



Aislamiento e identificación de bacterias patógenas presentes en leche de vacas con mastitis de las Islas Santa Cruz e Isabela, de la provincia de Galápagos - Ecuador

Guazha Herrera, César Daniel

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

Lic. Koch Kaiser, Alma Rosel Mgs.

25 de agosto del 2020



Document Information

Analyzed document	TESIS César Guazha-urkund.docx (D78136174)
Submitted	8/25/2020 4:04:00 AM
Submitted by	
Submitter email	fjflores2@espe.edu.ec
Similarity	2%
Analysis address	fjflores2.espe@analysis.arkund.com

Sources included in the report

SA	Urkund 24 Ballesteros-Valdivieso.docx Document Urkund 24 Ballesteros-Valdivieso.docx (D36181888)	 3
SA	RODRIGUEZ FLORES JESSICA. TESIS.pdf.pdf Document RODRIGUEZ FLORES JESSICA. TESIS.pdf.pdf (D8438720)	 1
SA	Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE / Tesis Andrade Sanchez VF.docx Document Tesis Andrade Sanchez VF.docx (D36485283) Submitted by: jwron@espe.edu.ec Receiver: jwron.espe@analysis.arkund.com	 2
W	URL: https://stadium.unad.edu.co/preview/UNAD.php?url=/bitstream/10596/2741/3/32296762.pdf Fetched: 6/13/2020 9:42:34 PM	 1
SA	Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE / Tesis Alex Cristian V0 07 03 2018.docx Document Tesis Alex Cristian V0 07 03 2018.docx (D36207914) Submitted by: jwron@espe.edu.ec Receiver: jwron.espe@analysis.arkund.com	 2
SA	Tesis katherine chavez-1(2).docx Document Tesis katherine chavez-1(2).docx (D77872258)	 2

ALMA
ROSEL
KOCH
KAISER

Formado digitalmente por ALMA
ROSEL KOCH KAISER
en fecha 2020-11-04 10:58:05.00
Código de Verificación:
D77872258-1-4-10-10-58-05-00

Lic. Koch Kaiser, Alma Rosel Mgs.

C.C. 1708880792



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, **Guazha Herrera, César Daniel**, con cédula de ciudadanía n° 1900711126, declaro/declaramos que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Aislamiento e identificación de bacterias patógenas presentes en leche de vacas con mastitis de las Islas Santa Cruz e Isabela, de la provincia de Galápagos – Ecuador”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolqui, 25 de agosto del 2020

.....
Guazha Herrera, César Daniel

C.C.: 1900711126



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo **Guazha Herrera, César Daniel**, con cédula de ciudadanía n°1900711126, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“Aislamiento e identificación de bacterias patógenas presentes en leche de vacas con mastitis de las Islas Santa Cruz e Isabela, de la provincia de Galápagos – Ecuador”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 25 de agosto del 2020

.....
Guazha Herrera, César Daniel

C.C.: 1900711126

Dedicatoria

Quiero dedicar este trabajo a mis amados padres, Iliana y Marcos por su comprensión, brindarme su amor y por enseñarme que con trabajo duro y perseverancia se puede vencer cualquier adversidad.

A mis hermanos Stalin y Madeleyne por su cariño y apoyo incondicional.

Agradecimientos

A la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, por abrirme sus puertas, y permitirme formarme profesionalmente enriqueciéndome en conocimientos.

A la Agencia de Regulación y Control de la Bioseguridad y Cuarentena para Galápagos, por ayudarme con las instalaciones, materiales y reactivos, en especial a Rommel, Karina y Jaime por apoyarme durante mi trabajo en las Islas.

A Almita por su interés, apoyo, enseñanzas y haberme guiado en este proceso para desarrollarme profesionalmente.

Al Dr. Jorge Ron Román PhD., por apoyarme con su conocimiento y haberme brindado esta oportunidad de investigación.

A la Ing. Alicia Maya e Ing. Cristina Cholota por todo el apoyo, paciencia y conocimientos que me han brindado durante la investigación.

A la Universidad de Bélgica por el financiamiento que permitió la realización del proyecto.

A todos los docentes e investigadores que forman parte del Laboratorio de Biotecnología Animal y Microbiología por su apoyo durante mi trabajo de titulación.

A toda mi familia por su cariño y compañía.

A mis amigos que estuvieron conmigo compartiendo grandes momentos.

Índice de contenidos

Reporte de la herramienta Urkund	2
Certificación	3
Responsabilidad de autoría.....	4
Autorización de publicación.....	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimientos.....	7
Índice de contenidos	8
Índice de tablas	12
Índice de figuras	13
Resumen	14
Abstract.....	15
Capítulo I.....	16
Introducción	16
Justificación del problema.....	17
Objetivos de la Investigación	18
<i>Objetivo General.....</i>	<i>18</i>
<i>Objetivos Específicos</i>	<i>18</i>
Hipótesis.....	18
Capítulo II.....	19

Revisión bibliográfica	19
Mastitis	19
<i>Factores causantes de mastitis</i>	19
Etiología.....	21
<i>Mastitis contagiosa</i>	21
<i>Mastitis ambiental</i>	23
<i>Mastitis por bacterias oportunistas</i>	23
Clasificación	24
<i>Mastitis clínica</i>	24
<i>Mastitis subclínica</i>	25
Métodos de detección de mastitis	25
<i>Prueba de fondo oscuro</i>	25
<i>California Mastitis Test - CMT</i>	25
<i>Conteo de células somáticas</i>	26
<i>Cultivos microbianos</i>	26
<i>Técnicas moleculares</i>	27
Capítulo III	28
Materiales y métodos	28
Trabajo de campo	28
Aplicación de encuesta epidemiológica.....	29
Toma de coordenadas de las fincas.....	29

	10
Determinación de mastitis clínica y subclínica	29
<i>Prueba de fondo oscuro</i>	29
<i>California Mastitis Test - CMT</i>	30
<i>Conteo de células somáticas</i>	30
Recolección de muestras	31
Detección de antibióticos	32
Aislamiento de agentes etiológicos	33
<i>Siembra en medios de cultivo selectivos</i>	33
<i>Aislamiento de cultivos puros</i>	33
<i>Tinción Gram</i>	34
Pruebas bioquímicas	35
<i>Sal Manitol</i>	36
<i>Maltosa</i>	37
<i>DNAsa</i>	37
<i>Agar sangre</i>	38
<i>Catalasa</i>	39
<i>Coagulasa</i>	39
Capítulo IV	41
Resultados	41
Georreferenciación de las fincas	41
Encuesta epidemiológica	42

	11
Detección de mastitis clínica y subclínica	42
Detección de antibióticos	43
Aislamiento de microorganismos	43
Identificación de microorganismos	44
Capítulo V	46
Discusión	46
Detección de mastitis bovina	46
Detección de antibióticos en leche	48
Microorganismos identificados.....	49
Capítulo VI	53
Conclusiones y recomendaciones	53
Bibliografía	55
Anexos	62

Índice de tablas

Tabla 1 <i>Fincas seleccionadas para el estudio</i>	28
Tabla 2 <i>Interpretación de la reacción de la prueba CMT</i>	30
Tabla 3 <i>Interpretación del conteo de células somáticas</i>	31
Tabla 4 <i>Concentración de medios diferenciales y selectivos</i>	33
Tabla 5 <i>Claves bioquímicas para la diferenciación de estafilococos Gram positivos</i>	40
Tabla 6 <i>Porcentaje de cuartos afectados según el CCS</i>	42
Tabla 7 <i>Resultados de la prueba coagulasa y sal manitol de todos los estafilococos Gram positivos aislados</i>	43
Tabla 8 <i>Resultados CMT, CCS y número de cultivos obtenidos de los 36 cuartos muestreados</i>	44
Tabla 9 <i>Microorganismos identificados</i>	45

Índice de figuras

Figura 1 <i>Diferenciación de cultivos por tinción Gram, Bacilos Gram negativos (izquierda) y estafilococos Gram positivos (derecha) 100X.....</i>	34
Figura 2 <i>Siembra en estriado para la obtención de colonias.....</i>	35
Figura 3 <i>Crecimiento en medio sal manitol, estafilococos sal manitol negativo (1) y estafilococos sal manitol positivo (2) y (3).....</i>	36
Figura 4 <i>Bacterias beta hemolíticas</i>	38
Figura 5 <i>Reacción de catalasas positivas (formación de burbujas)</i>	39
Figura 6 <i>Prueba de coagulasa: estafilococo coagulasa negativo (1) y estafilococo coagulasa positivo (2)</i>	40

Resumen

La mastitis bovina es una de las principales enfermedades que afecta a la industria láctea, debido a los cambios que produce en la calidad y cantidad de leche provocando problemas económicos al ganadero. Se define como la inflamación de la glándula mamaria resultado de la infección por microorganismos o causado por una lesión química, térmica o física. El objetivo de este estudio fue aislar e identificar bacterias patógenas presentes en leche de vacas con mastitis de las islas Santa Cruz e Isabela, de la provincia de Galápagos - Ecuador. El estudio se realizó en nueve vacas que presentaron mastitis en al menos un cuarto de la ubre, estas fueron evaluadas mediante prueba de fondo oscuro, california mastitis test y conteo de células somáticas. Se obtuvo un total de 36 muestras de las cuales el 33.33% presentó mastitis. En las fincas muestreadas no se detectó casos de mastitis clínica, de los 12 cuartos con mastitis subclínica, se obtuvo *Staphylococcus aureus* en un 47.36%, seguido de 26.31% *Staphylococcus epidermidis*, 15.79% bacilos Gram positivos, 5.26% *Staphylococcus saprophyticus*, y 5.26% otros estafilococos coagulasa negativo. De 24 muestras de leche sin mastitis se aisló en mayor porcentaje bacilos Gram positivos (38.78%). Se identificó a *S. aureus* como principal agente causal de mastitis.

Palabras clave:

- **MASTITIS BOVINA**
- **AISLAMIENTO**
- **GALÁPAGOS**
- **STAPHYLOCOCCUS AUREUS**

Abstract

Bovine mastitis is one of the main diseases that affects the dairy industry, due to the changes it produces in the quality and quantity of milk causing economic problems for the farmer. It is defined as inflammation of the mammary gland resulting from infection by microorganisms or caused by chemical, thermal or physical injury. The objective of this study was to isolate and identify pathogenic bacteria present in the milk of cows with mastitis from the Santa Cruz and Isabela Islands, in the province of Galapagos - Ecuador. The study was carried out in nine cows that presented mastitis in at least one quarter of the udder, these were evaluated by means of a dark background test, California mastitis test and somatic cell count. A total of 36 samples were obtained, of which 33.33% presented mastitis. In the sampled farms, no cases of clinical mastitis were detected, of the 12 quarters with subclinical mastitis, *Staphylococcus aureus* was obtained in 47.36%, followed by 26.31% *Staphylococcus epidermidis*, 15.79% Gram positive bacilli, 5.26% *Staphylococcus saprophyticus*, and 5.26% other staphylococci coagulase negative. Gram positive bacilli were isolated in a higher percentage from 24 milk samples without mastitis (38.78%). *S. aureus* was identified as the main causal agent of mastitis.

Keywords:

- **MASTITIS BOVINE**
- **ISOLATION**
- **GALÁPAGOS**
- **STAPHYLOCOCCUS AUREUS**

Capítulo I

Introducción

La industria láctea en el Ecuador representa un rubro importante para los campesinos además de ser una actividad que crece constantemente. Las Islas Santa Cruz e Isabela de la provincia de Galápagos son dos de las islas pobladas y de producción de leche para autoabastecimiento; en el año 2000 se estimó una producción diaria de 4939 litros de leche en toda la provincia (SIPAE, 2007), cantidad que sigue en aumento por la constante demanda.

El desarrollo de este importante sector puede verse afectado por malas prácticas y enfermedades contagiosas o parasitarias, entre ellas la mastitis bovina (MB) es una de las principales, debido a su alta prevalencia y graves pérdidas económicas (FAO, 2004).

La MB es una enfermedad compleja de origen multifactorial, causada como una reacción de los tejidos de las ubres a una infección por microorganismos o provocada en respuesta a una lesión química, mecánica o térmica (Amer, 2015).

A pesar de la intensa investigación y la implementación de varias estrategias de control de mastitis a lo largo de las décadas, no ha desaparecido. Sin embargo, ha habido una disminución considerable en la incidencia de casos clínicos de mastitis en todo el mundo como resultado de medidas de control (FAO, 2013).

Mundialmente existe una amplia gama de microorganismos causantes de mastitis en ganado, siendo los principales patógenos responsables:

Staphylococcus aureus, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*,
Streptococcus dysgalactiae y *Escherichia coli* (Reyher et al., 2012).

En el Ecuador, se ha identificado en el cantón Cayambe provincia de Pichincha como principal agente causal a *Staphylococcus intermedius* y *S. aureus* (Bonifaz & Conlago, 2016), en la provincia de El Oro a estafilococos coagulasa negativos (CNS) (Amer et al., 2018) y en la Cooperativa de Producción Agropecuaria “El Salinerito”, Provincia de Bolívar a *S. aureus* seguido de *Bacillus* sp. (C. Andrade & Sánchez, 2018). En las Islas Galápagos poco o nada se sabe sobre el surgimiento y diversidad microbiano causante de mastitis.

Justificación del problema

La mastitis es una enfermedad prioritaria en la industria ganadera debido al impacto negativo en la calidad y cantidad de leche produciendo pérdidas al ganadero, además se considera la más costosa en la producción láctea a nivel mundial (Ruiz, Peña, & Remón, 2016). Las pérdidas pueden ser directas como gastos en diagnóstico, servicios veterinarios, medicamentos, descarte de leche y mano de obra, además de costos indirectos futuros como reducción en la producción de leche, descarte del animal o pérdida del cuarto mamario (Heikkilä, Liski, Pyörälä, & Taponen, 2018).

Puede ser causada por números patógenos siendo los principales estafilococos, estreptococos y enterobacterias (Gomes & Henriques, 2016). Según Heikkilä et al. (2018), una de las causas por las cuales la mastitis persiste en poblaciones es debido a que se trata empíricamente sin conocer los microorganismos causantes de la misma, por ello tener información acerca de los patógenos causantes es una herramienta que permitirá implementar medidas eficientes, económicas y seguras para controlar y prevenir la enfermedad y en consecuencia mejorar de la industria láctea.

Dado que el lugar donde se desenvuelve la actividad ganadera se trata de las Islas Galápagos, provincia que se maneja bajo un régimen especial y cautelosa

importancia ecológica (LOREG, 2015), el control de esta enfermedad puede evitar posibles problemas que involucren a la fauna del sector y a la población humana.

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Aislar e identificar bacterias patógenas presentes en leche de vacas con mastitis de las islas Santa Cruz e Isabela, de la provincia de Galápagos - Ecuador.

Objetivos Específicos

- Determinar el grado de mastitis clínica y sub clínica de vacas enfermas a través de las pruebas Fondo Oscuro, California Mastitis Test (CMT) y conteo de células somáticas.
- Identificar los antibióticos (tetraciclinas, beta lactámicos y sulfonamidas) usados para tratar vacas con mastitis, a través de la prueba Strip Milk.
- Aislar e identificar las bacterias presentes en leche de vacas con mastitis a través de claves y pruebas bioquímicas.

Hipótesis

En vacas con mastitis de las Islas Santa Cruz e Isabela de la provincia de Galápagos no se identifica a *Staphylococcus aureus* como agente causal ni existe la presencia de antibióticos en leche.

Capítulo II

Revisión bibliográfica

Mastitis

La MB se define como la inflamación de la glándula mamaria provocada por agentes infecciosos o traumatismos físicos, químicos o térmicos. Se caracteriza por alterar la composición de la leche, producir reducción en la producción y causar anomalías en los tejidos glandulares dependiendo del daño (FAO, 2014).

Entre los cambios producidos en la composición de la leche, están:

- Disminución de la cantidad de lactosa debido al daño tisular y reducción de actividad enzimática en las células secretoras

- Aumento de la permeabilidad capilar, pérdida de uniones estrechas y producción local de leucocitos, todo ello provoca migración de sangre a la leche, por ende, presencia de inmunoglobulinas, transferrina sérica y otras proteínas de suero.

- Conductividad eléctrica aumentada por altas concentraciones de sodio y cloro y disminución de potasio.

- La caseína, principal proteína de la leche, por su alto nivel nutricional disminuye, y proteínas de baja calidad aumentan (Adkins & Middleton, 2018; Seegers, Fourichon, & Beaudeau, 2003).

Factores causantes de mastitis

La mastitis se produce generalmente por una invasión bacteriana al tejido de la ubre. Traumatismos físicos e irritantes químicos también pueden contribuir al grado de infección dado que hace más susceptible al pezón al ataque bacteriano por daño a la queratina o mucosas (Jones, 2009).

Hay factores que predisponen a la glándula a una infección, entre ellos está la edad de la vaca, genética, tipo de ordeño, nutrición y factores externos, como el clima (Amer, 2015).

Edad. El número de paridad es uno de los predictores de presencia de mastitis, se ha visto que a mayor edad cambia la posición de la ubre, formándose ubres pendulantes que exponen al pezón y al tejido de la glándula a lesiones (Abebe et al., 2016).

Genética. Razas como Hollstein y razas exóticas se han reportado con altos índices de mastitis. La influencia de la raza puede verse influenciada por rasgos fisiológicos y anatómicos de las glándulas mamarias, por ejemplo vacas con pezones planos y extremos redondos tiene mayor probabilidad de contraer mastitis que vacas con pezones puntiagudos, esto se da por canales estriados más anchos que permiten mayor riesgo de ingreso de patógenos (Biffa, Debela, & Beyene, 2005; Abebe et al., 2016).

Ordeño. El ordeño manual con lavado de manos puede contribuir a la disminución de la transmisión de microorganismos ambientales a más de buenas prácticas de higiene como lavado de pezones, sellado después del ordeño y uso de guantes (Ramírez Vásquez et al., 2011).

Nutrición. La nutrición puede aumentar la probabilidad de contraer mastitis o de afectar la gravedad y duración de la infección, se ha visto que dietas deficientes de Ca^{2+} iónico puede afectar la capacidad contráctil de músculos lisos como el cierre del esfínter del pezón aumentando el tiempo post-ordeño y la posibilidad de que se infecte por microorganismos presentes en el canal del pezón. También se ha reportado que la deficiencia de algunos microelementos como minerales y vitaminas aumentan la

gravedad y duración en casos clínicos, de igual forma escasez de antioxidantes puede limitar la capacidad fagocítica de leucocitos polimorfonucleares (Corbellini, 2002).

Clima. Se ha encontrado que en clima lluvioso aumenta la proliferación y transmisión de microorganismos patógenos que aumentan la prevalencia de mastitis (Biffa et al., 2005).

Etiología

Actualmente se han reportado más de 100 microorganismos causantes de infecciones intramamarias, la mayoría causadas por estafilococos, estreptococos y coliformes Gram negativos (Bedolla & Ponce, 2008).

Los agentes etiológicos pueden diferir según el lugar dependiendo del clima, especies de animales y la cría de animales (Amer, 2015).

Mastitis contagiosa

La mastitis es causada por patógenos contagiosos que son transmitidos de vaca a vaca cuando el reservorio se encuentra en el cuarto de la ubre infectada, por la máquina de ordeño o las manos del ordeñador al estar en contacto con los microorganismos (Bedolla & Ponce, 2008). La mastitis se caracteriza por ser una infección persistente y el dominio de una cepa en la población (Amer, 2015).

Los principales microorganismos responsables de la mastitis contagiosa son *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus bovis* y *Mycoplasma* spp.

Staphylococcus aureus. Son cocos Gram positivos con diámetro de 0.5 a 1,5 μm . Es el principal causante de mastitis y el de mayor prevalencia tanto en mastitis clínica como subclínica, la bacteria puede adherirse a las células epiteliales de la glándula mamaria para posteriormente invadir por endocitosis las células de la glándula mamaria, por ello en la mastitis subclínica las bacterias intracelulares son protegidas de

las defensas del huésped y de efectos de antibióticos (Morales, 2011). Cuando entra al orificio del pezón puede persistir y multiplicarse hasta entrar al canal donde, en contacto con la leche, puede diseminarse por la glándula. El principal mecanismo para combatir la infección es la fagocitosis por neutrófilos, sin embargo, *S. aureus* presenta factores de virulencia como antifagocíticos, producción de exotoxinas y proteasas, que lo vuelven incontrolable frente al sistema inmune (Ruiz, 2015).

Streptococcus agalactiae. Son cocos Gram positivos causantes de mastitis crónica y en algunos casos mastitis clínica. No tiene la capacidad de invadir tejidos internos de la glándula mamaria, pero coloniza la superficie de los epitelios de manera que su forma de transmisión se da durante el ordeño y debido a una mala higiene. Cuando se adhiere a la pared epitelial, fermenta la lactosa produciendo ácido láctico que irrita los tejidos, desencadenando reacciones inflamatorias llegando a producir taponamientos con obstrucción en los canales del pezón, esto puede provocar la retención de leche e involución del alvéolo con posible fibrosis (Ruiz, 2015).

Mycoplasma spp. La mastitis causada por mycoplasma es menos común que la provocada por estreptococos o estafilococos. Difiere de otros patógenos contagiosos por varias razones: es altamente contagiosa, afecta a más de un cuarto causando pérdidas mayores de producción, se la considera intratable y es refractaria al tratamiento con antibióticos, por ende, el control recomendado es el descarte pero la enfermedad en algunos casos desaparece a los pocos meses del brote (Nicholas, Fox, & Lysnyansky, 2016).

Se han registrado cerca de 25 tipos de mycoplasmas pero la más frecuente es *Mycoplasma bovis*, tiene la capacidad de diseminarse a otros tejidos del huésped y de adherirse a células formando biopelículas que le permiten evadir el tratamiento antimicrobiano (Josi et al., 2018).

Mastitis ambiental

Los microorganismos causantes de la mastitis son también transmitidos por el ambiente como fuente primaria (Bedolla & Ponce, 2008). Existen varios géneros causantes de ella, coliformes y *Streptococcus* clasificados como ambientales (*Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* y *Enterococcus* spp.) (Rocio Ruiz, 2015).

El principal coliforme encontrado en mastitis es *Escherichia coli* seguido por *Klebsiella* spp. y *Enterobacter* spp. y en menor proporción *Serratia* spp., *Pseudomonas* spp. y *Proteus* spp., se encuentran en el tracto gastrointestinal, suelo, estiércol, mangueras, agua y alimentos (Rocio Ruiz, 2015). Generalmente producen mastitis subclínica que puede llegar a ser persistente si penetra en el conducto galactóforo hacia la ubre (Bedolla & Ponce, 2008), pueden causar mastitis clínica solo si se encuentran en cantidades elevadas y en condiciones de clima húmedo y caluroso. La higiene es el principal control de esta infección (Rocio Ruiz, 2015).

Mastitis por bacterias oportunistas

Las principales bacterias oportunistas son *Staphylococcus* coagulasa negativos, entre ellos *S. chromogenes*, *S. xylosus*, *S. sciuri*, *S. saprophyticus*, bacterias que se han aislados de pelo, ollares y pezones de animales; otros como *S. epidermidis*, *S. chromogenes* y *S. simulans*, son aislados de leche. Solo causan mastitis subclínica y son considerados patógenos menores en comparación con *S. aureus* y *S. agalactiae*. En muchos casos la epidemiología ocasionada con estos microorganismos es incierta (Ruiz, 2015).

Otros microorganismos presentes en MB pueden ser levaduras, prototecas y nocardias. Los principales son *Cryptococcus neoformans* y *Cándida albicans*, la mastitis

provocada por estos microorganismos se da en un 80% por terapias inmoderadas de antibióticos o por heridas en pezones (Bedolla & Ponce, 2008).

Clasificación

La MB da como resultado la infección intra-mamaria que puede generar la enfermedad de manera clínica o subclínica, es decir, puede ser acompañada de signos clínicos o no (Dos Santos et al., 2002).

Mastitis clínica

La mastitis clínica se caracteriza por un inicio repentino, alteraciones en la composición y apariencia de la leche, disminución de la producción de leche y la presencia de signos de inflamación en los cuartos mamarios infectados, además, es fácilmente detectable (Khan & Khan, 2006).

Este tipo de mastitis puede variar de acuerdo a su severidad y tipo de microorganismo causante de la infección (Bedolla & Ponce, 2008), pueden sub clasificarse en:

Mastitis sub-aguda. No muestra cambios observables en el animal, el cuarto puede estar inflamado, la producción disminuye y la leche presenta una apariencia normal o puede presentar natillas observables en la prueba de fondo oscuro (Bedolla & Ponce, 2008).

Mastitis aguda. Se caracteriza por la aparición súbita de la enfermedad con o sin síntomas sistémicos, apariencia anormal de la leche (purulenta), y la ubre presenta enrojecimiento, tumefacción y dolor (Morin, 2004).

Mastitis hiperaguda. El bovino presenta problemas con la coordinación muscular, fibrosis mamaria en la ubre y la calidad de la leche es sumamente baja pues se muestra frecuentemente aguada y con manchas de sangre (Bedolla & Ponce, 2008).

Mastitis subclínica

En el caso de mastitis subclínica no se observan signos visibles ni en la ubre ni en la leche, pero la producción de leche disminuye y el recuento de células somáticas aumenta, además es más común y tiene un grave impacto en los animales lactantes mayores que en las novillas de primera lactación. Debido a la falta de manifestaciones clínicas, el diagnóstico de mastitis subclínica es un desafío en el manejo de animales lecheros y en la práctica veterinaria (FAO, 2014; Khan & Khan, 2006).

Es la principal forma de mastitis debido a una prevalencia que es de 15 a 40 veces mayor que la mastitis clínica, mayor duración y no son detectadas inmediatamente o no pueden ser reconocidas por el ordeñador (Bedolla & Ponce, 2008).

Métodos de detección de mastitis

Entre los principales métodos de detección de mastitis están:

Prueba de fondo oscuro

La prueba de fondo oscuro es un examen visual que determina ciertas irregularidades provocadas por una infección seria, para esta prueba se utilizan taza o paletas color negro que permite visualizar copos, grumos, restos de fibrina, moco o cualquier otro material extraño en la leche (Figueroa, 1984).

California Mastitis Test - CMT

La prueba California mastitis test (CMT) es la que se utiliza con mayor frecuencia en análisis de campo para el diagnóstico de mastitis tanto clínica como

subclínica. Según Echeverria, Guillermo, & Restrepo (2010), la prueba consiste en agregar un detergente a la leche, el alquil-aril-sulfonato de sodio la cual causa la liberación del ADN de los leucocitos presentes en la leche, y éste se convierte, en combinación con agentes proteicos de la leche, en un complejo gelatinoso.

Conteo de células somáticas

El conteo de células somáticas (CCS) es un indicador del estado de salud de la glándula mamaria, permite conocer el número de células por mililitro de leche, es decir, la concentración de leucocitos en leche.

Cuando la cantidad de células somáticas aumenta, la producción de leche disminuye. Se ha observado que por cada aumento de 100,000 en el recuento hay una disminución del 2,5% en producción. Se ha propuesto el valor de referencia de 200.000 en el recuento, valores mayores indican daños en el tejido que pueden conducir a mastitis (Reyes & Bedolla, 2008).

Cultivos microbianos

Los cultivos microbianos permiten la identificación de patógenos de diversas enfermedades veterinarias (Ashraf & Imran, 2018), para ello se toma muestras de leche de cuartos mamarias que presentan la infección y se procede a su siembra en medios como agar sangre, Mc Conkey, EMB y otros medios diferenciales y selectivos (Calvinho, 2002).

Una ventaja de esta técnica es que permite obtener información de la presencia o ausencia de un grupo bacteriano específico y la identificación de organismos patógenos prevalentes en el hato lechero para con ello implementar programas de control de la enfermedad (Calvinho, 2002).

Técnicas moleculares

En los últimos años se ha utilizado técnicas moleculares para el diagnóstico veterinario dado que presentan mayor sensibilidad y especificidad. Técnicas basadas en detección de ácido nucleico como PCR junto con extensiones como PCR multiplex, PCR en tiempo real y LAMP son aplicadas como técnicas gold estándar por su rapidez y confiabilidad. En la industria lechera son de utilidad principalmente para la detección de ciertos patógenos de lento crecimiento y difícil tipificación por medios bioquímicos (Ashraf & Imran, 2018). Otras técnicas como electroforesis en gel bidimensional y la espectroscopía de masas, permiten identificar patrones de expresión de proteínas de patógenos invasores en leche con mastitis (Hamid, 2016).

Capítulo III

Materiales y métodos

Trabajo de campo

Un estudio de tipo transversal fue desarrollado entre octubre y noviembre de 2019 que incluyó cinco fincas de la isla Santa Cruz y tres fincas de la isla Isabela (Tabla 1), las cuales son fincas de alta producción y con presencia de mastitis.

Las fincas fueron seleccionadas según la prevalencia de mastitis, nivel de positividad y localización geográfica. Se tomó en cuenta que las fincas muestreadas se encuentren alejadas entre sí de manera que el estudio abarque toda la zona ganadera de las islas.

Los datos para la selección fueron tomados de un estudio previo en el cual se determinó la prevalencia de mastitis por medio del conteo de células somáticas en el marco del proyecto de Vinculación con la Sociedad: “Desarrollo de un programa de control para mastitis bovina con base en la contextualización del problema en la provincia de Galápagos – Ecuador”.

Tabla 1

Fincas seleccionadas para el estudio

Número de finca	Ubicación	Número de vacas muestreada
1	Santa Cruz	1
2	Santa Cruz	1
3	Santa Cruz	1
4	Santa Cruz	1
5	Santa Cruz	2
6	Isabela	1
7	Isabela	1
8	Isabela	1

Aplicación de encuesta epidemiológica

En cada finca muestreada se aplicó una encuesta epidemiológica al ganadero (Anexo A).

La encuesta recopiló información acerca de:

- Identificación y localización de la explotación
- Datos generales de la finca
- Aspectos sanitarios
- Ordeño
- Datos de trabajadores de la UPA

Los datos obtenidos se utilizaron para relacionar factores que pueden contribuir al surgimiento y diseminación de la enfermedad.

Toma de coordenadas de las fincas

Para la toma de coordenadas se utilizó la herramienta EpiCollet, esta aplicación permite recopilar en un sitio web información como fotos, videos, encuestas y ubicación GPS.

Para ello se creó el proyecto GalápagosESPE en el cual se registró cada vaca muestreada junto con fotos, observaciones y la ubicación de la finca.

Determinación de mastitis clínica y subclínica

Para la determinación del grado de mastitis se realizó en campo la prueba de fondo oscuro y California Mastitis Test (CMT) así como para la confirmación se realizó en laboratorio el conteo de células somáticas.

Prueba de fondo oscuro

Para la primera prueba a realizar se lavó la ubre y se secó con papel toalla, se tomó los primeros chorros de leche en la paleta de fondo oscuro y se examinó la

presencia de irregularidades como la formación de grumos, copos, fibrina, moco, sangre u materiales extraños. Su presencia indica efectos crónicos resultado de una mastitis clínica (Ruiz, 2017).

California Mastitis Test - CMT

Posteriormente a la prueba de fondo oscuro, se realizó la prueba CMT la cual hace uso de un detergente alquil-aril-sulfonato de sodio. Se ordeñó cada pezón en una paleta con cuatro compartimentos, a continuación, se inclinó para desechar la cantidad de leche en exceso de los cuartos y se colocó un volumen igual del detergente durante 15 o 20 segundos (Bedolla & Castañeda, 2007).

Para la interpretación se analizó el grado de espesamiento de la solución (Tabla 2).

Tabla 2

Interpretación de la reacción de la prueba CMT

Grado CMT	Reacción
Negativo	La solución no se ve alterada, por lo tanto, no hay infección.
Trazas	Ligero espesamiento que desaparece a los 20 segundos de colocar el reactivo, es necesario comparar con otro cuarto.
1	Presencia de precipitado, pero no se forma gel.
2	Formación de flóculo con viscosidad semejante a la clara de huevo.
3	Formación de un flóculo denso, se adhiere a la paleta.

Fuente: Tomado de RCRMB (2019)

Conteo de células somáticas

Para el conteo de células somáticas se utilizó el equipo Ekomilk Scan, se colocó 10 ml de leche junto con 5 ml de surfactante Ekoprim en el homogenizador. El equipo se basa en el principio de viscosidad, el surfactante disuelve la membrana celular y al

entrar en contacto con el material genético se vuelve gelatinosa aumentando la viscosidad de la solución. Este aumento es proporcional a la concentración de células somáticas, por lo tanto, el equipo mide el tiempo de flujo de la solución (Gonçalves et al., 2018).

Tabla 3

Interpretación del conteo de células somáticas

Interpretación	Rango de células somáticas/cm³
Cuarto sano	0-200.000
Trazas	200.000-500.000
Mastitis grado 1	500.000-1,200.000
Mastitis grado 2	1,200.000-5,000.000
Mastitis grado 3	Más de 5,000.000

Fuente: Tomado de RCRMB (2019)

Recolección de muestras

Previamente al muestreo, se aseguró la limpieza de la piel de la ubre y especialmente los pezones para evitar contaminación por agentes no relacionados a patógenos de la leche. Primero se realizó un lavado con abundante agua y jabón secando con papel toalla. Una vez seco y con equipo de protección personal como guantes de látex y mascarilla, se desinfectó con alcohol al 70%, se frotó vigorosamente con un papel toalla la piel de la ubre y con una torunda distinta, se frotó cada punta del pezón (Agrocalidad, 2015).

Posteriormente a la desinfección y con nuevo equipo de protección personal, se abrió un frasco estéril cuidadosamente evitando tocar la parte interna de la tapa o la boca del mismo, se receptó un volumen de al menos 5 ml de leche empezando del cuarto más cercano y finalizando con el más alejado. Para evitar contaminación en el procedimiento, se abrió el frasco junto al pezón y se dirigió el chorro de leche, todo el

procedimiento se realizó de la forma más acelerada posible (Calvinho, 2002; Agrocalidad, 2015).

Se tomó una muestra para el análisis bacteriológico y otra para la detección de antibióticos. Se etiquetó cada frasco con el nombre o arete del animal, fecha, finca y cuarto del cual se tomó la leche. Para el transporte al laboratorio, los frascos se colocaron en un recipiente de espumaflex con gel en frío a una temperatura de 4°C.

Trabajo de laboratorio

Esta fase de estudio se realizó en los laboratorios de la Agencia de Regulación y Control de la Bioseguridad y Cuarentena para Galápagos (ABG) ubicada en la Isla Santa Cruz, provincia de Galápagos.

Detección de antibióticos

Se utilizó el Test Strip Milk para la detección de tetraciclinas, beta lactámicos y sulfonamidas. El Kit se basa en inmunocromatografía de inhibición competitiva. En el proceso, los antibióticos presentes en leche al estar en contacto con anticuerpos monoclonales específicos inhiben la unión de los anticuerpos con el conjugado antibiótico-BSA presente en la banda de la tira de revelación. La presencia de líneas coloreados da como resultado negativo a la presencia de antibióticos, por el contrario la ausencia es positivo (GreenSpring, 2014).

Se colocó 200 µl de la muestra de leche en viales de incubación y se mezcló con el reactivo presente en los microposillos. Se incubó a 40°C durante 5 min. Posteriormente se colocó las tiras del test durante otros 5 min y se procedió a visualizar los resultados según la presencia o ausencia de bandas coloreadas.

Aislamiento de agentes etiológicos

Siembra en medios de cultivo selectivos

Para la siembra, se prepararon de uno a tres días antes de la toma de muestras, cajas Petri con agar sal manitol, agar Mac-Conkey, agar EMB y agar sangre a la concentración indicada cada uno (Tabla 4).

Tabla 4

Concentración de medios diferenciales y selectivos

Medio	Especificación
Agar MacConkey	50 g/L
Agar sangre	40 g/L
Agar Sal Manitol	111 g/L
Agar EMB	36 g/L

En un mesón previamente desinfectado y cerca de mecheros, se colocó con una micropipeta 50 µl de muestra de leche en cada medio de cultivo (agar MacConkey, sangre, sal manitol y EMB), se distribuyó con un triángulo de siembra esterilizado con alcohol al 70%; se incubó las cajas Petri a 37°C y se observó resultados a las 24 y 48 h (Acuña & Rivadeneira, 2008).

Para la caracterización macroscópica se observaron los cambios producidos por cada colonia en los diferentes medios de cultivos, como presencia de halos, cambios de color del medio, coloración y forma de las colonias.

Aislamiento de cultivos puros

Para el aislamiento se prepararon tubos inclinados de agar nutriente. Una vez desinfectado el lugar de trabajo y seleccionado los medios que presentaran crecimiento, en frente de un mechero, se tomó una muestra de cada colonia aislada tras la siembra

en caja Petri en los medios selectivos y se sembraron en zigzag de manera homogénea en tubos inclinados. Se incubaron a 37°C durante 24 h (García et al., 2008).

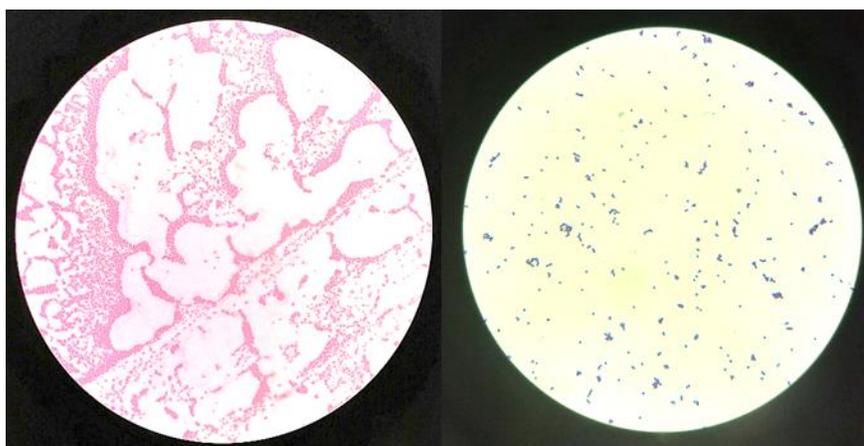
Tinción Gram

Para verificar la pureza del cultivo, se realizó un frotis que consistió en colocar una gota de agua destilada sobre un portaobjetos y con un asa bacteriana previamente esterilizada, se extendió la muestra del tubo de ensayo sobre la superficie del portaobjetos. Posteriormente, se fijó al calor pasándola por la llama del mechero tres veces (Rodríguez et al., 2011).

Para la tinción, se colocó durante un minuto gotas de colorante cristal violeta y se enjuagó, posteriormente se colocó lugol seguido de otro enjuague, se puso aproximadamente 20 gotas de decolorante y, para finalizar, unas gotas de safranina seguido de un último enjuague. Con el uso de microscopio se diferenció los cultivos según su Gram: positivo si presenta color azul-violeta o negativo rojo-rosado (Figura 1); forma: cocos o bacilos y agrupación: solos, racimo o en filas (Rodríguez et al., 2011).

Figura 1

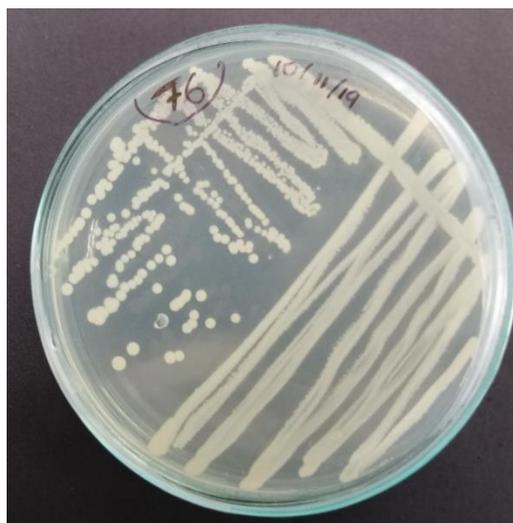
Diferenciación de cultivos por tinción Gram, Bacilos Gram negativos (izquierda) y estafilococos Gram positivos (derecha) 100X



En caso de obtener un cultivo impuro, se tomó muestra del tubo inclinado y se sembró en caja Petri por estriado mixto (Figura 2); se verificó la pureza nuevamente por tinción Gram. Este proceso se repitió hasta obtener cultivos puros.

Figura 2

Siembra en estriado para la obtención de colonias



Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas y antibiogramas se realizaron en el laboratorio de Microbiología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, sede Sangolquí.

A partir de los resultados obtenidos por tinción Gram, se efectuaron pruebas bioquímicas para identificar de forma precisa la ausencia de una enzima, grupo de enzimas o de una vía metabólica completa en uno o más microorganismos (Bou et al., 2011).

Para la identificación de estafilococos Gram positivos se realizaron las pruebas de catalasa, coagulasa y siembra en agar Sal Manitol, Maltosa, Coagulasa, DNAsa y agar sangre.

Sal Manitol

El medio sal manitol contiene peptona y extracto de carne bovina que provee de nutrientes esenciales, cloruro de sodio al 7,5% que produce la inhibición parcial o total de bacterias diferentes de estafilococos. Tiene rojo de metilo que sirve como indicador al cambio de pH producto de la fermentación de maltosa. Facilita la diferenciación de especies de estafilococos. Estafilococos coagulasa positivos, como *Staphylococcus aureus*, producen cambio en el medio circundante de color amarillo, estafilococos coagulasa negativos, como *Staphylococcus epidermidis*, producen colonias de color rojo y no hay cambio de coloración del medio (Figura 3) (Laboratorios BD, 2013).

Para la siembra, se dividió la caja en partes, en cada una se realizó la siembra de una muestra por estriado simple. Se incubó a 37°C por 24 horas y se observó el cambio de coloración en el medio.

Figura 3

Crecimiento en medio sal manitol, estafilococos sal manitol negativo (1) y estafilococos sal manitol positivo (2) y (3)



Maltosa

El agar maltosa se utiliza para la identificación de microorganismos utilizadores de maltosa como hidrato de carbono. El medio contiene púrpura de bromocresol que permite la identificación del cambio de pH por la fermentación de maltosa, produciendo una coloración amarillenta en el medio circundante (MacFaddin, 2000).

Para la elaboración del medio, se colocó en un litro de agua 40 g de maltosa, 15 g de agar, 10 g de extracto de levadura, 10 g de peptona y 0,1 g de púrpura de bromocresol. Se autoclavó y dispensó en cajas Petri. Se sembraron dos muestras por caja, por estriado simple, se incubaron a 37°C por 24 h y se observó el cambio en la coloración del medio.

DNAsa

Se utiliza para la detección de microorganismos con actividad desoxirribonucleasa. Permite diferenciar entre especies de estafilococos, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Serratia spp* (Britania, 2011). La DNAsa es un enzima que hidroliza el ácido desoxirribonucleico del medio liberando oligonucleótidos y fosfato, el ácido desoxirribonucleico hidrolizado presenta transparencia mientras que el ácido desoxirribonucleico polimerizado, precipita y se torna opaco (Bou et al., 2011).

Para la preparación del medio, se colocó 42 g del medio y 0,05 g de azul de toluidina en un litro de agua, se esterilizó y se dispensó en cajas Petri. Se sembraron dos muestras por caja, mediante una sola estría gruesa, se incubó a 37°C por 24 h. Para la observación de resultados, se cubrió la caja con ácido clorhídrico hasta cubrir todo el medio y se observó la formación de un halo transparente alrededor del crecimiento.

Agar sangre

Es un medio de cultivo complejo que permite el crecimiento de una gran cantidad de microorganismos. La infusión cerebro corazón y la peptona aportan nutrientes para el crecimiento, el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y la adición de sangre ovina estéril promueve el crecimiento de microorganismos exigentes. Debido al contenido de sangre, se pueden observar reacciones de hemólisis. La hemólisis alfa se da por la lisis parcial de glóbulos rojos observándose un halo verdoso alrededor del crecimiento producto de la oxidación de la hemoglobina a metahemoglobina por el peróxido de hidrógeno generado por los microorganismos. Hemólisis beta se da por la lisis total de glóbulos rojos, forma un halo claro alrededor de las colonias (Figura 4). Hemólisis gamma se da por la ausencia de hemólisis, el medio no presenta cambios de coloración (Britania, 2015).

Para la elaboración del medio se colocó 40 g de base sangre en un litro de agua, se esterilizó y se agregó del 5 al 8% de sangre al medio a 40°C. Se dispensó y se sembraron dos muestras por caja, por estriado simple. Se incubó a 37°C por 24 h y se observó el tipo de hemólisis.

Figura 4

Bacterias beta hemolíticas



Catalasa

Se utiliza para la detección de la enzima catalasa presente en la mayoría de bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo. Las bacterias que sintetizan catalasa hidrolizan el peróxido de hidrógeno produciendo agua y oxígeno molecular, como resultado se da la formación de burbujas (MacFaddin, 2000).

Para la prueba se utilizó cultivos en agar nutriente de 24 horas, en un portaobjetos se colocó dos o tres gotas de peróxido de hidrógeno al 3%, se depositó una colonia y se observó la formación de burbujas en los próximos 20 segundos (Figura 5).

Figura 5

Reacción de catalasas positivas (formación de burbujas)



Coagulasa

Permite la diferenciación de especies de estafilococos por su capacidad de coagular plasma por acción de la enzima coagulasa. La enzima convierte fibrinógeno del plasma en fibrina, puede ser de dos formas: a partir de coagulasa unida a la pared bacteriana o coagulasa secretada al medio extracelular (Bou et al., 2011).

Para la obtención de plasma, se sacrificó un conejo con descargas eléctricas. Se extrajo sangre por punción cardiaca y se colocó en tubos con EDTA. Se centrifugaron los tubos a 4500 rpm por 20 min y se recogió el plasma obtenido con una micropipeta en microtubos eppendorf de 1,5 ml estériles.

Se tomó muestras del cultivo bacteriano y se sembró en los tubos con plasma de conejo. Se incubó a 37°C y se observó cada 30min por 4 h y a las 24 h la formación de coágulos (Figura 6).

Figura 6

Prueba de coagulasa: estafilococo coagulasa negativo (1) y estafilococo coagulasa positivo (2)



En la tabla 5 se observa las características fenotípicas esperadas para la diferenciación de estafilococos Gram positivos.

Tabla 5

Claves bioquímicas para la diferenciación de estafilococos Gram positivos

Especie	Sal Manitol	Maltosa	DNAsa	Sangre	Catalasa	Coagulasa
<i>S. aureus</i>	+	+	+	β	+	+
<i>S. epidermidis</i>	-	+	-	γ	+	-
<i>S. saprophyticus</i>	+	+	-	γ	+	-

Fuente: Tomado de Zendejas, Avalos, & Soto (2014)

Capítulo IV

Resultados

Georreferenciación de las fincas

Se muestrearon un total de 8 fincas, 5 procedentes de la Isla Santa Cruz (Figura 7) y 3 de la Isla Isabela (Figura 8) las cuales fueron georreferenciadas con la herramienta EpiCollet.

Figura 7

Georreferenciación de las fincas muestreadas en la Isla Santa Cruz



Figura 8

Georreferenciación de las fincas muestreadas en la Isla Isabela



Encuesta epidemiológica

Con las encuestas realizadas se pudo obtener información sobre datos generales de la finca, aspectos sanitarios, ordeño y datos de trabajadores. Los datos obtenidos se detallan en el Anexo B. De las ocho fincas muestreadas el 12.5% realiza el manejo de estiércol, 62.5% ordeña en un sitio libre de otras especies de animales, 100% implementa una secuencia de ordeño correcta, 100% realiza el despunte, 100% realiza el lavado de pezones, 100% reciben capacitación de buenas prácticas de ordeño (BPO), y el 78% sella los pezones al final del ordeño.

Detección de mastitis clínica y subclínica

Para la detección de mastitis clínica y subclínica se muestreó un total de nueve vacas por cuartos obteniendo 36 muestras de leche.

Mediante la prueba de fondo oscuro no se observó la presencia de mastitis clínica en ninguna de las muestras. Con CMT y células somáticas se detectó la presencia de vacas con mastitis subclínica en al menos un cuarto de la ubre (Tabla 8).

De las 36 muestras recolectadas, el 66,67% (24) presentaron conteo de células somáticas menores a 200.000 células/ cm^3 (sin mastitis) y el 33,33% (12) presentó un recuento mayor a 200.000 células/ cm^3 (mastitis subclínica) (Tabla 6).

Tabla 6

Porcentaje de cuartos afectados según el CCS

Grado de mastitis	CCS	Cuartos afectados
Sin mastitis	<200.000	66,67%
Trazas	200.00-400.000	5,56%
Mastitis subclínica	>400.000-1.500.000	27,78%

Detección de antibióticos

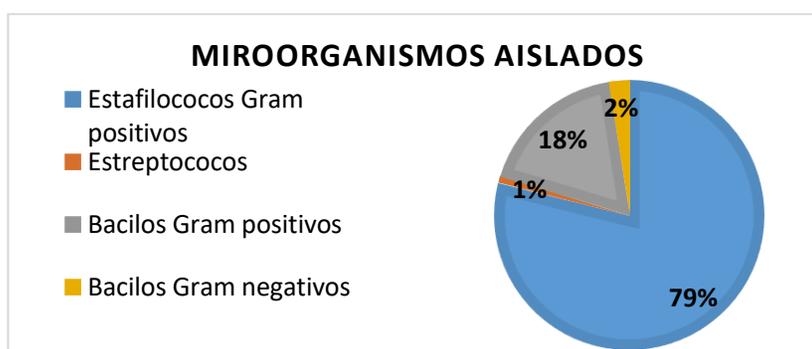
Las muestras recolectadas no presentaron antibióticos como tetraciclinas, beta lactámicos y sulfonamidas.

Aislamiento de microorganismos

Tras la siembra en los medios agar sangre, sal manitol, EMB y MacConkey se obtuvieron un total de 128 aislamientos cuya morfología y tinción Gram se detallan a continuación.

Figura 9

Porcentaje de microorganismos aislados de los 36 cuartos de nueve vacas muestreadas para mastitis en las Islas Galápagos



Para realizar la diferenciación de las 97 muestras de estafilococos Gram positivos aislados se utilizó la prueba de sal manitol y coagulasa.

Tabla 7

Resultados de la prueba coagulasa y sal manitol de todos los estafilococos Gram positivos aislados

Sal Manitol	Coagulasa	Número de cultivos puros
Positivo	Positivo	37
Positivo	Negativo	15
Negativo	Negativo	45

Se seleccionaron los aislados que obtuvieron los mismos resultados en las pruebas de sal manitol, coagulasa, y además perteneciera a la misma vaca y cuarto mamario.

De este modo, un total de 97 cultivos obtenidos se redujeron a 48, con los que se procedió a realizar una identificación por especie de estafilococos mediante pruebas bioquímicas. La tabla 8 detalla el número de aislados por cuarto mamario.

Identificación de microorganismos

Con la discriminación por vaca, cuarto mamario y pruebas bioquímicas, se obtuvo un total de 73 aislamientos.

Tabla 8

Resultados CMT, CCS y número de cultivos obtenidos de los 36 cuartos muestreados

Isla	Vaca	Cuarto	CMT	CCS	<i>S. aureus</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. epidermidis</i>	Otros SCN	<i>Streptococcus</i> sp	Bacilos Gram positivos	Bacilos Gram negativos
Santa Cruz	1	A	-	156.000	-	-	-	-	-	2	-
		B	2	468.000	-	-	-	-	-	-	-
		C	-	97.000	-	-	-	-	-	1	-
		D	-	90.000	-	3	-	-	-	1	-
	2	A	-	<90,000	-	-	-	3	-	1	-
		B	3	>1500.000	2	-	-	3	-	-	-
		C	3	>1500.000	1	-	2	-	-	2	-
		D	-	135.000	-	-	2	1	1	-	-
	3	A	-	125.000	-	-	-	2	-	-	-
		B	2	641.000	2	-	-	-	-	1	-
		C	-	170.000	-	-	2	2	-	1	-
		D	-	191.000	1	-	2	-	-	2	-
	4	A	-	<90.000	-	-	-	-	-	1	-
		B	3	>1500.000	3	-	-	-	-	-	-
		C	2	800.000	1	-	1	-	-	-	-

CONTINÚA

	D	-	<90.000	2	-	1	1	-	-	-	
5	A	-	<90,000	-	1	3	-	-	-	-	
	B	2	488.000	-	1	1	-	-	-	-	
	C	3	>1500,000	-	-	2	-	-	-	-	
	D	-	<90,000	-	1	2	-	-	-	-	
6	A	-	<90,000	-	2	3	-	-	-	2	
	B	-	156.000	-	3	-	-	-	1	-	
	C	3	>1500,000	3	-	-	-	-	1	-	
	D	1	258.000	4	-	-	-	-	-	-	
Isabela	7	A	3	>1500,000	5	-	1	-	-	-	
		B	-	>90,000	5	-	-	3	-	3	
		C	-	<90,000	3	-	-	1	-	-	
		D	-	<90,000	3	-	-	-	-	-	
	8	A	-	<90,000	-	-	-	-	-	-	-
		B	-	170.000	-	4	1	-	-	-	-
		C	1	237.000	2	-	-	-	-	-	-
		D	-	<90,000	-	-	2	-	-	1	1
	9	A	-	<90,000	-	-	1	-	-	1	-
		B	1	160.000	-	-	1	-	-	1	-
		C	-	<90.000	-	-	1	1	-	1	-
		D	-	135.000	-	-	-	1	-	3	-

En las 12 muestras que presentaron mastitis se identificó el 47.4% correspondiente a *S. aureus*, siendo el principal agente causal en este estudio. En las 24 muestras de cuartos sin mastitis los microorganismos más frecuentes fueron bacilos Gram positivos en un 38,78% y *S. epidermidis* en un 24.49%.

Tabla 9

Microorganismos identificados

Microorganismos	Porcentaje en muestras positivas a MB (%)	Porcentaje en muestras negativas a MB (%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	47.37	10.2
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	5.26	12.24
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	26.32	24.49
Otros estafilococos coagulasa negativo	5.26	16.32
<i>Streptococcus</i> sp	0	2.04
Bacilo Gram positivo	15.79	38.78
Bacilo Gram negativo	0	6.12

Capítulo V

Discusión

DetECCIÓN DE MASTITIS BOVINA

En el proyecto de Vinculación con la Sociedad “Desarrollo de un programa de control para mastitis bovina con base en la contextualización del problema en la provincia de Galápagos – Ecuador”, considerando las trazas como positivos, se determinó una prevalencia de 21,71% (38/175) en la Isla Isabela, 22% (92/418) en la isla Santa Cruz, 28.23% (24/85) en la isla San Cristóbal y en la Isla Floreana no se identificó mastitis clínica ni subclínica. Estos valores son bajos en comparación con los obtenidos por Andrade y Sánchez (2018) en la Cooperativa de producción agropecuaria “El Salinerito” provincia de Bolívar, en el cual se obtuvo una prevalencia de 36.9% (136/379), de igual manera mediante la aplicación de encuestas obtuvieron deficiencias en más del 90% de las fincas en cuanto a manejo, nutrición y aspectos de sanidad, lo cual explica una mayor predisposición a la enfermedad.

Según Ramírez (2016), la higiene de la ubre es el principal factor que predispone a contraer mastitis subclínica, el riesgo aumenta si no se tiene cuidado con la unidad de ordeño, utensilios y ausencia del sellado de pezones post ordeño. En Islas Galápagos, las fincas muestreadas conocen BPO lo que podría explicar la baja prevalencia de la enfermedad, sin embargo, la poca frecuencia de algunas prácticas como el sellado de pezones contribuye a la diseminación de microorganismos patógenos, a su vez la falta en el manejo de estiércol y condiciones ambientales como climas húmedos en la región alta de la Isla Santa Cruz pueden servir como vectores de proliferación de microorganismos contagiosos.

La identificación de mastitis subclínica se realizó mediante conteo de células somáticas y CMT. En ambos casos se obtuvieron valores relacionados (Tabla 8),

según Ceballos (2016) el diagnóstico de células somáticas y la prueba CMT son los principales medios para identificar mastitis en fincas ganaderas con una sensibilidad del 75% y especificidad del 90% para CCS.

Según Adkins & Middleton (2018), los cuartos mamarios no infectados tienen normalmente un recuento de células somáticas de 70.000 células/ cm^3 a 200.000 células/ cm^3 y en el caso de un recuento mayor ya se puede considerar una infección intramamaria (IIM), este umbral es el óptimo para reducir algún error de diagnóstico y ser considerado para análisis microbiológico.

De las 36 muestras obtenidas, el 5,56% de los cuartos muestreados presentaron recuentos entre 200.000-400.000 células por cm^3 , se deben considerar las trazas de mastitis como positivos para una IIM aun cuando no se presente disminución en producción de leche ya que indican el inicio de la infección o es señal de que un organismo ha sido eliminado (Adkins & Middleton, 2018).

El 28,68% presentó un recuento mayor a 400.000 células/ cm^3 señal de una IIM. Según Jones (2009), valores de CCS altos representa una infección por al menos uno de los principales patógenos y produce graves pérdidas en calidad y cantidad de leche.

Todos los cuartos mamarios positivos a mastitis presentaron crecimiento en medios de cultivo a excepción de uno. Esto puede darse debido a algún factor traumático en la vaca de estudio, Adkins & Middleton (2018) menciona considerar que el conteo de células somáticas puede verse alterado por factores como raza, estación del año, etapa de lactancia, edad, paridad, frecuencia de ordeño y estresores.

Detección de antibióticos en leche

El uso de antibióticos en ganadería es una práctica común para el manejo de enfermedades como mastitis y neumonía, entre otros. Su uso generalizado ha llevado a contribuir al aumento en la prevalencia de bacterias resistentes (Khachatryan et al., 2006).

En el proyecto de Vinculación con la Sociedad “Desarrollo de un programa de control para mastitis bovina con base en la contextualización del problema en la provincia de Galápagos – Ecuador”, de 678 muestras recolectadas en las Islas Santa Cruz, San Cristóbal e Isabela, 3 muestras fueron positivas a la presencia de residuos de antibióticos betalactámicos o tetraciclinas es decir un 0.44% de las muestras presentaban residuos de antibióticos de los cuales 2 fueron positivas para betalactámicos (0.29%) y 1 para tetraciclinas (0.15%).

La baja presencia de residuos de antibióticos en leche puede deberse al desarrollo de capacitaciones de ganaderos en calidad de leche por el Ministerio de Agricultura y Ganadería (Ministerios de Agricultura y Ganadería, 2018), por ello los ganaderos conocen sobre el uso adecuado y cumplen con los días el retiro del fármaco. Además, instituciones como la Agencia de Regulación y Control de Bioseguridad y Cuarentena para Galápagos realiza constantes monitorios de inocuidad de alimentos, entre ellos pruebas para detección de antibióticos en leche cruda (ABG, 2019), lo cual también regula el uso de estos medicamentos veterinarios en las islas.

En otras investigaciones realizadas en el país se han encontrados residuos de antibióticos en valores altos comparados con las Islas Galápagos. En el cantón Cuenca de la provincia del Azuay, el 22.8% de muestras de leche cruda fue positivo a la presencia de betalactámicos, 2.6% a tetraciclinas y un 0.6% a la presencia de ambas

familias en la misma muestra (Caracundo, 2019). En la provincia de Cañar se identificó el 3.7% de muestras de leche con residuos de antibióticos (Andrade et al., 2017).

Según Máttar et al. (2009) la presencia de antibióticos en leche puede influir en el desarrollo de microorganismos patógenos y modificación de la flora intestinal, además el crecimiento de microorganismos en leche positivos a antibióticos puede indicar la posible presencia de un microorganismo resistente. En el análisis microbiológico de leche puede alterar la identificación de agentes causales impidiendo la proliferación de algunas especies. El presente estudio no se vio afectado debido a la nula presencia de antibióticos.

Microorganismos identificados

El agente causal encontrado con mayor porcentaje en muestras positivas a mastitis fue *S. aureus* en 47,37%, valores similares han sido reportados por Andrade y Sánchez (2018) en la provincia de Bolívar, en el cual *S. aureus* fue el principal patógeno causante de mastitis detectado en el 55.2% de los aislados. Además, *S. aureus* se identificó en el 10.2% de aislados de cuartos con CCS menor a 200.000 células/ cm^3 ; al ser un patógeno contagioso, Jones (2009) menciona que puede diseminarse de cuartos infectados a toda la ubre si no se aplican buenas prácticas de ordeño.

Dado que *S. aureus* es el principal agente causal de mastitis en las Islas Santa Cruz e Isabela se rechaza la hipótesis de este estudio, por ende, los casos de mastitis en las islas son de tipo contagioso. *S. aureus* es el agente infeccioso más reportado y el que presenta mayor riesgo para hatos lecheros, es un patógeno que se puede encontrar en lesiones de la piel, manos del ordeñador, equipo de ordeño y cama. Mediante el ordeño puede introducirse al canal del pezón y liberar factores de virulencia que

provocan inflamación y reducción en la eficacia del tratamiento con antibióticos (Calderón & Rodríguez, 2008).

El 5.26% de los aislados de muestras con mastitis corresponden a *S. saprophyticus*, 26.31% a *S. epidermidis*, y 5.26% otros estafilococos coagulasa negativos. Valores relacionados se encontraron en el estudio realizado por Amer et al.(2018) en la provincia de El Oro, en el cual identificaron que el 55.3% de los aislados causantes de mastitis subclínica corresponden a estafilococos coagulasa negativos (SCN) tales como *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. sciuri*, *S. arlettae* y *S. gallinarum*.

El 83% de los todos los SCN aislados de cuartos positivos a mastitis se presentaron como infecciones mixtas junto con *S. aureus*. Los SCN tales como *S. epidermidis* pueden encontrarse en la piel de los pezones y en raras ocasiones provocar formas de mastitis subclínica, son considerados patógenos menores (Calderón & Rodríguez, 2008; Fernandes dos Santos et al., 2016).

Estreptococos y bacilos Gram negativos fueron identificado en el 1.49% y 3% de los aislados. Estos valores son similares a los reportados por Andrade y Sánchez (2018), que identificaron 1.5% de *Streptococcus* sp., 1.5% *E. coli*, 1.5% *Shigella* sp., 3% *Klebsiella* sp. y 1.5% *Enterobacter* sp., pero son bajos comparados con los reportados por Bonifaz & Conlago (2016) en Paquiestancia, cantón Cayambe, que identificaron *Streptococcus dysgalactiae* en el 13% y *E. coli* en el 13% de aislados. Estos microorganismos han sido reportados ampliamente como causantes de mastitis por falta de buenas prácticas de ordeño como mala higiene de los pezones y presencia de un ambiente contaminado por heces o lodo (FAO, 2004). En las fincas muestreadas de las islas Santa Cruz e Isabela solo el 12.5% realiza el manejo de estiércol (fuente principal

de coliformes); sin embargo, el bajo nivel de contagio por microorganismos ambientales se da por las buenas prácticas de ordeño.

Bacilos Gram positivos se identificaron en el 15.79% de los aislados de cuartos con mastitis. En el estudio realizado por Andrade y Sánchez se encontró *Bacillus* sp. en el 26.9% de aislados, en el realizado por Amer et al. (2018) se encontró bacilos Gram positivos como *B. cereus*, *B. licheniformis* y *B. subtilis* en un 22.1% de casos mencionando que son patógenos importantes de mastitis clínica y subclínica. De igual forma Bonifaz & Conlago (2016) reportó especies como *Micrococcus* 5% y *Corynebacterium* sp en 4%. En el presente estudio los bacilos Gram positivos al igual que SCN aislados de los cuartos con mastitis se presentaron como infección mixta junto con *S. aureus*.

De los aislados obtenidos de cuartos mamarios con CCS menor a 200.000 células/cm³ se identificó SCN, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, bacilos Gram negativos y en mayor porcentaje bacilos Gram positivos. Según Calvinho (2002) la leche obtenida de una glándula mamaria sana puede contaminarse incluso cuando es tomada en condiciones asépticas por microorganismos presentes en el canal del pezón, los organismos más frecuentes aislados de leche y parte de la flora intestinal de la ubre sana son: *Micrococcus* spp., *Corynebacterium bovis*, *Bacillus* spp., estreptococos, estafilococos y *Pseudomonas* spp.

Jones (2009) menciona que la línea de defensa en la glándula mamaria para evitar contaminación es el esfínter que rodea el canal del pezón, este evita que las bacterias entren, sin embargo después del ordeño el músculo del esfínter permanece dilatado durante 1-2 horas y las bacterias presentes alrededor del canal en este tiempo pueden ingresar. El 78% de las fincas muestreadas realizan el sellado del pezón

después del ordeño, esta práctica puede evitar la contaminación de leche por microorganismos ambientales y flora normal de la glándula.

Capítulo VI

Conclusiones y recomendaciones

Conclusiones

Las fincas muestreadas no presentaron casos de mastitis clínica. Formas de mastitis subclínica, grado 1, 2 y 3, se identificaron con CMT y CCS en el 33.33% de los cuartos recolectados.

Las muestras de leche no presentaron antibióticos, por lo cual no hubo alteraciones en la detección de agentes causales.

Se identificó a *S. aureus* como patógeno principal causante de mastitis, concluyendo que los casos de mastitis son de tipo contagioso.

Se identificó estafilococos coagulasa negativos como *S. epidermidis* y *S. saprophyticus* así como bacilos Gram positivos en muestras con mastitis, todas ellas a excepción de una se presentaron como infección mixta junto a *S. aureus*, lo que podría indicar que por sí solas no afectarían significativamente el desarrollo de la enfermedad.

En muestras con conteo de células somáticas menores a 200.000 células/cm³ se identificó en mayor porcentaje a bacilos Gram positivos (38,19%), microorganismos presentes en el conducto del pezón o contaminantes del ambiente.

Recomendaciones

Los ganaderos deben aplicar métodos de detección como fondo oscuro y CMT constantemente, esto permitirá el control a tiempo de los casos de mastitis subclínica.

Se deben mantener y aplicar buenas prácticas de ordeño para controlar la mastitis, si bien no se puede eliminar la enfermedad totalmente de un hato lechero, si se puede mantener al mínimo la cantidad de contagios.

Se deben realizar antibiogramas para poder aplicar un tratamiento más eficaz.

Se recomienda continuar la identificación por medio de análisis moleculares para tener un mejor panorama de la diversidad microbiana en hatos lecheros de las Islas Galápagos.

Bibliografía

- Abebe, R., Hatiya, H., Abera, M., Megersa, B., & Asmare, K. (2016). Bovine mastitis: Prevalence, risk factors and isolation of *Staphylococcus aureus* in dairy herds at Hawassa milk shed, South Ethiopia. *BMC Veterinary Research*, 12(1), 1–11.
<https://doi.org/10.1186/s12917-016-0905-3>
- ABG. (2019). AGENCIA DE REGULACIÓN Y CONTROL DE LA BIOSEGURIDAD Y CUARENTENA PARA GALÁPAGOS-ABG INFORME DE RENDICIÓN DE CUENTAS 2019 AGENCIA DE REGULACIÓN Y CONTROL DE LA BIOSEGURIDAD Y CUARENTENA PARA GALÁPAGOS-ABG. *Ministerio del Ambiente*.
- Acuña, V. L., & Rivadeneira, A. P. (2008). Aislamiento, identificación y antibiograma de patógenos presentes en leche con mastitis en ganaderías bovinas de la provincia de Pichincha. *Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE*.
- Adkins, P. R. F., & Middleton, J. R. (2018). Methods for Diagnosing Mastitis. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 34(3), 479–491.
<https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2018.07.003>
- Agrocalidad. (2015). *Instructivo “Para la toma de muestras de leche cruda.”*
- Amer, S. (2015). Epidemiología molecular de la bacteriana mastitis en el ganado vacuno en la provincia de El Oro, Ecuador: Impacto económico y medidas de control. *Universidad Técnica de Machala*, 16(2), 39–55.
<https://doi.org/10.1377/hlthaff.2013.0625>
- Amer, S., Gálvez, F. L. A., Fukuda, Y., Tada, C., Jimenez, I. L., Valle, W. F. M., & Nakai, Y. (2018). Prevalence and etiology of mastitis in dairy cattle in El Oro Province, Ecuador. *Cell*.

- Andrade, C., & Sánchez, A. (2018). Estudio Clínico, microbiológico y estimación económica de mastitis Bovina, en la cooperativa de producción agropecuaria “El Salinerito”, provincia Bolívar - Ecuador. *Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE*.
- Andrade, O. S., Ayala, L. E., Nieto, P. E., Pesántez, J. L., Rodas, E. R., Vázquez, J. M., Palacios, M. (2017). Determinación de adulterantes en leche cruda de vaca en centros de acopio , medios de transporte y ganaderías de la provincia del Cañar , Ecuador. *Maskana*, 133–135. Recuperado de <https://publicaciones.ucuenca.edu.ec/ojs/index.php/maskana/article/view/1507>
- Ashraf, A., & Imran, M. (2018). Diagnosis of bovine mastitis: from laboratory to farm. *Tropical Animal Health and Production*, 50(6), 1193–1202. <https://doi.org/10.1007/s11250-018-1629-0>
- Bedolla, C., & Castañeda, V. (2007). Métodos de detección de la mastitis bovina (Methods of detection of the bovine mastitis). *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 9, 7–9. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/273449619_Metodos_de_deteccion_de_la_mastitis
- Bedolla, C., & Ponce, M. (2008). Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina en la industria lechera - Economic causalities inflicted by the bovine mastitis in the milk industry). *Redvet*, XI.
- Biffa, D., Debela, E., & Beyene, F. (2005). Prevalence and Risk Factors of Mastitis in Lactating Dairy Cows in. *Intern J Appl Res Vet Med*, 3, 189–198.
- Bonifaz, N., & Conlago, F. (2016). Prevalencia e incidencia de mastitis bovina mediante la prueba de California Mastitis Test con identificación del agente etiológico, en Paquiestancia, Ecuador. *La Granja*, 24(2), 43–52.

- Bou, G., Fernández, A., García, C., Sáez, J. A., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. In *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (Vol. 29).
<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Britania. (2015). Sangre agar base. Recuperado Marzo 20, 2020, de Britania website:
https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5b6b262facd0e.pdf
- Britania, L. (2011). DNAsa Agar. Recuperado Enero 16, 2020, de Britania Lab website:
http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a28220e1b707.pdf
- Calderón, A., & Rodríguez, V. (2008). Prevalencia de mastitis bovina y su etiología infecciosa en sistemas especializados en producción de leche en el altiplano cundiboyacense (Colombia). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 21(1), 582–589.
- Calvinho, L. (2002). *Diagnóstico bacteriológico de mastitis y su importancia en los programas de control*.
- Caracundo Guamán, E. N. (2019). Determinación de antibióticos betalactámicos y tetraciclinas en la leche cruda comercializada. *Universidad Politécnica Salesiana*.
- Ceballos, A. (2016). *Análisis del Recuento de Células Somáticas: Aproximación Epidemiológica*. (January). Recuperado de
<https://www.researchgate.net/publication/312220583>
- Corbellini, C. N. (2002). La mastitis bovina y su impacto sobre la calidad de la leche. *Seminario Internacional de Competitividad En Leche y Carne. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria*, 251–263.
- Dos Santos, J., Dos Santos, K., Gentilini, E., Sordelli, D., & De Freire, M. D. C. (2002). Phenotypic and genetic characterisation of bacteriocin-producing strains of *Staphylococcus aureus* involved in bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, 85(2),

133–144.

- Echeverria, J., Guillermo, M., & Restrepo, L. (2010). *Evaluación comparativa de dos metodologías de diagnóstico de mastitis en un hato lechero del Departamento de Antioquia*. 7(1), 49–57.
- FAO. (2004). Impact of mastitis in small scale dairy production systems. Animal production and health working paper. No.13. In *New York*. Recuperado de <http://www.fao.org/3/a-i3377e.pdf>
- FAO. (2013). *Enhancing Animal Welfare and farmer income through strategic animal feeding* (Harinder M; Harinder P.S, Ed.). Roma, Italia.
- FAO. (2014). IMPACT OF MASTITIS IN SMALL SCALE DAIRY PRODUCTION SYSTEMS. *Animal Production and Health Working Paper, 13*.
- Fernandes dos Santos, F., Mendonça, L. C., Reis, D. R. de L., Guimarães, A. de S., Lange, C. C., Ribeiro, J. B., ... Brito, M. A. V. P. (2016). Presence of mecA-positive multidrug-resistant *Staphylococcus epidermidis* in bovine milk samples in Brazil. *Journal of Dairy Science*, 99(2), 1374–1382. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9931>
- Figueroa, M. (1984). *Enfermedades infecciosas de los animales domésticos en Centroamérica* (U. E. a Distancia, Ed.). San Jose, Costa Rica.
- García, J., Cantón, R., García, E., Gómez, L., Martínez, L., Rodríguez, C., & Vila, J. (2008). *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Madrid, España.
- Gomes, F., & Henriques, M. (2016). Control of Bovine Mastitis: Old and Recent Therapeutic Approaches. *Current Microbiology*, 72(4), 377–382. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0958-8>
- Gonçalves, A. C. S., Roma Júnior, L. C., Privatti, R. T., Salles, M. S. V., De Paz, C. C. P., Zadra, L. E. F., & Vidal, A. M. C. (2018). Somatic cell count obtained by ekomilk scan® and correlations with other methods of analysis. *Ciencia Rural*, 48(6).

<https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20170848>

GreenSpring. (2014). Lsy-20103 Beta-lactams, Tetracyclines And Sulfonamides Test For Antibiotic Combo Milk Antibiotics Test Kit. Recuperado Marzo 27, 2020, de https://www.alibaba.com/product-detail/LSY-20103-Beta-lactams-Tetracyclines-and_60740508379.html

Hamid, E. (2016). Bovine Mastitis: Current Concepts and Future Control Approaches. *Austin Clinical Microbiology*, 1(1), 377–382. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0958-8>

Heikkilä, A. M., Liski, E., Pyörälä, S., & Taponen, S. (2018). Pathogen-specific production losses in bovine mastitis. *Journal of Dairy Science*, 101(10), 9493–9504. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14824>

Jones, G. (2009). Understanding the basics of Mastitis. *Journal of Management Development*, 30(1), 106–111. <https://doi.org/10.1108/026217111111098406>

Josi, C., Bürki, S., Stojiljkovic, A., Wellnitz, O., Stoffel, M. H., & Pilo, P. (2018). Bovine epithelial in vitro infection models for *Mycoplasma bovis*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8(SEP), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00329>

Khachatryan, A. R., Besser, T. E., Hancock, D. D., & Call, D. R. (2006). Use of a nonmedicated dietary supplement correlates with increased prevalence of streptomycin-sulfa-tetracycline-resistant *Escherichia coli* on a dairy farm. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7), 4583–4588. <https://doi.org/10.1128/AEM.02584-05>

Khan, Z., & Khan, A. (2006). *BASIC FACTS OF MASTITIS IN DAIRY ANIMALS: A REVIEW*. 26(4), 204–208.

Laboratorios BD. (2013). *BD Mannitol Salt Agar USO PREVISTO*. (April), 1–3. <https://doi.org/PA-254027.07>

- LOREG. (2015). Ley Orgánica de Régimen Especial de la Provincia de Galápagos. *Registro Oficial Suplemento 520*, 41. Recuperado de <https://www.turismo.gob.ec/wp-content/uploads/2016/04/LOREG-11-06-2015.pdf>
- MacFaddin, J. (2000). *Pruebas Bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica* (p. 839). p. 839. Editorial Médica Panamericana.
- Máttar, S., Calderón, A., Sotelo, D., Sierra, M., & Tordecilla, G. (2009). Detección de antibióticos en Leches: Un problema de Salud Pública. *Revista de Salud Pública*, 11(4), 579–590. <https://doi.org/10.1590/s0124-00642009000400009>
- Ministerios de Agricultura y Ganadería. (2018). En Galápagos se desarrolló la Capacitación del Plan Nacional de Ganadería Sostenible – Ministerio de Agricultura y Ganadería. Recuperado Octubre 13, 2020, de <https://www.agricultura.gob.ec/en-galapagos-se-desarrollo-la-capacitacion-del-plan-nacional-de-ganaderia-sostenible/>
- Morales, H. (2011). *Mastitis bovina: Enfoque biotecnológico*. Cali, Colombia.
- Morin, D. (2004). ACUTE MASTITIS: REVISITING THE GOALS OF THERAPY. *Clinical Journal of Oncology Nursing*, 13(1), 11. <https://doi.org/10.1188/09.CJON.11>
- Nicholas, R. A. J., Fox, L. K., & Lysnyansky, I. (2016). Mycoplasma mastitis in cattle: To cull or not to cull. *Veterinary Journal*, 216, 142–147. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.08.001>
- Ramírez, J. (2016). Prevalencia y factores predisponentes a mastitis subclínica en establos lecheros de la provincia de Trujillo. *Cedamaz*, 5(1), 11.
- Ramírez Vásquez, N., Arroyave Henao, O., Cerón-Muñoz, M., Jaramillo, M., Cerón, J., & Palacio, L. G. (2011). Factores asociados a mastitis en vacas de la microcuena lechera del altiplano norte de Antioquia, Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria*, (22), 31. <https://doi.org/10.19052/mv.562>
- RCRMB. (2019). Réseau canadien de recherche sur la mammite bovine. Le test de

- mammite de Californie (CMT). Recuperado Agosto 5, 2020, de <http://www.reseaumammite.org/>
- Reyes, J., & Bedolla, J. (2008). Importancia del conteo de células somáticas en la calidad de la leche. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, IX(9), 1–34.
- Rodríguez, E., Gamboa, M., Hernández, F., & Gracia, J. (2011). *Bacteriología General: Principios Y Prácticas de Laboratorio*. Recuperado de <https://books.google.com.ec/books?id=vwB0fgirgN0C&pg=PA63&dq=tincion+gram&hl=es419&sa=X&ved=0ahUKEwjK56onPHmAhUlqIkKHTTrtCiAQ6AEIKDAA#v=onepage&q=tincion+gram&f=false>
- Ruiz, A., Peña, J., & Remón, D. (2016). Mastitis bovina en Cuba. In *Rev. prod. anim* (Vol. 28).
- Ruiz, Rocío. (2015). *MASTITIS BACTERIANA EN GANADO BOVINO: ETIOLOGÍA Y TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO EN EL LABORATORIO*.
- Ruiz, Rocío. (2017). *Técnicas alternativas para el diagnóstico de mastitis*.
- Seegers, H., Fourichon, C., & Beaudeau, F. (2003). Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Veterinary Research*, 35, 467–483. <https://doi.org/10.1051/vetres>
- SIPAE. (2007). Libre comercio y lácteos: La producción de leche en el Ecuador: Entre el Mercado Nacional y la Globalización. *SIPAE*, 45. Recuperado de <https://biblio.flacsoandes.edu.ec/libros/digital/42275.pdf>
- Zendejas, G., Avalos, H., & Soto, M. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades de patogenicidad, métodos de identificación. *Revista Biomed*, 25(3), 129–143.

Anexos