

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

ESCUELA DE POSGRADO

**UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
AGRARIAS**



TESIS:

**Caracterización y susceptibilidad antimicrobiana de
Staphylococcus aureus en leche con mastitis subclínica bovina,
en tres comunidades de Allpachaka - Ayacucho 2024**

Para optar el grado académico de:

**MAESTRA EN CIENCIAS, MENCIÓN EN SALUD
Y PRODUCCIÓN ANIMAL**

PRESENTADO POR:

Bach. Ruth PALOMINO MARTINEZ

ASESORA:

Mtra. Gloria Betti ADRIANZEN FACUNDO

AYACUCHO - PERÚ

2026

DEDICATORIA

A mi madre Marcelina Martínez Gutiérrez, por su amor, sacrificio y apoyo incondicional, que hicieron posible alcanzar esta importante meta.

A mi padre Óscar Palomino Maldonado, por sus enseñanzas y constante respaldo.

A mis hermanos, Gloria y Óscar Junior, por su cariño y palabras de aliento durante este camino.

A mi compañero de vida, Noé, por acompañarme en esta etapa de mi crecimiento personal y profesional.

Y, de manera muy especial, a mi hija, Aitana Sofía, por ser la mayor inspiración de mi vida. Este logro también es para ti.

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi más sincero agradecimiento a la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, por darme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría y contribuir a mi formación académica y profesional.

A mi asesora, Mtra. Gloria Betti Adrianzen Facundo, por su orientación, dedicación y valiosos aportes durante el desarrollo de la presente investigación.

A mi coasesora, Dra. Maritza Mercedes Calderón Sánchez, de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, por sus acertadas observaciones y recomendaciones, que contribuyeron al fortalecimiento de este trabajo.

Mi especial reconocimiento al Mg. Alfredo Pozo Curo, al Mtro. Julio Alberto Ruiz, al Mg. Florencio Cisneros Nina y al Mg. Tomas Yuret Miranda Tomasevich, por su apoyo, orientación y valiosas contribuciones brindadas durante las diferentes etapas de esta investigación.

Asimismo, agradezco a mi amiga Mg. Reyna Isabel Castilla Torres, por su apoyo, motivación y confianza durante este proceso académico.

Finalmente, expreso mi agradecimiento a todas las personas e instituciones que, de una u otra manera, contribuyeron al desarrollo y culminación de la presente tesis.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE ANEXOS	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
INTRODUCCIÓN	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
OBJETIVOS	5
I. REVISIÓN DE LITERATURA	6
1.1. Antecedentes	6
1.2. Marco conceptual	8
1.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	8
1.2.2. <i>Resistencia antimicrobiana (RAM)</i>	11
1.2.3. <i>Evaluación de susceptibilidad antimicrobiana</i>	13
1.2.4. <i>Importancia de la vigilancia de la resistencia</i>	14
1.2.5. <i>Mastitis subclínica bovina</i>	14
II. MATERIAL Y MÉTODOS	18
2.1. Lugar de estudio	18
2.1.1. <i>Trabajo de Campo</i>	18
2.1.2. <i>Trabajo de laboratorio</i>	19
2.2. Materiales de estudio	20
2.2.1. <i>Material biológico</i>	20
2.2.2. <i>Material de laboratorio</i>	20
2.2.3. <i>Insumos y reactivos</i>	21

2.2.4. Equipos	22
2.3. Población y muestra	23
2.4. Diseño y tipo de investigación	23
2.5. Procedimiento metodológico	24
2.5.1. Recolección de muestra de leche	24
2.5.2. Asilamiento bacteriológico de <i>Staphylococcus aureus</i>	25
2.5.3. Identificación fenotípica	26
2.5.4. Confirmación molecular mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	26
2.5.5. Determinación del perfil de susceptibilidad antimicrobiana	31
2.6. Técnicas e instrumentos de recolección de datos	32
2.7. Análisis estadístico	33
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
3.1. Características fenotípicas de <i>staphylococcus aureus</i>	34
3.2. Identidad molecular de <i>staphylococcus aureus</i>	37
3.3. Perfil de susceptibilidad antimicrobiana de <i>staphylococcus aureus</i>	39
3.4. Frecuencia de mastitis subclínica con <i>staphylococcus aureus</i>	43
3.5. prevalencia de mastitis subclínica	45
3.6. Discusión y resultados	47
CONCLUSIONES	49
RECOMENDACIONES	50
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
ANEXOS	58

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1.	Factores de virulencia de <i>Staphylococcus aureus</i> 11
Tabla 2.	Técnicas e instrumentos de recolección de datos utilizados en la investigación 32
Tabla 3.	Características fenotípicas de <i>S. aureus</i> en muestras positivas cultivadas de muestras (n=27) de cuartos mamarios de vacas en tres comunidades de la Microcuenca de Allpachaka. Ayacucho, 2024 34
Tabla 4.	Genotipo de <i>S. aureus</i> en muestras positivas cultivadas de muestras (n=27) de cuartos mamarios de vacas en tres comunidades de la Microcuenca de Allpachaka. Ayacucho, 2024 37
Tabla 5.	Perfil de susceptibilidad antimicrobiana de <i>Staphylococcus aureus</i> a partir de muestras positivas de cuartos mamarios de vacas en tres comunidades de la Microcuenca Allpachaka. Ayacucho, 2024 39
Tabla 6.	Frecuencia de mastitis subclínica con <i>S. aureus</i> a partir de muestras cultivadas T/+/++/+++ según cuartos mamarios en vacas de tres comunidades en la Microcuenca de Allpachaka. Ayacucho, 2024 43
Tabla 7.	Prevalencia de mastitis subclínica según grado de reacción a CMT en cuartos mamarios de bovinos en tres comunidades de la Microcuenca de Allpachaka. Ayacucho, 2024 45

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Interpretación de resultados de la prueba de califonia	16
Figura 2. Recolección de muestras en la comunidad de Llachoccmayo	18
Figura 3. Vista panorámica de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria – UNSCH	19
Figura 4. Laboratorios de Enfermedades Infecciosas Facultad de Ciencias y Filosofía Universidad Peruana Cayetano Heredia	20
Figura 5. Muestras de leche transportadas al laboratorio	25
Figura 6. Siembra de muestras de leche	25
Figura 7. Observación macroscópica de crecimiento de colonias	26
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa que muestra la amplificación del gen <i>coa</i> en aislamientos de <i>Staphylococcus aureus</i> . Carril M: marcador de peso molecular de 100 pb.	28
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa que muestra la amplificación del gen <i>femB</i> en aislamientos de <i>Staphylococcus aureus</i> . Carril M: marcador de peso molecular de 100 pb.	28
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa que muestra la amplificación del gen <i>nucA</i> en aislamientos de <i>Staphylococcus aureus</i> . Carril M: marcador de peso molecular de 100 pb.	30
Figura 11. Antibiograma del <i>S. aureus</i>	32
Figura 12. Gráfico de barras que muestra la susceptibilidad antimicrobiana de <i>Staphylococcus aureus</i> frente a diferentes antibióticos	40

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Protocolo de PCR para la detección del gen <i>nuc</i> en el aislamiento de <i>Staphylococcus aureus</i>	59
Anexo 2. Protocolo de PCR para la detección del gen <i>coa</i> en el aislamiento de <i>Staphylococcus aureus</i>	60
Anexo 3. Proceso para elaborar la parte estadística del trabajo	61
Anexo 4. Ficha de recolección de muestras de leche con mastitis subclínica	64
Anexo 5. Panel fotográfico	65

Resumen

La mastitis bovina constituye una de las principales enfermedades que afectan a la producción lechera, siendo *Staphylococcus aureus* uno de los agentes etiológicos de mayor importancia por su capacidad de generar infecciones persistentes y resistentes a los tratamientos antimicrobianos. El presente estudio tuvo como objetivo caracterizar fenotípica y genotípicamente cepas de *S. aureus* y evaluar su perfil de susceptibilidad antimicrobiana en leche de vacas con mastitis subclínica en tres comunidades de la microcuenca de Allpachaka, Ayacucho, durante el año 2024. Se recolectaron 392 muestras de leche de 98 vacas, realizándose el diagnóstico inicial mediante la prueba de California Mastitis Test (CMT), el aislamiento bacteriano en medios selectivos y pruebas bioquímicas, así como la confirmación molecular mediante PCR para la identificación de los genes *coa*, *femB* y *nucA*. La prevalencia de mastitis subclínica fue del 32,9 %, de las cuales el 6,9 % presentó aislamiento positivo a *S. aureus*. Las cepas mostraron características fenotípicas homogéneas, predominando colonias de color crema (74,1 %), y en el análisis genotípico todas resultaron positivas para los genes evaluados. En la prueba de susceptibilidad antimicrobiana, se observó alta resistencia frente a penicilina (92,6 %), clindamicina (66,7 %) y cefoxitina (48,1 %), mientras que la mayor sensibilidad correspondió a oxacilina (81,5 %). Estos resultados evidencian la presencia de *S. aureus* como agente causal de mastitis subclínica en la zona de estudio y revelan un preocupante patrón de resistencia antimicrobiana, lo que subraya la necesidad de implementar programas de monitoreo, uso racional de antibióticos y estrategias preventivas que contribuyan a mejorar la sanidad y productividad del sector lechero regional.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*; mastitis subclínica bovina; resistencia antimicrobiana; susceptibilidad antibiótica; leche bovina.

Abstract

Bovine mastitis is one of the main diseases affecting dairy production, with *Staphylococcus aureus* being one of the most important etiological agents due to its ability to cause persistent infections and resistance to antimicrobial treatments. The present study aimed to phenotypically and genotypically characterize *S. aureus* strains and evaluate their antimicrobial susceptibility profile in milk from cows with subclinical mastitis in three communities of the Allpachaka micro-basin, Ayacucho, during 2024. A total of 392 milk samples were collected from 98 cows. The initial diagnosis was performed using the California Mastitis Test (CMT), followed by bacterial isolation on selective media and biochemical tests, as well as molecular confirmation by PCR for the identification of the *coa*, *femB*, and *nucA* genes. The prevalence of subclinical mastitis was 32.9%, of which 6.9% showed positive isolation for *S. aureus*. The strains exhibited homogeneous phenotypic characteristics, with cream-colored colonies predominating (74.1%), and all isolates tested positive for the evaluated genes in the genotypic analysis. The antimicrobial susceptibility test revealed high resistance to penicillin (92.6%), clindamycin (66.7%), and cefoxitin (48.1%), while the highest sensitivity was observed to oxacillin (81.5%). These results demonstrate the presence of *S. aureus* as a causal agent of subclinical mastitis in the study area and reveal a concerning pattern of antimicrobial resistance, highlighting the need to implement monitoring programs, rational antibiotic use, and preventive strategies to improve animal health and the productivity of the regional dairy sector.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; bovine subclinical mastitis; antimicrobial resistance; antibiotic susceptibility; bovine milk.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial una de las enfermedades con mayor impacto económico en la producción lechera es la mastitis bovina, siendo el *Staphylococcus aureus* uno de los principales agentes responsables, que tiene la capacidad de sobrevivir intracelularmente, además de poseer diferentes mecanismos de resistencia (Aliverti et al., 2021).

La mastitis subclínica es silenciosa y complicada de tratar, porque la vaca se encuentra aparentemente sana, sin embargo, hay una alteración de las características organolépticas de la leche, incremento del conteo de células somáticas en la leche, lo cual es un indicador de que se está dando un proceso inflamatorio a nivel de las ubres, además un incremento de la carga bacteriana y una disminución de la producción láctea (Reyes & Arguello, 2015). Para este tipo de mastitis, las pérdidas económicas son significativas debido a la disminución de la producción de leche que tienen una tendencia de persistir por un largo periodo y la cantidad de animales afectados es mayor (Valero-Leal et al., 2010).

El *Staphylococcus aureus* posee un patrón de resistencia antimicrobiana que es una problemática mundial que se viene incrementando, según (García, 2012), cada vez es más alarmante la situación de resistencia antimicrobiana en América Latina, debido a un número elevado de infecciones bacterianas en los animales, que son difíciles de tratar con los antibióticos. Esto ocurre por la evolución de las bacterias, que han generado cepas cada vez más resistentes a los tratamientos, convirtiéndose en un serio problema de salud pública.

Esta investigación es de gran valor, ya que permitió aislar y caracterizar a este agente, además de evaluar su perfil de susceptibilidad antimicrobiana. El análisis

genotípico de *S. aureus*, mediante la técnica de PCR para la identificación de genes de resistencia como *coa*, *femB* y *nucA*, representa un aporte significativo para nuestra región. Considerando la presencia de casos de mastitis subclínica crónica asociados a *S. aureus*, y reconociendo su capacidad de desarrollar resistencia, este estudio contribuye a la elaboración de planes de segregación en la zona de intervención y fomenta la generación de futuras investigaciones en esta línea.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La mastitis subclínica es una enfermedad de alta prevalencia en la producción lechera. Al no presentar signos clínicos evidentes, suele pasar desapercibida si no se realiza un control diagnóstico constante, lo cual es frecuentemente deficiente en el campo, además es importante mencionar que esta enfermedad puede ocasionar grandes pérdidas económicas por la disminución de la producción y calidad láctea (Gonçalves et al., 2023). Se considera que uno de los agentes etiológicos más representativos de la mastitis subclínica es *Staphylococcus aureus*, la cual es una bacteria que puede establecer infecciones persistentes y difícil de tratar (Freu, Tomazi, & Filho, 2022).

Actualmente, los métodos fenotípicos convencionales permiten identificar *S. aureus*, pero no siempre garantizan precisión. Por lo cual, la detección de genes específicos como *coa*, *femB* y *nucA* mediante PCR es fundamental para confirmar su identidad molecular (Monistero et al., 2018).

Además, se sabe que la mayoría de cepas de *S. aureus* presentan una notable resistencia a antibióticos, lo cual dificulta su tratamiento eficaz. Evaluar el perfil de resistencia antimicrobiana mediante antibiograma es indispensable para conocer la situación actual en la zona y orientar un uso racional de antibióticos en el tratamiento de mastitis.

- **Problema general:**

- ¿Cuáles son las características y el perfil de susceptibilidad antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* en leche con mastitis subclínica bovina en tres comunidades de Allpachaka, Ayacucho – 2024?

- **Problemas secundarios:**

- ¿Qué características fenotípicas presentan las cepas bacterianas aisladas de leche con mastitis subclínica bovina?
- ¿Las cepas fenotípicamente identificadas como *Staphylococcus aureus* presentan los genes *coa*, *femB* y *nucA* que confirman su identidad molecular?
- ¿Cuál es el perfil de susceptibilidad antimicrobiana que presentan las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de leche con mastitis subclínica bovina?
- ¿Qué proporción de las muestras de leche con mastitis subclínica bovina contienen *Staphylococcus aureus*, confirmado mediante análisis fenotípico y molecular?

OBJETIVOS

Objetivo general:

Caracterizar y determinar el perfil de susceptibilidad antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* en leche con mastitis subclínica bovina en tres comunidades de Allpachaka, Ayacucho – 2024.

Objetivos específicos:

- Caracterizar fenotípicamente las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de leche con mastitis subclínica bovina.
- Confirmar la identidad molecular de las cepas fenotípicamente identificadas como *Staphylococcus aureus*, mediante la detección de los genes *coa*, *femB* y *nucA*.
- Determinar el perfil de susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de leche con mastitis subclínica bovina.
- Cuantificar la proporción de muestras de leche con mastitis subclínica bovina que presentan *Staphylococcus aureus*, mediante análisis fenotípico y molecular.

I. REVISIÓN DE LITERATURA

1.1. Antecedentes:

Hamdan-Partida et al. (2015), determinaron como se puede hacer la identificación del *Staphylococcus aureus* por la presencia de los genes *nucA* y *femB* para lo cual analizaron 196 aislados de *S. aureus* que ya previamente se identificaron por métodos microbiológicos, obteniendo los resultados donde 186 fueron coagulasa positivo, 184 presentaron el gen *nucA* y todos portadores del gen *femB*, concluyendo a que la detección de los genes *nucA* y *femB* identifican al *Staphylococcus aureus*, pues solo este posee ambos genes.

Soltan Dallal et al. (2016), hicieron un estudio sobre el polimorfismo del gen de la coagulasa de aislados de *Staphylococcus aureus* de productos lácteos y otros alimentos en Teherán, Irán, considerando que la coagulasa es un indicador para la identificación de cepas de *S. aureus*, en muchos estudios epidemiológicos, en esta investigación utilizaron un método interno de PCR-RFLP, aislando un total de 100 cepas de muestras de alimentos. Los resultados mostraron que la amplificación de genes de coagulasa de *S. aureus* produjo diferentes productos de PCR. Los aislados se agruparon en 18 genotipos utilizando los resultados del análisis RFLP de los genes. En este estudio, se ha demostrado que los aislados de *S. aureus* incluyen más de un genotipo de coagulasa, pero solo predominaban unos pocos genotipos de coa.

Aliverti et al. (2021), determinaron la susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *S. aureus* aisladas de muestras de leche de vacas Holstein en la provincia de Buenos Aires de Argentina. Aislaron y analizaron 44 cepas de *Staphylococcus aureus* utilizando difusión de disco en agar (DDA) de los siguientes antimicrobianos: oxacilina, cefoxitina,

clindamicina, eritromicina, rifampicina, rifaximina y cefacetrilo/rifaximina. Encontrándose un 2,27 % de cepas resistentes a clindamicina y eritromicina. El 95,45 % presentó sensibilidad a los antibióticos ensayados. Considerando los halos de inhibición presentados se aisló 17 colonias, de las cuales se identificó 10 muestras positivas a *S. aureus*, con estas muestras positivas se realizó una segunda prueba de DDA. Se obtuvo resultados de resistencia a eritromicina con un 20%, y 70% para rifampicina y rifaximina, lo cual mostro cierta resistencia existente del *S. aureus*.

Valero-Leal et al. (2010), evaluaron en Venezuela el comportamiento de *Staphylococcus aureus* frente a diferentes antimicrobianos, utilizando aislamientos provenientes de leche de cuartos mamarios de vacas con mastitis subclínica y de leche de tanque. En total, se estudiaron 88 cepas, de las cuales 81 procedieron de cuartos mamarios y 7 de leche de tanque. La susceptibilidad antimicrobiana fue evaluada mediante el método de difusión en disco en agar frente a 14 antimicrobianos. En los aislamientos de cuartos mamarios, las mayores frecuencias de resistencia correspondieron a penicilina (12,3 %), enrofloxacin (8,6 %) y ciprofloxacina y estreptomycin (4,9 % cada una); mientras que para eritromicina se registró 3,7 %, y para clindamicina y rifampicina, 2,5 % cada una. Por otro lado, entre los aislamientos de leche de tanque se observó resistencia a penicilina y tetraciclina (28,6 % cada una) y a clindamicina (14,3 %).

Quispe et al. (2021), recolectaron muestras del fundo Allpachaka de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, de 94 vacas lecheras utilizando la prueba de CMT, obteniendo 35 bovinos con mastitis subclínica, luego en el laboratorio realizaron el aislamiento e identificación de *S. aureus* (35,2%) y *S. agalactiae* (12,7%) y posteriormente un antibiograma utilizando el método de Bauer. Los resultados indicaron que *Staphylococcus aureus* fue resistente a la penicilina en 52% y la amoxicilina más ácido clavulánico en 28% y sensible en un 100% para la cefalexina, tetraciclina y sulfatrimetoprima.

1.2. Marco conceptual

1.2.1. *Staphylococcus aureus*:

Este microorganismo fue descubierto en 1880 por el cirujano escocés Alexander Ogston (1844-1929), quien encontró a esta bacteria al observar en el microscopio una muestra de pus de una herida quirúrgica de uno de sus pacientes. En el año de 1882, Ogston le da el nombre de “*Staphylococcus*”, proveniente del griego “*Staphylo*” que significa “racimo de uvas”. En el 1884, Anton J. Rosenbach (1842-1923) un cirujano alemán, identifica dos cepas y las denomina de acuerdo a la pigmentación que producían, *Staphylococcus aureus*, del latín “*aurum*” con pigmento color oro, y *Staphylococcus albus* (actualmente denominado *Staphylococcus epidermidis*), del latín “*albus*” con pigmento blanco. (Orenstein, 2017 citado en Pasachova Garzón et al., 2019).

El *Staphylococcus aureus* es una bacteria que esta diseminada en el medio ambiente, porque posee características de virulencia y presenta resistencia contra los antimicrobianos, esto es motivo para que sea un grave problema para la salud, además su distribución es a nivel mundial, teniendo una morbilidad y mortalidad considerable en el nivel comunitario e intrahospitalario (Zendejas-Manzo et al., 2014).

La relevancia de estudiar este patógeno radica en que su transmisión no se limita a los animales, sino que también puede producirse mediante fómites y el contacto directo entre personas, favoreciendo su diseminación (Zendejas-Manzo et al., 2014).

a) Características microbiológicas

El género *Staphylococcus* está constituido por cocos Gram positivos, que tienen un diámetro de 0.5 a 1.5 μm , se agrupan como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o en forma de racimos de uvas (Cervantes et al., 2014).

Staphylococcus aureus es un coco Gram positivo, agrupado en racimos, β hemolítico, catalasa y coagulasa positivo (Pasachova Garzón et al., 2019).

Actualmente se han identificado 35 especies conocidas y 17 subespecies del género *Staphylococcus*. Este género tiene una gran capacidad para adaptarse, por ello afectan a todas las especies de mamíferos, también a roedores comunes de laboratorio, lo cual facilita su transmisión y propagación, dándose con frecuencia casos de transmisión entre humanos-animales y viceversa (Zendejas-Manzo et al., 2014).

Una de las maneras de identificar al *S. aureus* es mediante PCR, por la presencia de genes como: *nucA*, *coa*, *femA* o *femB* y otros, otra de las características de virulencia es la detección del gen *mecA* que el marcador molecular de la resistencia a la meticilina (Hamdan-Partida et al., 2015).

En sus características macroscópicas las colonias de *S. aureus* se observan lisas, elevadas, brillantes y con bordes enteros, de consistencia cremosa y pigmentación amarilla a dorado por la producción de carotenoides, en su mayoría las cepas producen β -hemólisis o hemólisis total alrededor de las colonias cuando son cultivadas en agar sangre, además produce coagulasa (capacidad para coagular plasma), crece en medios de cultivo no selectivos por lo que se sugiere utilizar medio selectivos como el agar manitol salado o medio Chapman para su aislamiento, observándose una pigmentación de color amarillo en el manitol salado debido a que este fermenta el manitol (Cervantes et al., 2014).

b) Epidemiología:

El *Staphylococcus aureus* es el causante de una amplia variedad de enfermedades infecciosas como neumonía, infecciones cutáneas, septicemia e intoxicación alimentaria, entre otras (Hamdan-Partida et al., 2015).

Lo preocupante es que esta bacteria se encuentra presente en el aire, leche, agua potable, aguas residuales y en la comida o en el equipo donde los alimentos han sido elaborados; es importante señalar que a partir de la década de los 80, se ha incrementado

el número de bacteriemias producidas por *Staphylococcus aureus*, tanto adquiridas en la comunidad como hospitalarias (Zendejas-Manzo et al., 2014).

c) Presencia de *Staphylococcus aureus* en mastitis subclínica

El *Staphylococcus aureus* está considerado como el principal patógeno de causar mastitis a nivel mundial, aproximadamente un tercio de casos de mastitis subclínica y clínica en bovinos esta ocasionado por esta bacteria, es por este motivo que es un problema para la industria pecuaria (Adame-Gómez et al., 2021).

La mastitis subclínica generada por el *Staphylococcus aureus*, es debido a que esta bacteria puede vivir dentro o fuera de la glándula mamaria, piel del pezón, además la infección se puede transmitir a los demás cuartos mamarios y entre diferentes animales, por inadecuadas prácticas de manejo en el ordeño. Varias características de esta bacteria hacen que tenga una alta prevalencia y sea difícil erradicarlos (Aliverti et al., 2021).

d) Factores de virulencia

El *S. aureus* es una bacteria anaerobia facultativa, catalasa y coagulasa positivo; no esporulado, es muy resistente porque puede sobrevivir a muchas adversidades medioambientales; también produce gran variedad de enzimas y toxinas, fermenta el manitol (Hurtado et al., 2002).

Los factores de virulencia del *S. aureus* son diversos, desde su estructura hasta la producción de toxinas. Según Zendejas-Manzo et al. (2014), el *S. aureus* tiene la capacidad de producir toxinas y enzimas celulares que provocan intoxicaciones alimentarias severas. Además, señalan que la virulencia de esta bacteria se basa en tres factores: la adhesión bacteriana a la célula hospedadora, el daño con diseminación en los tejidos y los mecanismos de protección frente al sistema inmunitario del hospedador.

Tabla 1*Factores de virulencia de Staphylococcus aureus*

Componentes superficiales	Toxinas y enzimas extracelulares
1. Polisacárido capsular	1. Toxinas con actividad sobre membranas
2. Polisacárido extracelular	• Toxinas o hemolisinas α, β, γ, σ • Leucocidina
3. Proteínas superficiales	2. Toxinas con actividad de superantígenos
• Proteínas de unión a colágeno, Cna	• Enterotoxinas, A-E y G-J • Toxina del síndrome del choque tóxico 1, TSST-1 • Toxinas epidermolíticas o exfoliativas, A y B
• Proteínas de unión a fibronectina, FnBPA, FnBpB	3. Enzimas extracelulares
• Proteínas de unión a fibrinógeno, ClfA y ClfB	• Estafiloquinasa • Coagulasa • Hialuronidasa • Lipasa • Proteasa
• Proteína A, Spa	• ADNasa termoestable o termonucleasa • Catalasa

Fuente: Zendejas-Manzo et al., (2014)

1.2.2. Resistencia antimicrobiana (RAM)

La resistencia antimicrobiana es un fenómeno natural producido por los microorganismos como recurso de supervivencia, que reduce la capacidad microbicida que poseen los fármacos. Este proceso se acelera por el uso constante e irracional de antimicrobianos en seres humanos y animales (Bisso-Andrade, 2018).

La RAM es un problema creciente a nivel mundial. En América Latina, las infecciones bacterianas multidrogaresistentes se incrementan de manera alarmante. Este fenómeno, consecuencia de la evolución bacteriana, ha dado lugar a cepas más difíciles de tratar, ocasionando enfermedades graves asociadas o incluso la muerte (García, 2012).

El inadecuado tratamiento favorece el desarrollo de resistencia a los antimicrobianos comerciales y, al mismo tiempo, incrementa las pérdidas económicas en la industria láctea (Quispe et al., 2021).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la resistencia antimicrobiana (RAM) se encuentra entre los diez principales problemas de salud pública a nivel global, ya que causa aproximadamente 700 000 muertes anuales. Se proyecta que para el año 2050 la RAM podría ocasionar alrededor de 10 millones de decesos, superando a las neoplasias como principal causa de muerte (Herrero et al., 2024).

a) Resistencia antimicrobiana del *Staphylococcus aureus*

Dos años después de que comenzara el uso masivo de la penicilina para tratar infecciones bacterianas, en 1940, surgieron las primeras cepas de *Staphylococcus aureus* capaces de producir penicilinas. Para 1960, casi el 100% de las cepas ya eran resistentes a la penicilina. Los mecanismos de resistencia en *S. aureus* han sido descritos en detalle (Miranda, 2011).

El *Staphylococcus aureus*, tiene formas propias de resistencia a los fármacos, una forma es mediante la reducción de la permeabilidad de la membrana, lo cual impide la absorción y fluides de fármacos, favoreciendo la salida de fármacos la sobreproducción de β -lactamasa (Herrero et al., 2024).

También tiene una gran capacidad de adaptación a los antimicrobianos, porque posee tres mecanismos de resistencia a los antibióticos β -lactámicos: resistencia determinada por las enzimas penicilinasas o β -lactamasas, que desactivan al antibiótico; resistencia propia del *S. aureus* responsable de la resistencia a meticilina; resistencia por modificación de las proteínas de unión a penicilinas (PBPs). Además, *S. aureus* tiene la capacidad de manifestar tolerancia, un fenómeno en el que se separan los efectos inhibidores y bactericidas de los antibióticos β -lactámicos. El mecanismo clave de este proceso es la resistencia intrínseca, que probablemente sea más compleja, ya que diversos factores pueden influir en su expresión (Castellano & Perozo-Mena, 2010).

1.2.3. Evaluación de susceptibilidad antimicrobiana

La prueba de susceptibilidad a los antibióticos (AST) constituye un método *in vitro* que permite determinar la eficacia de un antimicrobiano frente a un microorganismo patógeno. Los resultados derivados del AST facilitan la selección de terapias antimicrobianas empíricas apropiadas antes de contar con información específica del aislado clínico (Audrey et al., 2017).

La determinación de la susceptibilidad y los patrones de resistencia antimicrobiana constituye una herramienta fundamental para establecer tratamientos eficaces frente a los agentes infecciosos. Esta información permite elegir el antimicrobiano más apropiado y definir su correcta forma de administración, considerando las características del microorganismo. Asimismo, contribuye a un empleo más responsable de estos fármacos, lo que puede limitar la aparición y propagación de microorganismos resistentes, disminuir los riesgos para la salud pública y reducir las consecuencias económicas asociadas a las infecciones en la producción lechera (Aliverti et al., 2021).

a) Método de AST

Los principales métodos de prueba de susceptibilidad a los antibióticos (AST) comprenden la prueba cualitativa de difusión en disco de Kirby-Bauer y los métodos cuantitativos, como la macro y microdilución en caldo, que también pueden llevarse a cabo mediante sistemas automatizados. En todos estos procedimientos, la interpretación de los resultados se basa en las directrices establecidas por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

En el método de Kirby-Bauer, se colocan discos de papel impregnados con una concentración específica de antibiótico sobre una superficie previamente inoculada con la bacteria de interés. Tras la incubación, se mide el diámetro de la zona de inhibición y los resultados se clasifican como susceptibles, intermedios o resistentes.

Por otro lado, los métodos cuantitativos permiten determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), definida como la menor concentración de un antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de la incubación. La determinación de la CMI es esencial para confirmar la resistencia bacteriana y evaluar la eficacia de nuevos antimicrobianos (Audrey et al., 2017).

1.2.4. Importancia de la vigilancia de la resistencia:

Los animales deben ser protegidos de la RAM con el cuidado adecuado basado en el cumplimiento de buenas prácticas ganaderas recomendadas por el Servicio Nacional de Sanidad Agraria – SENASA en el Perú, que establece la Organización Mundial de Sanidad Animal – OIE, el cual hace énfasis sobre el ejercicio veterinario, donde los profesionales deben ser responsables y prudentes al recetar medicamentos, los cuales deben adquirirse en lugares autorizados y suministrarlos en el tiempo establecido, con una dosis exacta («Gob.pe», 2023).

1.2.5. Mastitis subclínica bovina

El mercado exige leche de alta calidad, libre de residuos de medicamentos y con bajo contenido de células somáticas, para proteger la salud humana. La mastitis genera importantes pérdidas económicas en la producción lechera. Por ello, mantener la salud del sistema mamario es esencial para que las vacas alcancen su máximo potencial de producción (Maldonado et al., 2022)

La mastitis subclínica es el problema más frecuente y con mayor repercusión económica en las explotaciones lecheras a nivel global. La inflamación de la glándula mamaria afecta tanto la cantidad como la calidad de la leche, debido a alteraciones físicas y químicas, el incremento de células somáticas y eventualmente la pérdida de la capacidad secretora. Las pérdidas económicas directas son principalmente causadas por la reducción en la producción de leche. Además, se generan otros costos relacionados con el descarte

de leche, los tratamientos veterinarios, problemas reproductivos, el descarte de vacas y la reposición de animales (Aliverti et al., 2021).

La mastitis subclínica es una condición invisible y complicada de tratar, ya que la vaca parece estar sana, no presenta signos visibles de inflamación en la ubre y la leche no muestra cambios en sus características sensoriales. Sin embargo, el conteo de células somáticas en la leche se encuentra elevado, lo que refleja la respuesta inflamatoria, al igual que la cantidad de bacterias. Esto provoca una disminución en la producción de leche y altera su composición (Reyes & Arguello, 2015).

a) Diagnóstico de mastitis subclínica

❖ *Prueba de California Mastitis Test (CMT)*

El California Mastitis Test (CMT) es una técnica sencilla y de gran utilidad para la detección de mastitis subclínica, ya que permite estimar de manera aproximada el recuento de células somáticas presentes en la leche (incluyendo células epiteliales y leucocitos). Aunque no proporciona un valor numérico exacto, indica si el recuento celular es alto o bajo; por ello, cualquier resultado superior a una reacción mínima se considera sospechoso (Reyes & Arguello, 2015).

Se trata de una prueba rápida que emplea un reactivo compuesto por alquil lauril sulfonato de sodio al 3 %, el cual se mezcla en partes iguales con la muestra de leche. Este reactivo actúa disolviendo o rompiendo las membranas celulares externas y nucleares de los leucocitos, constituidas principalmente por lípidos, lo que provoca la liberación del ADN nuclear y la posterior formación de una masa fibrosa con aspecto gelificado (Maldonado et al., 2022).

Además, la prueba incorpora un indicador de pH, el púrpura de bromocresol, que permite evaluar la acidez de la muestra. La interpretación de los resultados se basa en el

grado de viscosidad del gel formado, lo que posibilita estimar de manera indirecta la concentración aproximada de células presentes en la leche (Tineo, 2015).

Figura 1

Interpretación de resultados de la prueba de california



Fuente: Citado por Bolaños et al., (2012)

❖ **Conteo de células somáticas (CCS):**

En condiciones normales, la leche contiene un número reducido de células somáticas cuando la glándula mamaria se encuentra sana. Estas células corresponden tanto a células del tejido epitelial como a células del sistema inmune, principalmente neutrófilos polimorfonucleares, granulocitos, macrófagos y linfocitos, cuya función biológica es participar en la defensa frente a infecciones de la ubre. El incremento del número de células somáticas se produce como respuesta a estímulos o procesos patológicos en la glándula mamaria, debido al aumento en la migración de células inmunes hacia la leche (Reyes & Arguello, 2015).

El CCS en muestras de leche de tanque constituye un indicador confiable de la prevalencia de mastitis en el hato. Se considera que un conteo superior a 200 000 células/ml es indicativo de mastitis subclínica. En hatos con programas efectivos de control, los conteos suelen mantenerse por debajo de 100 000 células/ml. Por el contrario, valores

superiores a 500 000 células/ml sugieren que al menos una tercera parte de las glándulas mamarias están infectadas, con una pérdida de producción de leche superior al 10 %, atribuible a la mastitis subclínica (García, 2004, citado por Bedolla et al., 2022).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Lugar de estudio:

El trabajo de investigación, se realizó en dos fases: Campo y Laboratorio.

2.1.1. Trabajo de Campo

La investigación se inició con la recolección de muestras en las comunidades de Tambocucho y Manzanayocc, pertenecientes al distrito de Socos, y Llachoccmayo, ubicada en el distrito de Chiara, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho. Estas localidades forman parte de la microcuenca Allpachaka, ubicada en la zona altoandina de la región Ayacucho. Las comunidades evaluadas presentan características altitudinales propias de la zona altoandina, con elevaciones aproximadas superiores a los 3500 m s. n. m.; específicamente, Manzanayocc presenta una altitud media de 3682 m s. n. m., Tambocucho 3802 m s. n. m. y Llachoccmayo aproximadamente 3814 m s. n. m. (Topographic Map, s. f.; Mapcarta, s. f.).

Figura 2

Recolección de muestra de leche en la comunidad de Llachoccmayo.



Fuente: Elaboración propia.

2.1.2. Trabajo de laboratorio

El procesamiento de las muestras se realizó en el Laboratorio de Microbiología e Inmunología de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria (EPMV) de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga (UNSCH), ubicado en la Ciudad Universitaria, distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga, a una altitud aproximada de 2750 m s. n. m. (Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga [UNSCH], 2025).

Figura 3

Edificio de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga (UNSCH).



Fuente: Sitio web de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria, UNSCH, 2025. Recuperado de <https://appweb.unsch.edu.pe/escuela-profesional-de-medicina-veterinaria/>

Posteriormente, el procesamiento molecular de las muestras se realizó en el Laboratorio de Investigación de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Ciencias y Filosofía de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH), ubicado en el Campus Central de la UPCH, distrito de San Martín de Porres, provincia y departamento de Lima, a una altitud aproximada de 123 m s. n. m. (Universidad Peruana Cayetano Heredia [UPCH], 2025).

Figura 4

Instalaciones de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo, Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH).



Fuente: Facultad de Ciencias e Ingeniería, UPCH. (22 de septiembre de 2023). Recuperado de <https://ciencias.cayetano.edu.pe/eventos/conoce-los-laboratorios-de-investigacion-y-desarrollo/>

2.2. Materiales de estudio:

2.2.1. Material biológico

El material biológico estuvo constituido por muestras de leche obtenidas de vacas con diagnóstico de mastitis subclínica bovina, procedentes de las comunidades de Tambocucho, Manzanayocc y Llachoccmayo de la microcuenca de Allpachaka. A partir de estas muestras se aislaron cepas de *Staphylococcus aureus*, las cuales fueron empleadas para la caracterización fenotípica, la confirmación molecular mediante la detección de los genes *coa*, *femB* y *nucA*, y la evaluación de su perfil de susceptibilidad antimicrobiana. Asimismo, se utilizó ADN bacteriano extraído de las cepas aisladas para los análisis moleculares mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

2.2.2. Material de laboratorio

- Tubos de ensayo estériles.
- Tubos Falcon de 15 y 50 mL.
- Tubos de microcentrífuga de 1,5 y 2,0 mL.
- Placas de Petri estériles.
- Asas bacteriológicas.

- Micropipetas automáticas (P10, P20, P200 y P1000).
- Puntas estériles para micropipeta.
- Gradillas para tubos.
- Laminas portaobjetos y cubreobjetos.
- Mechero Bunsen.
- Marcador indeleble para laboratorio.

2.2.3. Insumos y reactivos

Medios de cultivo

- Agar TSA
- Agar manitol salado.
- Agar Mueller-Hinton.

Reactivos microbiológicos

- Plasma de conejo (prueba de coagulasa).
- Solución salina estéril.

Reactivos para biología molecular

- Reactivos de extracción de ADN
- Master Mix para PCR.
- Primers específicos para los genes *coa*, *femB* y *nucA*.
- Agua libre de nucleasas.
- Marcador de peso molecular (DNA Ladder).
- Agarosa.
- Buffer TAE.
- Bromuro de etidio.

- Buffer de carga (Loading Dye).

Insumos para antibiograma

- Discos de susceptibilidad antimicrobiana: Clindamicina, cefoxitina, eritromicina, penicilina y oxacilina
- Hisopos estériles.
- Estándar de turbidez McFarland.

2.2.4. Equipos

- Cabina de bioseguridad.
- Incubadora bacteriológica.
- Autoclave.
- Centrífuga.
- Microcentrífuga.
- Termociclador (PCR).
- Cámara de electroforesis.
- Fuente de poder para electroforesis.
- Transiluminador UV y sistema de documentación de geles.
- Refrigeradora (4 °C).
- Congeladora (-20 °C).
- Vórtex.
- Balanza analítica.
- Microscopio óptico.

2.3. Población y muestra:

Considerando una población de 930 vacas en producción pertenecientes a las comunidades de Tambocucho, Manzanayocc y Llachoccmayo de la microcuenca Allpachaka, según el registro productivo generado en el marco del proyecto FOCAM “Calidad sanitaria y nutricional de la leche bovina de la Microcuenca Allpachaka-Ayacucho en el ámbito de la salud pública y prevención de enfermedades endémicas”, ejecutado por la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga (UNSCH, 2018), se determinó el tamaño muestral mediante la fórmula estadística para poblaciones finitas (Aguilar-Barojas, 2005).

El cálculo consideró un nivel de confianza del 95%, un margen de error del 10% y una proporción esperada de máxima variabilidad ($p = q = 0,5$), obteniéndose un tamaño inicial de 87 vacas en producción. Considerando un porcentaje adicional para compensar posibles pérdidas, muestras no válidas o eventualidades durante el proceso de muestreo, se estableció un tamaño muestral final de 98 vacas en producción.

De cada vaca seleccionada se recolectaron muestras de leche provenientes de los cuatro cuartos mamarios, obteniéndose un total de 392 muestras de leche (98 vacas $\times$ 4 cuartos mamarios). Las muestras fueron empleadas para el aislamiento, identificación microbiológica y caracterización de *Staphylococcus aureus*, así como para la evaluación del perfil de susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos bacterianos obtenidos.

2.4. Diseño y tipo de investigación:

La presente investigación fue de enfoque cuantitativo, de tipo básica, nivel descriptivo y de diseño no experimental, observacional y de corte transversal, debido a que se orientó a caracterizar fenotípica y molecularmente las cepas de *Staphylococcus aureus*, evaluar su perfil de susceptibilidad antimicrobiana y cuantificar su frecuencia de aislamiento, sin manipular las variables de estudio.

2.5. Procedimiento metodológico:

2.5.1. Recolección de muestras de leche

La recolección de muestras se realizó en las comunidades de Tambocucho, Manzanayocc y Llachoccmayo, pertenecientes a la microcuenca de Allpachaka, durante el ordeño de la mañana a partir de las 7:30 horas. Se evaluaron 98 vacas en producción, obteniéndose 392 muestras de leche, correspondientes a los cuatro cuartos mamarios de cada animal.

Previamente a la toma de muestras, la ubre y los pezones fueron sometidos a un proceso de limpieza y desinfección mediante agua limpia, secado con papel toalla desechable y desinfección del extremo de los pezones con algodón embebido en alcohol etílico al 70 %, con la finalidad de evitar la contaminación de las muestras.

Posteriormente, se aplicó la prueba California Mastitis Test (CMT) a cada cuarto mamario para el diagnóstico de mastitis subclínica. Las muestras de leche correspondientes a los cuartos mamarios que presentaron resultado positivo al CMT fueron recolectadas asépticamente en frascos estériles previamente rotulados con el código de identificación del animal, comunidad y cuarto mamario.

Finalmente, las muestras fueron transportadas en cajas térmicas de tecnopor con acumuladores de frío, manteniendo la cadena de refrigeración, hasta el Laboratorio de Microbiología e Inmunología Veterinaria de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, donde se realizaron los análisis microbiológicos, moleculares y de susceptibilidad antimicrobiana.

Figura 5

Muestras de leche transportadas al laboratorio



Fuente: Elaboración propia.

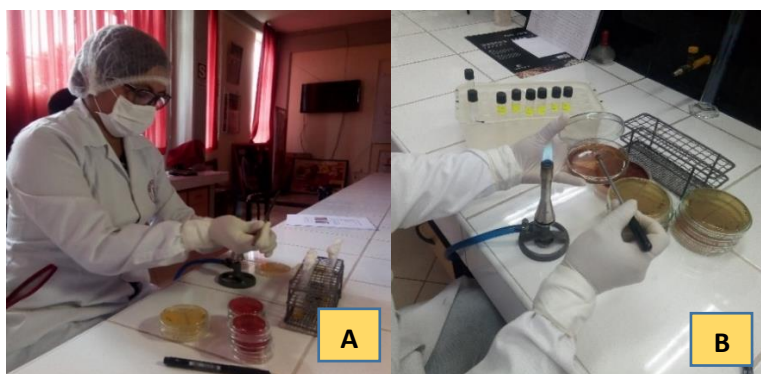
2.5.2. Aislamiento bacteriológico de *Staphylococcus aureus*

Las muestras de leche fueron procesadas inmediatamente después de su recepción en el Laboratorio de Microbiología e Inmunología Veterinaria de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, verificando previamente que se mantuviera la cadena de frío durante el transporte.

Bajo condiciones de asepsia, las muestras fueron homogeneizadas y sembradas mediante la técnica de estría por agotamiento en placas con agar Tripticasa de Soya (Tryptic Soy Agar, TSA) y agar Manitol Salado (MSA). Posteriormente, las placas fueron incubadas en estufa bacteriológica a 37 °C durante 24 horas.

Figura 6

Siembra de muestras de leche.



A) Siembra de muestra en Agar TSA B) Siembra de muestra en Agar sangre

Fuente: Elaboración propia.

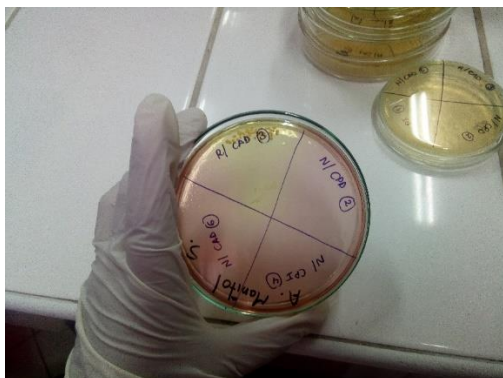
2.5.3. Identificación fenotípica

Transcurridas 24 horas de incubación, se evaluó el crecimiento bacteriano mediante la observación de las características macroscópicas de las colonias, considerando su morfología, borde, superficie, consistencia, color y la fermentación de manitol. Las colonias con características compatibles con *Staphylococcus aureus* fueron sometidas a tinción de Gram y observadas mediante microscopía óptica para evaluar su morfología y reacción tintorial. Posteriormente, se realizó la prueba bioquímica de coagulasa, siguiendo los procedimientos convencionales para la identificación fenotípica. Como resultado de esta evaluación, 27 cepas fueron identificadas fenotípicamente como compatibles con

Staphylococcus aureus, las cuales fueron seleccionadas para su posterior confirmación molecular mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Figura 7

Observación macroscópica de crecimiento de colonias



Fuente: Elaboración propia.

2.5.4. Confirmación molecular mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las 27 cepas compatibles con *Staphylococcus aureus*, identificadas mediante pruebas fenotípicas, fueron remitidas al Laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Ciencias y Filosofía de la Universidad Peruana Cayetano Heredia para su confirmación molecular mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La identificación molecular se realizó mediante la amplificación de los genes *coa*, *femB* y *nucA*, utilizando cebadores específicos para cada uno de ellos.

2.5.4.1. Extracción de ADN bacteriano

Las 27 cepas identificadas fenotípicamente como compatibles con *Staphylococcus aureus* fueron sometidas a la extracción de ADN genómico para su posterior confirmación molecular. El ADN obtenido fue evaluado en cuanto a su calidad y utilizado como molde para la amplificación de los genes *coa*, *femB* y *nucA* mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

2.5.4.2. Amplificación, electroforesis y visualización del gen *coa* mediante PCR.

La amplificación del gen *coa* se llevó a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), empleando los cebadores específicos *F-coa* y *R-coa*. Para cada reacción se preparó un volumen total de 25 µL, que contenía tampón de PCR a una concentración de 1X, 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,5 µM de cada cebador, 0,7 U de Taq ADN polimerasa y 3 µL de ADN genómico.

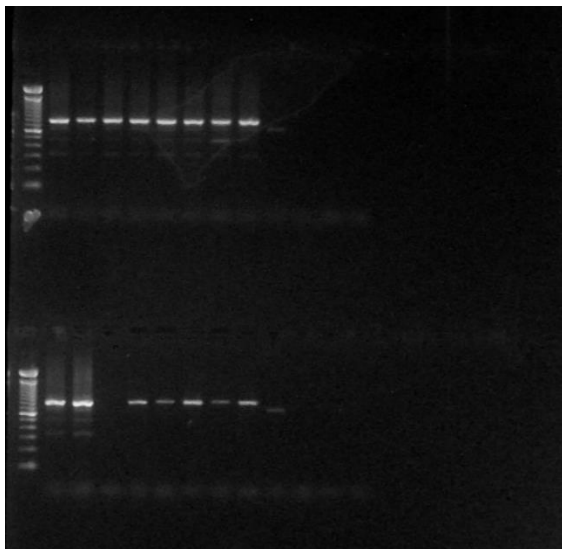
El proceso de amplificación se realizó en un termociclador. Inicialmente, las muestras fueron sometidas a una etapa de desnaturalización a 94 °C durante 5 minutos. Posteriormente, se desarrollaron 30 ciclos, cada uno compuesto por una fase de desnaturalización a 94 °C por 40 segundos, seguida del alineamiento de los cebadores a 58 °C durante 60 segundos y una etapa de extensión a 72 °C por 60 segundos. Al finalizar los ciclos, se efectuó una extensión adicional a 72 °C durante 10 minutos.

Para comprobar el funcionamiento de la reacción se utilizó como control positivo ADN previamente purificado de una cepa de *Staphylococcus aureus*. Por otro lado, se emplearon ADN de *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus saprophyticus* como controles negativos.

Una vez obtenidos los productos de PCR, estos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1,5 %, elaborado con tampón TAE 1X y teñido con bromuro de etidio a 0,3 µg/mL. La separación electroforética se realizó aplicando un voltaje de 100 V durante 50 minutos. Posteriormente, los productos amplificados se observaron mediante luz ultravioleta y se registraron utilizando un sistema de fotodocumentación. Para determinar el tamaño aproximado de los fragmentos obtenidos se utilizó como referencia un marcador de peso molecular DNA Ladder de 100 pb.

Figura 8

Electroforesis en gel de agarosa que muestra la amplificación del gen coa en aislamientos de Staphylococcus aureus. Carril M: marcador de peso molecular de 100 pb.



Fuente: Elaboración propia.

2.5.4.3. Amplificación, electroforesis y visualización del gen *femB* mediante PCR.

La amplificación del gen *femB* se realizó a cabo mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), empleando los cebadores específicos F-*femB* y R-*femB*. Para cada reacción se preparó un volumen total de 25 µL, que contenía tampón de PCR a una concentración de 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 0,5 µM de cada cebador, 0,25 U de Taq ADN polimerasa y 3 µL de ADN genómico.

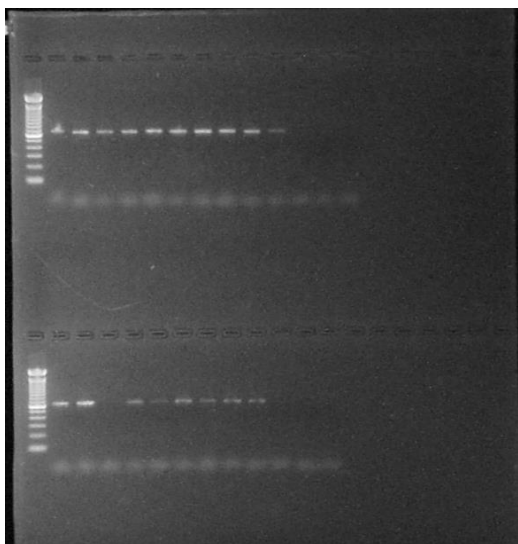
El proceso de amplificación se realizó en un termociclador bajo las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 45 segundos, alineamiento a 50 °C durante 45 segundos y extensión a 72 °C durante 60 segundos. Al finalizar los ciclos, se efectuó una extensión final a 72 °C durante 5 minutos.

Como control positivo se utilizó ADN purificado de una cepa de *Staphylococcus aureus*, mientras que como controles negativos se emplearon ADN de *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus saprophyticus*.

Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 %, preparado en tampón TAE 1X y teñido con bromuro de etidio (0,3 µg/mL). La corrida electroforética se realizó a 100 V durante 40 minutos. Posteriormente, los fragmentos amplificados fueron visualizados bajo luz ultravioleta y documentados mediante un sistema de fotodocumentación. Como marcador de peso molecular se utilizó un DNA Ladder de 100 pb.

Figura 9

Electroforesis en gel de agarosa que muestra la amplificación del gen femB en aislamientos de Staphylococcus aureus. Carril M: marcador de peso molecular de 100 pb.



Fuente: Elaboración propia.

2.5.4.4. Amplificación, electroforesis y visualización del gen nucA mediante PCR.

La amplificación del gen nucA se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando los cebadores específicos F-nucA y R-nucA. La mezcla de reacción tuvo un volumen final de 25 µL, compuesta por tampón de PCR (1X), 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,5 µM de cada cebador, 0,7 U de Taq ADN polimerasa y 3 µL de ADN genómico.

El proceso de amplificación se realizó en un termociclador bajo las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 minutos, seguida de 30 ciclos

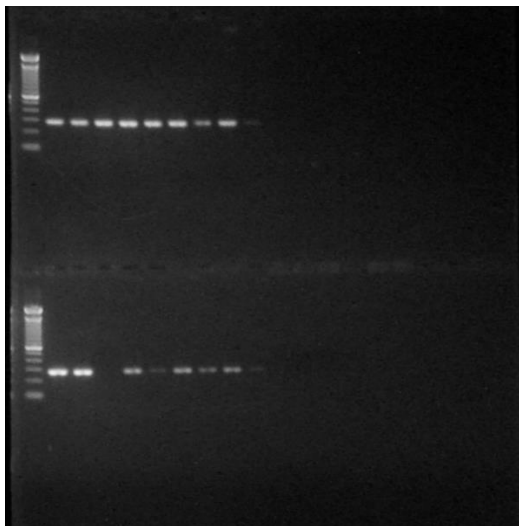
de desnaturalización a 94 °C durante 3 minutos, alineamiento a 58 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 45 segundos. Al finalizar los ciclos se efectuó una extensión final a 72 °C durante 10 minutos.

Como control positivo se empleó ADN purificado de una cepa de *Staphylococcus aureus*, mientras que como controles negativos se utilizaron ADN de *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus saprophyticus*.

Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 %, preparado en tampón TAE 1X y teñido con bromuro de etidio (0,3 µg/mL). La corrida electroforética se realizó a 100 V durante 40 minutos. Posteriormente, los fragmentos amplificados fueron visualizados bajo luz ultravioleta y documentados mediante un sistema de fotodocumentación. Como marcador de peso molecular se utilizó un DNA Ladder de 100 pb.

Figura 11

Electroforesis en gel de agarosa que muestra la amplificación del gen nucA en aislamientos de Staphylococcus aureus. Carril M: marcador de peso molecular de 100 pb.



Fuente: Elaboración propia.

2.5.5. Determinación del perfil de susceptibilidad antimicrobiana

Las 27 cepas de *Staphylococcus aureus* confirmadas molecularmente fueron sometidas a la prueba de susceptibilidad antimicrobiana mediante la técnica de difusión en disco (Kirby-Bauer), siguiendo el procedimiento descrito en el Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Disco Difusión del Instituto Nacional de Salud (INS, 2002).

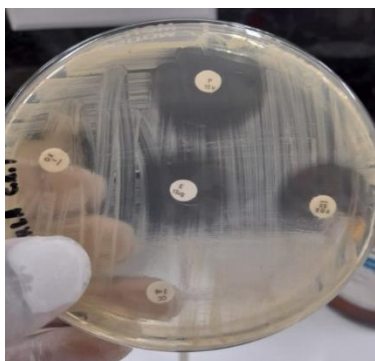
Previamente, las cepas fueron subcultivadas en agar Tripticasa de Soya (TSA) e incubadas a 37 °C durante 24 horas para obtener cultivos puros. Posteriormente, se seleccionaron entre tres y cinco colonias aisladas y se suspendieron en solución salina estéril (NaCl al 0,85 %) hasta obtener una turbidez equivalente al estándar 0,5 de McFarland, correspondiente aproximadamente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

El inóculo estandarizado fue distribuido uniformemente sobre la superficie de placas con agar Mueller-Hinton mediante un hisopo estéril, realizando estrías en tres direcciones para asegurar una siembra homogénea. A continuación, se colocaron los discos de antimicrobianos sobre la superficie del medio y las placas fueron incubadas en posición invertida a 37 °C durante 18 a 24 horas.

Finalizado el período de incubación, se midieron los diámetros de los halos de inhibición en milímetros y los resultados fueron interpretados de acuerdo con los criterios establecidos en el Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Disco Difusión del Instituto Nacional de Salud (INS, 2002), clasificando las cepas como sensibles (S), intermedias (I) o resistentes (R) frente a los antimicrobianos evaluados.

Figura 11

Antibiograma del S. aureus



Fuente: Elaboración propia.

Los antimicrobianos utilizados en el estudio fueron: penicilina (10 µg), cefoxitina (30 µg), clindamicina (2 µg), eritromicina (15 µg) y oxacilina (1 µg)

2.6. Técnicas e instrumentos de recolección de datos:

Para el cumplimiento de los objetivos específicos de la investigación se emplearon diferentes técnicas e instrumentos de recolección de datos, los cuales permitieron obtener información relacionada con la caracterización fenotípica y molecular de *Staphylococcus aureus*, así como con la evaluación de su perfil de susceptibilidad antimicrobiana. En la Tabla 2 se presentan las técnicas e instrumentos utilizados.

Tabla 2

Técnicas e instrumentos de recolección de datos utilizados en la investigación.

Objetivo específico	Técnica	Instrumento
Caracterizar fenotípicamente las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> .	Observación microbiológica y pruebas fenotípicas convencionales.	Ficha de registro de caracterización fenotípica.
Confirmar la identidad molecular mediante la detección de los genes <i>coa</i> , <i>femB</i> y <i>nucA</i> .	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	Ficha de registro de resultados de PCR.
Evaluar el perfil de susceptibilidad antimicrobiana.	Técnica de difusión en disco (Kirby-Bauer).	Ficha de registro del antibiograma.
Cuantificar la proporción de muestras positivas para <i>Staphylococcus aureus</i> .	Registro y análisis microbiológico de los resultados	Base de datos en Microsoft Excel

Fuente: Elaboración propia

2.7. Análisis estadístico:

Los datos obtenidos fueron registrados en una base de datos en Microsoft Excel y posteriormente sometidos a análisis estadístico. Se realizó un análisis descriptivo mediante frecuencias absolutas y relativas (porcentajes), cuyos resultados fueron presentados en tablas y figuras.

Para evaluar las diferencias entre proporciones se aplicó la prueba de comparación múltiple de proporciones con ajuste de Holm. Asimismo, se empleó la prueba de Chi-cuadrado (χ^2) para el análisis de variables categóricas. En todos los análisis se consideró un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$, aceptándose diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

No fue posible realizar análisis de asociación entre la caracterización molecular y el perfil de susceptibilidad antimicrobiana, debido a que todas las cepas confirmadas presentaron positividad para los genes *coa*, *femB* y *nucA*, por lo que no existió variabilidad en esta variable que permitiera efectuar comparaciones estadísticas.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Características fenotípicas de *Staphylococcus aureus*

Tabla 3

Características fenotípicas de Staphylococcus aureus en muestras positivas cultivadas de muestras (n=27) de cuartos mamarios de vacas en tres comunidades de la Microcuenca de Allpachaka. Ayacucho, 2024.

Características de los medios de cultivo	Fenotipo de <i>Staphylococcus aureus</i>	
	Cantidad	Porcentaje (%)
Morfología:		
<i>Redonda</i>	27	100,0%
Borde:		
<i>Entero</i>	27	100,0%
Superficie:		
<i>Lisa</i>	27	100,0%
Consistencia:		
<i>Creмоса</i>	27	100,0%
Color:		
<i>Blanco</i>	1	3,7%
<i>Amarillo</i>	6	22,2%
<i>Creмосо</i>	20	74,1%
Elevación:		
<i>Convexas</i>	27	100,0%

Manitol:		
<i>Positivo</i>	27	100,0%
Coagulasa:		
<i>Positivo</i>	27	100,0%

En la Tabla 2, encontramos las características fenotípicas de los 27 aislamientos de *Staphylococcus aureus* obtenidos de cuartos mamarios positivos a mastitis bovina en tres comunidades de la microcuenca de Allpachaka (Ayacucho, 2024). Donde todas las cepas (100%) mostraron morfología redonda, borde entero, superficie lisa, consistencia cremosa y elevación convexa. Asimismo, la totalidad de los aislamientos resultaron positivos tanto en la prueba de fermentación de manitol como en la prueba de coagulasa. En cuanto a la pigmentación de las colonias, se observó variabilidad: el 74,1% fueron de color crema, el 22,2% de color amarillo y el 3,7% de color blanco.

Las características fenotípicas observadas en los aislados coinciden con las descripciones clásicas de *S. aureus*, que incluyen colonias circulares, de borde bien definido, superficie lisa, consistencia cremosa y positividad en las pruebas de fermentación de manitol y coagulasa (Katz, 2010; Shields & Tsang, 2006). Estos rasgos permiten diferenciar a *S. aureus* de otros estafilococos coagulasa negativos, los cuales suelen presentar colonias menos definidas y carecen de la capacidad de coagular plasma.

Respecto a la pigmentación, la mayoría de las cepas mostraron color crema (74,1%), seguidas por amarillo (22,2%) y en menor proporción blanco (3,7%). Esta variabilidad concuerda con lo descrito en estudios previos, en los que se ha señalado que la expresión de pigmentos carotenoides, como la estafiloxantina, depende tanto de factores genéticos como de condiciones ambientales (Clauditz et al., 2006). En contraste, Zhang et al., (2018) reportaron una mayor proporción de cepas pigmentadas de color amarillo

(41%), lo cual sugiere que la distribución de fenotipos cromáticos puede variar según la procedencia geográfica y el origen clínico de los aislamientos.

El hallazgo de colonias pigmentadas resulta de interés, dado que la estafiloxantina no solo confiere el color característico, sino que también actúa como factor de virulencia al proteger a la bacteria frente al estrés oxidativo, aumentando su capacidad de persistencia en el hospedador (Elmessaoui et al., 2022). Esto podría explicar, en parte, la capacidad de *S. aureus* para establecer infecciones crónicas y recurrentes en glándulas mamarias bovinas.

La positividad universal en la prueba de coagulasa refuerza la identificación de los aislados como *S. aureus*. Esta enzima es considerada un marcador clásico de virulencia, ya que convierte fibrinógeno en fibrina, favoreciendo la formación de coágulos que protegen a la bacteria de la fagocitosis y de la acción de los mecanismos de defensa del hospedador (Katz, 2010).

Desde una perspectiva epidemiológica, estos resultados confirman la presencia de *S. aureus* como agente causal de mastitis bovina en la microcuenca de Allpachaka. Esta enfermedad se caracteriza por infecciones persistentes que generan pérdidas económicas considerables en la producción lechera, tanto por la disminución del rendimiento como por la necesidad de tratamientos antimicrobianos prolongados (Campos, Pickering, Souza, et al., 2022). El predominio de cepas pigmentadas sugiere, además, una mayor capacidad adaptativa en el tejido mamario, lo que resalta la importancia de implementar programas de control más efectivos en la región.

3.2. Identidad molecular de *Staphylococcus aureus*

Tabla 4

Genotipo de Staphylococcus aureus en muestras positivas cultivadas de muestras (n=27) de cuartos mamarios de vacas en tres comunidades de la Microcuenca de Allpachaka. Ayacucho, 2024

Presencia de los genes en las cepas aisladas	Genotipo del <i>Staphylococcus aureus</i>	
	Cantidad	Porcentaje (%)
Coa	27	100.0%
FemB	27	100.0%
NucA	27	100.0%

En relación con la identidad molecular de los 27 aislamientos de *Staphylococcus aureus* provenientes de cuartos mamarios positivos a mastitis subclínica bovina, se observó que todos los aislados fueron positivos (100 %) para los genes *coa*, *femB* y *nucA* mediante PCR (Tabla 3). Estos hallazgos, confirman la utilidad de estos genes como marcadores moleculares confiables en la identificación de *S. aureus*.

Los resultados concuerdan con lo reportado por Monistero et al., (2018), quienes en un estudio multicéntrico sobre aislamientos de *Staphylococcus aureus* en mastitis bovina en ocho países (n = 120) encontraron que el 100 % de los aislados fueron positivos para los genes *coa* y *nuc*, lo que resalta la alta prevalencia de estos marcadores a nivel internacional y su relevancia diagnóstica.

De manera complementaria, Locatelli et al. (2023) evidenciaron que el análisis de la secuencia del gen *coa* mostró variaciones que pueden ocasionar diagnósticos erróneos cuando se utilizan únicamente pruebas fenotípicas, concluyendo que la secuenciación del *coa* constituye una herramienta valiosa para evitar la malidentificación de cepas atípicas. Este aspecto resulta relevante al considerar que, aunque en nuestro estudio la prevalencia

de *coa* fue del 100%, el análisis molecular de secuencia puede ofrecer un nivel adicional de precisión diagnóstica.

Respecto al gen *femB*, los resultados también revelaron una prevalencia del 100%. Esto coincide con lo señalado por Ning et al. (2023), quienes al analizar 76 cepas de *S. aureus* de leche cruda en la provincia de Hunan (China), detectaron *femB* en la totalidad de los aislados. Estos hallazgos refuerzan la hipótesis de que *femB* es un gen altamente conservado y esencial en la biología de *S. aureus*, dada su implicancia en la síntesis de la pared celular y en la resistencia intrínseca a los β -lactámicos. Asimismo, Kobayashi et al. (1994) demostraron que la detección conjunta de *mecA*, *femA* y *femB* mediante PCR era un enfoque efectivo para diferenciar *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) de otros estafilococos, destacando que *femA* y *femB* estaban presentes en la gran mayoría de los aislamientos clínicos evaluados.

En conjunto, la detección universal de *coa*, *femB* y *nucA* en nuestro estudio sugiere que los aislados de la microcuenca de Allpachaka presentan un perfil genético homogéneo respecto a estos marcadores, lo cual coincide con lo descrito en investigaciones internacionales. Esto refuerza la importancia de dichos genes como herramientas de diagnóstico molecular, aunque la incorporación de análisis de secuencia y estudios de mayor escala podrían aportar información adicional sobre la diversidad genética de *S. aureus* en contextos locales y globales.

3.3. Perfil de susceptibilidad antimicrobiana de *Staphylococcus aureus*

Tabla 5

Perfil de susceptibilidad antimicrobiana de Staphylococcus aureus a partir de muestras positivas de cuartos mamarios de vacas en tres comunidades de la Microcuenca Allpachaka. Ayacucho, 2024.

Susceptibilidad antimicrobiana	Clindamicina		Cefoxitina		Eritromicina		Penicilina		Oxacilina		Total	%
	CC 2µg	%	FOX 30µg	%	E 15µg	%	P 10µg	%	OX 1µg	%		
Sensible	1	3,7% ^a	14	51,9% ^a	2	7,4% ^a	2	7,4% ^a	22	81,5% ^a	41	30,4%
Intermedio	8	29,6% ^b	0	0,0% ^b	22	81,5% ^b	0	0,0% ^a	2	7,4% ^b	32	23,7%
Resistente	18	66,7% ^b	13	48,1% ^a	3	11,1% ^a	25	92,6% ^b	3	11,1% ^b	62	45,9%
Total	27	100,0%	27	100,0%	27	100,0%	27	100,0%	27	100,0%	135	100,0%

^{a,b} Letras distintas en cada fila indica diferencias estadísticas ($p < 0.05$) a la prueba de homogeneidad de Chi².

En la Tabla 4, se presentan los resultados del análisis de susceptibilidad antimicrobiana de los 27 aislamientos de *Staphylococcus aureus* obtenidos de mastitis subclínica bovina en tres comunidades de la microcuenca de Allpachaka (Ayacucho, 2024). Los resultados muestran altos niveles de resistencia a múltiples antibióticos. La mayor resistencia se observó frente a penicilina (92,6%) y clindamicina (66,7%), seguidas de cefoxitina (48,1%). Por otro lado, oxacilina presentó la mayor sensibilidad (81,5%), mientras que cefoxitina mostró un patrón heterogéneo (51,9% sensibles y 48,1% resistentes).

Un hallazgo particular se observó en la eritromicina, donde el 81,5% de los aislamientos presentaron sensibilidad intermedia, el 11,1% resistencia y solo el 7,4% sensibilidad plena. En términos generales, únicamente el 30,4% de los aislamientos fueron sensibles a los antibióticos evaluados, mientras que el 45,9% se clasificaron como resistentes y el 23,7% como intermedios.

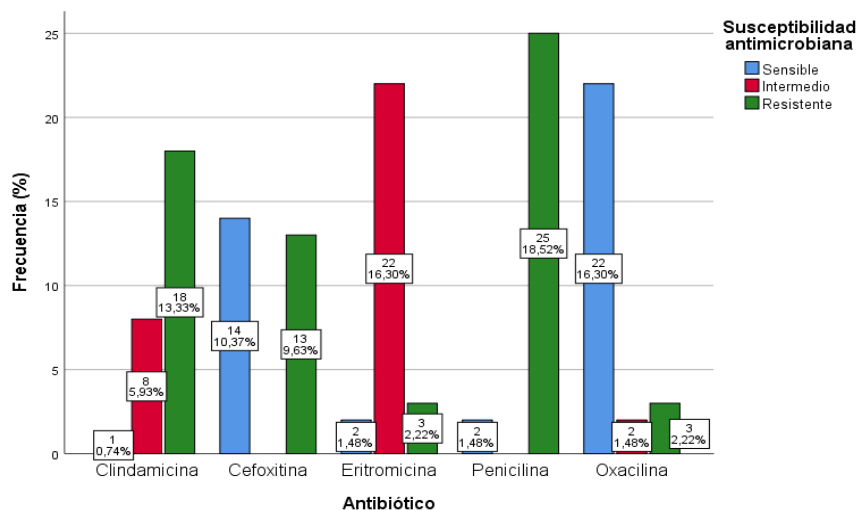
La mayor resistencia se observó frente a penicilina (92.6 %), lo que confirma la pérdida de eficacia de este fármaco en el control de la enfermedad. Estos hallazgos coinciden con lo descrito por Wang et al. (2015), quienes reportaron que el 90.4 % de los aislamientos de *S. aureus* en casos de mastitis bovina en China fueron resistentes a penicilina. Este hallazgo es comparable con lo descrito por Neelam et al. (2022) quienes reportaron un 83.64% de resistencia de *S. aureus* a la penicilina asociado a mastitis clínica en ganado.

En concordancia, Vakkamäki et al. (2017) señalaron que la elevada resistencia a este antibiótico se relaciona con su uso prolongado y con la capacidad de *S. aureus* de producir β -lactamasas, mecanismos que reducen significativamente la utilidad terapéutica de la penicilina en bovinos lecheros.

La resistencia a clindamicina observada en nuestros aislamientos (66,7 %) es elevada y supera ampliamente el estimador global reportado en una revisión sistemática y meta-análisis (14,9 %); (Molineri et al., 2021). Sin embargo, nuestros resultados son comparables con estudios en países de Asia, donde Brahma et al. (2022) encontraron resistencia a clindamicina en el 53,75 % de los aislados clínicos de mastitis en India, además, investigaciones en Europa muestran frecuencias marcadamente menores, teniendo como resultado un 4.7 % de los países evaluados Nemati et al. (2023), lo que evidencia la heterogeneidad geográfica en la eficacia de este antimicrobiano y la influencia de los patrones de uso de antibióticos en la dinámica de resistencia.

Figura 12

Gráfico de barras que muestra la susceptibilidad antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* frente a diferentes antibióticos.



En relación con cefoxitina, nuestros resultados mostraron un patrón heterogéneo: 51,9 % de sensibilidad y 48,1 % de resistencia. Este porcentaje de resistencia es notablemente más alto que lo reportado por la mayoría de los estudios disponibles. Por ejemplo, Algammal et al. (2020) documentaron que 35,7 % de las cepas de *S. aureus* aisladas en mastitis bovina presentaban resistencia a cefoxitina, un valor inferior al observado en nuestro estudio.

Rodríguez et al. (2023) encontraron un 40,0% de resistencia a cefoxitina en su población de aislamientos, cifra aún menor que el resultado obtenido de 48,1%.

Además, en el contexto de mastitis subclínica en Pakistán, Haq et al. (2024) informaron que 11 de 94 aislados ($\approx 11,7$ %) fueron resistentes a cefoxitina, cifra bastante menor que la encontrada en nuestra población.

Esta diferencia sustancial indica que las cepas de *S. aureus* presentes en las tres comunidades de la microcuenca de Allpachaka podrían estar sometidas a una presión selectiva más intensa o portar mecanismos de resistencia más robustos que los encontrados en otras regiones. En virtud de este elevado porcentaje de resistencia, es

posible que una porción significativa de las cepas se encuentre en transición hacia un fenotipo MRSA completo, o ya lo sean. Por tanto, estos hallazgos sugieren la necesidad de vigilancia continua del perfil de resistencia, uso racional de antibióticos desde la práctica veterinaria local, y la implementación de estrategias preventivas para limitar la difusión de cepas resistentes en el sector lechero regional.

Respecto a oxacilina, la mayoría de nuestros aislados fueron sensibles (81,5 %), lo que indica una prevalencia relativamente baja de MRSA en la microcuenca de Alpachaka. Este hallazgo es similar al descrito en Brasil, donde Freu et al. (2022) reportaron un bajo nivel de resistencia a oxacilina (12 %), y al de Argentina, donde se encontró un valor de solo 3,2 % (Crespi et al., 2021). Sin embargo, contrasta con los resultados de India, donde la resistencia alcanzó el 25 % (Brahma et al., 2022). Este panorama sugiere que, si bien oxacilina podría seguir considerándose una alternativa terapéutica en la región, existe el riesgo de un incremento progresivo de MRSA si no se regulan adecuadamente las prácticas de uso antimicrobiano.

Finalmente, para eritromicina, en nuestro estudio predominó la sensibilidad intermedia (81,5 %), lo cual podría indicar un proceso de transición hacia resistencia estable. Este hallazgo coincide con lo descrito en otros países. Por ejemplo, Freu et al. (2022) en Brasil reportaron una resistencia superior al 54.8 % en aislados de mastitis bovina, mientras que Brahma et al. (2022) en India señalaron variabilidad entre 40 %. En Argentina, Crespi et al. (2021) encontraron una resistencia de 0 %. De manera similar, Wang et al. (2015) en China hallaron tasas de resistencia a eritromicina de aproximadamente 79.9 %, confirmando que este antimicrobiano enfrenta un patrón de eficacia diferente a nivel global.

En conjunto, estos resultados confirman la creciente problemática de resistencia antimicrobiana en *S. aureus* asociado a mastitis bovina y resaltan la necesidad de fortalecer la vigilancia epidemiológica, promover el uso prudente de antimicrobianos y considerar

alternativas preventivas y terapéuticas innovadoras que reduzcan la presión selectiva ejercida por el uso indiscriminado de antibióticos.

3.4. Frecuencia de mastitis subclínica con *Staphylococcus aureus*

Tabla 6

Frecuencia de mastitis subclínica con Staphylococcus aureus a partir de muestras cultivadas T/+ /++ /+++ según cuartos mamarios en vacas de tres comunidades en la Microcuenca de Allpachaka. Ayacucho, 2024

Característica patológica de vacas	Cuartos mamarios				Total	%
	CAD	CAI	CPD	CPI		
Vacas sanas sin mastitis sub clínica	64	69	66	64	263	67,2 ^a
Vacas con mastitis subclínica con Ausencia de <i>S. aureus</i>	26	23	26	27	102	25,9 ^b
Vacas con mastitis subclínica con presencia de <i>S. aureus</i>	8	6	6	7	27	6,9 ^c
Total	98	98	98	98	392	100,0

CAD: Cuarto anterior derecho; CAI: Cuarto anterior izquierdo; CPD: Cuarto posterior derecho; CPI: Cuarto posterior izquierdo.

^{a,b} Letras distintas en filas indica diferencias estadísticas ($p < 0.05$) a la prueba de bondad de ajuste de la Chi² y de la diferencia de proporciones.

En la Tabla 5, se presenta la frecuencia de mastitis subclínica y la presencia de *Staphylococcus aureus* en cuartos mamarios de vacas de tres comunidades en la microcuenca de Allpachaka (Ayacucho, 2024). Se encontró que el 67,2 % de los cuartos evaluados correspondieron a vacas sanas sin mastitis subclínica. El 25,9 % de los cuartos mostraron mastitis subclínica con ausencia de *S. aureus*, mientras que el 6,9 % presentó mastitis subclínica con aislamiento confirmado de *S. aureus*.

El análisis estadístico evidenció diferencias significativas entre los grupos ($p < 0,05$), siendo la condición de vacas sanas la más frecuente, seguida por los casos de

mastitis subclínica sin aislamiento de *S. aureus* y, en menor proporción, los casos positivos a *S. aureus*.

La frecuencia del 32,8 %, de la cual el 6,9 % correspondió a casos con aislamiento de *Staphylococcus aureus*. Este valor es considerablemente menor al reportado en metaanálisis globales, donde la prevalencia combinada de *S. aureus* en mastitis bovina alcanza aproximadamente el 36,2 % de los aislamientos (K. Wang et al., 2022). De igual forma, Campos, et al. (2022) identificaron a *S. aureus* como uno de los agentes predominantes en mastitis subclínica, con prevalencias reportadas entre 20 % y 50 % en diferentes regiones, lo que evidencia una variabilidad considerable según las condiciones de manejo.

La baja proporción de *S. aureus* hallada en este estudio podría explicarse por la participación de otros patógenos en la etiología de la mastitis subclínica, lo que coincide con lo señalado por Kerro Dego & Vidlund (2024), quienes resaltan que estreptococos y estafilococos coagulasa-negativos representan hasta el 40 % de los aislamientos en algunos hatos lecheros. Asimismo, Khanal et al. (2022), en un metaanálisis de 42 estudios, reportaron una prevalencia global de MRSA en granjas lecheras de 3,8 %, aunque con marcadas diferencias regionales, siendo los valores en Sudamérica consistentemente más bajos que en Asia y Europa.

Por otra parte, (Son & Duc, 2024) en Vietnam reportaron prevalencias de 13.5% de *S. aureus* en mastitis subclínica, lo que refuerza que los factores geográficos, de manejo y de diagnóstico influyen en las diferencias entre estudios.

Así mismo, (Quispe et al., 2021) evaluaron aislados de leche de vacas con mastitis en 94 vacas del fundo Allpachaka de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, obteniendo una prevalencia de *S. aureus* del 35.2 %.

En este sentido, la proporción relativamente baja (6,9 %) encontrada en las tres comunidades de Allpachaka puede deberse a características locales del sistema de producción.

En conjunto, los hallazgos sugieren que, aunque la prevalencia de *S. aureus* fue inferior a la reportada en la literatura, su presencia sigue siendo epidemiológicamente relevante por su potencial de generar infecciones crónicas y dificultar los programas de control en vacas lecheras.

3.5. Prevalencia de mastitis subclínica

Tabla 7

Prevalencia de mastitis subclínica según grado de reacción a CMT en cuartos mamarios de bovinos en tres comunidades de la Microcuenca de Allpachaka. Ayacucho, 2024

Grado de reacción al CMT	Cuartos mamarios bovinos				Total	Frecuencia (%)
	CAD	CAI	CPD	CPI		
Negativo (N)	64	69	66	64	263	67,1 ^a
Trazas (T)	7	5	5	8	25	6,4 ^b
Positivo débil (+)	15	14	20	13	62	15,8 ^c
Positivo evidente (++)	9	6	7	13	35	8,9 ^b
Positivo fuerte (+++)	3	4	0	0	7	1,8 ^d
Total	98	98	98	98	392	100,0

CAD: Cuarto anterior derecho; CAI: Cuarto anterior izquierdo; CPD: Cuarto posterior derecho

CPI: Cuarto posterior izquierdo.

^{a,b} Letras distintas en filas indica diferencias estadísticas ($p < 0.05$) a la prueba de bondad de ajuste χ^2 y la diferencia de proporciones

La prevalencia de mastitis subclínica, según el grado de reacción al California Mastitis Test (CMT), en cuartos mamarios de 98 bovinos pertenecientes a tres comunidades de la microcuenca de Allpachaka (Ayacucho, 2024), se presenta en la Tabla

6. De un total de 392 cuartos mamarios evaluados, se obtuvieron los siguientes resultados: 263 cuartos negativos (67,1 %), 25 con trazas (6,4 %), 62 positivos débiles (+) (15,8 %), 35 positivos evidentes (++) (8,9 %) y 7 positivos fuertes (+++) (1,8 %). En conjunto, estos valores representan una prevalencia total de mastitis subclínica del 32,9 %.

En contraste, Quispe et al. (2021) evaluaron aislados de leche de vacas con mastitis mediante la prueba de CMT en 94 vacas del fundo Allpachaka de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, obteniendo una prevalencia del 58.1 %. De manera similar, Tineo (2015) reportó una prevalencia aún mayor (82,1 %) en 95 vacas del mismo fundo. Ambos valores superan ampliamente los obtenidos en el presente estudio, lo que sugiere que las estimaciones realizadas en el fundo Allpachaka podrían reflejar condiciones particulares de esa unidad productiva y no necesariamente representar la situación de toda la microcuenca lechera.

Por otro lado, Maldonado et al. (2022), informaron una prevalencia del 87,5 % en la Estación Experimental Tunchi (Ecuador). Sin embargo, este hallazgo debe interpretarse con cautela, ya que se basó en un tamaño muestral reducido (16 vacas en producción), lo cual podría limitar la generalización de los resultados determinaron una prevalencia de 87.5 % en la Estación Experimental Tunchi, en Ecuador, aunque este resultado podría estar influenciado por el reducido tamaño muestral (16 vacas en producción).

La menor frecuencia detectada en el presente trabajo podría estar asociada a factores locales de manejo, sanidad o diagnóstico, que limitan la diseminación de la mastitis subclínica en las comunidades evaluadas. No obstante, el hecho de que aproximadamente un tercio de los cuartos mamarios presentara reacción positiva al CMT reafirma la importancia de esta enfermedad como un problema sanitario relevante en la producción lechera de la microcuenca.

3.6. Discusión de resultados:

Los resultados obtenidos en la presente investigación permitieron caracterizar integralmente los aislamientos de *Staphylococcus aureus* procedentes de vacas con mastitis subclínica de tres comunidades de la microcuenca de Allpachaka mediante la combinación de métodos fenotípicos, moleculares y de susceptibilidad antimicrobiana. La concordancia entre las características microbiológicas observadas y la detección del 100 % de los genes *coa*, *femB* y *nucA* demuestra la confiabilidad del enfoque diagnóstico empleado y coincide con lo reportado por Monistero et al. (2018), Ning et al. (2023) y Kobayashi et al. (1994), quienes destacan la utilidad de estos marcadores para la identificación específica de *S. aureus*. Asimismo, la presencia de colonias pigmentadas y la positividad de la prueba de coagulasa respaldan lo descrito por Clauditz et al. (2006), Elmesserli et al. (2022) y Katz (2010), quienes relacionan estas características con la capacidad de persistencia y virulencia del microorganismo.

La confirmación molecular permitió interpretar con mayor certeza los resultados del perfil de susceptibilidad antimicrobiana. En particular, la elevada resistencia frente a penicilina (92,6 %), acompañada de la resistencia observada frente a clindamicina y cefoxitina, evidencia que las cepas circulantes en la microcuenca presentan un comportamiento similar al descrito por Wang et al. (2015), Neelam et al. (2022), Vakkamäki et al. (2017), Molineri et al. (2021) y Brahma et al. (2022), lo que confirma que la resistencia antimicrobiana constituye una problemática creciente en los sistemas de producción lechera. En contraste, la elevada sensibilidad observada frente a oxacilina indica que este antimicrobiano aún conserva actividad frente a la mayoría de los aislamientos evaluados; sin embargo, la resistencia detectada a cefoxitina pone de manifiesto la necesidad de fortalecer la vigilancia microbiológica y de complementar futuras investigaciones con la detección de genes asociados con resistencia a meticilina, a fin de comprender mejor la dinámica de la resistencia en los sistemas lecheros de la región.

Al integrar estos hallazgos con la frecuencia de aislamiento de *S. aureus* y la prevalencia de mastitis subclínica (32,9 %), se observa que, aunque la proporción de aislamientos fue inferior a la reportada por Wang et al. (2022), Campos et al. (2022), Quispe et al. (2021), Tineo (2015) y Maldonado et al. (2022), la enfermedad continúa representando un importante problema sanitario para la producción lechera de la microcuenca de Allpachaka. La menor frecuencia de *S. aureus* encontrada sugiere la participación de otros agentes etiológicos en la presentación de la mastitis subclínica, tal como señalan Kerro Dego y Vidlund (2024), sin restar importancia epidemiológica a este microorganismo, cuya capacidad para persistir en la glándula mamaria y presentar resistencia a diversos antimicrobianos dificulta su control y tratamiento.

En conjunto, la integración de la caracterización fenotípica, la confirmación molecular y el perfil de susceptibilidad antimicrobiana evidencia que la problemática de la mastitis subclínica en la microcuenca de Allpachaka no depende únicamente de la presencia de *Staphylococcus aureus*, sino también de las características biológicas de las cepas circulantes y de su comportamiento frente a los antimicrobianos. Estos hallazgos aportan evidencia sobre la situación epidemiológica de *S. aureus* en los sistemas de producción lechera de la zona y resaltan la importancia de fortalecer los programas de diagnóstico microbiológico, vigilancia epidemiológica y uso racional de antimicrobianos, con el propósito de contribuir al control de la mastitis bovina y disminuir el riesgo de selección y diseminación de cepas resistentes.

CONCLUSIONES

1. En la caracterización fenotípica, las cepas de *Staphylococcus aureus* presentaron características morfológicas homogéneas, con forma circular, superficie lisa, bordes regulares y colonias de color crema (74,1 %).
2. En la confirmación de la identidad molecular, la detección de los genes *coa*, *femB* y *nucA* en la totalidad de los aislamientos confirmó la identidad genética de *S. aureus* y la correspondencia entre los métodos fenotípico y molecular.
3. Los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana demostraron una alta resistencia frente a penicilina (92,6 %), clindamicina (66,7 %) y cefoxitina (48,1 %), mientras que oxacilina presentó el mayor porcentaje de sensibilidad (81,5 %).
4. El perfil de susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de *Staphylococcus aureus* presentó altos porcentajes de resistencia frente a penicilina (92,6 %), clindamicina (66,7 %) y cefoxitina (48,1 %), mientras que oxacilina presentó el mayor porcentaje de sensibilidad (81,5 %).
5. La proporción de muestras de leche con mastitis subclínica bovina que presentaron *Staphylococcus aureus*, confirmada mediante análisis fenotípico y molecular, fue de 6,9 %.

RECOMENDACIONES

- Fortalecer el diagnóstico y control de mastitis subclínica mediante el uso combinado de pruebas fenotípicas y moleculares para la detección precisa de *Staphylococcus aureus*.
- Promover el uso racional de antimicrobianos en la ganadería lechera, sustentado en pruebas de susceptibilidad antimicrobiana y capacitación continua a los productores.
- Implementar programas de vigilancia epidemiológica y análisis moleculares que permitan monitorear la resistencia y virulencia de *S. aureus*.
- Fomentar buenas prácticas de ordeño, bioseguridad y manejo higiénico del ganado para mejorar la calidad sanitaria y la productividad lechera en la región de Ayacucho.
- Desarrollar investigaciones orientadas a la identificación y caracterización de otros agentes bacterianos asociados a la mastitis subclínica en la microcuenca de Allpachaka, mediante técnicas microbiológicas y moleculares, con el propósito de conocer su frecuencia, perfil de susceptibilidad antimicrobiana e importancia epidemiológica, contribuyendo así al diseño de estrategias de prevención y control más integrales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adame-Gómez, R., Toribio-Jimenez, J., Castro-Alarcón, N., Talavera-Alarcón, K., Flores-Gavilan, J., Pineda-Rodríguez, S. A., & Ramírez Peralta, A. (2021). Diversidad genética y factores de virulencia de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de la piel de ubre bovina. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 12(3), 665-680. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v12i3.5646>
- Aguilar-Barojas, S. (2005). Fórmulas para el cálculo de la muestra en investigaciones de salud. *Salud en Tabasco*, 11(1-2), 333–338.
- Algammal, A. M., Enany, M. E., El-Tarabili, R. M., Ghobashy, M. O. I., & Helmy, Y. A. (2020). Prevalence, Antimicrobial Resistance Profiles, Virulence and Enterotoxins-Determinant Genes of MRSA Isolated from Subclinical Bovine Mastitis in Egypt. *Pathogens*, 9(5), 362. <https://doi.org/10.3390/pathogens9050362>
- Aliverti, F., Lucas, M., Buldain, D., Marchetti, L., & Mestorino, N. (2021). *Susceptibilidad antimicrobiana de Staphylococcus aureus aislados de vacas holstein portadoras de mastitis subclínica en la provincia de Buenos Aires, Argentina*. https://www.researchgate.net/publication/354627568_SUSCEPTIBILIDAD_ANTIMICROBIANA_DE_Staphylococcus_aureus_AISLADOS_DE_VACAS_HOLSTEIN_PORTADORAS_DE_MASTITIS_SUBCLINICA_EN_LA_ANTIMICROBIAL_SUSCEPTIBILITY_OF_Staphylococcus_aureus_ISOLATED_FROM_HOLSTEIN
- Audrey, W., Chavez, V., Huang, R., Wahed, A., Actor, J., & Dasgupta, A. (2017). *Microbiología y diagnóstico molecular en patología*. https://www-sciencedirect-com.translate.goog/topics/immunology-and-microbiology/antibiotic-susceptibility-testing?_x_tr_sl=en&_x_tr_tl=es&_x_tr_hl=es&_x_tr_pto=sge#:~:text=In%20the%20Kirby%20Bauer%20method,susceptible%2C%20intermediate%2C%20or%20resistant.
- Bisso-Andrade, A. (2018). *Resistencia a los antimicrobianos*. https://www.medicinainterna.net.pe/sites/default/files/revista_vol_23_2/SPMI%202018-2%20%20Resistencia%20a%20los%20antimicrobianos.pdf
- Bolaños, F., Fernando, O., Graffe, T., Eduardo, J., Cabrera, P., Jaiver, J., & Gallego, C. (2012). *MASTITIS BOVINA: GENERALIDADES Y MÉTODOS DE DIAGNOSTICO*. <https://www.produccion->

animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_leche/78-mastitis.pdf

- Brahma, U., Suresh, A., Murthy, S., Bhandari, V., & Sharma, P. (2022). Antibiotic Resistance and Molecular Profiling of the Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* Causing Bovine Mastitis from India. *Microorganisms*, 10(4), 833. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040833>
- Campos, B., Pickering, A. C., Rocha, L. S., Aguilar, A. P., Fabres-Klein, M. H., de Oliveira Mendes, T. A., Fitzgerald, J. R., & de Oliveira Barros Ribon, A. (2022). Diversity and pathogenesis of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis: Current understanding and future perspectives. *BMC Veterinary Research*, 18, 115. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03197-5>
- Campos, B., Pickering, A., Souza, L., & Pereira, A. (2022). *Diversity and pathogenesis of Staphylococcus aureus from bovine mastitis: Current understanding and future perspectives | BMC Veterinary Research | Full Text*. <https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-022-03197-5>
- Castellano, M., & Perozo-Mena, A. (2010). *Mecanismos de resistencia a antibióticos β-lactámicos en Staphylococcus aureus*. 38(1). [https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0075-52222010000100003#:~:text=aureus:%20resistencia%20mediada%20por%20enzimas,uni%C3%B3n%20a%20penicilinas%20\(PBPs\)](https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0075-52222010000100003#:~:text=aureus:%20resistencia%20mediada%20por%20enzimas,uni%C3%B3n%20a%20penicilinas%20(PBPs)).
- Cervantes, E., García, R., & Salazar, P. M. (2014). *Características generales del Staphylococcus aureus*. 13.
- Chakrawarti, A., Casey, C., & Burk, A. (2024). *An observational study demonstrates human-adapted Staphylococcus aureus strains have a higher frequency of antibiotic resistance compared to cattle-adapted strains isolated from dairy farms making farmstead cheese | BMC Veterinary Research | Full Text*. <https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-024-03910-6>
- Clauditz, A., Resch, A., Wieland, K.-P., Peschel, A., & Götz, M. (2006). *Staphyloxanthin Plays a Role in the Fitness of Staphylococcus aureus and Its Ability To Cope with Oxidative Stress*. <https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/iai.00204-06>
- Crespi, E., Pereyra, A. M., Puigdevall, T., Rumi, M. V., Testorelli, M. F., Caggiano, N., Gulone, L., Mollerach, M., Gentilini, E. R., & Srednik, M. E. (2021). Antimicrobial

- resistance studies in staphylococci and streptococci isolated from cows with mastitis in Argentina. *Journal of Veterinary Science*, 23(6), e12. <https://doi.org/10.4142/jvs.21062>
- Elmesseri, R. A., Saleh, S. E., Elsherif, H. M., Yahia, I. S., & Aboshanab, K. M. (2022). *Staphyloxanthin as a Potential Novel Target for Deciphering Promising Anti-Staphylococcus aureus Agents*. <https://www.mdpi.com/2079-6382/11/3/298>
- Freu, G., Tomazi, T., & Filho, A. (2022). *Antimicrobial Resistance and Molecular Characterization of Staphylococcus aureus Recovered from Cows with Clinical Mastitis in Dairy Herds from Southeastern Brazil*. <https://www.mdpi.com/2079-6382/11/4/424>
- Freu, G., Tomazi, T., Filho, A. F. S., Heinemann, M. B., & dos Santos, M. V. (2022). Antimicrobial Resistance and Molecular Characterization of *Staphylococcus aureus* Recovered from Cows with Clinical Mastitis in Dairy Herds from Southeastern Brazil. *Antibiotics*, 11(4), 424. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11040424>
- García, C. (2012). *Resistencia antibiótica en el Perú y América Latina*. 29(2). http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1728-59172012000200010&script=sci_arttext
- Gob.pe. (2023, diciembre 6). *Resistencia a los antimicrobianos*. <https://www.gob.pe/institucion/senasa/campa%C3%B1as/4953-resistencia-a-los-antimicrobianos>
- Gonçalves, J. L., Lee, S. H. I., Camargo, C. H., Zanella, R. C., Silva, N. C. C., Rall, V. L. M., Cue, R. I., & Dos Santos, M. V. (2023). Molecular characterization of persistent subclinical mastitis-causing *Staphylococcus aureus* from dairy farms. *Brazilian Journal of Microbiology: [Publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 54(2), 1181-1189. <https://doi.org/10.1007/s42770-023-00918-2>
- Hamdan-Partida, A., González García, S., & Bustos-Martínez, J. (2015). Identificación de *Staphylococcus aureus* utilizando como marcadores los genes *nucA* y *femB*. *Ciencias Clínicas*, 16(2), 37-41. <https://doi.org/10.1016/j.cc.2016.02.002>
- Haq, I., Kamai, M., Swelum, A., & Kan, S. (2024). *Alarming multidrug resistance in Staphylococcus aureus isolated from raw milk of cows with subclinical mastitis: Antibiotic resistance patterns and occurrence of selected resistance genes | PLOS One*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38753608/>

- Herrero, A., Lopez, S., Rodriguez, K., Paz, J., & Cardenas, L. (2024). *Resistencia antimicrobiana de Staphylococcus aureus aislado en cultivos del Laboratorio de Microbiología, Hospital Mártires del 9 de abril*. 3, 6.
- Hurtado, M., de la Parte, M., & Brito, A. (2002). *Staphylococcus aureus: Revisión de los mecanismos de patogenicidad y la fisiopatología de la infección estafilocócica*. 22(2). [https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562002000200003#:~:text=aureus%20es%20anaerobio%20facultativo%20y,para%20la%20desoxirribonucleasa%20\(2\).](https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562002000200003#:~:text=aureus%20es%20anaerobio%20facultativo%20y,para%20la%20desoxirribonucleasa%20(2).)
- Katz, D. S. (2010). *Coagulase Test Protocol*. <https://asm.org/asm/media/protocol-images/coagulase-test-protocol.pdf>
- Kerro Dego, O., & Vidlund, J. (2024). Staphylococcal mastitis in dairy cows. *Frontiers in Veterinary Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fvets.2024.1356259>
- Khanal, S., Boonyayatra, S., & Awaiwanont, N. (2022). Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy farms: A systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Veterinary Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.947154>
- Kobayashi, N., Wu, H., Kojima, K., Taniguchi, K., Urasawa, S., Uehara, N., Omizu, Y., Kishi, Y., Yagihashi, A., & Kurokawa, I. (1994). Detection of *mecA*, *femA*, and *femB* genes in clinical strains of staphylococci using polymerase chain reaction. *Epidemiology and Infection*, 113(2), 259-266. <https://doi.org/10.1017/s0950268800051682>
- Locatelli, C., Gattolin, S., Monistero, V., Castiglioni, B., Moroni, P., Addis, M. F., & Cremonesi, P. (2023). *Staphylococcus aureus* *coa* gene sequence analysis can prevent misidentification of coagulase-negative strains and contribute to their control in dairy cow herds. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1120305. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1120305>
- Mapcarta. (s. f.). *Llachoccmayo - Mapa - Pueblo - Distrito de Chiara, Perú*. <https://mapcarta.com/es/20220206>
- Maldonado, D., Santos, C., Qilapanta, A., & Mena, L. (2022). *Diagnóstico de Mastitis Subclínica Mediante Tres Métodos para el Control y Tratamiento en Bovinos de Leche Holstein*. 8. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8383375>

- Miranda, M. (2011). *Resistencia antimicrobiana del Staphylococcus aureus en México*. 68(4). https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-11462011000400003
- Molineri, A. I., Camussone, C., Zbrun, M. V., Suárez Archilla, G., Cristiani, M., Neder, V., Calvino, L., & Signorini, M. (2021). Resistencia antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* aislado de mastitis bovina: Revisión sistemática y metanálisis. *Preventive Veterinary Medicine*, 188, 105261. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2021.105261>
- Monistero, V., Graber, H. U., Pollera, C., Cremonesi, P., Castiglioni, B., Bottini, E., Ceballos-Marquez, A., Lasso-Rojas, L., Kroemker, V., Wente, N., Petzer, I.-M., Santisteban, C., Runyan, J., Veiga dos Santos, M., Alves, B. G., Piccinini, R., Bronzo, V., Abbassi, M. S., Said, M. B., & Moroni, P. (2018). *Staphylococcus aureus* Isolates from Bovine Mastitis in Eight Countries: Genotypes, Detection of Genes Encoding Different Toxins and Other Virulence Genes. *Toxins*, 10(6), 247. <https://doi.org/10.3390/toxins10060247>
- Neelam, Jain, V. K., Singh, M., Joshi, V. G., Chhabra, R., Singh, K., & Rana, Y. S. (2022). Virulence and antimicrobial resistance gene profiles of *Staphylococcus aureus* associated with clinical mastitis in cattle. *PLoS ONE*, 17(5), e0264762. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264762>
- Nemati, G., Romano, A., Waht, F., Berger, T., & Vazquez, L. (2023). *Frontiers | Bovine Staphylococcus aureus: A European study of contagiousness and antimicrobial resistance*. <https://www.frontiersin.org/journals/veterinary-science/articles/10.3389/fvets.2023.1154550/full>
- Ning, K., Zhou, R., & Li, M. (2023). Antimicrobial resistance and molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolates from raw milk in Hunan Province. *PeerJ*, 11, e15847. <https://doi.org/10.7717/peerj.15847>
- Pasachova Garzón, J., Ramirez Martinez, S., & Muñoz Molina, L. (2019). *Staphylococcus aureus*: Generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular. *Nova*, 17(32), 25-38. <https://doi.org/10.22490/24629448.3631>
- Quispe, R., Peña, G., & Andia, V. (2021). *Resistencia antimicrobiana de Staphylococcus aureus y Streptococcus agalactiae aislados de leche de vacas con mastitis*. <https://www.scielo.org.ar/pdf/revet/v32n1/1669-6840-revet-32-01-79.pdf>

- Reyes, E., & Arguello, Jefferson. (2015). *Estudio comparativo entre los métodos diagnósticos para mastitis subclínicas, California Test y DRAMINSKI 4Q en vacas Jersey, Diriamba Carazo, Agosto-Octubre, 2015* [UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA]. <https://repositorio.una.edu.ni/3214/1/tnl73r457.pdf>
- Rodríguez, M. F., Gomez, A. P., & Ceballos-Garzon, A. (2023). Antimicrobial Resistance Profiles of Staphylococcus Isolated from Cows with Subclinical Mastitis: Do Strains from the Environment and from Humans Contribute to the Dissemination of Resistance among Bacteria on Dairy Farms in Colombia? *Antibiotics*, 12(11), 1574. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12111574>
- Shields, P., & Tsang, A. (2006). *Mannitol salt agar plates protocols. American Society for Microbiology*. <https://asm.org/asm/media/protocol-images/mannitol-salt-agar-plates-protocols.pdf>
- Soltan Dallal, M. M., Khoramizadeh, M. R., Amiri, S. A., Saboor Yaraghi, A. A., & Mazaheri Nezhad Fard, R. (2016). Coagulase gene polymorphism of Staphylococcus aureus isolates: A study on dairy food products and other foods in Tehran, Iran. *Food Science and Human Wellness*, 5(4), 186-190. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2016.09.004>
- Son, H. M., & Duc, H. M. (2024). Prevalence and Phage-Based Biocontrol of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Isolated from Raw Milk of Cows with Subclinical Mastitis in Vietnam. *Antibiotics*, 13(7), 638. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13070638>
- Tineo-Ayala, J. Y., & Andía-Ayme, V. (2017). Mastitis bovina por recuento de células somáticas con PortaSCC® y Test de California en el fundo de Allpachaca–UNSCH, Ayacucho, Perú. REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria, 18(7).
- Topographic Map. (s. f.). Mapa topográfico de Manzanayocc, distrito de Socos, provincia de Huamanga, Ayacucho, Perú. <https://es-pe.topographic-map.com/>
- Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. (2018). *Calidad sanitaria y nutricional de la leche bovina de la Microcuenca Allpachaka-Ayacucho en el ámbito de la salud pública y prevención de enfermedades endémicas* [Proyecto de investigación financiado por el Fondo de Desarrollo Socioeconómico de Camisea (FOCAM)]. Ayacucho, Perú.

- Universidad Peruana Cayetano Heredia. (2025). Campus Central San Martín de Porres. Universidad Peruana Cayetano Heredia. <https://cayetano.edu.pe/sobre-cayetano/sedes/campus-central/>
- Vakkamäki, J., Taponen, S., Heikkilä, A.-M., & Pyörälä, S. (2017). Bacteriological etiology and treatment of mastitis in Finnish dairy herds. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 59(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s13028-017-0301-4>
- Valero-Leal, K., Olivares, Y., Perozo, A., Valbuena, E., Boscán, L., Colina, G., & Briñez, W. (2010). *Susceptibilidad a los agentes antimicrobianos en cepas de Staphylococcus aureus aisladas en leche de bovinos con mastitis subclínica y leche de tanque*. https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592010000400006
- Wang, D., Wang, Z., Yan, Z., Wu, J., Ali, T., Li, J., Lv, Y., & Han, B. (2015). Bovine mastitis *Staphylococcus aureus*: Antibiotic susceptibility profile, resistance genes and molecular typing of methicillin-resistant and methicillin-sensitive strains in China. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 31, 9-16. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.12.039>
- Wang, K., Cha, J., Liu, K., Deng, J., Yang, B., Xu, H., Wang, J., Zhang, L., Gu, X., Huang, C., & Qu, W. (2022). The prevalence of bovine mastitis-associated *Staphylococcus aureus* in China and its antimicrobial resistance rate: A meta-analysis. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 1006676. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1006676>
- Zendejas-Manzo, G. S., Avalos-Flores, H., & Soto-Padilla, M. Y. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades,. *Staphylococcus aureus*, 25(3).
- Zhang, J., Suo, Y., Zhang, D., Jin, F., Zhao, H., & Shi, C. (2018). Genetic and Virulent Difference Between Pigmented and Non-pigmented *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00598>

ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de PCR para la detección del gen *nuc* en el aislamiento de *Staphylococcus aureus*

Nombre primer	Gen	Secuencia 5'--3' Secuencia 5'--3'
forward	nuc	CGATTGATGGTGATACGGTT
reverse:		ACGCAAGCCTTGACGAACTAAAGC

Tamaño del amplicom	Ciclado
279 pb	Desnaturalización inicial = 94°C por 5min; Ciclado= 30 ciclos: 94°C 30min -- 58° 30seg -- 72°C 45seg; Extension final = 72°C por 10min

Reacción de PCR --> Vol. final = 25ul	
Reactivo	Volumen
H2O	12.9 ul
Buffer 10X	2.5 ul
MgCl2 (25 mM)	2.0 ul
dNTP's (2.5 mM)	2.0 ul
Primer Forward (10 µM)	1.25 ul
Primer Reverse (10 µM)	1.25 ul
Taq pol (5U/ul)	0.75 U/ul
ADN	3 ul
Vol. Final	25 ul

Controles	
A (+)	<i>S. aureus</i>
E (-)	<i>S. epidermidis</i>
S (-)	<i>S. saprophyticus</i>

Anexo 2. Protocolo de PCR para la detección del gen *coa* en el aislamiento de *Staphylococcus aureus*

Nombre primer	Gen	Secuencia 5'--3' Secuencia 5'--3'
forward	coa	ATAGAGATGCTGGTACAGG
reverse:		GCTTCCGATTGTTCGATGC

Tamaño del amplicom	Ciclado
627, 710, 910 pb	Desnaturalización inicial = 94°C por 5min; Ciclado= 30 ciclos: 94°C 40seg -- 58° 60seg -- 72°C 60seg; Extension final = 72°C por 10min

Reacción de PCR --> Vol. final = 25ul	
Reactivo	Volumen
H2O	12.9 ul
Buffer 10X	2.5 ul
MgCl2 (25 mM)	2.0 ul
dNTP's (2.5 mM)	2.0 ul
Primer Forward (10 µM)	1.25 ul
Primer Reverse (10 µM)	1.25 ul
Taq pol (5U/ul)	0.75 U/ul
ADN	3 ul
Vol. Final	25 ul

Controles	
A (+)	<i>S. aureus</i>
E (-)	<i>S. epidermidis</i>
S (-)	<i>S. saprophyticus</i>

Anexo 3. Proceso para elaborar la parte estadística del trabajo.

1. Prueba de homogeneidad de χ^2 para la sensibilidad antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* a partir de muestras positivas de cuartos mamarios de vacas en tres comunidades de la Microcuenca Allpachaka. Ayacucho, 2024.

Resumen de procesamiento de casos

	Válido		Casos Perdido		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Antibiótico * Susceptibilidad antimicrobiana	135	100,0%	0	0,0%	135	100,0%

Tabla cruzada Antibiótico*Susceptibilidad antimicrobiana

			Susceptibilidad antimicrobiana			Total
			Sensi ble	Interme dio	Resiste nte	
Antibiótico	Clindamicina	Recuento	1 _a	8 _b	18 _b	27
		% dentro de Susceptibilidad antimicrobiana	2,4%	25,0%	29,0%	20,0%
	Cefoxitina	Recuento	14 _a	0 _b	13 _a	27
		% dentro de Susceptibilidad antimicrobiana	34,1%	0,0%	21,0%	20,0%
	Eritromicina	Recuento	2 _a	22 _b	3 _a	27
		% dentro de Susceptibilidad antimicrobiana	4,9%	68,8%	4,8%	20,0%
	Penicilina	Recuento	2 _a	0 _a	25 _b	27
		% dentro de Susceptibilidad antimicrobiana	4,9%	0,0%	40,3%	20,0%
	Oxacilina	Recuento	22 _a	2 _b	3 _b	27
		% dentro de Susceptibilidad antimicrobiana	53,7%	6,3%	4,8%	20,0%
	Total	Recuento	41	32	62	135
		% dentro de Susceptibilidad antimicrobiana	100,0 %	100,0%	100,0%	100,0 %

Cada letra del subíndice denota un subconjunto de Susceptibilidad antimicrobiana categorías cuyas proporciones de columna no difieren de forma significativa entre sí en el nivel ,05.

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	Df	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	126,887 ^a	8	,000
Razón de verosimilitud	128,827	8	,000
Asociación lineal por lineal	11,465	1	,001
N de casos válidos	135		

a. 0 casillas (0,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 6,40.

2. Prueba de homogeneidad de χ^2 para la frecuencia de mastitis subclínica y a *Staphylococcus aureus* a partir de muestras cultivadas T/+/+/+/+ según cuartos mamarios en vacas entres comunidades de la Microcuenca de Allpachaka. Ayacucho, 2024

Resumen de procesamiento de casos

	Válido		Casos Perdido		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Característica * Cuarto mamario	390	100,0%	0	0,0%	390	100,0%

Tabla cruzada Característica*Cuarto mamario

			Cuarto mamario				Total
			CAD	CAI	CPD	CPI	
Característica	Sanas sin mastitis sub clínica	Recuento	64 _a	69 _a	66 _a	63 _a	262
		% dentro de Cuarto mamario	65,3%	70,4 %	68,0%	64,9 %	67,2%
	Con mastitis subclínica con Ausencia de S. aureus	Recuento	26 _a	23 _a	25 _a	27 _a	101
		% dentro de Cuarto mamario	26,5%	23,5 %	25,8%	27,8 %	25,9%
	Staphiloccocus aureus positive	Recuento	8 _a	6 _a	6 _a	7 _a	27
		% dentro de Cuarto mamario	8,2%	6,1 %	6,2%	7,2 %	6,9%
Total	Recuento	98	98	97	97	390	
	% dentro de Cuarto mamario	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	

Cada letra del subíndice denota un subconjunto de Cuarto mamario categorías cuyas proporciones de columna no difieren de forma significativa entre sí en el nivel ,05.

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	1,062 ^a	6	,983
Razón de verosimilitud	1,059	6	,983
Asociación lineal por lineal	,000	1	,983
N de casos válidos	390		

a. 0 casillas (0,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 6,72.

Anexo 4. Ficha de recolección de muestras de leche con mastitis subclínica.

FICHA DE RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Título del proyecto: Caracterización y susceptibilidad antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* en leche con mastitis subclínica bovina, en tres comunidades de Allpachaka – Ayacucho 2024.

Investigador responsable: M.V. Ruth Palomino Martinez.

Institución: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga

Fecha de muestreo: ____ / ____ / ____ **Código de muestra:** _____

1. Datos del animal

Parámetro	Información
Identificación del animal	_____
Raza	_____
Edad	☐ < 2 años ☐ 2–5 años ☐ > 5 años

2. Datos de la granja o unidad productiva

Parámetro	Información
Nombre del propietario / responsable	_____
Comunidad	_____
Tipo de explotación	☐ Extensiva ☐ Semi-intensiva ☐ Intensiva
Tipo de alimentación	☐ Pastoreo ☐ Forraje ☐ Balanceado ☐ Mixta
Observaciones	_____

3. Datos de la muestra

Parámetro	Información
Tipo de muestra	Leche cruda individual por cuarto mamario
Hora de muestreo	_____
Cuartos evaluados	☐ CAD ☐ CAI ☐ CPD ☐ CPI
Resultado de CMT	CAD: ☐ Neg ☐ Traza ☐ + ☐ ++ ☐ +++ CAI: ☐ Neg ☐ Traza ☐ + ☐ ++ ☐ +++ CPD: ☐ Neg ☐ Traza ☐ + ☐ ++ ☐ +++ CPI: ☐ Neg ☐ Traza ☐ + ☐ ++ ☐ +++
Observaciones	_____

4. Firma del responsable de la toma de muestra

Nombre y firma: _____

Cargo: _____

Fecha: ____ / ____ / ____

Anexo 5. Panel fotográfico



Foto 1. Recolección de muestras de leche con mastitis subclínica en vacas de la comunidad de Llachoccmayo.



Foto 2. Recolección de muestras de leche con mastitis subclínica en vacas de la comunidad de Tambocucho



Foto 3. Prueba de fermentación de manitol en agar manitol salado. Las placas con color amarillo indican cepas manitol positivas (fermentadoras), mientras que las de color rojo representan cepas manitol negativas (no fermentadoras).

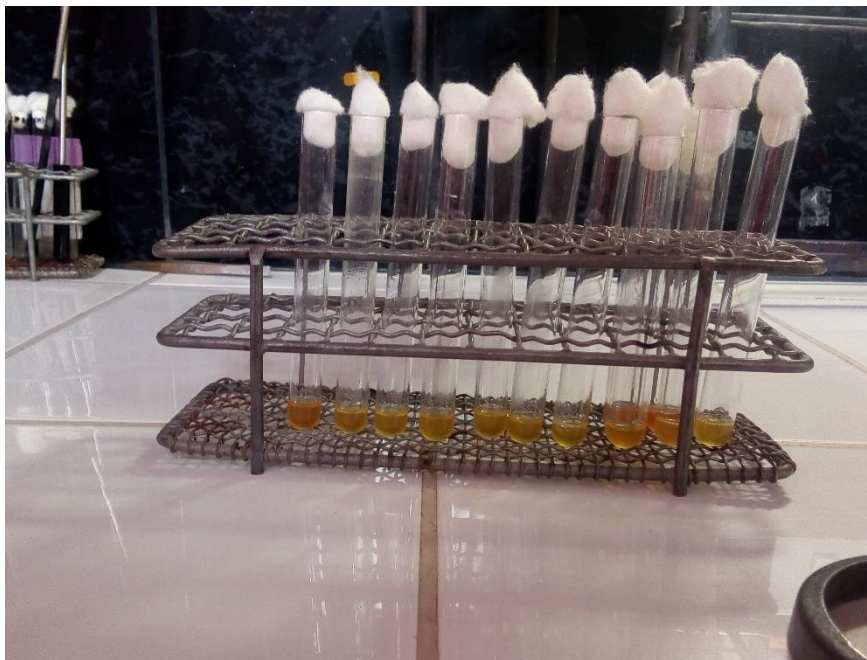


Foto 4. Prueba de coagulasa en tubo para la identificación de *Staphylococcus aureus*.

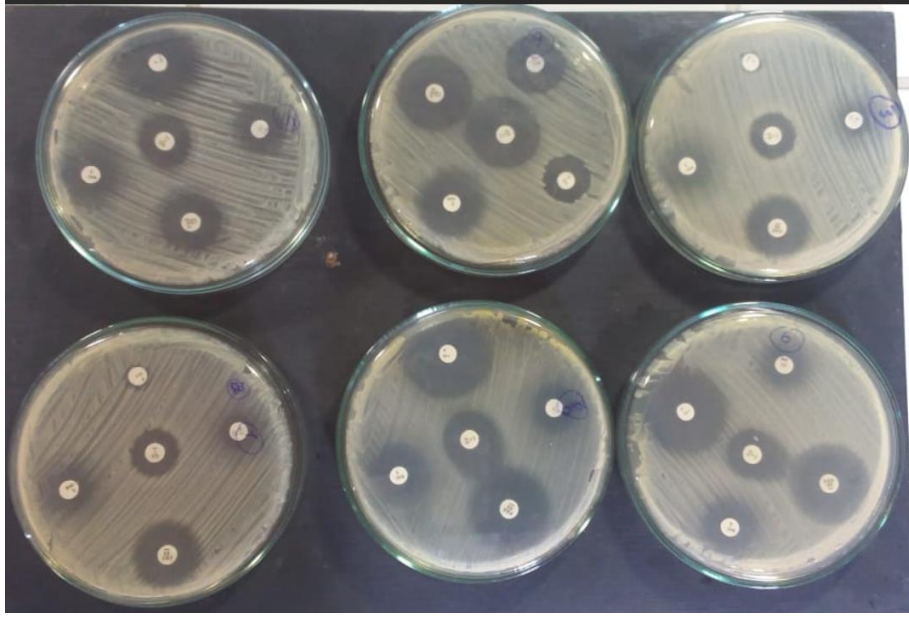


Foto 5. Antibiogramas realizados a las cepas de *Staphylococcus aureus*.

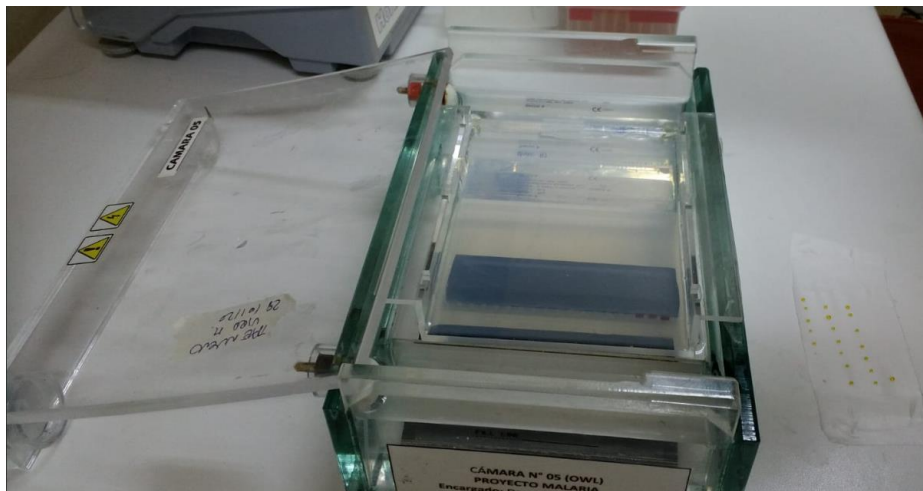


Foto 6. Corrida en gel de agarosa de genes de *Staphylococcus aureus*.



Foto 7. Gel de agarosa con genes de *Staphylococcus aureus* visualizado en transiluminador UV.



Foto 8. Sistema de foto documentación de geles de agarosa bajo luz UV.

Anexo 6. Artículo científico

Caracterización fenotípica, molecular y perfil de susceptibilidad antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* aislado de leche con mastitis subclínica bovina en la microcuenca de Allpachaka, Ayacucho

Phenotypic and molecular characterization and antimicrobial susceptibility profile of *Staphylococcus aureus* isolated from milk with bovine subclinical mastitis in the Allpachaka micro-basin, Ayacucho

Autora: Ruth PALOMINO MARTINEZ

Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga

ruth.palomino@unsch.edu.pe

RESUMEN

Staphylococcus aureus es un importante agente asociado con la mastitis subclínica bovina y representa un problema sanitario por su capacidad de persistir en la glándula mamaria y desarrollar resistencia antimicrobiana. El objetivo fue caracterizar fenotípica y molecularmente *S. aureus* y determinar su perfil de susceptibilidad antimicrobiana en leche con mastitis subclínica bovina de tres comunidades de la microcuenca de Allpachaka, Ayacucho, durante 2024. Se analizaron 392 muestras de leche de 98 vacas mediante California Mastitis Test, aislamiento bacteriano, identificación fenotípica y PCR para los genes *coa*, *femB* y *nucA*. La susceptibilidad antimicrobiana se evaluó mediante difusión en disco. Se obtuvieron 27 aislamientos de *S. aureus*; el 74,1 % presentó colonias de color crema y todos fueron positivos para los genes evaluados. La mayor resistencia correspondió a penicilina (92,6 %), clindamicina (66,7 %) y cefoxitina (48,1 %), mientras que la mayor sensibilidad se observó frente a oxacilina (81,5 %). El 6,9 % de las muestras presentó aislamiento confirmado de *S. aureus*. Los hallazgos

evidencian su presencia y un perfil relevante de resistencia antimicrobiana en la zona de estudio.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, mastitis subclínica bovina, resistencia antimicrobiana, susceptibilidad antimicrobiana.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is an important agent associated with bovine subclinical mastitis and represents a health concern due to its ability to persist in the mammary gland and develop antimicrobial resistance. This study aimed to phenotypically and molecularly characterize *S. aureus* and determine its antimicrobial susceptibility profile in milk from bovine subclinical mastitis cases in three communities of the Allpachaka microbasin, Ayacucho, Peru, during 2024. A total of 392 milk samples from 98 cows were analyzed using the California Mastitis Test, bacterial isolation, phenotypic identification, and PCR targeting the *coa*, *femB*, and *nucA* genes. Antimicrobial susceptibility was evaluated by the disk diffusion method. Twenty-seven *S. aureus* isolates were obtained; 74.1% showed cream-colored colonies, and all were positive for the evaluated genes. The highest resistance was observed to penicillin (92.6%), clindamycin (66.7%), and ceftiofur (48.1%), whereas the highest susceptibility was observed to oxacillin (81.5%). Confirmed *S. aureus* isolation was detected in 6.9% of the samples. These findings demonstrate the presence of *S. aureus* and a relevant antimicrobial resistance profile in the study area.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; bovine subclinical mastitis; antimicrobial resistance; antimicrobial susceptibility.

I. Introducción

La mastitis subclínica bovina constituye una de las enfermedades de mayor importancia sanitaria en los sistemas de producción lechera. Su carácter poco evidente favorece que permanezca sin diagnóstico y se asocia con pérdidas por disminución de la producción y deterioro de la calidad de la leche (Gonçalves et al., 2023).

Entre los principales agentes etiológicos se encuentra *Staphylococcus aureus*, microorganismo capaz de establecer infecciones persistentes y cuya epidemiología dificulta el control de la mastitis en los sistemas lecheros (Campos et al., 2022; Kerro Dego & Vidlund, 2024).

La identificación convencional se basa en aislamiento, características coloniales y pruebas fenotípicas; sin embargo, la confirmación molecular mediante marcadores como *coa*, *femB* y *nucA* permite respaldar la identidad bacteriana con mayor precisión (Hamdan-Partida et al., 2015; Monistero et al., 2018).

La resistencia antimicrobiana constituye otra dificultad relevante, debido a que puede comprometer la eficacia del tratamiento y favorecer la persistencia de cepas resistentes. Los perfiles de susceptibilidad de *S. aureus* aislado de mastitis bovina muestran variaciones entre regiones y sistemas productivos (Molineri et al., 2021; Neelam et al., 2022). En este contexto, la determinación del perfil de susceptibilidad contribuye a orientar el uso racional de antimicrobianos.

En la microcuenca de Allpachaka, la producción bovina lechera representa una actividad de importancia para las comunidades de la zona. Sin embargo, es necesario contar con información específica sobre las características de los

aislamientos de *S. aureus* y su comportamiento frente a los antimicrobianos. Por ello, el objetivo del presente estudio fue caracterizar fenotípica y molecularmente *Staphylococcus aureus* y determinar su perfil de susceptibilidad antimicrobiana en leche con mastitis subclínica bovina en tres comunidades de la microcuenca de Allpachaka, Ayacucho.

II. Metodología

Investigación cuantitativa, básica, descriptiva, no experimental, observacional y transversal, orientada a caracterizar fenotípica y molecularmente *Staphylococcus aureus*, determinar su susceptibilidad antimicrobiana y frecuencia de aislamiento, sin manipulación de variables.

2.1. Población y muestra

La población estuvo conformada por 930 vacas en producción de Tambocucho, Manzanayocc y Llachoccmayo. Con un 95 % de confianza, 10 % de error y máxima variabilidad, se obtuvo una muestra inicial de 87 vacas, incrementada por posibles pérdidas, estableciéndose finalmente 98 vacas, de las cuales se recolectaron 392 muestras de leche, correspondientes a los cuatro cuartos mamarios.

2.2. Recolección y procesamiento de las muestras

La recolección se realizó durante el ordeño matutino en Tambocucho, Manzanayocc y Llachoccmayo. Previo al muestreo, se realizó la limpieza, secado y desinfección de los pezones. Se aplicó el California Mastitis Test (CMT) a cada cuarto mamario y las muestras positivas se recolectaron asépticamente en frascos

estériles, se identificaron y transportaron refrigeradas al Laboratorio de Microbiología e Inmunología Veterinaria de la UNSCH.

2.3. Aislamiento e identificación fenotípica

Las muestras fueron sembradas por estría en agar Tripticasa de Soya y agar Manitol Salado e incubadas a 37 °C durante 24 horas. Posteriormente, se evaluaron las características macroscópicas, fermentación de manitol, tinción de Gram y prueba de coagulasa, identificándose 27 cepas fenotípicamente compatibles con *Staphylococcus aureus*.

2.4. Confirmación molecular

Las 27 cepas identificadas fenotípicamente fueron confirmadas mediante PCR, amplificando los genes *coa*, *femB* y *nucA* con cebadores específicos. Los productos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 %, utilizando *S. aureus* como control positivo, *S. epidermidis* y *S. saprophyticus* como controles negativos.

2.5. Determinación del perfil de susceptibilidad antimicrobiana

Las 27 cepas confirmadas molecularmente fueron evaluadas mediante difusión en disco de Kirby-Bauer, siguiendo el protocolo del INS (2002). Las suspensiones se ajustaron a 0,5 de McFarland y se inocularon en agar Mueller-Hinton. Se evaluaron penicilina (10 µg), cefoxitina (30 µg), clindamicina (2 µg), eritromicina (15 µg) y oxacilina (1 µg). Los resultados se clasificaron como sensibles, intermedios o resistentes.

2.6. Análisis estadístico

Los datos se registraron en Microsoft Excel y se analizaron mediante estadística descriptiva, frecuencias absolutas y relativas. Se aplicaron las pruebas de comparación múltiple de proporciones con ajuste de Holm y Chi-cuadrado, considerando $\alpha = 0,05$ y $p < 0,05$ como criterio de significancia estadística.

III. Resultados

3.1. Caracterización fenotípica de *Staphylococcus aureus*

Se identificaron 27 cepas fenotípicamente compatibles con *Staphylococcus aureus*. Las cepas presentaron características morfológicas homogéneas, con forma circular, superficie lisa y bordes regulares. Predominaron las colonias de color crema, observadas en el 74,1 % de los aislamientos.

3.2. Caracterización molecular de *Staphylococcus aureus*

Los 27 aislamientos fueron positivos para los genes *coa*, *femB* y *nucA*, confirmando molecularmente su identidad como *Staphylococcus aureus*.

Tabla 1. Detección de genes en los aislamientos de *Staphylococcus aureus* (n = 27)

Gen	Aislamientos positivos	%
<i>coa</i>	27	100
<i>femB</i>	27	100
<i>nucA</i>	27	100

3.3. Perfil de susceptibilidad antimicrobiana

La mayor resistencia se observó frente a penicilina (92,6 %), seguida de clindamicina (66,7 %) y cefoxitina (48,1 %). La mayor sensibilidad correspondió a oxacilina (81,5 %). Para eritromicina predominó la categoría intermedia, con 81,5 % de los aislamientos.

Tabla 2. Perfil de susceptibilidad antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* (n = 27)

Susceptibilidad antimicrobiana	Clindamicina		Cefoxitina		Eritromicina		Penicilina		Oxacilina		Total	%
	CC	%	FOX	%	E	%	P	%	OX	%		
	2µg		30µg		15µg		10µg		1µg			
Sensible	1	3,7% ^a	14	51,9% ^a	2	7,4% ^a	2	7,4% ^a	22	81,5% ^a	41	30,4%
Intermedio	8	29,6% ^b	0	0,0% ^b	22	81,5% ^b	0	0,0% ^a	2	7,4% ^b	32	23,7%
Resistente	18	66,7% ^b	13	48,1% ^a	3	11,1% ^a	25	92,6% ^b	3	11,1% ^b	62	45,9%
Total	27	100,0%	27	100,0%	27	100,0%	27	100,0%	27	100,0%	135	100,0%

Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las categorías de susceptibilidad para los antimicrobianos evaluados ($p < 0,05$)

3.4. Frecuencia de mastitis subclínica y aislamiento de *Staphylococcus aureus*

De las 392 muestras evaluadas, 263 (67,2 %) correspondieron a cuartos mamarios sin mastitis subclínica. Un total de 102 muestras (25,9 %) presentó mastitis subclínica sin aislamiento de *S. aureus*, mientras que 27 muestras (6,9 %) presentaron mastitis subclínica con aislamiento confirmado de *S. aureus*. Las diferencias entre los grupos fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Tabla 3. Frecuencia de mastitis subclínica y presencia de *Staphylococcus aureus*

Característica patológica de vacas	Cuartos mamarios				Total	%
	CAD	CAI	CPD	CPI		
Vacas sanas sin mastitis sub clínica	64	69	66	64	263	67,2 ^a
Vacas con mastitis subclínica con Ausencia de <i>S. aureus</i>	26	23	26	27	102	25,9 ^b
Vacas con mastitis subclínica con presencia de <i>S. aureus</i>	8	6	6	7	27	6,9 ^c
Total	98	98	98	98	392	100,0

3.5. Prevalencia de mastitis subclínica

De los 392 cuartos mamarios evaluados, 263 (67,1 %) presentaron resultado negativo al CMT; 25 (6,4 %) presentaron trazas; 62 (15,8 %) fueron positivos débiles (+); 35 (8,9 %) positivos evidentes (++); y 7 (1,8 %) positivos fuertes (+++). En conjunto, la prevalencia de mastitis subclínica fue de 32,9 %.

Tabla 4. Prevalencia de mastitis subclínica según la reacción al CMT

Grado de reacción al CMT	Cuartos mamarios bovinos				Total	Frecuencia (%)
	CAD	CAI	CPD	CPI		
Negativo (N)	64	69	66	64	263	67,1 ^a
Trazas (T)	7	5	5	8	25	6,4 ^b
Positivo débil (+)	15	14	20	13	62	15,8 ^c
Positivo evidente (++)	9	6	7	13	35	8,9 ^b
Positivo fuerte (+++)	3	4	0	0	7	1,8 ^d
Total	98	98	98	98	392	100,0

CAD: Cuarto anterior derecho; CAI: Cuarto anterior izquierdo; CPD: Cuarto posterior derecho
CPI: Cuarto posterior izquierdo.

^{a,b} Letras distintas en filas indica diferencias estadísticas ($p < 0.05$) a la prueba de bondad de ajuste χ^2 y la diferencia de proporciones

DISCUSIÓN

Los resultados permitieron caracterizar los aislamientos de *Staphylococcus aureus* procedentes de vacas con mastitis subclínica de tres comunidades de la microcuenca de Allpachaka mediante la integración de métodos fenotípicos, moleculares y de susceptibilidad antimicrobiana.

Las características fenotípicas observadas fueron homogéneas, predominando las colonias de color crema, positividad de la prueba de coagulasa concuerdan con las características descritas para *S. aureus* en estudios previos (Clauditz et al., 2006; Elmesserli et al., 2022).

La confirmación molecular evidenció la detección de *coa*, *femB* y *nucA* en el 100 % de los 27 aislamientos. Este resultado demuestra concordancia entre la identificación fenotípica, molecular y coincide con estudios que destacan la utilidad de estos marcadores para la identificación de *S. aureus*. Monistero et al. (2018) reportaron positividad del 100 % para los genes *coa* y *nuc* en aislamientos procedentes de mastitis bovina. Asimismo, Ning et al. (2023) detectaron *femB* en la totalidad de las cepas analizadas, mientras que Kobayashi et al. (1994) demostraron la utilidad de los genes *fem* en estudios moleculares de estafilococos.

La elevada resistencia frente a penicilina (92,6 %) fue el hallazgo más relevante del perfil antimicrobiano. Este resultado fue similar al 90,4 % reportado por Wang et al. (2022) y al 83,64 % descrito por Neelam et al. (2022). La elevada resistencia puede estar relacionada con mecanismos como la producción de β -lactamasas, que reducen la eficacia terapéutica de la penicilina (Vakkamäki et al., 2017).

La resistencia a clindamicina alcanzó 66,7 %, valor superior al estimador global de 14,9 % reportado por Molineri et al. (2021). Sin embargo, Brahma et al. (2022) también comunicaron una frecuencia elevada de resistencia, de 53,75 %, en aislamientos de mastitis bovina en India. Estas diferencias reflejan la variabilidad geográfica de la resistencia antimicrobiana y la posible influencia de los patrones locales de utilización de antibióticos.

En relación con cefoxitina, se observó un patrón heterogéneo, con 51,9 % de sensibilidad y 48,1 % de resistencia. El porcentaje de resistencia fue superior al 35,7 % informado por Algamal et al. (2020), al 40,0 % descrito por Rodríguez et al. (2023) y al aproximadamente 11,7 % reportado por Haq et al. (2024). Este resultado evidencia la necesidad de fortalecer la vigilancia de los mecanismos de resistencia en los aislamientos de la zona.

Por otro lado, la oxacilina presentó la mayor sensibilidad, con el 81,5 % de las cepas clasificadas como sensibles, resultado consistente con lo reportado por Freu et al. (2022) y Crespi et al. (2021), aunque Brahma et al. (2022) informaron una mayor frecuencia de resistencia. Sin embargo, la resistencia observada frente a cefoxitina resalta la necesidad de realizar estudios sobre los mecanismos genéticos asociados a la resistencia a meticilina.

Para eritromicina predominó la categoría intermedia, con 81,5 % de los aislamientos. La respuesta frente a este antimicrobiano difiere entre investigaciones: Freu et al. (2022) reportaron resistencia superior al 54,8 %, Crespi et al. (2021) informaron ausencia de resistencia y Wang et al. (2022) encontraron aproximadamente 79,9 % de resistencia. Estos resultados demuestran la

variabilidad del comportamiento de *S. aureus* frente a la eritromicina en diferentes contextos epidemiológicos.

La prevalencia de mastitis subclínica fue de 32,9 %, inferior a la reportada por Quispe et al. (2021) (58,1 %), Tineo (2015) (82,1 %) y Maldonado et al. (2022) (87,5 %). Estas diferencias podrían atribuirse a las características de las poblaciones evaluadas y a las condiciones de manejo y sanidad de los sistemas de producción.

La proporción de muestras con mastitis subclínica y aislamiento confirmado de *S. aureus* fue de 6,9 %, inferior a la reportada por Wang et al. (2022), Campos et al. (2022) y Quispe et al. (2021). Este último estudio, realizado en el fundo Allpachaka, informó una prevalencia de *S. aureus* de 35,2 %. Esta diferencia podría atribuirse a las características de los sistemas de producción evaluados y a la participación de otros microorganismos en la etiología de la mastitis subclínica.

En conjunto, la caracterización fenotípica y molecular, junto con la evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana, permitió conocer las características de los aislamientos de *S. aureus* en las comunidades estudiadas. Los hallazgos sugieren que la mastitis subclínica en la microcuenca de Allpachaka también involucra otros agentes etiológicos. Sin embargo, la presencia de *S. aureus* y su resistencia a determinados antimicrobianos resaltan la importancia del diagnóstico microbiológico, la vigilancia epidemiológica y el uso racional de antimicrobianos.

CONCLUSIONES

Las cepas de *Staphylococcus aureus* presentaron características fenotípicas homogéneas, con forma circular, superficie lisa, bordes regulares y predominio de colonias de color crema (74,1 %).

La detección de los genes *coa*, *femB* y *nucA* en la totalidad de los aislamientos confirmó molecularmente la identidad de *Staphylococcus aureus* y demostró correspondencia entre los métodos fenotípicos y moleculares.

Las cepas presentaron elevada resistencia frente a penicilina (92,6 %), clindamicina (66,7 %) y cefoxitina (48,1 %), mientras que oxacilina presentó el mayor porcentaje de sensibilidad (81,5 %).

La prevalencia de mastitis subclínica bovina en los cuartos mamarios evaluados fue de 32,9 %.

La proporción de muestras de leche con mastitis subclínica bovina que presentó *Staphylococcus aureus*, confirmada mediante análisis fenotípico y molecular, fue de 6,9 %.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Algammal, A. M., Enany, M. E., El-Tarabili, R. M., Ghobashy, M. O. I., & Helmy, Y. A. (2020). Prevalence, antimicrobial resistance profiles, virulence and enterotoxins-determinant genes of MRSA isolated from subclinical bovine mastitis in Egypt. *Pathogens*, 9(5), 362. <https://doi.org/10.3390/pathogens9050362>

- Brahma, U., Suresh, A., Murthy, S., Bhandari, V., & Sharma, P. (2022). Antibiotic resistance and molecular profiling of the clinical isolates of *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis from India. *Microorganisms*, 10(4), 833. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040833>
- Campos, B., Pickering, A. C., Rocha, L. S., Aguilar, A. P., Fabres-Klein, M. H., de Oliveira Mendes, T. A., Fitzgerald, J. R., & de Oliveira Barros Ribon, A. (2022). Diversity and pathogenesis of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis: Current understanding and future perspectives. *BMC Veterinary Research*, 18, 115. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03197-5>
- Clauditz, A., Resch, A., Wieland, K.-P., Peschel, A., & Götz. (2006). Staphyloxanthin plays a role in the fitness of *Staphylococcus aureus* and its ability to cope with oxidative stress.
- Crespi, E., Pereyra, A. M., Puigdevall, T., Rumi, M. V., Testorelli, M. F., Caggiano, N., Gulone, L., Mollerach, M., Gentilini, E. R., & Srednik, M. E. (2021). Antimicrobial resistance studies in staphylococci and streptococci isolated from cows with mastitis in Argentina. *Journal of Veterinary Science*, 23(6), e12. <https://doi.org/10.4142/jvs.21062>
- Elmessaeri, R. A., Saleh, S. E., Elsherif, H. M., Yahia, I. S., & Aboshanab, K. M. (2022). Staphyloxanthin as a potential novel target for deciphering promising anti-*Staphylococcus aureus* agents.
- Freu, G., Tomazi, T., Filho, A. F. S., Heinemann, M. B., & dos Santos, M. V. (2022). Antimicrobial resistance and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* recovered from cows with clinical mastitis in dairy herds from

southeastern Brazil. Antibiotics, 11(4), 424.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics11040424>

Gonçalves, J. L., Lee, S. H. I., Camargo, C. H., Zanella, R. C., Silva, N. C. C., Rall, V. L. M., Cue, R. I., & Dos Santos, M. V. (2023). Molecular characterization of persistent subclinical mastitis-causing *Staphylococcus aureus* from dairy farms. Brazilian Journal of Microbiology, 54(2), 1181–1189.
<https://doi.org/10.1007/s42770-023-00918-2>

Haq, I., Kamai, M., Swelum, A., & Kan, S. (2024). Alarming multidrug resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk of cows with subclinical mastitis: Antibiotic resistance patterns and occurrence of selected resistance genes.

Hamdan-Partida, A., González García, S., & Bustos-Martínez, J. (2015). Identificación de *Staphylococcus aureus* utilizando como marcadores los genes *nucA* y *femB*. Ciencias Clínicas, 16(2), 37–41.
<https://doi.org/10.1016/j.cc.2016.02.002>

Instituto Nacional de Salud. (2002). Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión.

Kerro Dego, O., & Vidlund, J. (2024). Staphylococcal mastitis in dairy cows. Frontiers in Veterinary Science, 11.
<https://doi.org/10.3389/fvets.2024.1356259>

Kobayashi, N., Wu, H., Kojima, K., Taniguchi, K., Urasawa, S., Uehara, N., Omizu, Y., Kishi, Y., Yagihashi, A., & Kurokawa, I. (1994). Detection of *mecA*, *femA*, and *femB* genes in clinical strains of staphylococci using polymerase chain

reaction. *Epidemiology and Infection*, 113(2), 259–266.
<https://doi.org/10.1017/S0950268800051682>

Maldonado, D., Santos, C., Qilapanta, A., & Mena, L. (2022). Diagnóstico de mastitis subclínica mediante tres métodos para el control y tratamiento en bovinos de leche Holstein.

Molineri, A. I., Camussone, C., Zbrun, M. V., Suárez Archilla, G., Cristiani, M., Neder, V., Calvino, L., & Signorini, M. (2021). Resistencia antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* aislado de mastitis bovina: Revisión sistemática y metanálisis. *Preventive Veterinary Medicine*, 188, 105261.
<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2021.105261>

Monistero, V., Graber, H. U., Pollera, C., Cremonesi, P., Castiglioni, B., Bottini, E., Ceballos-Marquez, A., Lasso-Rojas, L., Kroemker, V., Wente, N., Petzer, I.-M., Santisteban, C., Runyan, J., Veiga dos Santos, M., Alves, B. G., Piccinini, R., Bronzo, V., Abbassi, M. S., Said, M. B., & Moroni, P. (2018). *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in eight countries: Genotypes, detection of genes encoding different toxins and other virulence genes. *Toxins*, 10(6), 247. <https://doi.org/10.3390/toxins10060247>

Neelam, Jain, V. K., Singh, M., Joshi, V. G., Chhabra, R., Singh, K., & Rana, Y. S. (2022). Virulence and antimicrobial resistance gene profiles of *Staphylococcus aureus* associated with clinical mastitis in cattle. *PLoS ONE*, 17(5), e0264762. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264762>

- Ning, K., Zhou, R., & Li, M. (2023). Antimicrobial resistance and molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolates from raw milk in Hunan Province. *PeerJ*, 11, e15847. <https://doi.org/10.7717/peerj.15847>
- Quispe, R., Peña, G., & Andia, V. (2021). Resistencia antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* aislados de leche de vacas con mastitis.
- Rodríguez, M. F., Gomez, A. P., & Ceballos-Garzon, A. (2023). Antimicrobial resistance profiles of *Staphylococcus* isolated from cows with subclinical mastitis: Do strains from the environment and from humans contribute to the dissemination of resistance among bacteria on dairy farms in Colombia? *Antibiotics*, 12(11), 1574. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12111574>
- Tineo-Ayala, J. Y., & Andía-Ayme, V. (2017). Mastitis bovina por recuento de células somáticas con PortaSCC® y Test de California en el fundo de Allpachaca–UNSCH, Ayacucho, Perú. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 18(7).
- Vakkamäki, J., Taponen, S., Heikkilä, A.-M., & Pyörälä, S. (2017). Bacteriological etiology and treatment of mastitis in Finnish dairy herds. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 59(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s13028-017-0301-4>
- Wang, K., Cha, J., Liu, K., Deng, J., Yang, B., Xu, H., Wang, J., Zhang, L., Gu, X., Huang, C., & Qu, W. (2022). The prevalence of bovine mastitis-associated *Staphylococcus aureus* in China and its antimicrobial resistance rate: A meta-analysis. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 1006676. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1006676>



ESCUELA DE

POSGRADOUNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD N°0137-2026-UNSCH-EPG/KBA**

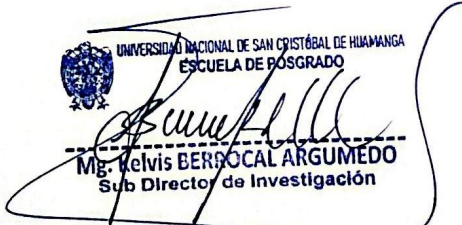
El que suscribe; responsable verificador de originalidad de trabajo de tesis de Posgrado en segunda instancia para la **Escuela de Posgrado – UNSCH**; en cumplimiento a la Resolución Directoral N°002-2026-UNSCH-EPG/D, Reglamento de Originalidad de trabajos de Investigación de la UNSCH, otorga lo siguiente:

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD

AUTOR	Bach. RUTH PALOMINO MARTINEZ
DENOMINACIÓN DEL PROGRAMA DE ESTUDIOS	MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS
GRADO ACADÉMICO QUE OTORGA	MAESTRO
DENOMINACIÓN DEL GRADO ACADÉMICO	MAESTRO(A) EN CIENCIAS, MENCIÓN EN SALUD Y PRODUCCIÓN ANIMAL
TÍTULO DE TESIS	Caracterización y susceptibilidad antimicrobiana de Staphylococcus aureus en leche con mastitis subclínica bovina, en tres comunidades de Allpachaka – Ayacucho 2024
EVALUACIÓN DE ORIGINALIDAD	14% de similitud
N° DE TRABAJO	3029041220
FECHA	10 de setiembre de 2026

Por tanto, según los artículos 12, 13 y 17 del Reglamento de Originalidad de Trabajos de Investigación, es procedente otorgar la constancia de originalidad con depósito.

Se expide la presente constancia a solicitud de la interesada para los fines que crea conveniente.


UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA
ESCUELA DE POSGRADO
Mg. Melvis BERRUCAL ARGUMENTO
Sub Director de Investigación

10 de setiembre de 2026.

CC.
Archivo
KBA/

Caracterización y susceptibilidad antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* en leche con mastitis subclínica bovina, en tres comunidades de Allpachaka - Ayacucho 2024

por Ruth PALOMINO MARTINEZ

Fecha de entrega: 10-sept-2026 11:37p. m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 3029041220

Nombre del archivo: Ruth_PALOMINO_MARTINEZ_T.docx (1.58M)

Total de palabras: 13939

Total de caracteres: 84698

Caracterización y susceptibilidad antimicrobiana de Staphylococcus aureus en leche con mastitis subclínica bovina, en tres comunidades de Allpachaka - Ayacucho 2024

INFORME DE ORIGINALIDAD

14%	15%	6%	8%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	hdl.handle.net	Fuente de Internet	3%
2	repositorio.unsch.edu.pe	Fuente de Internet	1%
3	Submitted to ucr	Trabajo del estudiante	1%
4	Submitted to Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga	Trabajo del estudiante	1%
5	ri.conicet.gov.ar	Fuente de Internet	1%
6	patents.google.com	Fuente de Internet	1%
7	repositorio.unsaac.edu.pe	Fuente de Internet	<1%
8	revistas.unne.edu.ar	Fuente de Internet	<1%
9	dspace.esPOCH.edu.ec	Fuente de Internet	<1%
10	Submitted to Universidad Privada San Juan Bautista	Trabajo del estudiante	<1%
11	Submitted to Universidad Ricardo Palma	Trabajo del estudiante	<1%
12	repositorio.unc.edu.pe	Fuente de Internet	<1%
13	repositorio.unapiquitos.edu.pe	Fuente de Internet	<1%
14	bibliotecadigital.udea.edu.co	Fuente de Internet	<1%

dspace.ups.edu.ec

15	Fuente de Internet	<1 %
16	worldwidescience.org Fuente de Internet	<1 %
17	Submitted to Universidad Nacional de Colombia Trabajo del estudiante	<1 %
18	revcolumnamedica.sld.cu Fuente de Internet	<1 %
19	repositorio.unan.edu.ni Fuente de Internet	<1 %
20	Submitted to ITESM: Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey Trabajo del estudiante	<1 %
21	repositorio.uss.cl Fuente de Internet	<1 %
22	ru.dgb.unam.mx Fuente de Internet	<1 %
23	www.scielo.org.pe Fuente de Internet	<1 %
24	bffrepositorio.unal.edu.co Fuente de Internet	<1 %
25	Submitted to Universidad Católica Boliviana "San Pablo" Trabajo del estudiante	<1 %
26	Submitted to Universidad Nacional de Tumbes Trabajo del estudiante	<1 %
27	repositorio.ucv.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
28	Submitted to BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE PUEBLA BIBLIOTECA Trabajo del estudiante	<1 %
29	up-rid.up.ac.pa Fuente de Internet	<1 %
30	repositorio.espe.edu.ec Fuente de Internet	<1 %

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias

< 30 words

Excluir bibliografía

Activo

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR
EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO(A) EN CIENCIAS, MENCIÓN EN SALUD Y PRODUCCIÓN ANIMAL
RESOLUCIÓN DIRECTORAL N°00615-2026-UNSCH-EPG/D.

Siendo las 02:00 p.m. del 27 de julio de 2026 se reunieron en el auditorio de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, el Jurado Examinador y Calificador de Tesis, presidido por el **Dr. MARCELINO POMASONCCO ILLANES** Director (e) de la Escuela de Posgrado, el **Dr. RAUL JOSE PALOMINO MARCATOMA** Director de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Ciencias Agrarias, e integrado por los siguientes miembros: **Dra. NERY LUZ SANTILLANA VILLANUEVA** y el **Dr. LUIS ARTURO RODRIGUEZ ZAMORA**; para la sustentación oral y pública de la tesis titulada: **CARACTERIZACIÓN Y SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS EN LECHE CON MASTITIS SUBCLÍNICA BOVINA, EN TRES COMUNIDADES DE ALLPACHAKA - AYACUCHO 2024**, presentado por la **Bach. RUTH PALOMINO MARTINEZ**. Teniendo como asesora a la **Mg. GLORIA BETTI ADRIANZEN FACUNDO**.

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar el Grado Académico de **MAESTRO(A) EN CIENCIAS, MENCIÓN EN SALUD Y PRODUCCIÓN ANIMAL**. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por la graduanda.

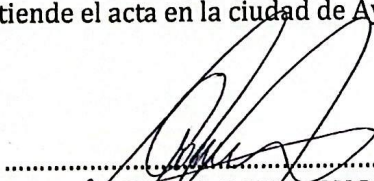
A continuación, el Jurado Examinador y Calificador de Tesis procedió a la votación, la que dio como resultado el siguiente calificativo: DIPLISEIS (16).

CALIFICACION (x)	
Aprobado(a) por Unanimidad.	X
Aprobado(a) por Mayoría.	
Desaprobado(a) por Unanimidad.	
Desaprobado(a) por Mayoría.	

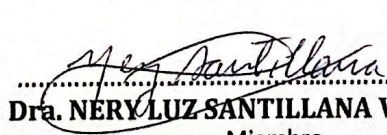
Marcar con un aspa (x).

Luego, el presidente del Jurado recomienda que la Escuela de Posgrado proponga que se le otorgue a la **Bach. RUTH PALOMINO MARTINEZ**, el Grado Académico de **MAESTRO(A) EN CIENCIAS, MENCIÓN EN SALUD Y PRODUCCIÓN ANIMAL**. Siendo las 3.20 pm hrs. se levanta la sesión.

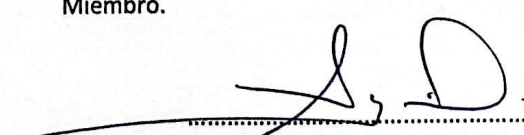
Se extiende el acta en la ciudad de Ayacucho, a las 3.20 pm hrs. del 27 de julio de 2026.


.....
Dr. MARCELINO POMASONCCO ILLANES
Director (e) de la Escuela de Posgrado.


.....
Dr. RAUL JOSE PALOMINO MARCATOMA
Director de la UPG-FCA.


.....
Dra. NERY LUZ SANTILLANA VILLANUEVA
Miembro.

.....
Dr. LUIS ARTURO RODRIGUEZ ZAMORA
Miembro.


.....
Dr. ENRIQUE JAVIER AGUILAR FELICES
Secretario Docente.

Observaciones: