en la que muchas infecciones comunes y

lesiones menores volverán a ser potencialmente mortales (Organización Mundial de la Salud, 2018).

Entre las enfermedades más importantes que afectan al ganado bovino de leche se encuentra la mastitis, patología reconocida mundialmente por causar grandes pérdidas económicas, debido a la disminución de la producción de leche, aumento del número de vacas descartadas, gastos médicos y desecho de leche de animales tratados; y además, interviene en la transmisión de la resistencia a antimicrobianos debida al consumo de leche como alimento; siendo una amenaza para la salud mundial y la seguridad alimentaria (San Martín et al., 2002; Martínez et al., 2013; Gómez et al., 2015; Aponte, 2007).

En el contexto local, los estudios relacionados a la resistencia antibacteriana en mastitis bovina son pocos. Por ello, resulta importante identificar y comprender la etiología bacteriana de mastitis bovina y su resistencia a antibacterianos más usados; con el propósito de generar nuevos conocimientos que aporten a la actividad lechera, en asegurar resultados eficientes después del uso de antibacterianos, minimizando el riesgo de su elección y diseminación de la resistencia, y orientar estrategias para los programas de control y de vigilancia de susceptibilidad antibiótica; en ese sentido, lo que se propone es el estudio de resistencia antibiótica de bacterias aisladas de mastitis bovina en la provincia de Trujillo.

II. ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

La mastitis es un grave problema que afecta la industria lechera a nivel mundial; implica grandes pérdidas económicas debido a la disminución de la producción de leche, aumento del número de vacas descartadas, gastos médicos y desecho de leche de animales tratados (Martínez et al., 2013; Gómez et al., 2015). El mayor impacto económico de la mastitis bovina es por la presentación de la forma subclínica, ya que evoluciona sin presentar signos visibles de infección y pasa inadvertido por el personal involucrado, además de ser el tipo de mastitis más prevalente (Calderón, Rodríguez, Arrieta y Máttar, 2011).

En nuestra región, Rodríguez y Muñoz, 2015; determinaron la frecuencia y susceptibilidad antimicrobiana de bacterias causantes de mastitis en bovinos de un establo del distrito de Conache. Se detectaron 31 vacas con mastitis bacteriana, donde el 76% presentó bacterias gram negativas y 24% gram positivas. Las bacterias gram negativas más frecuentes fueron *Escherichia coli* (28%) y *Klebsiella* sp. (24%); y la bacteria gram positiva más frecuente fue *Staphylococcus aureus* (16%). *Pseudomonas aeruginosa* fue resistente a la mayoría de antibióticos, excepto a la eritromicina (susceptibilidad intermedia). *E. coli* presentó susceptibilidad intermedia a la eritromicina y resistencia a la oxacilina y rifampicina. *Staphylococcus aureus* presentó susceptibilidad intermedia a la clindamicina y eritromicina y resistencia a la ampicilina.

En Lurín, Lima, se realizó un estudio que determinó la resistencia antibiótica de los agentes bacterianos causantes de mastitis clínica en bovinos de cuatro establos de crianza intensiva. Las cepas bacterianas más comunes aisladas de muestras de leche con mastitis clínica de las vacas del estudio fueron *Staphylococcus aureus* ($24,84 \pm 6,76\%$), y *Streptococcus agalactiae* ($15,92 \pm 5,72\%$), en porcentajes importantes. La resistencia antibiótica frente a Penicilina, Cefalotina y Cefalexina es mayor al 50%. Se encontró asociación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre los casos de tratamientos con penicilina, cefalotina, cefalexina frente a las cepas bacteriana evaluadas con respecto a los establos de procedencia (Villanueva y Morales, 2019).

En Uruguay, se determinó que *Staphylococcus aureus* (21,4%) fue el principal agente etiológico con un alto porcentaje de resistencia a penicilina. El 39,1% de aislamientos de *S. aureus* fueron obtenidos de casos subclínicos y un 36% de casos clínicos fueron resistentes a la penicilina, y en *Staphylococcus coagulasa* negativos el 29,4% y 33,3%, respectivamente. Los aislamientos del género estreptococo resultaron susceptibles a penicilina, mientras que el 12,5% del género enterococo fueron resistentes (Giannechini y col., 2014).

Lindeman et al., 2014 en su investigación sobre la susceptibilidad a agentes antimicrobianos entre los patógenos causantes de mastitis bovina aislados de ganado lechero de América del Norte, 2002-2010, se aislaron cepas de *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, y se ensayó la susceptibilidad in vitro a los beta-lactámicos, macrólidos y las drogas lincosamidas. En general, los resultados sugirieron que los agentes patógenos causantes de mastitis en los Estados Unidos y Canadá no han mostrado ningún cambio sustancial en la sensibilidad in vitro a los beta-lactámicos, los macrólidos, lincosamidas y medicamentos probados durante los nueve años del estudio.

En Colombia se realizó un estudio para determinar la resistencia antimicrobiana de los patógenos involucrados en una región lechera. El grupo estafilococo coagulasa-negativo (SNC) fue el principal patógeno encontrado en el 46,7% de los aislamientos, seguido de *Staphylococcus aureus* (31,1%) y *Streptococcus* spp (20,7%). *Klebsiella pneumoniae* y *E. coli* tuvieron una baja ocurrencia (0,5%). CNS, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* spp presentaron un alto grado de resistencia a penicilina G y a eritromicina, además de multirresistencia (Sánchez, Gutiérrez y Posada, 2018).

En la investigación sobre la susceptibilidad antibiótica de patógenos productores de mastitis en ganado lechero del norte de Antioquia en Colombia, se reportó que *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes* y *Corynebacterium* spp. fueron los agentes etiológicos más frecuentes, con 29,8; 11,7 y 5,9%, respectivamente. Se halló una alta sensibilidad de las bacterias contagiosas para los antibióticos cloxacilina y cefoperazone (Ramírez, Fernández y Palacio, 2016).

III. FUNDAMENTACIÓN DE LAS ACTIVIDADES NO LECTIVAS

Las actividades no lectivas corresponden a la ejecución y tareas relacionadas del proyecto de investigación propuesto, que para el mismo se necesita de tiempo adicional.

III. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO (IMPORTANCIA, BENEFICIARIOS, RESULTADOS ESPERADOS)

La resistencia antibiótica es un fenómeno natural, pero el uso indebido de estos fármacos está acelerando este proceso, de modo que, actualmente constituye uno de los problemas más importantes en la salud pública; considerando su transmisión genética entre microorganismos, y también, a las personas a través de alimentos de origen animal como la leche. La persistencia de mastitis por bacterias en bovinos va en aumento y su tratamiento se vuelve más difícil debido a la pérdida de eficacia de los antibióticos. El origen de la resistencia antibiótica se debe principalmente al uso indiscriminado e irracional de los antibióticos, así como la implementación de dosis incorrectas o aplicaciones con una duración inapropiada en las terapias. La resistencia a los antibióticos en una mastitis bovina prolonga la disminución de la cantidad y calidad de leche, incrementa los costos médico veterinario y aumenta la morbilidad y mortalidad de los bovinos (OMS, 2018; Aponte, 2007; San Martín et al., 2002).

El departamento de La Libertad ocupa el cuarto lugar en producción de leche, después de Arequipa, Cajamarca y Lima. Son 280 mil litros de leche diario, los que produce la región liberteña, de los cuales, aproximadamente el 80% de la producción se registra en la parte costa (Gerencia Regional De Agricultura La Libertad – GRALL- 2017). El consumo per cápita de leche, actualmente es de 87 litros por persona al año y se espera que en los siguientes años, se aproxime a 120 litros, cifra, que recomienda la Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), con el propósito de aportar a una alimentación saludable de la población (Mendoza, 2018).

La demanda de leche de bovinos en el mercado tiene una tendencia positiva, pero debe ser concordante en salvaguardar la salud humana y animal, por ello, la comunidad científica, comprometida, debe establecer medidas de prevención para evitar la diseminación de la resistencia antibiótica y de bacterias patógenas junto a sus toxinas que aumenta el riesgo para la salud y seguridad alimentaria, debida al consumo de leche.

Las investigaciones publicadas respecto a resistencia antibiótica en La Libertad son pocos; por lo tanto, en la medida de poder generar mayores conocimientos en la actividad lechera y ser aplicados, se propone el presente estudio, respecto a la resistencia antibiótica, considerada un problema de salud pública, de bacterias aisladas de mastitis bovina en la provincia de Trujillo, porque resulta importante identificar y comprender la etiología bacteriana de mastitis bovina, y su resistencia y susceptibilidad a antibacterianos más usados en la región; en la medida que se

logren resultados eficientes que se tomen en cuenta para el uso de antibacterianos, que disminuya el riesgo de su elección y diseminación de la resistencia; y que por lo tanto, se traduzca en la elaboración y aplicación de estrategias para monitorear y vigilar programas de resistencia antibiótica promoviendo el uso razonable de antibióticos en el ganado vacuno de producción lechera.

También, mediante este estudio se determinará la etiología correspondiente a patógenos contagiosos o ambientales, para proponer medidas que focalicen y prioricen el manejo de prácticas de higiene durante el ordeño, e implementar medidas de control del ambiente, que favorezcan la producción lechera disminuyendo la presentación de casos de mastitis.

IV. OBJETIVOS

GENERAL:

Determinar y evaluar la resistencia antibiótica de bacterias aisladas de muestras de leche provenientes de vacas que presentan mastitis.

ESPECÍFICOS:

Identificación de bacterias aisladas de muestras de leche provenientes de vacas que presentan mastitis.

IV. OBJETIVOS

GENERAL:

Determinar y evaluar la resistencia antibiótica de bacterias aisladas de muestras de leche provenientes de vacas que presentan mastitis.

ESPECÍFICOS:

Identificación de bacterias aisladas de muestras de leche provenientes de vacas que presentan mastitis.

V. MARCO TEÓRICO

La leche es el principal alimento para niños y jóvenes, así como para los mamíferos jóvenes antes de que sean capaces de digerir otro tipo de alimento; la leche contiene altos niveles de proteína,

grasa, minerales y vitaminas, constituyéndose como un alimento indispensable en la dieta, igual que los derivados lácteos que se preparan a partir de ella. La calidad higiénica de la leche, así como la inocuidad de la misma, dependen de las buenas prácticas ganaderas, de una correcta rutina de ordeño y del cumplimiento de los tiempos de retiro, cuando se aplican tratamientos en animales de producción (Momtaz et al., 2012; en Martínez et al., 2013).

La producción y calidad de leche como la rentabilidad para los productores, se ve disminuida cuando se presentan patologías como la mastitis, la cual es una enfermedad inflamatoria de origen infeccioso, traumático o tóxico, de alta incidencia en los hatos lecheros a nivel mundial, causante de grandes pérdidas económicas para los productores, debidas al descenso de la producción de leche y a los costos de tratamientos, que también disminuye la calidad de la leche, impactando la inocuidad alimentaria (San Martín et al., 2002; Ramírez et al., 2001; en Martínez et al., 2013).

La mastitis es la inflamación mamaria caracterizada por alteraciones patológicas del epitelio glandular, las cuales se reflejan en cambios físicos y químicos de la leche. La mastitis puede ser causada por agentes físicos y por la interacción de algunos efectos ambientales (Blood & Radostis, 2002, en Gutiérrez y Agudelo, 2009). Una de las principales causas de la aparición de la mastitis es la presencia de microorganismos Gram Negativos y Gram Positivos que atacan y generan daños en la ubre de la vaca, que sumados a la resistencia bacteriana que oponen estos gérmenes a la acción de los antibióticos, presente en la mayoría de los casos, se torna una infección re emergente y reincidente. Al menos 140 microorganismos que causan mastitis han sido reportados, la mayoría de los cuales son de difícil erradicación (Philpot & Nickerson, 1992; en Gutiérrez y Agudelo, 2009).

No sólo los microorganismos son responsables de la mastitis, la realidad es que la enfermedad es el resultado de la interacción y cooperación de varios factores, entre los que se destacan: la higiene y el manejo de los animales, especialmente durante la ordeña; las características del ambiente productivo, y la susceptibilidad individual de las vacas (Philpot & Nickerson, 1992; en Gutiérrez y Agudelo, 2009).

Las formas más frecuentes de mastitis son: la subclínica y la clínica (Philpot & Nickerson, 1992; Kruze, 1988; en Gutiérrez y Agudelo, 2009). La subclínica es difícil de detectar, dado que la enfermedad transcurre sin provocar inflamación glandular visible, ni cambios organolépticos de la leche, aunque sí afecta la calidad fisicoquímica. Para su diagnóstico se requieren análisis de laboratorio que detecten la presencia de microorganismos causantes o el recuento de células somáticas en el fluido lácteo, y es de 10 a 40 veces más frecuente que la clínica. La forma clínica de la enfermedad presenta manifestaciones externas de naturaleza inflamatoria en la glándula, detectables por análisis clínico, secreciones lácteas alteradas y reacción sistémica (Tinsky & Zagrir, 1995; en Gutiérrez y Agudelo, 2009).

Las medidas básicas de control de los organismos contagiosos apuntan a la prevención, a evitar

que se produzcan las infecciones intramamarias. Estas medidas consisten en la práctica de un ordeño higiénico, el secado y el tratamiento antibiótico de mastitis clínicas. Estas medidas tradicionales logran reducir la incidencia de mastitis por *S. aureus*; sin embargo, en muchos casos, el nivel de infección puede ser tan elevado, que puede desencadenar mastitis clínica; con el agravante de originar resistencia bacteriana (Carrión, 2002; en Gutiérrez y Agudelo, 2009).

La resistencia se define como la relativa ausencia de susceptibilidad de una bacteria a un tratamiento en particular y se mide en base en la concentración mínima inhibitoria (CMI). La resistencia se debe a mutaciones del genoma bacteriano que pueden ser mutaciones puntuales, deleciones, inversiones o inserciones o bien, ocurre por recepción horizontal de genes de resistencia (transferencia génica horizontal) (Cabrera & Mejía, 2008; en Martínez et al., 2013).

Aunque la resistencia es un proceso normal dentro de la biología de los microorganismos, algunos factores pueden favorecer el desarrollo de la misma, dentro de estos se destacan el uso indiscriminado de antibacterianos, la utilización de los mismos en dosis subterapéuticas, la formulación de estos fármacos como promotores de crecimiento, residualidad de antimicrobianos en alimentos de origen animal, administración de antibacterianos por personal no autorizado, formulación de antibacterianos sin diagnósticos confirmados y suspensión de tratamientos antes de su culminación, entre otros. Es así como, el antibacteriano seleccionado no solamente debe actuar contra el agente causal, sino también cumplir con la concentración mínima inhibitoria en la glándula mamaria con un tiempo de permanencia suficiente para cumplir su acción (Parada et al., 2011 y Betancourt et al., 2003; en Martínez et al., 2013).

La mastitis es la principal enfermedad infecciosa en ganado vacuno lechero y es responsable de grandes transformaciones económicas o pérdidas en la producción de leche. Además, representa la razón principal en el uso de antimicrobianos en animales en todo el mundo. *Staphylococcus* spp. es el agente etiológico que prevalece en una mastitis subclínica, es considerada la especie más patógena y se caracteriza por una elevada capacidad de invasión con la formación de tejido fibroso en el sitio de la infección, que conduce a los casos crónicos que se caracterizan por bajas tasas de curación. Además, *Staphylococcus* spp. coagulasa negativo es causa etiológica emergente de mastitis subclínica. *S. aureus*, es resistente a múltiples antimicrobianos utilizados comúnmente en el tratamiento de la mastitis (Kowalski et al., 2015)

La aparición de resistencia a los antimicrobianos tiene consecuencias en la salud humana y animal. La presión selectiva impuesta por el uso constante de antimicrobianos y la presencia de genes de resistencia son las características más importantes en la ocurrencia de este fenómeno. Varios estudios con microorganismos aislados de la leche de vacas con mastitis reportan diferentes patrones de susceptibilidad a los agentes antimicrobianos. Sin embargo, hay una falta de información con respecto a los cambios temporales en la susceptibilidad de estos patógenos a los agentes antimicrobianos utilizados en el tratamiento de esta enfermedad (Kowalski et al., 2015).

La mastitis es un problema importante en el ganado lechero y puede poner en peligro la lactancia normal. Los patógenos que causan mastitis incluyen a *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Mycoplasma*, *Pasteurella*, *E. coli* y *Streptococcus* (Kandasamy et al, 2011; en Van Alfen, 2014).

Los agentes terapéuticos para el tratamiento de la mastitis aprobados por la FDA son novobiocina, pirlimicina, y estreptomicina. Cualquiera de estos antibióticos se pueden utilizar solos o en combinación con penicilina (Wagner & Erskine, 2006; en Van Alfen, 2014). Otros antibióticos intramamarios aprobados contra la mastitis son amoxicilina, cefapirina, cloxacilina, hetacilina, y lincomicina (Wagner & Erskine, 2006; en Van Alfen, 2014). La eritromicina también está aprobado por la FDA en la forma de un antibiótico inyectable. Además de éstos, también se recomiendan los betalactámicos, cefalosporinas, la neomicina, y las tetraciclinas (Van Alfen, 2014).

Los antibióticos y sulfas en medicina humana y veterinaria constituyen una de las principales herramientas terapéuticas utilizadas en el control y, en algunos casos, en la erradicación de enfermedades infecciosas de origen bacteriano. Sin embargo, existen numerosas publicaciones internacionales en el ámbito de la producción animal, incluyendo al ganado lechero, que señalan la existencia de multiresistencia bacteriana, donde se indica además que las bacterias adquieren resistencia no solo a antimicrobianos de una misma familia, sino también a drogas con diferentes estructuras y mecanismos de acción (Stephan & Rusch, 1997; Martel et al., 2000; en San Martín et al., 2002).

VI. HIPÓTESIS

Existen casos de resistencia antibiótica de bacterias que causan mastitis bovina en la Provincia de Trujillo.

VII. METODOLOGÍA

Área de estudio

La presente investigación se realizará en la provincia de Trujillo del departamento de La Libertad (Perú).

Tamaño de la población muestral

El proyecto se basa siguiendo un diseño de estudio transversal (Beltrán, 2014).

Los datos sobre la población de establos lecheros y vacas de la provincia de La Libertad fueron recogidos del Portal Agrario de la Dirección Regional de Agricultura de La Libertad (Anexo 1).

Tamaño de la muestra

Para el cálculo del número de establos lecheros muestreados y del número de vacas muestreadas; se estimará siguiendo lo propuesto por Mateu y Casal, (2003) y Fernández (2001), considerando para el muestreo aleatorio, un nivel de confianza del 95 % para resultados esperados 50%.

MATERIAL BIOLÓGICO

Muestras de leche fresca de vacas en producción.

Criterios de Inclusión

Muestras de leche fresca provenientes de vacas que presentan mastitis clínica y subclínica, de los diferentes establos de la Provincia de Trujillo.

Criterios de exclusión

Muestras de leche fresca provenientes de vacas que no presentan mastitis clínica ni subclínica, de los diferentes establos de la Provincia de Trujillo.

Las muestras serán procesadas en el Laboratorio de Medicina Veterinaria de la Universidad privada Antenor Orrego de Trujillo.

Métodos y técnicas

El muestreo se realizará en horas de la mañana en horario de ordeño. Se iniciará con la limpieza del pezón con alcohol isopropílico, descartando los primeros cuatro chorros de leche para poder tomar el quinto chorro en frasco estéril, se rotularán con datos de procedencia, número de vaca y cuarto afectado; poniendo las muestras en un cooler, el cual permitirá mantener la temperatura a 4°C aproximadamente, hasta llegar al laboratorio (Villanueva y Morales, 2017). Se considerará un consentimiento firmado de los dueños o responsables para mantener en el anonimato la identidad de los establecimientos muestreados.

Prueba de California para Mastitis (CMT)

La prueba de CMT es una prueba de campo de fácil manejo y buena sensibilidad que se fundamenta en la capacidad que tiene el reactivo Lauril Sulfato de Sodio para reaccionar con el ácido desoxirribonucleico (ADN) celular produciendo viscosidad directamente proporcional al número de células somáticas presentes en la muestra de leche.

Una vez que la vaca esté lista para ser ordeñada con pezones limpios y secos, se escurrirán los 3

ó 4 primeros chorros de leche de cada pezón en los compartimentos de la bandeja apropiada. Se inclinará la bandeja en un ángulo de 60° para igualar la cantidad de leche en cada uno (debiendo quedar entre 2 y 4mL de leche). Se agregará una cantidad igual de reactivo y se iniciará un proceso suave de agitación por rotación durante 15 a 20 segundos. Se leerá e interpretará la prueba de inmediato de acuerdo a un precipitado: de acuerdo al siguiente cuadro:

Grado de CMT	Rango de Células Somáticas	Interpretación
N (Negativo)	0 – 200,000	Cuarto Sano
T (Trazas)	200,000 – 400,000	Mastitis Subclínica
1	400,000 – 1,200,000	Mastitis Subclínica
2	1,200,000 – 5,000,000	Infección Seria
3	Más de 5,000,000	Infección Seria

Fuente:(Mellenberger, 2000, en Acuña, 2008)

Cultivo Microbiológico y Pruebas Bioquímicas

Las muestras se sembrarán por estría en agar sangre y agar Mac Conkey, e incubadas a 37 °C por 24-48 h. Se observará la morfología de las colonias y se aislarán en cultivo puro para su identificación. A cada cultivo se le realizará la tinción de Gram para confirmar su pureza y diferenciar a las bacterias gram positivas y gram negativas (Amand de Mendieta et al., 2001 citado en Rodríguez y Muñoz, 2017)

De los cultivos de agar sangre se observará el tipo de hemólisis de las colonias. Se utilizará la prueba de catalasa para diferenciar *Staphylococcus* de *Streptococcus*. La prueba de coagulasa en tubo diferenciará *S. aureus* y otros *Staphylococcus* coagulasa positiva (SCP) de los SCN. Se sembrarán en agar manitol salado para diferenciar a las bacterias del género *Staphylococcus*.

(Mac Faddin, 2000; Sacsquispe y Ventura, 2001 citado en Rodríguez y Muñoz, 2017).

Se realizarán pruebas bioquímicas diferenciales en agar-hierro-triple azúcar (TSI) a las colonias de bacilos gram negativos para identificar bacterias fermentadoras de glucosa, lactosa o sacarosa, y si hay o no producción de gas (H_2S). En la prueba de agar hierro-lisina (LIA) se observará la decarboxilación de lisina o desaminación de lisina. También, se realizarán las pruebas de citrato de Simmons, hidrólisis de úrea, producción de indol, rojo de metilo, Voges Proskauer y caldo glutamato (Mac Faddin, 2000; Sacsquispe y Ventura, 2001 citado en Rodríguez y Muñoz, 2017).

Determinación de Resistencia Antibiótica - Kirby Bauer

La cepa bacteriana se transferirá a un tubo de 5mL con caldo de tripticasa de soya, luego se incubará a una temperatura aproximada de 37°C hasta que alcance el nivel estándar de turbidez 0,5 en la escala de Mc Farland (Aponte, 2007). Cinco minutos después, se sumergirá un hisopo estéril en la suspensión. Se inoculará sobre la superficie de la placa de agar Muller Hinton; se procederá a inocular con el hisopo en tres direcciones diferentes para así asegurar una distribución uniforme del inóculo; se dejará la placa a temperatura ambiente durante 5 minutos, e inocularán los discos de antibióticos con una pinza estéril, para continuar con la incubación durante 24 horas a 37°C; y posteriormente con la lectura de las zonas de inhibición (Velásquez y Sacsquispe, 2002) que varíaran según la bacteria aislada y el antibacteriano usado (Penicilina, Gentamicina, Cefalotina, Enrofloxacino, Amikacina, Estreptomina, Tetraciclina, Cefalexina, Ampicilina, Clindamicina, Doxiciclina, Eritromicina, Oxacilina y Rifampicina).

PROCESAMIENTO Y ANALISIS DE LA INFORMACIÓN

Los resultados se analizarán mediante la prueba de chi cuadrado ($p < 0.05$), midiendo la asociación entre resistencia antibiótica y el diagnóstico bacteriano de las muestras aisladas de mastitis bovina pertenecientes a los establos evaluados (Villanueva y Morales, 2017).

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Acuña, V., Rivadeneira, A. (2008). Aislamiento, identificación y antibiograma de patógenos presentes en leche con mastitis en ganaderías bovinas de la provincia de Pichincha. Sangolquí. Escuela Politécnica del Ejército Departamento de Ciencias de la Vida Carrera de Ciencias Agropecuarias. Disponible en <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/2553>

<http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/2553/1/T-ESPE-IASA%20I-003435.pdf>

Aponte, Florentín. (2007). Perfil de resistencia in vitro a antimicrobianos de cepas causantes de mastitis aisladas de leche cruda bovina en establecimientos de pequeña y mediana producción In

vitro. Servicio Nacional de Calidad y Salud Animal. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud*, Vol. 5(1). Junio 2007. Recuperado de <http://revistascientificas.una.py/index.php/RIIC/article/view/329/256>

Beltrán O., R. (2014). Metodología de la Investigación Científica. Orientada a las Ciencias Bio-Agrarias y Ambientales. Trujillo, Perú: CONCYTEC/FONDECYT.

Calderón, A., Rodríguez, V., Arrieta, G., Máttar, S. (2011). Prevalencia de mastitis bovina en sistemas doble propósito en Montería (Colombia): etiología y susceptibilidad antibacteriana. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 24: pp19-28. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/rccp/v24n1/v24n1a04.pdf>

Fernández S., Pita. (2001). Determinación del tamaño muestral. *Cad Aten Primaria* 3: 138-14. 1-6

Gerencia Regional de Agricultura de La Libertad-GRALL- (2017). Portal Agrario Regional Noticias. Recuperado de <http://www.agrolalibertad.gob.pe/> - <http://www.regionlalibertad.gob.pe/noticias/regionales/7888-premiar-on-a-mejores-establos-lecheros-de-la-cuenca-la-libertad>

Gianneechini, R., Concha, C., Delucci, I., Gil, J., Salvarrey, L. y Rivero, R. (2014). Mastitis bovina, reconocimiento de los patógenos y su resistencia antimicrobiana en la Cuenca Lechera del Sur de Uruguay. *VETERINARIA* (Montevideo) - Vol. 50. Recuperado de <http://www.revistasmvu.com.uy/component/content/article/74-cientificos/266-cientifico-mastitis-bovina-reconocimiento-de-los-patogenos-y-su-resistencia-antimicrobiana-en-la-cuenca-lechera-del-sur-de-uruguay.html>

Gómez, O., Santivañez, C., Arauco, F., Espezua, O., Manrique, J. (2015). Criterios de interpretación para California Mastitis Test en el diagnóstico de mastitis subclínica en bovinos. *Rev. investig. vet. Perú*. Vol.26. Lima. Versión impresa ISSN 1609-9117. DOI: <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v26i1.10912>

Gutiérrez, L., Agudelo D. (2009). Control del crecimiento In Vitro sobre cepas Gram positivas y Gram negativas productoras de mastitis. *Revista Lasallista de Investigación. Colombia*. Vol. 6. pp 67-74.

Kowalski, A., Maboni, G., Espindola, J., Foletto, A., Bandeira, G., Pötter, L., Botton, S., Castagna, A. (2015). Temporal profile of antimicrobial resistance exhibited by strains of *Staphylococcus* spp. isolated from cases of bovine mastitis for 20 years (1992-2011). *Cienc. Rural* Vol.45 No.6. On-line version ISSN 1678-4596. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20140928>

Lindeman, C., Portis, E., Johansen L., Mullins, L., Stoltman, G. (2014). Susceptibility to antimicrobial agents among bovine mastitis pathogens isolated from North American dairy cattle,

Martínez, D., Cruz, A., Moreno, G. (2013). Resistencia de las bacterias causantes de mastitis bovina frente a los antimicrobianos más frecuentes. Artículos de Revisión. Fundación Universitaria Juan de Castellano. Colombia. *Conexión Agropecuaria JDC Vol. 3* pp. 53 – 73. Disponible en: <http://www.revistasjdc.com/main/index.php/conexagro/article/view/273/265>

Mateu, E y Casal, J. (2003). Tamaño de la muestra. Universidad Autónoma de Barcelona. Rev. Epidemiol. Med. Prev. 1: 8-14

Mendoza, R. (2018). Prevalencia de mastitis bovina subclínica en el distrito de Moche, Trujillo - La Libertad. Memorias. XLI Reunión Científica Anual – 2018. Asociación Peruana de Producción Animal. Recuperado de https://www.researchgate.net/profile/Uri_Perez_Guerra/publication/330082954_CHARACTERIZACION_DE_EXPERIENCIAS SOBRE_INSEMINACION_ARTIFICIAL_EN_OVINOS_EN_LA_SIERRA_PERUANA/links/5c2c91f3a6fdccfc70774029/CARACTERIZACION-DE-EXPERIENCIAS-SOBRE-INSEMINACION-ARTIFICIAL-EN-OVINOS-EN-LA-SIERRA-PERUANA.pdf

Organización Mundial de la Salud. (2018). Resistencia a los antibióticos. Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>

Ramírez, N., Fernández, J. y Palacio, L. (2016). Tasa de incidencia de mastitis clínica y susceptibilidad antibiótica de patógenos productores de mastitis en ganado lechero del norte de Antioquia, Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria* N° 36. Pp 75-87.

DOI: <https://doi.org/10.19052/mv.5173>

Rodríguez, R. y Muñoz, E. (2017). Frecuencia y susceptibilidad antimicrobiana de bacterias causantes de mastitis en bovinos de un establo de Trujillo, Perú *Rev. investig. vet. Perú vol.28* no.4. DOI: <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v28i4.13874>

Sánchez, M., Gutiérrez, N. y Posada, I. (2018). Prevalencia de mastitis bovina en el Cañón de Anaime, región lechera de Colombia, incluyendo etiología y resistencia antimicrobiana. *Rev Inv Vet Perú*, 29(1): 226-239. DOI: <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v29i1.14084>

San Martín, B., Kruze, J., Morales, A., Agüero, H., León, B., Espinoza, S., Iragüen, D., Puga, J. y Borie, C. (2002). Resistencia bacteriana en cepas patógenas aisladas de mastitis en vacas lecheras de la V Región, Región Metropolitana y Xª Región, Chile. *Arch. Med. Vet.* XXXIV, N° 2. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2002000200008>

Van Alfen, Neal K. (2014). Encyclopedia of agriculture and food systems. University of California, Davis, Ca, USA. Vol. 1. Copyright ELSEVIER. Pág. 354. Disponible en:

[https://books.google.com.pe/books?id=Y-](https://books.google.com.pe/books?id=Y-VfAwAAQBAJ&pg=PA354&lpg=PA354&dq=Wagner+y+Erskine+2006&source=bl&ots=tzS7RgOCXf&sig=Zv68WqpReuZ_ABm9GOvLLs9b80&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=Wagner%20y%20Erskine%202006&f=false)

[VfAwAAQBAJ&pg=PA354&lpg=PA354&dq=Wagner+y+Erskine+2006&source=bl&ots=tzS7RgOCXf&sig=Zv68WqpReuZ_ABm9GOvLLs9b80&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=Wagner%20y%20Erskine%202006&f=false](https://books.google.com.pe/books?id=Y-VfAwAAQBAJ&pg=PA354&lpg=PA354&dq=Wagner+y+Erskine+2006&source=bl&ots=tzS7RgOCXf&sig=Zv68WqpReuZ_ABm9GOvLLs9b80&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=Wagner%20y%20Erskine%202006&f=false)

Velásquez, J. y Sacsquispe, R. 2002. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Instituto Nacional de Salud. Perú; 30. 1-67.

Recuperado de

<http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/manual%20sensibilidad%202.pdf>

Villanueva, T. y Morales, S. (2017). Resistencia antibiótica de patógenos bacterianos aislados de mastitis clínica en bovinos de crianza intensiva. *REDVET Rev. Electrón. vet. Volumen 18*. Nº 12.

Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/636/63654640046.pdf>

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES		
ACTIVIDAD	INICIO	FIN
Informe parcial del trabajo	01/08/2019	03/02/2020
INFORME PARCIAL DEL PROYECTO	01/08/2019	03/02/2020
Informe Parcial del Proyecto	01/08/2019	03/02/2020
INFORME FINAL DEL PROYECTO	03/05/2020	20/06/2020
Informe Final del Proyecto	30/05/2020	20/06/2020

PRESUPUESTO			
DESCRIPCION	CANTIDAD	PRECIO UNITARIO	PRECIO PARCIAL
REACTIVOS E INSUMOS	2 UNI	150	300
MATERIAL DE VIDRIO	3 UNI	11	33
REACTIVOS E INSUMOS	3 UNI	260	780
REACTIVOS E INSUMOS	2 UNI	162	324
REACTIVOS E INSUMOS	2 UNI	335	670
REACTIVOS E INSUMOS	2 UNI	422	844
REACTIVOS E INSUMOS	5 UNI	55	275
REACTIVOS E INSUMOS	2 UNI	50	100
MATERIAL DE VIDRIO	23 UNI	35	805
REACTIVOS E INSUMOS	5 UNI	317	1585
Librerías, Programas, Licencias, Plantillas de Diseño, etc.	1 UNI	1000	1000
REACTIVOS E INSUMOS	2 UNI	422	844
CONSULTOR	1 UNI	1000	1000
TRANSPORTE LOCAL	5 UNI	400	2000
Libros y/o revistas	1 UNI	1000	1000
REACTIVOS E INSUMOS	10 UNI	16	160
MATERIAL DE VIDRIO	200 UNI	35	7000
Fotocopiado y/o Impresiones	1 UNI	500	500
REACTIVOS E INSUMOS	2 UNI	390	780
Total 20000			