

UCUENCA

Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Efecto antimicrobiano *in vitro* del ácido hipocloroso en el control de bacterias provenientes de muestras de leche de vacas con mastitis subclínica

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Médico Veterinario Zootecnista

Autores:

Delia Beatriz Chimbo Pallchisaca

Ana Paula Loja Sarmiento

Director:

Edwin Francisco Larriva González

ORCID:  0009-0009-8531-7405

Cuenca, Ecuador

2024-10-29

Resumen

Objetivo: Este trabajo evaluó el efecto antimicrobiano *in vitro* del ácido hipocloroso sobre la inhibición de bacterias *Staphylococcus spp.*, *Escherichia coli* y/o *Streptococcus spp.*, comparando la eficacia de la actividad antimicrobiana del ácido hipocloroso frente al ceftiofur mediante la valoración cuantitativa del halo de inhibición en el antibiograma. **Metodología:** El estudio de tipo experimental se realizó en un total de 75 cultivos para el aislamiento de bacterias *Staphylococcus spp.*, *Escherichia coli* y/o *Streptococcus spp.* Posteriormente, se aplicó un antibiograma a cada cultivo bacteriano con el ácido hipocloroso y el ceftiofur, para evaluar la sensibilidad antimicrobiana mediante la medición de los halos de inhibición a las 24 horas de incubación. **Resultados:** Se obtuvo un total de 55 cultivos con crecimiento bacteriano, debido a que *Streptococcus spp.*, no creció en todos los cultivos. El efecto antimicrobiano del ácido hipocloroso a 500 ppm se evaluó de acuerdo a la escala de Duraffourd. Se registraron los siguientes promedios de halo de inhibición: 13,48 mm para *Staphylococcus spp.*; 8,84 mm para *Escherichia coli* y 7,6 mm para *Streptococcus spp.*. **Conclusiones:** El ácido hipocloroso a una concentración de 500 ppm sobre *Staphylococcus spp.* tuvo un efecto inhibitorio, mientras que no mostró efecto antimicrobiano sobre *Escherichia coli* y *Streptococcus spp.* bajo condiciones *in vitro*.

Palabras clave del autor: mastitis, ácido hipocloroso, *in vitro*



El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Cuenca ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por la propiedad intelectual y los derechos de autor.

Repositorio Institucional: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Abstract

Objective: This study evaluated the in vitro antimicrobial effect of hypochlorous acid on the inhibition of *Staphylococcus spp.*, *Escherichia coli* and/or *Streptococcus spp.* bacteria, comparing the efficacy of the antimicrobial activity of hypochlorous acid versus ceftiofur by quantitative assessment of the inhibition halo in the antibiogram. **Methodology:** The experimental study was performed on a total of 75 cultures for the isolation of *Staphylococcus spp.*, *Escherichia coli* and/or *Streptococcus spp.* Subsequently, an antibiogram was applied to each bacterial culture with hypochlorous acid and ceftiofur, to evaluate the antimicrobial sensitivity by measuring the inhibition halos at 24 hours of incubation. **Results:** A total of 55 cultures with bacterial growth were obtained, because *Streptococcus spp.* did not grow in all cultures. The antimicrobial effect of hypochlorous acid at 500 ppm was evaluated according to the Duraffourd scale. The following inhibition halo averages were recorded: 13.48 mm for *Staphylococcus spp.*; 8.84 mm for *Escherichia coli* and 7.6 mm for *Streptococcus spp.* **Conclusions:** Hypochlorous acid at a concentration of 500 ppm on *Staphylococcus spp.* had an inhibitory effect, while it showed no antimicrobial effect on *Escherichia coli* and *Streptococcus spp.* under in vitro conditions.

Author Keywords: mastitis, hypochlorous acid, in vitro



El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Cuenca ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por la propiedad intelectual y los derechos de autor.

Repositorio Institucional: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Índice de contenido

Agradecimiento	7
Introducción.....	9
Objetivos	11
2.1. Objetivo general	11
2.2. Objetivos específicos	11
Revisión de literatura	12
3.1. Definición de mastitis.....	12
3.2. Epidemiología	12
3.3. Caracterización de la mastitis bovina	12
3.3.1. Etiología	12
3.3.2. Principales agentes causales	13
3.3.3. Clasificación de la mastitis según el grado de inflamación.....	14
3.3.4. Patogenia	15
3.3.4. Prueba CMT.....	15
3.3.5. Cultivo bacteriano de mastitis.....	16
3.3.6. Diagnóstico bacteriológico de la mastitis	16
3.3.7. Halo de inhibición.....	17
3.4. Caracterización del ácido hipocloroso	17
3.4.1. Definición	17
3.4.2. Composición de la sustancia.....	18
3.4.3. Propiedades de la sustancia	18
3.4.4. Producción biológica del ácido hipocloroso	18
3.4.5. Acción de la sustancia	19
Materiales y Métodos.....	20
4.1. Materiales	20
4.2. Área de estudio	20
4.3. Diseño experimental	20
4.3.1. Variables	21
4.3.2. Variables independientes	21
4.3.3. Variable dependiente	21
4.4. Metodología.....	21
4.4.1. Diagnóstico de mastitis subclínica.....	21
4.4.2. Recolección de las muestras.....	22
4.4.3. Transporte de las muestras	22

4.5. Cultivo y aislamiento de bacterias	22
4.5.1. Elaboración de medios de cultivo	22
4.5.2. Siembra	22
4.5.3. Pruebas bioquímicas	23
4.5.4. Prueba de sensibilidad o antibiograma	23
4.6. Metodología experimental.....	24
4.6.1. Análisis estadístico	24
Resultados	25
5.1. Acción bactericida in vitro del ácido hipocloroso.....	25
Discusión.....	26
Conclusiones.....	28
Recomendaciones	29
Referencias	30

Índice de tablas

Tabla 1. Microorganismos con mayor relevancia en la mastitis bovina.....	12
Tabla 2. Interpretación de las puntuaciones de CMT y valores aproximados de células por ml.....	16
Tabla 3. Materiales empleados	20
Tabla 4. Promedio de los halos de inhibición formados in vitro por los diferentes tratamientos contra cepas de <i>Staphylococcus</i> spp. y <i>Escherichia coli</i> : Control, Ácido hipocloroso (HClO). Total, de réplicas: 5 sesiones.....	25
Tabla 5. Promedio de los halos de inhibición formados in vitro por los diferentes tratamientos contra <i>Streptococcus</i> spp.: Control, Ácido hipocloroso (HClO). Total, de réplicas: 1 sesión.....	25

Agradecimiento

A Dios por permitirme llegar hasta aquí, y a mi familia quienes han sido mi fortaleza durante todo este proceso. Su aliento y confianza en mí me han impulsado a seguir adelante en cada etapa de este proyecto académico.

Delia Chimbo P.

Agradecimiento

Agradezco en primer lugar a mi familia, especialmente a mis padres que han sido mi mayor ejemplo de esfuerzo y dedicación, gracias por motivarme y alentarme en cada paso. A mis hermanas por su apoyo y cariño durante toda la etapa de formación académica. Ustedes han sido un pilar fundamental para mi crecimiento profesional y personal.

Ana Paula Loja.

Dedicatoria

A mis queridos padres, cuya incondicional paciencia, amor y apoyo han sido el faro que me ha guiado a lo largo de este arduo pero gratificante camino académico. Sin su sacrificio, alcanzar este logro no habría sido posible. Les agradezco de todo corazón por creer en mí y por estar siempre a mi lado. A mis hermanos, en especial a Sisa, a pesar de no poder estar físicamente presente, su ánimo y palabras de aliento han sido una fuente constante de motivación y fuerza.

Delia Chimbo P.

Dedicatoria

Este logro le dedico a mi familia, especialmente a mis padres por su apoyo y cariño. Gracias por sus sacrificios para brindarme las mejores oportunidades y por inculcarme valores que han guiado mis pasos y me han permitido a culminar esta meta, de igual manera a mis hermanas por su amor incondicional.

Ana Paula Loja.

Introducción

La mastitis es una de las enfermedades que afecta a la glándula mamaria de la vaca y que ocasiona mayor impacto económico en las ganaderías de leche, ya que conduce a grandes pérdidas económicas, tanto directas como indirectas. Los costos directos están relacionados con el tratamiento de la enfermedad asociado a las pérdidas totales. Mientras que, los costos indirectos, como el descarte de la leche contaminada, la baja producción y mala calidad de la leche sumado al sacrificio selectivo, son sumamente importantes (Tommasoni et al., 2023).

Esta patología presenta una respuesta inflamatoria de la glándula mamaria de la vaca ante la presencia de agentes patógenos especialmente bacterianos, que provocan alteraciones localizadas o generalizadas en el tejido glandular (Pilla et al., 2013). Se clasifica en dos formas según su manifestación, subclínica y clínica. La presentación clínica provoca lesiones marcadas en la glándula mamaria causando cambios evidentes en la leche. Por el contrario, la forma subclínica presenta alteraciones visibles en la glándula mamaria y la ubre se ve aparentemente sana (Lopes et al., 2020). Se ha sugerido que la frecuencia de mastitis clínica en vacas lecheras se presenta en un 0,66 %, mientras que la subclínica en un 98,6 % (Martínez et al., 2015).

Esta patología puede ser causada por una gran variedad de agentes etiológicos, en los que sobresalen bacterias (Lakew et al., 2019). Las bacterias que desencadenan esta enfermedad con mayor frecuencia, y que han sido identificadas mediante aislamiento y cultivo celular son *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* y *Escherichia coli* (Coda Zabetta, 2019). Un estudio previo realizado en la Amazonía ecuatoriana demostró que las bacterias que causan mastitis en vacas lecheras con mayor frecuencia fueron: *Staphylococcus aureus* (31,5 %), *Staphylococcus spp.* (16,6 %), *Staphylococcus catalasa positivo* (16,0 %), *Shigella spp.* (15,5 %), *Escherichia coli* (7,4 %), y *Streptococcus spp.* (1,9 %), siendo estos los agentes etiológicos con mayor frecuencia (Puglla, 2016).

El diagnóstico de la mastitis subclínica a nivel de campo se puede realizar mediante pruebas de CMT (California Mastitis Test, por sus siglas en inglés) (García, 2018). Además, las pruebas laboratoriales, nos ayuda a cuantificar el conteo de células somáticas e identificar los principales agentes microbianos (Birhanu et al., 2017).

Su principal tratamiento aplicado a nivel de campo está basado en la administración de antibióticos (Pascu et al., 2022). Desafortunadamente, el uso indiscriminado de antibióticos, así como la aplicación sobredosificada o subdosificada han disminuido su eficacia debido a que las bacterias han presentado resistencia a dichos fármacos, constituyéndose un grave problema de salud a nivel mundial (Kovačević et al., 2023).

El consumo humano de leche se ha convertido en una amenaza inminente debido al residuo de antibióticos en este producto lácteo, por lo cual es importante buscar alternativas al uso de antibióticos para el tratamiento de esta enfermedad (Lopes et al., 2020; Rajamanickam et al., 2020).

En la actualidad, la circulación descontrolada de antibióticos ha sido el responsable de la llamada resistencia bacteriana, dando como consecuencia de al menos 30.000 muertes al año en la Unión europea (Gajdács et al., 2021) y 700.000 muertes al año alrededor del mundo (Mestrovic et al., 2022). En este sentido, a nivel mundial se busca tratamientos alternativos a los antibióticos que combatan la resistencia bacteriana y que sean más amigables con el consumo humano.

El ácido hipocloroso (HClO) es un compuesto químico basado en ion no disociado del cloro, que, por su estabilidad, y forma de acción, ha demostrado tener un gran efecto antimicrobiano de amplio espectro y de rápida acción categorizado como una “sustancia antimicrobiana no antibiótica” (Rosso & Bhatia, 2018). En este sentido, se ha sugerido que el HClO es una alternativa exitosa a los antibióticos para el tratamiento de la mastitis subclínica en vacas lecheras (Toasa, (2022).

Algunos estudios han citado el uso de HClO como un potente antimicrobiano y cicatrizante en medicina humana, así también en medicina veterinaria. Un estudio realizado demostró que el HClO aplicado para el tratamiento de heridas en equinos inhibe completamente el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Ramey & Kinde, 2015). Otro estudio realizado para el enjuague de oídos bajo anestesia y como limpiador de oídos para el tratamiento de otitis crónica en caninos resultó efectivo y seguro (Mueller et al., 2023).

Teniendo en cuenta los estudios mencionados, esta investigación planteó la hipótesis de usar un tratamiento alternativo para la mastitis subclínica, basado en HClO, lo cual podría reducir el uso de antibióticos y la resistencia microbiana a los mismos.

Objetivos**2.1. Objetivo general**

Evaluar el efecto antimicrobiano *in vitro* del ácido hipocloroso en bacterias aisladas de la leche de vacas con mastitis subclínica.

2.2. Objetivos específicos

- Identificar bacterias de las especies *Staphylococcus spp.*, *Escherichia coli* y/o *Streptococcus spp.* de vacas lecheras con mastitis subclínica.
- Comparar la eficacia de la actividad antimicrobiana del ácido hipocloroso frente al ceftiofur mediante la valoración cuantitativa del halo de inhibición en el antibiograma.

Revisión de literatura

3.1. Definición de mastitis

Se denomina mastitis al proceso inflamatorio que sufre la glándula mamaria debido al ingreso de microorganismos patógenos a través del pezón; activando mecanismos de inmunidad innata y adquirida; produciendo la migración de neutrófilos y demás factores proinflamatorios (Ezzat Alnakip et al., 2014; Medzhitov, 2007; Svennesen et al., 2019).

Según sus características se puede clasificar en clínica o subclínica y según su etiología en infecciosas y no infecciosas, siendo la causa infecciosa la más común, ocasionada en la mayoría de los casos por microorganismos patógenos asociados a bacterias (Ndahetuye et al., 2019).

3.2. Epidemiología

En el año 2017 se realizó un estudio de prevalencia de mastitis subclínica en el cantón Cuenca dando como resultado una prevalencia del 36,1 % (Alvarez & Chuqui, 2017). Otro estudio realizado en la parroquia Victoria del Portete en el año 2022 se obtuvo una prevalencia de mastitis subclínica de 17,39 % y 35,65 % de mastitis clínica (Gomezcoello, 2022). En la provincia de Cañar se determinó que el 56,5 % de fincas lecheras están asociadas a mastitis bovina subclínica (Cuenca-Condoy et al., 2021).

3.3. Caracterización de la mastitis bovina

3.3.1. Etiología

De entre los muchos microorganismos patógenos, las bacterias son uno de los agentes etiológicos más comunes y prevalentes en la mastitis (Lakew et al., 2019). Hasta el momento se han identificado más de 150 bacterias Gram positivas y Gram negativas como responsables de la patología (Bedolla, 2008).

En la siguiente tabla se presentan los microorganismos con mayor relevancia en esta enfermedad:

Tabla 1. Microorganismos con mayor relevancia en la mastitis bovina.

<i>Estreptococcus</i>	<i>Staphylococcus</i>	Bacterias Coliformes	Microorganismos que causan enfermedades específicas	Otros agentes infecciosos
<i>S. agalactiae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Listeria</i>	<i>Mycoplasmas</i>
<i>S. dysgalactiae</i>	<i>S. hucus</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Brucella</i>	<i>Nocardia</i>
<i>S. uberis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Leptospira</i>	<i>Clostridium</i>

<i>S. zooepidemicus</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Rickettias</i>	<i>Spherophorus</i>
			<i>Salmonellas</i>	

Adaptado de: Âna dos Santos Nascimento et al., (2002).

3.3.2. Principales agentes causales

Infección por *Staphylococcus spp.*

De entre el género de los *Staphylococcus spp.* el *S. aureus* es el patógeno Gram positivo más sobresaliente y responsable de diversas formas de mastitis clínica y subclínica (Âna dos Santos Nascimento et al., 2002). Al vivir en la ubre y la piel del pezón, colonizan y crecen en el canal por lo que son capaces de establecer infecciones subclínicas generalmente con elevación en recuento de células somáticas. Además, producen enzimas degradativas y toxinas que alteran el tejido mamario y, como resultado, disminuyen la producción de leche (Lakew et al., 2019; Vasudevan et al., 2003).

Infección por *Streptococcus spp.*

Dentro de este género, el *Streptococcus agalactiae*, un patógeno Gram positivo, viene siendo el responsable de la mastitis contagiosa, puede habitar en el tracto gastrointestinal de los bovinos y en el medioambiente de las vacas lecheras. Por lo tanto, se puede transmitir por medio de la máquina de ordeño y por vía oro-fecal, en especial a través del agua potable contaminada. Este microorganismo desarrolla mastitis subclínica con alto CCS o RCS (recuento de células somáticas), además de disminuir la producción de leche sin mostrar anomalías en la misma (Kibebew, 2017).

Por otra parte, en comparación con el *Staphylococcus aureus* y otros patógenos contagiosos, a *Streptococcus agalactiae* se le hace difícil multiplicarse y crecer fuera de la ubre, no obstante, puede permanecer durante un corto período en las manos del personal de ordeño, las máquinas ordeñadoras y en la superficie de los pezones. Por lo que esto podría ser suficiente para haya trasmisión a las demás vacas sanas durante el ordeño (Sandy, 2011).

Infección por *Escherichia coli*

Este es uno de los patógenos Gram negativos más importantes que causan mastitis ambiental, ya que se encuentran en el tracto digestivo, en la cama del rebaño, y sobre todo en condiciones húmedas (Smith & Hogan, 1993). Empiezan invadiendo la ubre a través del pezón, proliferando e iniciando la respuesta inflamatoria en la vaca lechera. Cuando la *Escherichia coli* se presenta en forma leve, las vacas sólo muestran signos locales en la ubre

y la leche, y la duración de los síntomas es breve. En otros casos más agudos, puede tener consecuencias muy graves o incluso letales (Lehtolainen & Yliopistopaino, 2004).

3.3.3. Clasificación de la mastitis según el grado de inflamación

La mastitis se puede clasificar según el grado de inflamación en subclínica y clínica, estas pueden estar asociadas a diferentes microorganismos patógenos los cuales van a producir diferentes alteraciones que involucran la calidad de la leche, el estado del animal y el nivel de producción (Cobirka et al., 2020).

a) Mastitis subclínica

Esta patología no siempre muestra signos clínicos, por lo que su diagnóstico requiere de pruebas o exámenes para determinar la presencia de microorganismos patógenos, es importante realizar pruebas periódicas de conteo de células somáticas (CCS) ya que este se eleva cuando existe una cantidad anormal de microorganismos y nos permite identificar a los animales positivos a la enfermedad y clasificarlos según su gravedad (González Salas & Vidal del Rio, 2021).

Usualmente, la ubre no presenta alteraciones morfológicas y en la leche no se evidencia cambios organolépticos, por lo que se considera una enfermedad silenciosa que ocasiona grandes pérdidas económicas. Generalmente, las infecciones por *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* van a provocar una reducción de la funcionalidad de los alveolos del cuero afectado dando como resultado un incremento en la presión intramamaria y la presencia de leche residual (Bedolla & Ponce de León, 2008).

Algunos estudios revelan que la mastitis subclínica se da 15 a 40 veces más que la mastitis clínica y perdura por más tiempo, por lo cual, resulta de gran importancia tomar medidas de manejo y diagnóstico oportunas para controlar y erradicar esta enfermedad (Chen et al., 2022).

b) Mastitis clínica

Puede presentar diferentes signos en la leche y en el animal, en el caso de la leche presenta cambios fenotípicos donde se puede evidenciar coágulos obteniendo una leche amarillenta o rojiza por la presencia de pus, en la ubre puede existir inflamación, dolor y enrojecimiento, en casos extremos puede producirse agalactia (Cobirka et al., 2020; Calderón et al., 2011).

Los animales presentan signos generales de letargia, inapetencia y en algunas ocasiones hipertemia, en casos graves puede ocasionar la muerte del animal o el sacrificio prematuro de la misma. El CCS es más alto comparado con los valores normales que están usualmente por debajo de 200.000 células/ml (Ruegg, 2017).

3.3.4. Patogenia

La mastitis es causada principalmente por la afección de un amplio espectro de bacterias u otros microorganismos como algas, virus y hongos (Pyörälä, 2003). Generalmente el músculo esfínter del pezón impide el ingreso de estos patógenos (Hettinga et al., 2008). Sin embargo, su eficacia se ve disminuida a lo largo de la vida del animal ya que, cuando se aproxima el parto, existe un acúmulo de líquido en la glándula mamaria, dando como resultado un incremento en la presión intramamaria, lo que ocasiona la salida de secreciones mamarias del pezón (Paulrud, 2005).

Hay que tener en cuenta también que, a la hora del ordeño, el pezón pierde queratina y se produce el agrandamiento del mismo, regresando a su tamaño normal a partir de 2 horas post ordeño. Las bacterias al ingresar al pezón se enfrentan al sistema de defensa celular y humorla, cuando existe gran cantidad de patógenos, estos forman biopelículas lo que favorece su multiplicación y persistencia, liberando gran cantidad de toxinas que provocan la liberación de leucocitos que desencadenan la liberación de citocinas (TNFa, IL-8, IL-1, PF2a, radicales de oxígeno, haptoglobina, entre otros) (Rainard & Riollet, 2006). En el canal del pezón se encuentran aglomerados los neutrófilos polimorfonucleares (PMN) por la presencia de toxinas, estos neutrófilos contienen gránulos intracelulares que almacenan proteasas, proteínas, péptidos y enzimas (Bank & Ansorge, 2001; Zhao & Lacasse, 2008).

El sistema inmunológico se activa provocando sustancias oxidantes y proteasas que eliminan bacterias y a la vez células epiteliales, dando como resultado una reducción en la producción láctea y la producción de enzimas, como N-acetil-bD-glucosaminidasa (NAGasa) y lactato deshidrogenasa (LDH). Una vez que los PMN cumplen su acción, son destruidos mediante apoptosis para ser ingeridos por los macrófagos (Paape et al., 2003).

Las células del epitelio mamario son secretadas junto con células blancas en la leche, dando como resultado un incremento en el CCS. En el curso de la infección se produce una inflamación en el epitelio de la glándula, provocando la pérdida de la integridad anatómica. Existe la presencia de sangre en la leche cuando los componentes extracelulares como cloro, sodio, potasio, hidrógeno e hidróxido alcanzan la glándula uniéndose con la leche al romper la barrera sangre leche. Se pueden observar signos como enrojecimiento e hinchazón de la glándula. El incremento de la conductividad, el pH y contenido de agua alteran el sabor de la leche (Zhao & Lacasse, 2008).

3.3.4. Prueba CMT

La prueba California Mastitis Test (CMT) es usada para determinar el grado de mastitis ya que brinda un rango aproximado del CCS. La prueba mide el grado de gelificación

que ocurre cuando el ADN es liberado por las células somáticas de la leche por acción del reactivo: a mayor contenido celular, mayor gelificación (Serratos Arévalo et al., 2019).

Tabla 2. Interpretación de las puntuaciones de CMT y valores aproximados de células por ml

Puntuación CMT	Reacción visible	Rango de células por ml
Negativo	La mezcla parece líquida; no existe precipitado	0 a 200,000
Traza	Ligero precipitado, se observa al inclinarlo y desaparece con el movimiento	200,000 a 500,000
1	Precipitado distinto, pero sin formación de gel	500,000 a 1,500,000
2	La muestra se espesa inmediatamente y se mueve hacia el centro	1,500,000 a 5,000,000
3	Formación de gel y la superficie se vuelve compacta	>5,000,000

Adaptado de: Ruegg & Heinemann (2002).

3.3.5. Cultivo bacteriano de mastitis

El cultivo bacteriano es una herramienta muy valiosa para el diagnóstico y tratamiento de la mastitis ya que es una enfermedad que causa grandes pérdidas en ganaderías de leche. Los organismos patógenos que causan la mastitis son predominantemente *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium bovis* y *Streptococcus dysgalactiae* (Langhorne et al., 2023; Dufour et al., 2019).

Según Minnesota Easy Culture System User's Guide (2016), los medios de cultivo deben permanecer en la incubadora boca abajo o sobre su tapa para que la condensación de la tapa no gotee sobre la muestra de la placa. Las cajas deben ser incubadas a una temperatura 37° C hasta por 48 horas.

3.3.6. Diagnóstico bacteriológico de la mastitis

Staphylococcus spp.: El agar sal Manitol o medio Champan son los medios recomendados y usados por la mayoría de laboratorios, ya que su elevado contenido de sal inhibe el crecimiento de la mayoría de las bacterias Gram negativas y estimulan el crecimiento de las Gram positivas. Creando pequeñas colonias redondas y cremosas con una pigmentación que va del amarillo al dorado por la producción de carotenoides (Cervantes-García et al., 2014).

Streptococcus spp.: Estas bacterias crecen bien en medios enriquecidos con sangre. Sus colonias de forma esférica y por lo general sin pigmentación forman colonias que

van de 0.5 – 1 mm de diámetro, aunque dependiendo de la especie pueden formar colonias incluso menores a 0.5 mm observándose puntiformes. Al ser Gram positivas tienden a ser catalasas negativas, microscópicamente se encuentran formando cadenas de 2 a 30 bacterias (Montes & García-Arenzana, 2007).

Escherichia coli: Pueden crecer tanto en agar E.M.B y MacConkey. En agar E.M.B las colonias crecen con un diámetro de 2 – 4 mm. Por lo general, el centro de las colonias tiene un pigmento oscuro, presentando un brillo verde metálico cuando se observa bajo la luz. Mientras que, en agar MacConkey tienen un pigmento rojo con un halo turbio. Son bacilos Gram negativos, microscópicamente muestran flagelos móviles, pudiéndose identificar por ser catalasas positivas, oxidases negativas y fermentan glucosa produciendo gas (Hossain et al., 2021).

3.3.7. Halo de inhibición

El efecto antibacteriano se puede medir cuando se agrega una solución antibacteriana en un cultivo bacteriano, el cual al esparcirse por el medio forma una zona de inhibición clara alrededor del disco, esta zona clara es donde no existe crecimiento bacteriano, por lo que su tamaño está directamente relacionado con su capacidad antibacteriana (Matos et al., 2014).

Para medir el efecto antimicrobiano, medimos el tamaño del halo de inhibición con una regla y los resultados se analizan tomando en cuenta la escala de Duraffourd, considerado un método fiable para evaluar el efecto antibacteriano de las sustancias (Granados-Jamanca et al., 2023). La escala mencionada posee los siguientes parámetros: Sensibilidad Nula <8 mm, Sensibilidad límite \geq 9-14 mm, Sensibilidad media \geq 15-19 mm, Sumamente sensible \geq 20 mm (Duraffourd & Herbocourt, 1986).

3.4. Caracterización del ácido hipocloroso

3.4.1. Definición

El HClO es parte de un grupo de sustancias microbicidas reconocidas como "sustancias antimicrobianas no antibióticas" por su rápida acción, amplio espectro, concentración, margen de seguridad amplio y gracias a su estabilidad puede usarse para desinfección y control de infecciones en piel y mucosas (Rosso & Bhatia, 2018).

Gracias a su neutralidad eléctrica el HClO penetra con facilidad la pared celular y membrana de las bacterias por medio de difusión pasiva, provocando efectos adversos en las macromoléculas de las células (Fukuzaki, 2006). Las proteínas encargadas de la transducción y transporte de energía, de la membrana celular sufren un daño ocasionando la hidrólisis del ATP (Barrette et al., 1987).

3.4.2. Composición de la sustancia

El HClO es un oxiácido de cloro compuesto por cloro monovalente que ejerce la acción de agente reductor u oxidante (National Center for Biotechnology Information, 2024). Se encuentra de diferentes formas de cloro acuoso: HClO, cloro gaseoso (Cl₂) e ion hipoclorito (OCl⁻). Gran cantidad de HClO se encuentra en soluciones acuosas con pH entre 2 y 7,5 a 25° (Kettle et al., 2014).

3.4.3. Propiedades de la sustancia

Su principal efecto bactericida se ha demostrado al introducirse en una gran diversidad de microorganismos. *In vitro*, esta sustancia provoca la oxidación de nucleótidos, inactivación de enzimas celulares, alteración de las membranas celulares y terminado con una lisis celular rápida (Anagnostopoulos et al., 2018; Jafry et al., 2017).

Su actividad antimicrobiana está relacionada con su interacción a estructuras celulares de las bacterias Gram negativas. Su acción ocurre en las estructuras nucleofílicas, como proteínas hierro-azufre, porfirinas y hemos, aminoácidos y aminas, grupos sulfhidrilo, pirimidina y bases purina (Winter et al., 2008).

Por otra parte, el HClO además de ser antimicrobiano, tiene la capacidad de ser reconstituyente de tejidos y membranas, esto hace que pueda ser utilizado en el campo de la medicina tanto humana como animal, otorgando resultados positivos en llagas orales, quemaduras y úlceras de la piel y mucosas (Armstrong et al., 2015).

Así demuestra un estudio realizado con una solución de HClO para el tratamiento de heridas en equinos inhibe completamente el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* *in vitro* (Ramey & Kinde, 2015). Otro estudio realizado para el enjuague de oídos bajo anestesia y como limpiador de oídos para el tratamiento de otitis crónica en caninos resultó efectivo y seguro (Mueller et al., 2023). El HClO elimina rápidamente los agentes causantes de la queratoconjuntivitis infecciosa, las infecciones de heridas y las mastitis (Gard et al., 2016; Amulic et al., 2012).

3.4.4. Producción biológica del ácido hipocloroso

Orgánicamente, el HClO pertenece al grupo de moléculas que se conocen como especies reactivas de oxígeno (ROS) sintetizadas por los neutrófilos y macrófagos del sistema inmunológico (Aratani, 2018). Durante una infección bacteriana estas células se activan y producen grandes cantidades de HClO a través de una enzima llamada mieloperoxidasa la cual es secretada por los neutrófilos en el sitio de la infección (Nizer et al., 2020).

La mieloperoxidasa juega un rol crucial en la producción de sustancias oxidantes. Esta enzima hemo utiliza peróxido de hidrógeno y cloruro para estimular la

producción de ácido hipocloroso. Esta reacción toma lugar en el lumen del fagolisosoma el cual se va acidificando al mismo tiempo que el proceso avanza, estabilizando y optimizando la actividad antimicrobiana molecular del HClO (Winterbourn et al., 2006; Lafaurie et al., 2009).

Finalmente, el HClO, producto del estallido respiratorio, es liberado a nivel extracelular reaccionando con la taurina produciendo cloramina de taurina, un oxidante de duración prolongada que igualmente cuenta con propiedades antibacterianas y antinflamatorias (Sam & Lu, 2009).

3.4.5. Acción de la sustancia

A partir de dicho interés, se ha desarrollado tecnología in vitro para producir HClO. Por lo que, desde hace años ha resultado ser destructor de células bacterianas (Epstein & Stephen, 1989), que ingresa fácilmente a través de las paredes celulares siendo similar al agua, principalmente por a su bajo peso molecular y su electroneutralidad (White, 1999). Cuando se encuentra dentro de la célula, puede reaccionar con numerosas moléculas biológicas gracias a su fuerte poder oxidante. Entre estas moléculas se encuentran especialmente ADN, ARN, tioles, proteínas hemo, grupos amino, lípidos y carbohidratos (Ward & Diego, 1988).

Además de su efecto como microbicida, el HClO puede tener un efecto antiinflamatorio, reducir la actividad de la histamina, reducir la actividad de los leucotrienos, aumentar la actividad de TGFbeta, aumentar la síntesis del factor de crecimiento y disminuir la actividad de la metaloproteasa, la colagenasa y la gelatinasa (Pelgrift & Friedman, 2013).

Materiales y Métodos

4.1. Materiales

Tabla 3. Materiales empleados

Físicos		Químicos	Biológicos
Equipos	Insumos		
<ul style="list-style-type: none"> • Calentador y agitador • Autoclave calor húmedo • Pipetas automáticas • Incubadora • Contador de colonias manual • Microscopio electrónico • Refrigeradora 	<ul style="list-style-type: none"> • Paletas para prueba de CMT • Guantes de examinación • Cooler • Mandiles • Agua destilada • Frascos de orina estériles • Rotuladores • Alcohol • Mechero • Fosforera • Cajas Petri • Tubos de ensayo • Aceite de inmersión • Puntas para pipeta de 100ul y 1000ul • Erlenmeyer • Papel secante • Discos en blanco para antibiograma 	<ul style="list-style-type: none"> • Reactivo para detección de mastitis (CMT) • EMB para enterobacterias • Agar Manitol para <i>Sthapylococcus</i> spp • Agar base sangre para <i>Streptococcus</i> spp • Agar Mueller Hinton para antibiogramas • Ácido hipocloroso 500 ppm • Tinción de Gram 	<ul style="list-style-type: none"> • Sangre de equinos • Muestras de leche

4.2. Área de estudio

El estudio se realizó en la provincia del Azuay en diferentes unidades productivas ganaderas ubicadas en el cantón Cuenca.

4.3. Diseño experimental

Esta investigación incluyó 5 vacas de la raza Holstein friesian diagnosticadas con mastitis subclínica de un total muestreado de 75 vacas. Las bacterias causantes de las mastitis fueron aisladas *in vitro* y cultivadas bajo condiciones controladas durante 24-48 horas. Este proceso se realizó en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Ciencias

Agropecuarias de la Universidad de Cuenca. Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) que incluyó dos tratamientos (Grupo 1, tratamiento con ácido hipocloroso a 500 ppm [HClO, n=5] y Grupo 2, tratamiento de control con ceftiofur [CEF, n=5]), cada uno con 5 repeticiones por bacteria. Inicialmente se realizó la prueba de CMT para el diagnóstico de mastitis subclínica, posteriormente se tomaron 3 muestras de cada vaca positiva para después mediante cultivo bacteriano aislar las bacterias (*Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. y/o *Escherichia coli*). A continuación, se le aplicó a cada muestra los tratamientos 1 y 2 mediante antibiograma para determinar el efecto antimicrobiano de cada tratamiento según el tamaño de los halos de inhibición. Los tratamientos y repeticiones se detallan a continuación:

Tipo de bacteria	Nº vacas	Repeticiones por bacteria	Control (cefalosporina) total de repeticiones	HClO total de repeticiones
<i>Staphylococcus</i> spp.	5	5	25	25
<i>Escherichia coli</i>	5	5	25	25
<i>Streptococcus</i> spp.	1	5	5	5

4.3.1. Variables

4.3.2. Variables independientes

- Antimicrobianos: 1) control (cefalosporina), y 2) HClO

4.3.3. Variable dependiente

- Halo de inhibición en cada especie bacteriana

4.4. Metodología

4.4.1. Diagnóstico de mastitis subclínica

Antes del ordeño, se procedió al lavado, secado y sellado de los pezones de todas las vacas, posteriormente se descartó el primer chorro de leche.

Para la prueba se utilizó un producto comercial con sodio lauril sulfato 2 % y cristal violeta 0,0033 % (CMT). A continuación, se describe el procedimiento:

- 1) En una paleta de 4 pocillos se colocó 2 ml de muestra de cada cuarto respectivamente rotulado.
- 2) Se añadió la misma cantidad de reactivo y se homogenizó la muestra con el reactivo durante 10 segundos.
- 3) Mediante un análisis cualitativo se procede a la interpretación inmediata del test.

4.4.2. Recolección de las muestras

Se analizaron un total de 240 muestras de cada pezón de 75 vacas mediante CMT, de las cuales fueron seleccionadas 5 vacas con mastitis subclínica. Posteriormente, de las vacas seleccionadas se tomaron 5ml de leche en recipientes estériles rotulados con el número de vaca y ubicación del pezón (AD, AI, PD y PI).

4.4.3. Transporte de las muestras

Para el transporte de las muestras se usó un *cooler* con hielo seco para mantener una temperatura de 4°C posteriormente las muestras se trasladaron para su procesamiento en el Laboratorio de Microbiología y Lácteos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca.

4.5. Cultivo y aislamiento de bacterias

4.5.1. Elaboración de medios de cultivo

- a) Inicialmente se pesó los diferentes agares (EMB, Manitol y Blood Base) con una balanza analítica siguiendo el Manual Difco & BBL (Zimbro et al., 2009).
- b) Se calculó el número de agares para medir el agua destilada en un matraz.
- c) En una estufa se colocó el matraz y se agregó el agar hasta llegar al punto de ebullición.
- d) Posteriormente, se selló el matraz con papel aluminio y cinta masking rotulada para ser esterilizados en el autoclave a 121°C durante 20 minutos.
- e) Finalmente, usando un guante se tomaron los matraces y se distribuyó homogéneamente los agares en las cajas Petri.

4.5.2. Siembra

- a) Para realizar la siembra se diluyó la leche en agua peptonada, con la finalidad de disminuir la carga bacteriana, siendo 100 µl de leche y 900 µl de agua peptonada, se homogenizó la muestra en tubos Falcon.
- b) Se colocó 50 µl de la dilución en las cajas Petri, con la ayuda de pipetas automáticas se distribuyó la muestra por toda la caja con un asa Driglaski y rotulamos.
- c) Posteriormente se colocó cada caja en posición invertida dentro de la incubadora a 35°C durante 24-48 horas.
- d) Finalmente, se examinó las cajas Petri bajo el contador de colonias manual para identificar si existió crecimiento bacteriano.

4.5.3. Pruebas bioquímicas**4.5.3.1. Prueba de catalasa para la identificación de *Streptococcus spp.***

- a) Tomando como base el manual de prácticas de bacteriología y micología veterinarias de Bello & González, (2015), se utilizó como reactivo el peróxido de hidrógeno y se colocó una gota de sustancia sobre una caja Petri.
- b) Con un asa de siembra se tomó una colonia de bacteria y se suspendió en la gota de peróxido de hidrógeno.
- c) Se procedió a observar la reacción y a anotar los resultados.

4.5.3.2. Tinción de Gram para la confirmación de *Streptococcus spp.*

- a) Siguiendo el manual de Bello & González, (2015), se tomó con un asa de siembra estéril una colonia de bacteria a identificar.
- b) Se colocó la colonia sobre un portaobjetos y se realizó un frotis bacteriano, dejándolo secar con ayuda del mechero.
- c) Se aplicó algunas gotas de cristal violeta, se esperó 1 minuto y se lavó la placa con agua destilada para eliminar el exceso de colorante.
- d) Se aplicó el segundo colorante, Lugol. Se esperó 1 minuto y se lavó.
- e) Se aplicó alcohol acetona sobre la placa, 15 segundos después se procedió a eliminar el excedente de colorante.
- f) Por último, se agregó safranina, se esperó 45 segundos y de igual manera se lavó el exceso y se dejó secar.
- g) Se llevó la placa al microscopio y con ayuda del aceite de inmersión se observó con el lente de x100.
- h) Se realizó la toma de datos e identificación bacteriana.

4.5.3.3. Prueba bioquímica para la identificación de enterobacterias

Para confirmar la presencia de enterobacterias se realizó la prueba bioquímica de T.S.I, basándonos en los escritos de MDM Científica, (2020):

- a) Con ayuda de un asa se tomó la colonia a identificar.
- b) Se sembró haciendo pequeñas estrías en un tubo de ensayo con agar T.S.I.
- c) Se incubó por 24-48 horas.
- d) Se observó e interpretó el resultado.

4.5.4. Prueba de sensibilidad o antibiograma

- a) Tomando como referencia el manual de Sacsaquispe & Velasquez, (2022), inicialmente se seleccionaron las colonias bacterianas previamente aisladas.

- b) Con un hisopo estéril se tomó la superficie de la colonia y se transfirió a un tubo de ensayo con 1ml de suero fisiológico.
- c) Se homogenizó el inóculo hasta obtener una turbidez equivalente a $1,5 \times 10^6$ bacterias (tomando como referencia el tubo 5 de la escala Mc Farland).
- d) Una vez ajustada la turbidez se tomó un hisopo estéril y se sumergió en la suspensión.
- e) Se eliminó todo el exceso de la suspensión y haciendo estrías en diferentes direcciones se impregnó el inóculo sobre la superficie de las placas de Mueller-Hinton.
- f) Se dejó secar las placas a temperatura ambiente de 3-5 minutos.
- g) Se colocó sobre la superficie de la placa dos discos de sensibilidad antibiótica en blanco (Oxoid™) embebidas de 25 μ l de HCIO y 25 μ l ceftiofur, respectivamente.
- h) La distancia entre los discos fue de 25 mm ya que consideró la futura formación y medición de los respectivos halos de inhibición de cada disco.
- i) Se empleó una pinza estéril para presionar suavemente los discos y así aseguramos de que se adhieran al medio de cultivo.
- j) Se colocaron las placas en posición invertida y se incubaron a 35°-37° C por 16-18 horas.
- k) Se observó el crecimiento del halo de inhibición alrededor de cada disco.
- l) Con ayuda de una regla milimétrica se realizó la medición del diámetro de los halos de inhibición de cada disco en el contador de colonias manual.
- m) Se procedió a interpretar los resultados comparando los halos de inhibición de cada tratamiento.

Para la medición de los halos de inhibición de este estudio se tomó como referencia la escala de Duraffourd.

4.6. Metodología experimental

4.6.1. Análisis estadístico

Los datos recolectados fueron tabulados en Excel y analizados en el software estadístico “STATISTICA versión 12.0”. La distribución normal de los datos fue comprobada mediante la prueba estadística Shapiro-Wilk; aquellas variables que no cumplieron una distribución normal fueron transformadas a Log-10 antes de los análisis estadísticos. Un ANOVA unidireccional fue usado para evaluar el efecto de los antimicrobianos en diferentes antibiogramas en las tres especies de bacterias aisladas. Los datos están expresados como promedio y error estándar de la media. Los valores de significancia fueron considerados como $P > 0,05$.

Resultados

5.1. Acción bactericida *in vitro* del ácido hipocloroso

Tabla 4. Promedio de los halos de inhibición (mm) formados *in vitro* por los diferentes tratamientos contra cepas de *Staphylococcus spp.* y *Escherichia coli*. Total, de réplicas: 5 sesiones.

Bacterias antibiograma	Control	HCIO	n
Halo de inhibición en colonias de <i>Staphylococcus spp</i> (mm)	$29,2 \pm 1,36^a$	$13,5 \pm 1,11^b$	25
Halo de inhibición en colonias de <i>Escherichia coli</i> (mm)	$29,5 \pm 1,36^a$	$8,8 \pm 0,42^b$	25

Diferentes superíndices en la misma fila expresan diferencias significativas entre tratamientos, ^{a-b}, $P < 0,05$.

Nuestros hallazgos muestran que bajo condiciones *in vitro* el halo de inhibición en los antibiogramas de colonias bacterianas de *Staphylococcus spp.* fue significativamente mayor ($P < 0,05$) con el tratamiento control (cefalosporina) en comparación con el tratamiento con HCIO. Asimismo, este efecto fue evidencia en los antibiogramas de las colonias de *Escherichia coli* en el cual el tratamiento basado en cefalosporina produjo un mayor halo de inhibición que el tratamiento con HCIO ($P < 0,05$) (Ver Tabla 4).

Tabla 5. Promedio de los halos de inhibición (mm) formados *in vitro* por los diferentes tratamientos contra *Streptococcus spp*. Total, de réplicas: 1 sesión.

Bacterias antibiograma	Control	HCIO	n
Halo de inhibición en colonias de <i>Streptococcus spp</i> (mm)	$31,2 \pm 0,73^a$	$7,6 \pm 1,03^b$	5

Diferentes superíndices en la misma fila expresan diferencias significativas entre tratamientos, ^{a-b}, $P < 0,05$.

Los resultados obtenidos en los antibiogramas de colonias de *Streptococcus spp.* concuerdan con los evidenciados anteriormente donde el tratamiento control (cefalosporina) fue significativamente mayor ($P < 0,05$) que el tratamiento con HCIO (Ver Tabla 5).

Discusión

Esta investigación evaluó el efecto antimicrobiano *in vitro* del ácido hipocloroso contrastado con el efecto de la cefalosporina como control, en cultivos de bacterias aisladas de la leche de vacas con mastitis subclínica: *Staphylococcus spp.*, *Escherichia coli* y *Streptococcus spp.* Los hallazgos de esta investigación indican que el ácido hipocloroso produjo una menor sensibilidad antimicrobiana ante dichos patógenos comparado con un control farmacológico. El HClO, a pesar de producir un menor halo de inhibición sobre cultivos de bacterias *Staphylococcus spp.* (Gram +), éste mostró una sensibilidad límite según la escala de Duraffourd. En las bacterias *Escherichia coli* (Gram -) y *Streptococcus spp.* (Gram +), sin embargo, alcanzó una sensibilidad nula según su halo de inhibición menor a 8 mm de diámetro. Estos resultados sugieren que el HClO puede tener varias vías de acción sobre las bacterias, las mismas que pueden discutirse a continuación.

El ácido hipocloroso es un desinfectante muy efectivo contra una amplia variedad de microorganismos, incluidas las bacterias Gram negativas. El mecanismo de acción en las bacterias implica varios procesos tales como la oxidación de proteínas, daño de los ácidos nucleicos, peroxidación lipídica, interacción con la pared celular y membrana externa, e inhibición de la respiración celular (Albrich et al., 1981; Prü Tz, 1996; Winter et al., 2008). El conjunto de estos efectos resulta en la inactivación y muerte de las bacterias Gram negativas, haciendo del HClO un desinfectante potente y de amplio espectro.

En estudios previos diseñados para evaluar el efecto *in vitro* del HClO se demostró que tiene efectividad sobre diferentes cepas, tal como lo menciona Romanowski et al., (2018) y Anagnostopoulos et al. (2018), evaluaron en diferentes estudios, el efecto del HClO a una concentración de 100 ppm y este tuvo un efecto significativo sobre las colonias bacterianas de *Staphylococcus spp.* Asimismo, algunos estudios contra cepas de *Escherichia coli* demostraron la eficacia inhibitoria del HClO, estudios como el de Ramey & Kinde, (2015), usaron una concentración similar 110 ppm de HClO de un producto comercial y evidenciaron un efecto significativo sobre las colonias bacterianas, aunque también se puede atribuir su eficacia al contenido de cloruro de sodio. Otros estudios usaron dosis elevadas de HClO (2350 ppm) en comparación con este estudio y también obtuvieron un efecto potencial inhibitorio sobre *E. coli* (Severino, 2023). Por otro lado, un estudio realizado por Arévalo, (2022), a una concentración de 80 ppm *in vitro*, resultó tener un efecto inhibitorio nulo frente a *Streptococcus anginosus*.

El mecanismo de acción de HClO se debe a que las bacterias Gram negativas llevan grupos 'sulfuro' y 'hemo' en su membrana externa, los mismos que son necesarios para llevar a cabo el transporte de electrones. Por lo tanto, una reacción enzimática

irreversible de HClO con proteínas de membrana, causan lesiones estructurales que alteran la permeabilidad celular y modifica la viabilidad de la bacteria (McKenna & Davies, 1988; Rosen & Klebanoff, 1982). En cambio, en las bacterias Gram positivas, el HClO interviene sobre los grupos amino de la glicina presente en el peptidoglucano, por lo que la cloración de estos microorganismos difiere en cuanto al blanco de acción (Sam & Lu, 2009).

Se debe tener en cuenta que diversos estudios afirman que el HClO al ser un desinfectante oxidante, su efectividad podría verse comprometida por diferentes condiciones como; la exposición a la luz solar que reduce su eficacia a partir del cuarto día, mientras que cuando está protegida de la misma su efectividad se ve reducida desde el día 14. Asimismo, temperaturas superiores a los 25°C inestabilizan la sustancia. De igual manera, su eficacia disminuye al contacto con el aire. La solución requiere temperaturas bajas para su estabilidad (< 10°C), contacto mínimo con el aire y protección de la luz (Ishihara et al., 2017).

Conclusiones

Los resultados de la presente investigación concluyen lo siguiente:

1. Se identificó las tres especies de bacterias *Staphylococcus spp.*, *Escherichia coli* y/o *Streptococcus spp.* en vacas lecheras con mastitis subclínica.
2. El HCIO evidenció una sensibilidad límite únicamente contra colonias bacterianas de *Staphylococcus spp.* Por otro lado, el HCIO no presentó sensibilidad contra colonias de *Escherichia coli* y *Streptococcus spp.* de acuerdo a la escala de Durafford. Por lo cual no tuvo un efecto antimicrobiano en comparación con el ceftiofur.

Recomendaciones

En referencia a los datos del análisis estadístico y las conclusiones presentadas, se recomienda:

- Realizar estudios comparativos del ácido hipocloroso con otros desinfectantes comerciales, ya que los antibióticos presentan diferentes mecanismos de acción y generan resistencia.
- Para determinar el efecto antimicrobiano, considerar evaluar el efecto del HClO a distintas concentraciones frente a las bacterias causantes de la mastitis, para asegurar un tratamiento eficaz para mastitis subclínica.
- Verificar la composición y concentración de los desinfectantes comerciales previo a realizarse el estudio de investigación, ya que la conservación del mismo puede disminuir su eficacia.

Referencias

- Albrich, J. M., McCarthy, C. A., & Hurst, J. K. (1981). Biological reactivity of hypochlorous acid: Implications for microbicidal mechanisms of leukocyte myeloperoxidase (bactericide/biological oxidation/neutrophil/respiration/toxin). In *Proc. Nati Acad. Sci. USA* (Vol. 78, Issue 1).
- Alvarez, E., & Chuqui, C. (2017). *Prevalencia de mastitis subclínica mediante California Mastitis Test (CMT) en ganado bovino lechero del cantón Cuenca*. Universidad de Cuenca.
- Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G. L., Metzler, K. D., & Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil function: From mechanisms to disease. In *Annual Review of Immunology* (Vol. 30, pp. 459–489). <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074942>
- Âna dos Santos Nascimento, J., Âtia Regina Netto dos Santos, K., Gentilini, E., Sordelli, D., & do Carmo de Freire Bastos, M. (2002). *Phenotypic and genetic characterisation of bacteriocin-producing strains of *Staphylococcus aureus* involved in bovine mastitis*.
- Anagnostopoulos, A. G., Rong, A., Miller, D., Tran, A. Q., Head, T., Lee, M. C., & Lee, W. W. (2018a). 0.01% hypochlorous acid as an alternative skin antiseptic: An in vitro comparison. *Dermatologic Surgery*, 44(12), 1489–1493. <https://doi.org/10.1097/DSS.0000000000001594>
- Anagnostopoulos, A. G., Rong, A., Miller, D., Tran, A. Q., Head, T., Lee, M. C., & Lee, W. W. (2018b). 0.01% hypochlorous acid as an alternative skin antiseptic: An in vitro comparison. *Dermatologic Surgery*, 44(12), 1489–1493. <https://doi.org/10.1097/DSS.0000000000001594>
- Aratani, Y. (2018). Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. In *Archives of Biochemistry and Biophysics* (Vol. 640, pp. 47–52). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.01.004>
- Arévalo, D. (2022). *Efecto inhibitorio del ácido hipocloroso, polihexanida y clorhexidina en cepas de *Streptococcus anginosus* in vitro. Estudio comparativo* [Universidad Central del Ecuador]. <https://www.dspace.uce.edu.ec/server/api/core/bitstreams/6ce99ef9-ceab-495a-9af6-c5b83b69bb4a/content>
- Armstrong, D. G., Bohn, G., & Snyder, R. J. (2015). *Expert Recommendations for the Use of Hypochlorous Solution: Science and Clinical Application*. <https://www.researchgate.net/publication/292489936>
- Bank, U., & Ansorge, S. (2001). More than destructive: neutrophil-derived serine proteases in cytokine bioactivity control. *Journal of Leukocyte Biology*, 69(2), 197–206. <https://doi.org/10.1189/jlb.69.2.197>
- Barrette, W. C., Albrich, J. M., & Hurst, J. K. (1987). Hypochlorous Acid-Promoted Loss of Metabolic Energy in *Escherichia coli*. In *INFECTION AND IMMUNITY* (Vol. 55, Issue 10). <https://journals.asm.org/journal/iai>

- Bedolla, C. (2008). Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina en la industria lechera. *Pérdidas Económicas Ocasionadas Por La Mastitis Bovina En La Industria Lechera, IX*(4), 1–26. <https://www.redalyc.org/pdf/636/63611952010.pdf>
- Bedolla, C., & Ponce de León, M. (2008). *Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina en la industria lechera. IX*.
- Bello, A. E., & González, G. J. (2015). *Manual de prácticas de bacteriología y micología veterinarias*.
- Birhanu, M., Leta, S., Mamo, G., & Tesfaye, S. (2017). Prevalence of bovine subclinical mastitis and isolation of its major causes in Bishoftu Town, Ethiopia. *BMC Research Notes*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s13104-017-3100-0>
- Calderón, A., Rodríguez, V., Arrieta, G., & Máttar, S. (2011). *Prevalence of mastitis in dual purpose cattle farms in Montería (Colombia): etiology and antibacterial susceptibility*. <http://rccp.udea.edu.co>
- Cervantes-García, E., García-González, R., & María Salazar-Schettino, P. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab*, 61(1), 28–40. www.medigraphic.com/patologiaclinicawww.medigraphic.org.mx
- Chen, X., Chen, Y., Zhang, W., Chen, S., Wen, X., Ran, X., Wang, H., Zhao, J., Qi, Y., & Xue, N. (2022). Prevalence of subclinical mastitis among dairy cattle and associated risks factors in China during 2012–2021: A systematic review and meta-analysis. *Research in Veterinary Science*, 148, 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2022.04.007>
- Cobirka, M., Tancin, V., & Slama, P. (2020). Epidemiology and classification of mastitis. In *Animals* (Vol. 10, Issue 12, pp. 1–17). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ani10122212>
- Coda Zabetta, E. I. (2019). *Aislamiento e identificación de bacterias vinculadas a mastitis bovina en leche cruda comercializada por el tambo Complejo Agropecuario Casilda*.
- Cuenca-Condoy, M., García-Bracho, D., Reinoso-García, L., González-Rojas, J., & Torracchi-Carrasco, J. (2021). Detection of Subclinic Bovine Mastitis and associated factors, in dairy farms of the Province of Cañar – Biblián, Ecuador. *Revista Científica de La Facultad de Veterinaria*, 31(3), 93–97. <https://doi.org/10.52973/rcfcv-luz313.art3>
- Dufour, S., Labrie, J., & Jacques, M. (2019). The Mastitis Pathogens Culture Collection. *Microbiology Resource Announcements*, 8(15). <https://doi.org/10.1128/mra.00133-19>
- Duraffourd, C., & Herbocourt, D. (1986). *Cuaderno de Fitoterapia Clínica* (Primera). Masson.
- Epstein, F., & Stephen, W. (1989). Destruction by Neutrophils. *New England Journal of Medicine*, 311, 365–376.
- Ezzat Alnakip, M., Quintela-Baluja, M., Böhme, K., Fernández-No, I., Caamaño-Antelo, S., Calo-Mata, P., & Barros-Velázquez, J. (2014). The Immunology of Mammary Gland of Dairy Ruminants between Healthy and Inflammatory Conditions. *Journal of Veterinary Medicine*, 2014, 1–31. <https://doi.org/10.1155/2014/659801>

- Fukuzaki, S. (2006). Mechanisms of Actions of Sodium Hypochlorite in Cleaning and Disinfection Processes. *Biocontrol Science*, 11. <https://doi.org/https://doi.org/10.4265/bio.11.147>
- Gajdács, M., Urbán, E., Stájer, A., & Baráth, Z. (2021). Antimicrobial resistance in the context of the sustainable development goals: A brief review. *European Journal of Investigation in Health, Psychology and Education*, 11(1), 71–82. <https://doi.org/10.3390/ejihpe11010006>
- García, M. (2018). *Diagnóstico bacteriológico y prevalencia de Mastitis bovina del proyecto ganadero de la Municipalidad de Satipo* [Universidad Nacional del Centro del Perú]. https://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12894/4954/T010_42827999_T.pdf?isAllowed=y&sequence=1
- Gard, J., Taylor, D., Maloney, R., Schnuelle, M., Duran, S., Moore, P., Justus, W., Walz, P., Stockle, R., Rodning, S., DeGraves, F., van Santen, E., Edmondson, M., & O, A. M. (2016). Preliminary evaluation of hypochlorous acid spray for treatment of experimentally induced infectious bovine keratoconjunctivitis. *The Bovine Practitioner*, 50, 180–189.
- Gomezcoello, L. (2022). *Prevalencia de mastitis mediante el recuento de células somáticas en bovinos de producción láctea*. Universidad Politécnica Salesiana.
- González Salas, R., & Vidal del Rio, M. (2021). *Bovine mastitis and milk quality, a challenge for human health*. 13, 92.
- Granados-Jamanca, L., Medrano-Colmenares, S., Gamboa-Alvarado, E., Ladera-Castañeda, M., Castañeda-Pérez, L., Cervantes-Ganoza, L., Cornejo-Pinto, A., & Cayo-Rojas, C. (2023). Antibacterial activity of Bixa orellana compared with Camellia sinensis against Streptococcus mutans: An in vitro comparative study. *Journal of International Oral Health*, 15(2), 174–183. https://doi.org/10.4103/jioh.jioh_212_22
- Hettinga, K. A., Van Valenberg, H. J. F., Lam, T. J. G. M., & Van Hooijdonk, A. C. M. (2008). Detection of mastitis pathogens by analysis of volatile bacterial metabolites. *Journal of Dairy Science*, 91(10), 3834–3839. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0941>
- Hossain, M., Rahman, W., Ali, M., Sultana, T., & Hossain, K. (2021). Identification and Antibiogram Assay of Escherichia Coli Isolated From Chicken Eggs. *Journal of Bio-Science*, 123–133. <https://doi.org/10.3329/jbs.v29i0.54828>
- Ishihara, M., Murakami, K., Fukuda, K., Nakamura, S., Kuwabara, M., Hattori, H., Fujita, M., Kiyosawa, T., & Yokoe, H. (2017). Stability of Weakly Acidic Hypochlorous Acid Solution with Microbicidal Activity. In *Note Biocontrol Science* (Vol. 22, Issue 4).
- Jafry, A. T., Lee, C., Kim, D., Han, G., Sung, W. K., & Lee, J. (2017). Development of high concentrated slightly acidic hypochlorous acid generator for food safety. *Journal of Mechanical Science and Technology*, 31(9), 4541–4547. <https://doi.org/10.1007/s12206-017-0854-1>
- Kettle, A. J., Albrett, A. M., Chapman, A. L., Dickerhof, N., Forbes, L. V., Khalilova, I., & Turner, R. (2014). Measuring chlorine bleach in biology and medicine. In *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* (Vol. 1840, Issue 2, pp. 781–793). <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.07.004>

- Kibebew, K. (2017). *Bovine Mastitis: A Review of Causes and Epidemiological Point of View*. 7(2). www.iiste.org
- Kovačević, Z., Samardžija, M., Horvat, O., Tomanić, D., Radinović, M., Bijelić, K., Vukomanović, A. G., & Kladar, N. (2023). Is There a Relationship between Antimicrobial Use and Antibiotic Resistance of the Most Common Mastitis Pathogens in Dairy Cows? *Antibiotics*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/antibiotics12010003>
- Lafaurie, G., Aya, M. del R., Arboleda, S., Escalante, A., Castillo, D., Millán, L., Calderón, J., & Ruiz, B. N. (2009). Eficacia desinfectante del ácido hipocloroso sobre cepas con poder patogénico de cavidad oral. *Revista Colombiana de Investigación En Odontología*, 1, 3–11.
- Lakew, B. T., Fayera, T., & Ali, Y. M. (2019). Risk factors for bovine mastitis with the isolation and identification of *Streptococcus agalactiae* from farms in and around Haramaya district, eastern Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production*, 51(6), 1507–1513. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-01838-w>
- Langhorne, C., Gupta, S. Das, Horsman, S., Wood, C., Wood, B. J., Barker, L., Deutscher, A., Price, R., McGowan, M. R., Humphris, M., Ranjbar, S., Henning, J., & Gibson, J. S. (2023). Bacterial culture and antimicrobial susceptibility results from bovine milk samples submitted to four veterinary diagnostic laboratories in Australia from 2015 to 2019. *Frontiers in Veterinary Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1232048>
- Lehtolainen, Tanja., & (Yliopistopaino). (2004). *Escherichia coli mastitis : bacterial factors and host response*. Tanja Lehtolainen.
- Lopes, T. S., Fontoura, P. S., Oliveira, A., Rizzo, F. A., Silveira, S., & Streck, A. F. (2020). Use of plant extracts and essential oils in the control of bovine mastitis. In *Research in Veterinary Science* (Vol. 131, pp. 186–193). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.04.025>
- Martínez, D., Cruz, A., Millán, A., & Moreno, G. (2015). Evaluación del estado de resistencia de agentes etiológicos de mastitis clínica y subclínica frente a algunos antimicrobianos utilizados en hembras bovinas del Municipio de Sotaquirá (Boyacá-Colombia). *Revistia Científica*, XXV.
- Matos, L., Costa, A., Pereira, C., Mendes, C., Botero, E., & Tannous, T. (2014). Differences of the inhibition halo of sweating using different types of botulinum toxins. *JOURNAL OF THE AMERICAN ACADEMY OF DERMATOLOGY*, 70(AB151).
- Mckenna, S. M., & Davies, K. J. A. (1988). The inhibition of bacterial growth by hypochlorous acid Possible role in the bactericidal activity of phagocytes. In *Biochem. J* (Vol. 254).
- MDM Científica. (2020). *SERIES DE IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA (UREA, CITRATO, LISINA, SIM Y TSI)*. www.mdmcientifica.com
- Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. In *Nature* (Vol. 449, Issue 7164, pp. 819–826). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nature06246>
- Mestrovic, T., Robles Aguilar, G., Swetschinski, L. R., Ikuta, K. S., Gray, A. P., Davis Weaver, N., Han, C., Wool, E. E., Gershberg Hayoon, A., Hay, S. I., Dolecek, C.,

- Sartorius, B., Murray, C. J. L., Addo, I. Y., Ahinkorah, B. O., Ahmed, A., Aldeyab, M. A., Allel, K., Ancuceanu, R., ... Naghavi, M. (2022). The burden of bacterial antimicrobial resistance in the WHO European region in 2019: a cross-country systematic analysis. *The Lancet Public Health*, 7(11), e897–e913. [https://doi.org/10.1016/S2468-2667\(22\)00225-0](https://doi.org/10.1016/S2468-2667(22)00225-0)
- Minnesota Easy Culture System User's Guide*. (2016).
- Montes, M., & García-Arenzana, J. M. (2007). *Género Streptococcus: una revisión práctica para el laboratorio de microbiología The Streptococcus genus: a practical review for the microbiology laboratory*. <http://www.elsevier.esel20/10/2010.Copiarparausopersonal,seprohibelatransmisión deestedocumentoporcualquiermediooformato>.
- Mueller, R. S., Baumann, K. N., Boehm, T., Dörfelt, S., Kasper, B., & Udraite-Vovk, L. (2023). Evaluation of hypochlorous acid as an ear flush in dogs with chronic otitis externa. *Veterinary Dermatology*, 34(2), 134–141. <https://doi.org/10.1111/vde.13142>
- National Center for Biotechnology Information. (2024). *Hypochlorous Acid*. Pubchem.
- Ndahetuye, J. B., Persson, Y., Nyman, A. K., Tukei, M., Ongol, M. P., & Båge, R. (2019). Aetiology and prevalence of subclinical mastitis in dairy herds in peri-urban areas of Kigali in Rwanda. *Tropical Animal Health and Production*, 51(7), 2037–2044. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-01905-2>
- Nizer, W. S. da C., Inkovskiy, V., & Overhage, J. (2020). Surviving reactive chlorine stress: Responses of gram-negative bacteria to hypochlorous acid. In *Microorganisms* (Vol. 8, Issue 8, pp. 1–27). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081220>
- Paape, M. J., Bannerman, D. D., Zhao, X., & Lee, J. W. (2003). The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. In *Veterinary Research* (Vol. 34, Issue 5, pp. 597–627). <https://doi.org/10.1051/vetres:2003024>
- Pascu, C., Herman, V., Iancu, I., & Costinar, L. (2022). Etiology of Mastitis and Antimicrobial Resistance in Dairy Cattle Farms in the Western Part of Romania. *Antibiotics*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/antibiotics11010057>
- Paulrud, C. O. (2005). *Basic Concepts of the Bovine Teat Canal*.
- Pelgrift, R. Y., & Friedman, A. J. (2013). Topical Hypochlorous Acid (HOCl) as a Potential Treatment of Pruritus. In *Current Dermatology Reports* (Vol. 2, Issue 3, pp. 181–190). Current Medicine Group LLC 1. <https://doi.org/10.1007/s13671-013-0052-z>
- Pilla, R., Malvisi, M., Snel, G. G. M., Schwarz, D., König, S., Czerny, C. P., & Piccinini, R. (2013). Differential cell count as an alternative method to diagnose dairy cow mastitis. *Journal of Dairy Science*, 96(3), 1653–1660. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6298>
- Prü Tz, W. A. (1996). Hypochlorous Acid Interactions with Thiols, Nucleotides, DNA, and Other Biological Substrates. In *ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS* (Vol. 332, Issue 1). <https://doi.org/10.1073/pnas.78.1.210>

- Puglla, Y. (2016). *Determinación in vitro de la actividad antimicrobiana de los fármacos utilizados en el tratamiento de la mastitis bovina en el cantón Centinela del Cóndor de la provincia de Zamora Chinchipe*. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Pyörälä, S. (2003). Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Veterinary Research*, 34(5), 565–578. <https://doi.org/10.1051/vetres:2003026>
- Rainard, P., & Riollet, C. (2006). Innate immunity of the bovine mammary gland. *Veterinary Research*, 37(3), 369–400. <https://doi.org/10.1051/vetres:2006007>
- Rajamanickam, K., Yang, J., Chidambaram, S. B., & Sakharkar, M. K. (2020). Enhancing drug efficacy against mastitis pathogens—an in vitro pilot study in *staphylococcus aureus* and *staphylococcus epidermidis*. *Animals*, 10(11), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ani10112117>
- Ramey, D. W., & Kinde, H. (2015). Commercial and Homemade Extremely Dilute Hypochlorous Acid Solutions Are Bactericidal Against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* In Vitro. *Journal of Equine Veterinary Science*, 35(2), 161–164. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2014.12.004>
- Romanowski, E. G., Stella, N. A., Yates, K. A., Brothers, K. M., Kowalski, R. P., & Shanks, R. M. Q. (2018). In Vitro Evaluation of a Hypochlorous Acid Hygiene Solution on Established Biofilms. *Eye & Contact Lens*, 0. <https://doi.org/10.1097/ICL.0000000000000456>
- Rosen, H., & Klebanoff, S. J. (1982). Oxidation of *Escherichia coli* iron centers by the myeloperoxidase-mediated microbial system. *Journal of Biological Chemistry*, 257(22), 13731–13735. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)33509-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)33509-9)
- Rosso, J., & Bhatia, N. (2018). Status Report on Topical Hypochlorous Acid: Clinical Relevance of Specific Formulations, Potential Modes of Action, and Study Outcomes. *Journal Of Clinical And Aesthetic Dermatology*, 11, 36–39. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6303114/>
- Ruegg, P. L. (2017). A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 10381–10397. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13023>
- Ruegg, P. L., & Heinemann, D. J. (2002). *Milk Quality and Mastitis Tests*. <https://bovine-ojs-tamu.tdl.org/bovine/article/view/1661>
- Sam, C. H., & Lu, H. K. (2009). The role of hypochlorous acid as one of the reactive oxygen species in periodontal disease. In *Journal of Dental Sciences* (Vol. 4, Issue 2, pp. 45–54). Association for Dental Sciences of the Republic of China. [https://doi.org/10.1016/S1991-7902\(09\)60008-8](https://doi.org/10.1016/S1991-7902(09)60008-8)
- Sandy, C. (2011). Milk Quality Pays: *Streptococcus agalactiae* Mastitis. A review. *Vet. J.*, 1–5.
- Serratos Arevalo, J., Castañeda Vázquez, H., Castañeda Vázquez, M., Padilla Ramírez, F., Salas, E., Bedolla Cedeño, C., & Wolter, W. (2019). *Mastitis causada por Enterobacterias* (H. Castañeda, W. Wolter, & M. Castañeda, Eds.; 1st ed.).
- Severino, A. (2023). *Eficiencia germicida y coeficiente de dilución del Ácido Hipocloroso in vitro frente a cepas bacterianas potencialmente frecuentes en la Industria Alimentaria* [Universidad de chile].

- <https://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/195138/Eficiencia-germicida-y-coeficiente-de-dilucion-del-acido-hipocloroso-in-vitro.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Smith, K. L., & Hogan, J. S. (1993). Environmental mastitis. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 9(3), 489–498. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30616-2](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30616-2)
- Svennesen, L., Nielsen, S. S., Mahmmod, Y. S., Krömker, V., Pedersen, K., & Klaas, I. C. (2019). Association between teat skin colonization and intramammary infection with *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* in herds with automatic milking systems. *Journal of Dairy Science*, 102(1), 629–639. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15330>
- Toasa, A. B. (2022). “EFECTO DEL ÁCIDO HIPOCLOROSO COMO ALTERNATIVA TERAPÉUTICA EN EL CONTROL DE MASTITIS SUBCLÍNICA EN VACAS LACTANTES.”
- Tommasoni, C., Fiore, E., Lisuzzo, A., & Ganesella, M. (2023). Mastitis in Dairy Cattle: On-Farm Diagnostics and Future Perspectives. In *Animals* (Vol. 13, Issue 15). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ani13152538>
- Vasudevan, P., Kumar, M., Nair, M., Annamalai, T., & Venkitanarayanan, K. S. (2003). *Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of Staphylococcus aureus for biofilm formation*. <http://w3.aces.uiuc.edu/>
- Ward, J. F., & Diego, S. (1988). *DNA Damage Produced by Ionizing Radiation in Mammalian Cells: Identities, Mechanisms of Formation, and Reparability*.
- White, G. C. (1999). *Handbook of chlorination and alternative disinfectants*. (Van Nostrand Reinhold International, Ed.; 5th ed.). John Wiley & Sons, Inc. www.wiley.com.
- Winter, J., Ilbert, M., Graf, P. C. F., Özcelik, D., & Jakob, U. (2008). Bleach Activates a Redox-Regulated Chaperone by Oxidative Protein Unfolding. *Cell*, 135(4), 691–701. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.09.024>
- Zhao, X., & Lacasse, P. (2008). Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. In *Journal of animal science* (Vol. 86, Issue 13 Suppl, pp. 57–65). <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0302>
- Zimbro, M. J., Power, D., Miller, S., Wilson, G., & Johnson, J. (Eds.). (2009). *Difco & BBL Manual Manual of Microbiological Culture Media Second Edition* (Second). BD.

Anexos



Anexo A. Preparación de medios de cultivo



Anexo B. Preparación de las cajas Petri para la siembra



Anexo C. Recolección de las muestras de leche



Anexo D. Realización de la prueba CMT



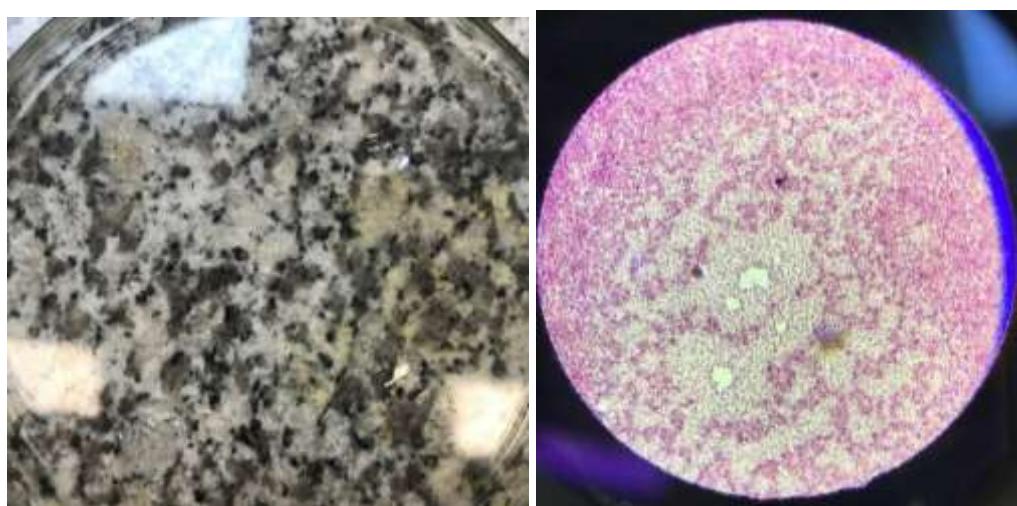
Anexo E. Transporte de las muestras hacia el laboratorio



Anexo F. Dilución de la leche



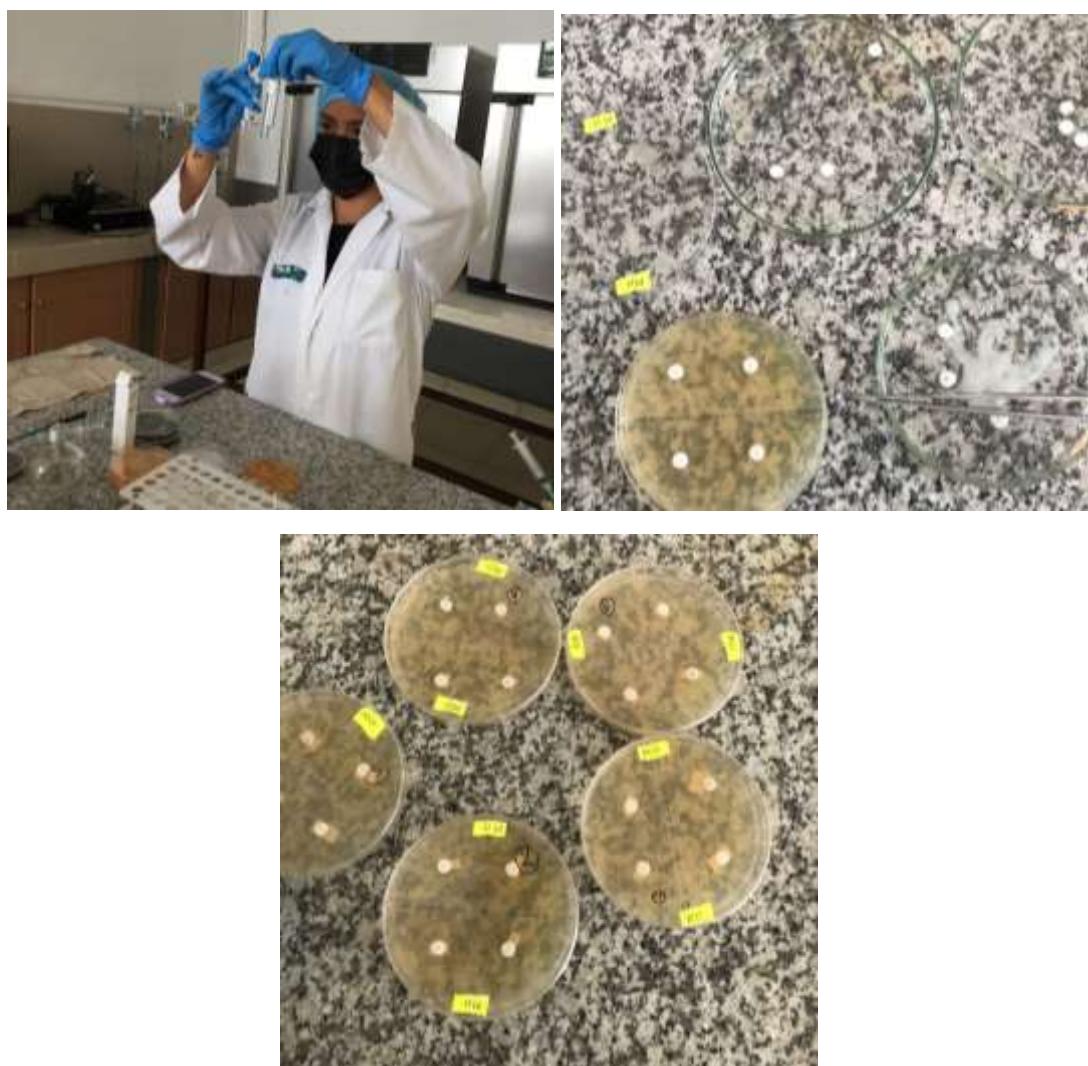
Anexo G. Siembra de la dilución en diferentes medios de cultivo



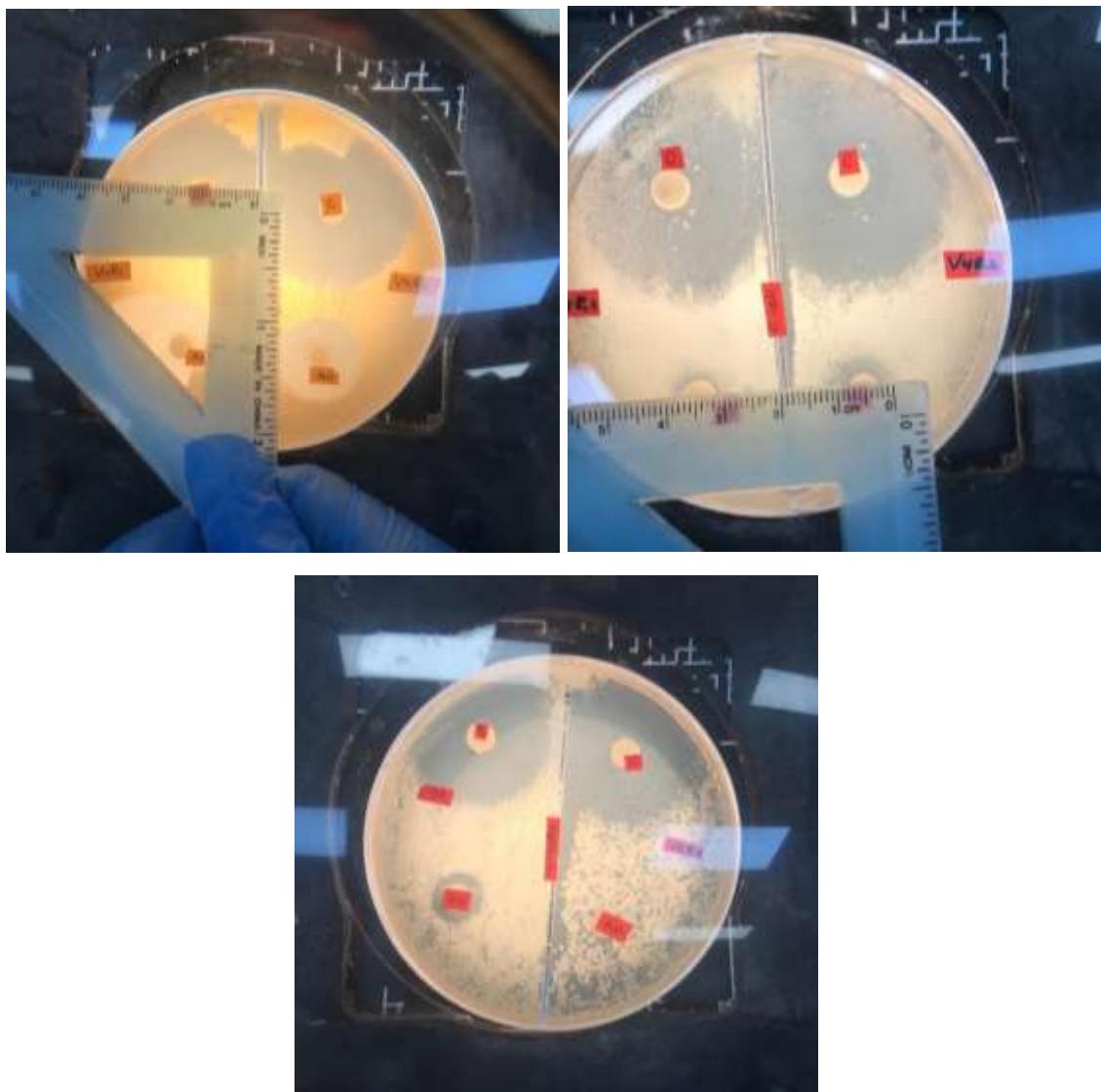
Anexo H. Pruebas bioquímicas para identificación de *Streptococcus spp.*



Anexo I. Pruebas bioquímicas para enterobacterias



Anexo J. Preparación de antibiogramas



Anexo K. Medición de los halos de inhibición