



Identificación molecular de genes de bioresistencia en *Staphylococcus aureus*, como agente causal de mastitis bovina, en la Cooperativa de Producción Agropecuaria El Salinerito, provincia de Bolívar - Ecuador.

Palacios Gaibor, Eduardo Geovanny

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








Ron Román, Jorge Washington PhD.

17 de agosto de 2021

Document Information

Analyzed document	Tesis_Palacios_Geovanny_VFdocx.pdf (D111761755)	
Submitted	8/27/2021 8:25:00 PM	
Submitted by	 Firmado electrónicamente por: JORGE WASHINGTON RON ROMAN	
Submitter email		biblioteca@espe.edu.ec
Similarity	2%	
Analysis address	ilbbioteca.GDC@analysis.urkund.com	

Sources included in the report

W	URL: http://scielo.isciii.es/pdf/albacete/v5n1/especial1.pdf Fetched: 8/27/2021 8:27:00 PM		1
W	URL: https://ar.zoetis.com/products/bovinos/orbenin-extra.aspx Fetched: 8/27/2021 8:27:00 PM		1
SA	TESIS FINAL.docx Document TESIS FINAL.docx (D544459354)		1
SA	Tesis_Palacios_Geovanny.docx Document Tesis_Palacios_Geovanny.docx (D111153873)		2
W	URL: http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/21251/1/T-ESPE-039868.pdf Fetched: 8/6/2021 11:27:45 PM		1
SA	Grupo Difusión Científica / TESIS_C_MEJIA_VF.docx Document TESIS_C_MEJIA_VF.docx (D111761756) Submitted by: biblioteca@espe.edu.ec Receiver: ilbbioteca.GDC@analysis.urkund.com		1
SA	ft_004_Coinfección bacteriana asociada a la COVID-19.docx Document ft_004_Coinfección bacteriana asociada a la COVID-19.docx (D111040687)		5



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de titulación, denominado **“Identificación molecular de genes de bioresistencia en Staphylococcus aureus, como agente causal de mastitis bovina, en la Cooperativa de Producción Agropecuaria El Salinerito, provincia de Bolívar - Ecuador”** fue desarrollado por el señor Palacios Gaibor, Eduardo Geovanny el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo que cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la que me permito acreditar y autorizar se sustente públicamente.

Sangolquí, 24 de agosto de 2021

Firma:



Firmado electrónicamente por:
**JORGE
WASHINGTON RON
ROMAN**

Jorge Washington Ron Román, PhD.

CC. 1709505125



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS

INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura
Carrera de Ingeniería en Biotecnología
Responsabilidad de Autoría

Yo, Eduardo Geovanny Palacios Gaibor, con CC. 1723244263, declaro que el contenido, criterios del trabajo de titulación **“Identificación molecular de genes de bioresistencia en *Staphylococcus aureus*, como agente causal de mastitis bovina, en la Cooperativa de Producción Agropecuaria “El Salinerito”, provincia de Bolívar-Ecuador”**, es de mi autoría y mi responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos y legales, establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando derechos intelectuales de terceros y referenciando con citas bibliográficas.

Sangolquí, 24 de agosto de 2021

Firma:

Palacios Gaibor, Eduardo Geovanny.

CC. 1723244263



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura
Carrera de Ingeniería en Biotecnología
Autorización de publicación

Yo, Eduardo Geovanny Palacios Gaibor, con CC. 1723244263, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación **“Identificación molecular de genes de bioresistencia en Staphylococcus aureus, como agente causal de mastitis bovina, en la Cooperativa de Producción Agropecuaria “El Salinerito”, provincia de Bolívar-Ecuador”**, en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad.

Sangolquí, 24 de agosto de 2021

Firma:

Palacios Gaibor, Eduardo Geovanny.

CC. 1723244263

Dedicatoria

“La cooperación es la esencia de la vida, los sueños son su motor, y la valentía su estrategia”

Este trabajo y el transcurso de la vida académica, no ha sido fácil, ha habido muchos momentos complicados, por lo que esto lo dedico a quienes han estado en cooperación continua, de una forma especial a mi madre, quien día a día por su entrega y dedicación ha estado al pendiente y en constante apoyo a nuestras ideas y sueños.

A mi padre por siempre mostrarnos la constancia, espíritu y dedicación en hacer y mantenerse constantemente a la disposición de todos quienes lo rodean.

A mis hermanas Karol, Monse y la memoria de Cristian por ser pilares fundamentales en mi vida.

A mis amigos y familia, por el cariño y las fuerzas para continuar juntos en el transcurso de la vida Académica.

Eduardo Geovanny Palacios Gaibor

Agradecimiento

A Dios por permitirme vivir varias experiencias a lo largo de la vida Universitaria y ahora culminar una etapa más en la vida,

A la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, por acogerme bajo sus puertas que con sus docentes me han formado y guiado, gracias a su conocimiento ha sido posible el desarrollo de este y otros proyectos en la Universidad,

A la Universidad de Liège de Bélgica y el programa ARES, por el desarrollo y trabajo conjunto, que han permitido la incursión al estudio de la mastitis en varias zonas del Ecuador y facilitarnos herramientas, equipos y las cepas control utilizadas en el presente trabajo,

A mi tutor Jorge Ron Román, PhD y Alma Koch, MSc. quienes por su constancia y guía han estado junto al desarrollo del proyecto de tesis a pesar del reto enorme que se nos presentó en estos tiempos,

A quienes conforman el laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, por acogerme con ellos, permitirme desarrollar el presente trabajo y convertirse en conjunto con los demás tesisistas en una segunda familia, de manera especial a Cristina Cholota y Dayana Sandoval por la constancia y el arduo trabajo que llevan en los laboratorios, quienes si en ellas este trabajo no hubiese sido posible completarlo,

A Claudia Mejía, por el compañerismo brindado y el apoyo constante durante todo el desarrollo de este proyecto.

A Josselyne por mostrarme situaciones más allá de un aula de clase y que con pasión una idea o un sueño por loco que sea puede darse y construirse a pesar del panorama,

A todos mis compañeros de la AEIB por el trabajo realizado y fomentar la ayuda hacia los demás, que su trabajo continúe siempre por el Bienestar de los Estudiantes,

A la Dra. Ximena Tapia por todo el apoyo mostrado, la guía en los momentos difíciles y las ganas de fomentar trabajo hacia los demás.

Índice de Contenido

Certificación Urkund	2
Certificación	3
Responsabilidad de Autoría	4
Autorización de Publicación	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimiento.....	7
Índice de Contenido	8
Índice de Tablas	11
Índice de Figuras	12
Abreviaturas	13
Resumen	15
Abstract.....	16
Capítulo I: Introducción	17
ANTECEDENTES	17
JUSTIFICACIÓN	19
OBJETIVOS DEL PROYECTO.....	20
<i>Objetivo General.....</i>	<i>20</i>
<i>Objetivos Específicos.....</i>	<i>20</i>
Capítulo II: Revisión Bibliográfica	21
LA INDUSTRIA LECHERA.....	21
MASTITIS	22
<i>Etiología de Mastitis.....</i>	<i>23</i>

<i>Diagnóstico</i>	24
<i>Tratamiento, Control Y Prevención</i>	26
<i>Staphylococcus aureus</i>	28
<i>Betalactámicos</i>	30
<i>Bioresistencias a antibióticos (gen Blaz, gen mecA Y mecC)</i>	30
TÉCNICAS MOLECULARES DE IDENTIFICACIÓN	34
Capítulo III: Metodología	35
ZONA DE ESTUDIO	35
PROCEDIMIENTOS	35
<i>Activación de cepas</i>	35
<i>Extracción de ADN</i>	37
<i>Protocolo PCR</i>	39
<i>Estandarización de PCR dúplex</i>	39
<i>Análisis mediante electroforesis</i>	45
<i>Secuenciación sanger</i>	45
ANÁLISIS DE FILOGENIA	47
Capítulo IV: Resultados	48
ACTIVACIÓN DE CEPAS	48
AISLAMIENTO DE CULTIVOS MIXTOS	50
EXTRACCIÓN DE ADN	50
CORRIDAS ELECTROFORESIS GENES DE RESISTENCIA	51
EVALUACIÓN DE LA SECUENCIACIÓN	54
<i>Primer Blaz</i>	54
ANÁLISIS DE FILOGENIA GEN 16S	56
Capítulo V: Discusión	59
Capítulo VI: Conclusiones	65

Capítulo VII: Recomendaciones.....	66
Bibliografía	67
Apéndices	77

Índice de tablas

Tabla 1 Componentes Kit de Extracción Wizard® Genomic DNA purification de Promega.....	38
Tabla 2 Primers para PCR genes 16S, Nuc y de resistencias BlaZ, mecA y mecC.....	40
Tabla 3 Concentraciones de reactivos para PCR Simple de gen mecA y mecC	41
Tabla 4 Concentraciones de reactivos para PCR de gen Nuc	42
Tabla 5 Concentraciones de reactivos para PCR dúplex de gen mecA y Nuc	43
Tabla 6 Concentraciones Reactivos para PCR simple 16S	44
Tabla 7 Concentraciones Reactivos para PCR simple BlaZ	45
Tabla 8 Criterios de búsqueda PATRIC	47
Tabla 9 Estandarización de PCR dúplex.....	52
Tabla 10 Relación de identidad con secuencias base de datos GenBank	55
Tabla 11 Valores de distanciamiento por pares.....	56

Índice de figuras

Figura 1 Existencia de ganado vacuno, vacas ordeñadas y producción de leche, según región, 2020	21
Figura 2 Diagnóstico de mastitis muestras de leche	24
Figura 3 Esquema anatómico de la ubre de la vaca.....	25
Figura 4 Factores de virulencia <i>Staphylococcus aureus</i>	29
Figura 5 Mecanismo de resistencia BlaZ	31
Figura 6 Esquema de modificación PBP.....	32
Figura 7 Esquema de variantes del casete SSCmec	33
Figura 8 Estriamiento por agotamiento	36
Figura 9 Esquema generado por el programa Sequencher	46
Figura 10 Cultivos bacterianos en Agar Sangre	48
Figura 11 Cultivos Bacterianos en BHI	49
Figura 12 Muestras bacterianas en tinción Gram	49
Figura 13 Tinción Gram de los cultivos aislados	50
Figura 14 Electroforesis de PCR controles gen <i>mecA</i> y <i>mecC</i>	51
Figura 15 Electroforesis PCR dúplex gen <i>mecA</i> y <i>Nuc</i>	53
Figura 16 Corrida electroforesis gen BlaZ	53
Figura 17 Alineamiento de secuencias obtenidas	55
Figura 18 Árbol filogenético 16S	58

Abreviaturas

IMI	Infección Intramamaria
AS	Agar sangre
SM	Sal Manitol
BHI	Infusión Cerebro corazón
AN	Agar nutriente
TSA	Agar de Soya Triptona
STPH	Medio Staphylo 110
HS	Hot Start
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
P10	Penicilina 10U
PG	Penicilina G
Ba	Bacitracina
Mec	Casete genético de resistencia a meticilina
BlaZ	Gen de Resistencia betalactámicos
RNA	Ácido Ribonucleico
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
16S	Gen de ARN ribosómico identificación bacteriana
Nuc	Gen de termonucleasa
G+	Bacterias Gram positivas
G-	Bacterias Gram negativas

nm	Nanómetros
μL	Microlitros
μg	Microgramos
ng	Nanogramos
ml	Mililitros
μM	Micromolar
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa (siglas en inglés)
bp	Pares de bases (siglas en inglés)
PBP	Proteína de unión a penicilina (siglas en inglés)
SSCmec	Casete cromosómico de estafilococos gen mec
PATRIC	Pathosystems Resource Integration Center
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
kDa	Kilodaltons
SSU	Unidad pequeña estructural de ribosoma

Resumen

La industria ganadera y lechera, acorde al Instituto Nacional de Estadísticas y Censos del último año se registró un total de 4.3 millones de cabezas de ganado con una producción de 9.2 millones de litros de leche, siendo esta de gran repercusión en la economía de familias ganaderas.

La mastitis bovina llegó a registrar pérdidas de hasta un 45% en la producción de leche por vaca afectada. Como mecanismo contra esta, los tratamientos con antibióticos han resultado efectivos, sin embargo, el desarrollo de antibioresistencias por parte de los agentes causales ha representado un factor de estudio de gran repercusión en el interés social y en la salud pública. Acorde a la OMS, en años recientes los índices de morbilidad y mortalidad han aumentado en personas con infecciones causadas por bacterias multirresistentes con origen zoonótico.

El actual trabajo, continúa lo realizado por Andrade & Sánchez en el 2018, donde se identificó como los principales agentes causales de mastitis bovina a *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus sp.* en las 58 vacas muestreadas de las diferentes granjas ganaderas en El Salinerito provincia de Bolívar.

Se recuperaron doce muestras de las identificadas como *S. aureus* confirmadas mediante la amplificación del gen 16S y gen nuc de termonucleasa por PCR. Se identificó la antibioresistencia a antibióticos betalactámicos, generada por la presencia del gen BlaZ, no se identificó la presencia del gen mecA en las muestras analizadas, indicativo de que tratamientos con beta lactámicos de segunda generación resultarían efectivos y concluyendo que se debe tener un uso y manejo racional para evitar la generación de nuevas resistencias.

PALABRAS CLAVE:

- **ANTIBIORESISTENCIA,**
- **BETALACTÁMICOS,**
- ***Staphylococcus aureus,***
- **PCR.**

Abstract

According to the National Institute of Statistics and Censuses in the last year, the livestock and dairy industries registered a total of 4.3 million head of cattle with a production of almost 9.2 million liters of milk, which has had a great impact on the economy of families for whom livestock is their livelihood.

Bovine mastitis is one of the conditions that most affects milk production, with losses of up to 45% in milk production per affected cow. As a mechanism against this, antibiotic treatments have been effective; however, in recent years, the development of antibiotic resistance by the causal agents has represented a study factor with great repercussion on social interest and public health. According to the WHO in recent years there has been an increase in morbidity and mortality in people affected by infections of multi-resistant bacterial with zoonotic origin.

The current work, is based on that made by Andrade & Sánchez in 2018, where they identified *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus sp.* as the main pathogens of bovine mastitis, in a sample of 58 cows belonging to different cattle farms in El Salinerito, Bolívar's province.

Twelve samples were recovered from those identified as *S. aureus*, which were confirmed by PCR amplification of the 16S gene and termonuclase nuc; Furthermore, resistance to beta-lactam antibiotics was identified, confirmed by the presence of the BlaZ gene. The presence of the mecA gene was not identified in the analyzed samples, which indicates that second-generation beta-lactam treatments are effective, which is relevant to avoid generating new resistance due to its misuse.

KEYWORDS:

- RESISTANCE,
- BETA-LACTAM,
- *Staphylococcus aureus*,
- PCR.

Capítulo I: Introducción

Antecedentes

La mastitis bovina, es una afección a la glándula mamaria, causada por la invasión en el canal del pezón de diferentes tipos de bacterias (Corbellini, 2002). Se han registrado más de 200 microorganismos causantes de mastitis denominados como contagiosos, ambientales y oportunistas (Bradley, 2002).

Los principales microorganismos patógenos comprenden *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Escherichia coli* y también patógenos "menores", incluyen los estafilococos coagulasa negativos (SNC) y varios bacilos Gram positivos (Amer et al., 2018). Estos se albergan en los cuartos afectados de tejido mamario y se transmiten de forma horizontal de vaca a vaca generalmente durante el ordeño (López et al., 2006).

La afección se presenta en fases clínicas y subclínicas; en la subclínica se ve un aumento en las células somáticas en la leche del cuarto afectado, provocando cambios en las propiedades físico químicas y por ende la calidad de la misma (Coronel & Espinosa, 2017). La mastitis clínica se identifica por coágulos en la leche, inflamación del tejido mamario y posterior pérdida total o parcial del mismo afectando el desempeño de producción de leche (Chasi, 2015).

La mastitis subclínica al no presentar síntomas, es compleja, se requiere mayor cuidado en cuanto a su control y la capacidad de transmisión. Existen pruebas de diagnóstico utilizadas en campo y en laboratorio como: la de fondo oscuro, la prueba del CMT, conteo de células somáticas y la verificación de propiedades físico químicas de la leche (Carpio, 2018).

S. aureus, es de gran interés de estudio, ya que ha sido capaz de desarrollar antibioresistencias, por adaptaciones a nivel genético, como es la capacidad para expresar el gen BlaZ, encargado de la producción de betalactamasas que hidrolizan el anillo de lactama de

medicamentos β -lactámicos, haciéndolos poco eficaces contra una infección (Bagcigil et al., 2012). Además, presenta bioresistencia a meticilina (penicilina semisintética), la cual viene mediada por la existencia de un elemento genético móvil mec con la presencia del gen mecA y su homólogo mecC, el mismo que cambia a una proteína P BP2a mutante evitando se una el antibiótico a esta (Sekizuka et al., 2019).

Debido a ello, la OMS, (2018) clasifica a *S. aureus* dentro de la categoría 2 de estado crítico para su control contra el desarrollo de antibioresistencias, dada su alta prevalencia y capacidad de desarrollar enfermedades en diferentes hospederos. En caso de mastitis, es importante la prevención, el diagnóstico, seguimiento, identificación de cepas multirresistentes y la segregación de los animales enfermos, con el fin de salvaguardar al ganado sano, tratar a los enfermos y minimizar el sacrificio en casos clínicos graves (ANEMBE, 2010).

Una vez se tiene indicios de la presencia de la enfermedad, es necesario realizar pruebas antibiogramas para conocer que tratamiento se lo puede brindar, sin embargo los cultivos microbiológicos demoran en el crecimiento e identificación de los mismo, por lo que las técnicas moleculares han permitido localizar de manera más rápida estas adaptaciones generadas por *S. aureus* e identifican las posibles bioresistencias que puedan adaptar otros microorganismos asociado a la enfermedad (Fetsch, 2017). La extracción de ADN genómico y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) simples o múltiples, ayudan a identificar y dar un adecuado monitoreo de la enfermedad para evitar la propagación de la misma (Frank M. Aarestrup, 2005).

Gracias al alcance del proyecto de vinculación "El empoderamiento y capacitación de las mujeres como estrategia contra la mastitis del ganado bovino en la cooperativa de producción agrícola El Salinerito, en la provincia de Bolívar en Ecuador", se han desarrollado varias investigaciones que evidencian las condiciones productivas del sector y la posibilidad de mejorarlas.

Andrade & Sánchez, (2018) realizaron estudios clínicos, microbiológicos y económicos de mastitis bovina, donde se identificó a varios agentes causales de mastitis, usando pruebas bioquímicas y de susceptibilidad a antibióticos. Entre los de mayor prevalencia se reportaron a *Staphylococcus aureus*, y a nivel de fenotipo se determinó la resistencia a Penicilina y susceptibilidad a Bacitracina, Cloxacilina, pero a nivel genotípico las muestras no fueron analizadas para validar la presencia de los genes de BlaZ, mecA y mecC importantes para evidenciar la bioresistencia en este microorganismo.

Justificación

La actividad ganadera en la industria bovina, representa uno de los ingresos importantes para la economía del país, con alrededor del 1% del PIB nacional, generando empleos a 1.2 millones de familias ecuatorianas (Heifer Ecuador, 2018).

La mastitis es una enfermedad que afecta directamente a la producción de leche, causa afecciones a la glándula mamaria ocasionada por bacterias, y en cuadros clínicos graves, da cabida a la pérdida del tejido mamario. Es una de las infecciones que deben ser contralada en la ganadería, debido a sus altas tasas de prevalencias, en el Ecuador llegó a un 80% registrado en el 2018 (Amer et al., 2018).

Si bien existen tratamientos con antimicrobianos y antiinflamatorios que se aplican al ganado, el mal uso y la evidencia de trazas en los productos derivados como leche y queso para consumo, provoca que se genere y aumente la resistencia a antibióticos. *S. aureus* y *S. agalactiae*, son los agentes responsables más comunes de provocar la enfermedad y presentan los genes de bioresistencia antes mencionados (López et al., 2006).

Para un tratamiento efectivo contra mastitis, es necesario conocer sobre el agente causal que provoca la enfermedad y un análisis a fondo sobre las posibles bioresistencias a antibióticos

que estos pueden desarrollar, permitiendo implementar un mejor programa de prevención y tratamiento específico para cada hato.

El presente estudio evaluó las cepas bacterianas identificadas como *S. aureus* en el proyecto de investigación de Andrade & Sánchez, (2018), y mediante técnicas moleculares se estandarizó un protocolo para PCR el cual permitió determinar la presencia de genes de antibioresistencias a antibióticos de las cepas de *S. aureus* agente causal de mastitis bovina, con el fin de permitir el desarrollo de planes estratégicos de prevención y tratamiento para los hatos de la provincia de Bolívar.

Objetivos del proyecto

Objetivo general

- Identificar molecularmente los genes de bioresistencia en *Staphylococcus aureus*, agente causal de mastitis bovina, en la Cooperativa de Producción Agropecuaria El Salinerito, provincia de Bolívar - Ecuador.

Objetivos específicos

- Estandarizar un protocolo de PCR convencional y PCR dúplex como herramienta de identificación molecular de bioresistencia de *Staphylococcus aureus* en aislados de leche de vacas con mastitis.
- Caracterización molecular de *Staphylococcus aureus* mediante amplificación de genes 16S y nuc en aislados de leche de vacas con mastitis.
- Identificar mediante técnicas moleculares los genes blaZ, mecA y mecC, de bioresistencia a antibióticos β -lactámicos y meticilina, generada por *S. aureus* de aislados de muestras de leche de vacas con mastitis.

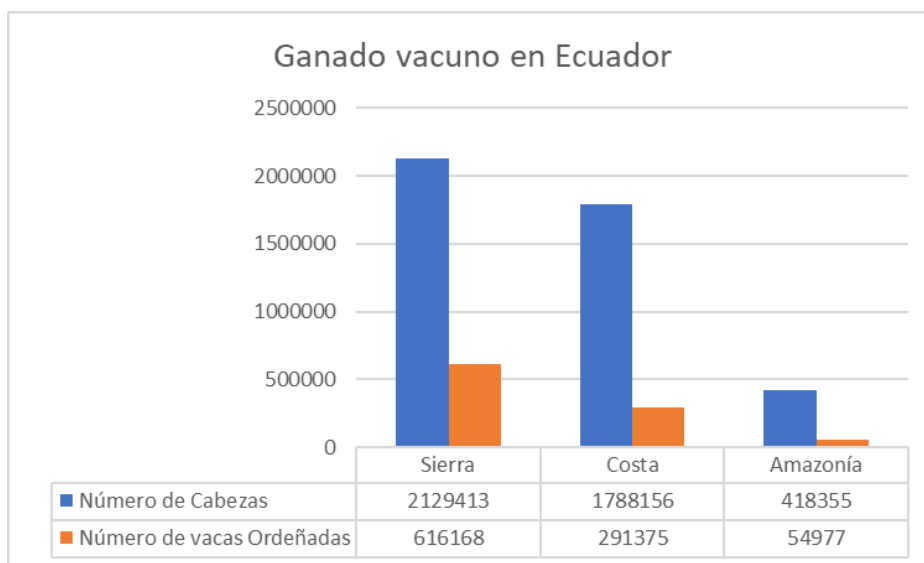
Capítulo II: Revisión Bibliográfica

La industria lechera

La actividad ganadera, representa un gran sustento económico en diversas zonas del mundo, debido a la variedad de productos tanto lácteos como cárnicos derivados de la misma. En Ecuador, la cadena láctea representa el 1% del PIB total con un crecimiento del 13.11% en los últimos años (Heifer Ecuador, 2018). De acuerdo al Instituto Nacional de Estadísticas y Censos la actividad ganadera en el 2020, registra un total de 4.3 millones de cabezas de ganado como lo muestra la Figura 1, que concentra el 49.1% en la Sierra, seguida del 41.2% en la Costa y un 9.6% en la Amazonía. La actividad de producción de leche es de gran relevancia con 4.8 millones de litros en la Sierra, 1.1 millones en la Costa y 300 mil en la Amazonía (ESPAC, 2021).

Figura 1

Existencia de ganado vacuno, vacas ordeñadas y producción de leche, según región, 2020



Nota. Adaptado de Boletín Técnico Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua, ESPAC, 2021.

En la actualidad, El Salinerito ha tenido un crecimiento exponencial y se ha colocado como distribuidor representativo en varias zonas del país, tanto en leche como derivados, por ello mantiene la regularidad, control y calidad con sus productos (Chamorro Chamorro, 2017; INEN, 2012; López Vásquez, 2006).

Una de los principales retos en la producción lechera, es la mastitis bovina. La presencia de mastitis clínica y subclínica, genera la disminución de la calidad de leche, afecta al ganado por las tasas bajas de recuperación de la enfermedad (Rojas, 2017). Los animales que responden al tratamiento tienen una pérdida significativa en la producción de leche, llegando hasta una disminución del 45% de la producción normal de leche en casos mastitis avanzadas, lo que significa pérdidas económicas para los dueños (Andrade & Sánchez, 2018).

Mastitis

La mastitis es una afectación en la glándula mamaria, ocasionando dolor y molestias en la vaca, esta se presenta de modo progresivo, afectando al tejido, la producción y calidad de leche (Kruze, 1988; Solís, 2007). Esta inflamación afecta la síntesis de lactosa, grasa y caseína, aumenta el conteo de células somáticas, cantidad de cloruros, recuentos bacterianos, presencia de adulterantes como agua y en casos no controlados la presencia de trazas de antibióticos (Kruze, 1988; Mata et al., 2002; Ruegg & Reinemann, 2002).

La mastitis se presenta en fases clínicas y subclínicas, siendo la subclínica de mayor complejidad en cuanto a control, por ser casi indetectable al no mostrar sintomatología (Coronel & Espinosa, 2017); sin embargo, esta puede desarrollarse a una afección clínica más grave donde los síntomas son visibles, genera hinchazón, presencia de hematomas en las ubres y puede llegar hasta la pérdida parcial o total del tejido (Bradley, 2002).

La mastitis bovina es una enfermedad costosa para el productor, por las pérdidas de producción en las vacas afectadas, los costos que implican el diagnóstico y tratamientos;

tomando en cuenta que muchos rebaños no tienen instalaciones ni mano de obra para manejar grupos adicionales o animales individuales o a sacrificar en casos críticos como se establece en programa recomendado para control de la mastitis del National Mastitis Council, (2020).

Etiología de mastitis

La enfermedad ocurre por una invasión del canal de la ubre por parte de microorganismos ya sean ambientales, o transmitidos por contacto directo, esta se instaura en la glándula y posterior a ello se da una extensión a lo largo del tejido mamario causando una infección interna (Ruegg, 2017).

Algunas de las causas que se han determinado son: malas prácticas de ordeño, falta de higiene del personal, descuido en el sellado de pezones, dejando el pezón abierto o por posibles daños a la misma (Peeler, Green, Fitzpatrick, Morgan, & Green, 2000). Otro momento vulnerable se da en la etapas secas, ya que, tanto en las fases de involución y la de producción de calostro están puntos críticos para la invasión de microorganismos, la presión interna generada por la acumulación de leche o calostro puede generar aperturas en el pezón y dar lugar a la invasión de agentes externos (Timón & Jiménez, 2016).

Aproximadamente 200 agentes microbianos pueden ser responsables de la enfermedad, de los cuales, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* y *Escherichia coli*, son los identificados como contagiosos, ambientales y oportunistas más representativos y de mayor prevalencia (Bradley, 2002; Solís, 2007). De acuerdo a Vayas & Carrera, (2012), los *Staphylococcus* son las bacterias causantes de hasta el 75% de las mastitis infecciosas, seguidos por *Streptococcus*, hallados en un 10 - 15%, alrededor al 3% de *E. coli* o *Klebsiella pneumoniae*, y en menor frecuencia también se han reportado mastitis a causa de levaduras.

Diagnóstico

Se pueden realizar diferentes pruebas para determinar la presencia y grado de esta afección, existiendo tanto pruebas cualitativas como cuantitativas. En las cualitativas para la etapa subclínica se utiliza las técnicas de fondo oscuro en complemento con la prueba de California Mastitis Test (CMT), Figura 2 (Acuña & Rivadeneira, 2008; Amer et al., 2018; Andrade & Sánchez, 2018; Coronel & Espinosa, 2017; Uchuari, 2018).

Figura 2

Diagnóstico de mastitis muestras de leche



Nota. Izquierda paleta para pruebas de CMT, derecha paleta de fondo oscuro, donde se ve la formación de grumos.

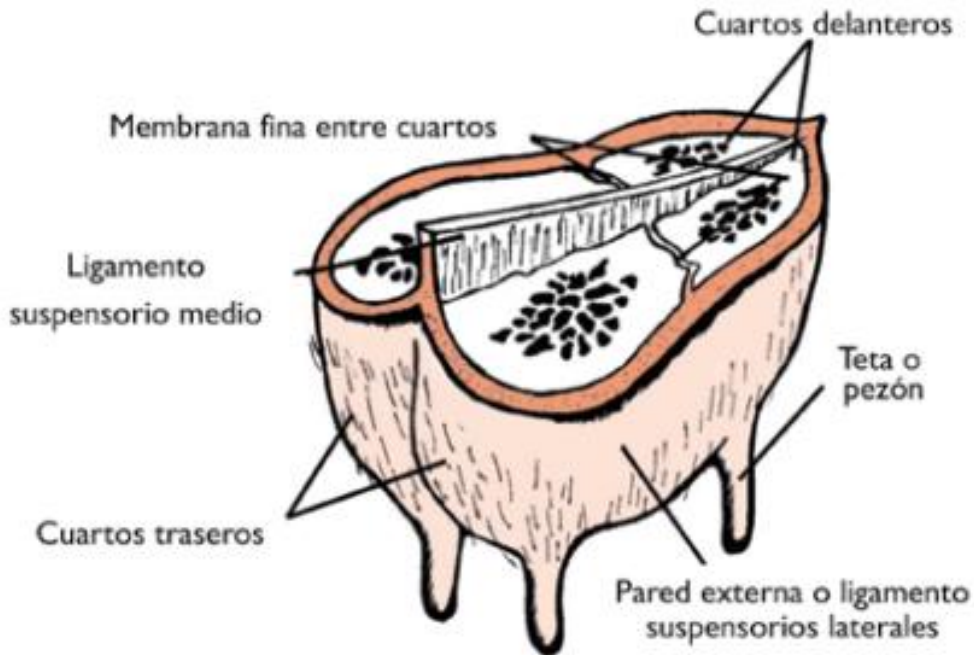
La prueba de fondo oscuro, permite diferenciar la formación de grumos, de materia fibrosa, incluso en mastitis avanzadas se ve cambio a un color anormal por la presencia de sangre (Bedolla, Catañeda, & Wolter, 2007). La prueba de CMT, consiste en añadir el reactivo, mismo que en contacto con la leche de la vaca afectada forma una emulsión (Saran & Chaffer, 2000).

La evaluación se realiza por ordeño y de cada pezón ya que internamente se divide en cuatro compartimentos, independiente uno del otro, Figura 3 (Castro Ramírez, 1999; Elizondo

Salazar, 2010). Cuando se encuentra anomalías en la leche, esta tiene que ser descartada y la vaca separada para dar inicio al tratamiento, determinando el agente causal y si este tiene o no resistencias (Andresen, 2013).

Figura 3

Esquema anatómico de la ubre de la vaca



Nota. Adaptado de “Anatomía de la ubre y secreción de la leche”, por Elizondo, Jorge, 2010, ECAG, 54.

En afecciones clínicas, los métodos cualitativos de determinación se basa por lo general en la observación de signos clínicos, hay hinchazón en la ubre, presencia de hematomas y verrugas en casos avanzados (Bedolla et al., 2007; Bradley, 2002). En el caso de la leche se puede ver cambios en su coloración pasa de ser blanca a color amarillento o en casos avanzados esta cambia a rosa o rojiza, debido al necrosamiento del tejido y secreciones de sangre (Olguín, 2007).

En la actualidad, también se hacen uso de técnicas moleculares como PCR, Western Blot, ELISA, entre otras, para la detección de la presencia de los agentes causales de la misma, la relación que se presentan con otros hospederos y determinar variantes a nivel genético dentro de una zona geográfica (Bagcigil et al., 2012; Oikonomou et al., 2012; Wang et al., 2012).

Las técnicas cuantitativas son usadas en ambos casos de la afección y ayudan a determinar el grado de la misma, incluye la evaluación de propiedades físico químicas de la leche, recuento de células somáticas, entre ellas neutrófilos, macrófagos, linfocitos y células epiteliales (Rojas, 2017), este análisis en laboratorio se lo realiza con ayuda del Ekomilk Scan; el análisis puede hacerse también por recuentos bacterianos en cultivos microbiológico y pruebas de adulterantes como agua, porcentaje de sal o presencia de antibióticos (Peeler et al., 2000).

Tratamiento, control y prevención

El tratamiento a la mastitis bovina consiste en la aplicación de una serie de antibióticos por la vía intramamaria, permite que el fármaco llegue de una forma directa a la infección y por ende se requiere menor concentración del mismo. Sin embargo, en los casos clínicos de afección mayor en tejido, se recomienda una aplicación por vía sistémica, ya que puede llegar el medicamento a difundirse dentro del mismo (VETCORP, 2011).

Para determinar el modo y la aplicación del tratamiento debe existir un análisis previo, ya que se requiere un control que resulte en un tratamiento eficaz, entre esto primero se debe identificar el agente causal de la misma, seguido de un estudio in vitro de antimicrobianos (Andresen, 2013).

Los antibióticos más utilizados en el tratamiento de mastitis de acuerdo a Andresen, (2013) y Ordóñez, (2015) son: Neomicina, Cloxacilina, Bencilpenicilina G, eficaces en mastitis causada por *Streptococcus*, mientras que Estreptomina, Dihidroestreptomina, Cloranfenicol,

Ampicilina, eficaces para *Staphylococcus* no resistentes a penicilinas y, Cloxacilina, Norfloxacin, Sulfa con Trimetropim, Amoxicilina con Ácido Clavulánico son eficaces en afecciones con *Staphylococcus* resistentes.

Hay varios medicamentos de uso comercial como Clavamox y Orbenin para su aplicación intramamaria. Clavamox® se usa para vacas en periodo de lactancia, es un bactericida de amplio espectro, posee Amoxicilina, Ácido Clavulánico y Prednisolona, para el control de la mastitis clínicas y subclínicas, producidas por *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *E. Coli*, *Corynebacterium* spp. (Zoetis, 2013a). Orbenin® se usa para vacas en periodo seco, posee acción bactericida de amplio espectro, es efectivo sobre patógenos Gram positivos y Gram negativos, no es recomendado para su uso en mastitis causadas por *Staphylococcus*, posee Cloxacilina benzatínica (Zoetis, 2013b).

En muchos de los casos, por lo general en zonas de bajos recursos, el productor decide no aplicar los tratamientos, ya que, el cuidado y los análisis implican un costo. Además, que a pesar de eliminar los agentes que provocan la enfermedad, no se asegura la recuperación del tejido, provocando que la producción de leche disminuya en forma significativa (Mera et al., 2017).

Los animales sometidos al tratamiento, deben ser separados un tiempo y su leche o carne no deben ser consumidas, por los antibióticos usados. Algunos antibióticos son de larga duración y demoran entre 30 a 40 días para su eliminación, mismos que no desaparecen con la pasteurización (Elizondo, 2007). Lácteos y derivados con trazas de antibióticos, que llegan a ser consumidos por el ser humano, provocan afecciones en la flora normal del organismo o contribuyen con la generación de resistencias a otras bacterias (Barkema, Schukken, & Zadoks, 2006).

Por lo que en general, el mejor tratamiento es la prevención de la enfermedad, manteniendo cuidados y buenas prácticas de ordeño, la higiene tanto de la vaca y el personal encargado del lugar de ordeño. La higiene, consiste en el lavado de ubres y pezones con agua potable, desinfección del pezón, uso de toallas desechables, desinfección completa de las pezoneras en los lugares que usen instrumentos mecánicos, desinfección posterior al ordeño y sellado con un agente que bloquee el crecimiento bacteriano (Solís, 2007).

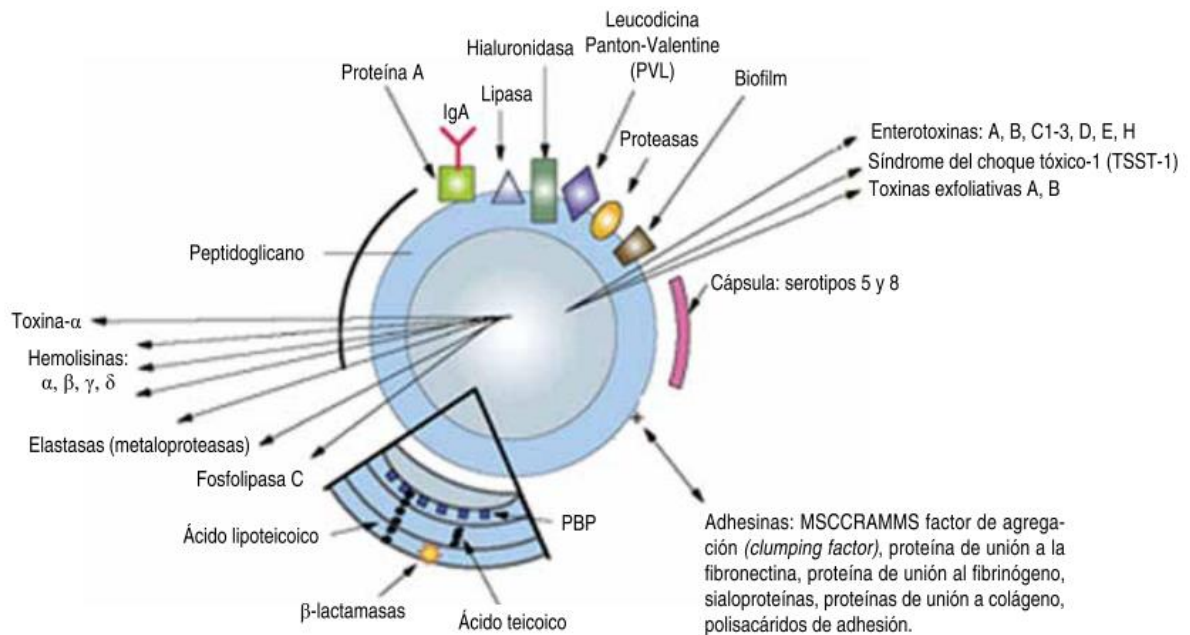
Staphylococcus aureus

Es el responsable de varias enfermedades tanto en humanos y animales, como es el caso de la mastitis bovina (Coronel & Espinosa, 2017). Es un microorganismo de forma esférica Gram positivo, se agrupa en racimos, tiene actividad positiva de catalasa, presenta colonias de coloración amarillenta en medios normales como Agar nutriente, BHI, TSA por la producción de carotenoides y colonias grisáceas con beta hemólisis en agar sangre y puede crecer en medios con grandes cantidades de sal 7.5% (Cervantes, García, & Salazar, 2014).

Staphylococcus aureus, tiene una pared gruesa compuesta por doble cadena de peptidoglicanos, ácidos teóicos y proteínas que le ayudan a la adhesión y virulencia Figura 4 (Cervantes et al., 2014). Una vez adherida al epitelio de la glándula mamaria, produce toxinas cuya función es el ataque a las células de respuesta inmune que a menudo desata en una infección crónica (Kraus & Peschel, 2008). El agente causal a la mínima apertura o lesión, se establece en la zona y puede llegar a vasos sanguíneos provocando una bacteriemia y necrosamiento de los tejidos (Rojas, 2017).

Figura 4

Factores de virulencia *Staphylococcus aureus*



Nota. Adaptado de *Características generales del Staphylococcus aureus*, por Cervantes et al., 2014, *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 61(1).

El estudio de *Staphylococcus aureus*, es de gran interés, ya que, tiene una propagación zoonótica a humanos y el riesgo de aparición de cepas resistentes pueden prevalecer e ingresar a cadena alimentaria, sobre todo en productos que no se haya dado una debida pasteurización a la leche cruda (Bradley, 2002).

La identificación molecular de *S. aureus* es una técnica que ha tomado lugar en estos días, tiene un ADN circular de aproximadamente 2.8 kb, y para la identificación se realizan la amplificación de genes específicos como el gen 16S y nuc, gen de enzima termonucleasa, característico de este (Maes, Magdalena, Rottiers, De Gheldre, & Struelens, 2002).

S. aureus tiene varias regiones móviles de ADN con múltiples inserciones, mismo que le ha ayudado a la adquisición de las características de antibioresistencia (Cervantes et al., 2014),

razón por la cual ha llegado a ser de gran cuidado a nivel clínico, y que cada vez más se complica el tratamiento (Lakhundi & Zhang, 2018).

La secuenciación ha permitido evaluar y determinar variantes a nivel de nucleótidos y conocer las características y presencias de genes, en cuestión de *S. aureus* se puede ver las diferentes variantes que este posee por el número de hospederos en los que puede estar y la distribución geográfica que tiene, sin embargo la capacidad de esto depende también de la comparación de secuencias reportadas en las bases de datos (Kraus & Peschel, 2008).

Betalactámicos

Son una gama de medicamentos utilizados para tratamiento de diferentes enfermedades ocasionadas por bacterias, su estructura tiene un anillo de lactama (VAM, 2020), actúan en el procesos de formación de la pared celular de los microorganismos, por lo que provoca un cambio en la presión osmótica destruyéndolo (Haro, 2019). Existen diferentes grupos de medicamentos β -lactámicos, entre ellos penicilinas, cefalosporinas, carbapénicos, monolactamas e inhibidores de betalactamas (Suárez & Gudiol, 2009).

Bioresistencias a antibióticos (Gen blaZ, gen mecA y mecC)

Desde la aparición de los antibióticos, se ha impulsado a que los microorganismos desarrollen mecanismos de defensa a estos, provocando cambios genéticos y que han podido transmitir entre sí y sobrevivir causando cada vez infecciones más difíciles de tratar (Ventola, 2015). Entre los factores que promueven esta adaptación está el abuso de consumo, la falta de acceso de agua limpia, higiene de las personas y animales, medidas deficientes de prevención en el uso de estos (OMS, 2020).

Staphylococcus aureus ha logrado adaptarse, el primer reporte de resistencia a penicilina se registra en 1940, por presencia del gen BlaZ (Barkema et al., 2006). Este gen puede

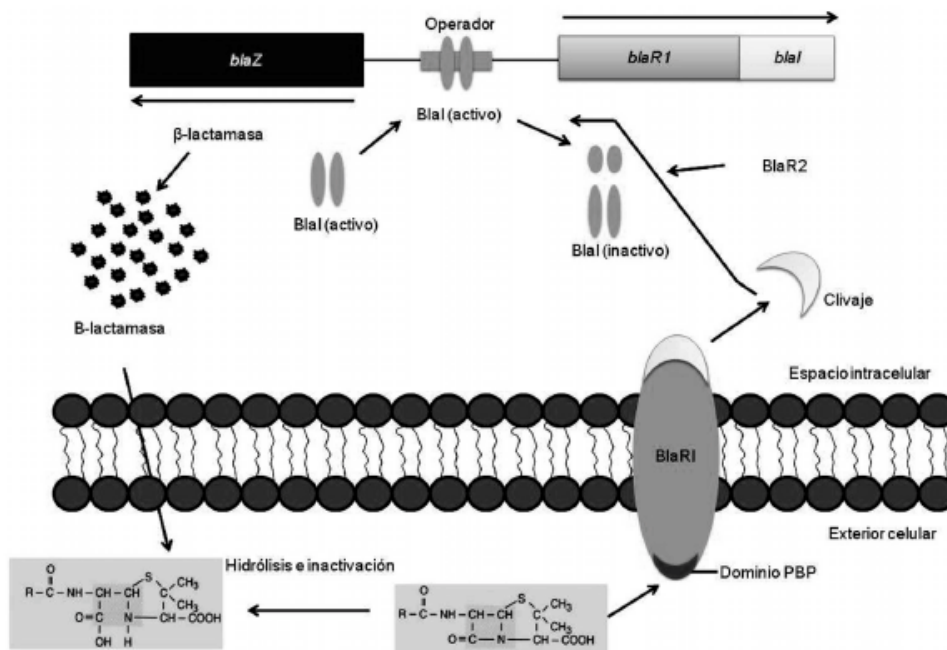
encontrarse cromosómico o en plásmidos, codifica las betalactamasas que se encargan de hidrolizar los compuestos β -lactámicos por afinidad a su anillo (Bagcigil et al., 2012).

El gen *BlaZ* se induce en presencia del antibiótico Figura 5, se une al dominio de reconocimiento a penicilina (P BP), lo que envía una señal para que se dé la activación del gen *BlaZ* y la síntesis de β -lactamasas que hidrolizan al medicamento (Castellano González & Perozo Mena, 2010).

Con esta bioresistencia por parte de *S. aureus*, se desarrolló la elaboración de penicilinas semisintéticas como la Meticilina, Oxacilina, Cloxacilina, mismas que cambia su estructura, imposibilitando las β -lactamasas lleguen al anillo de lactama y las degraden (Ventola, 2015), lo cual posteriormente generaría luego *Staphylococcus aureus* resistentes a Meticilina (MRSA) (Tchamba et al., 2021).

Figura 5

Mecanismo de resistencia *BlaZ*

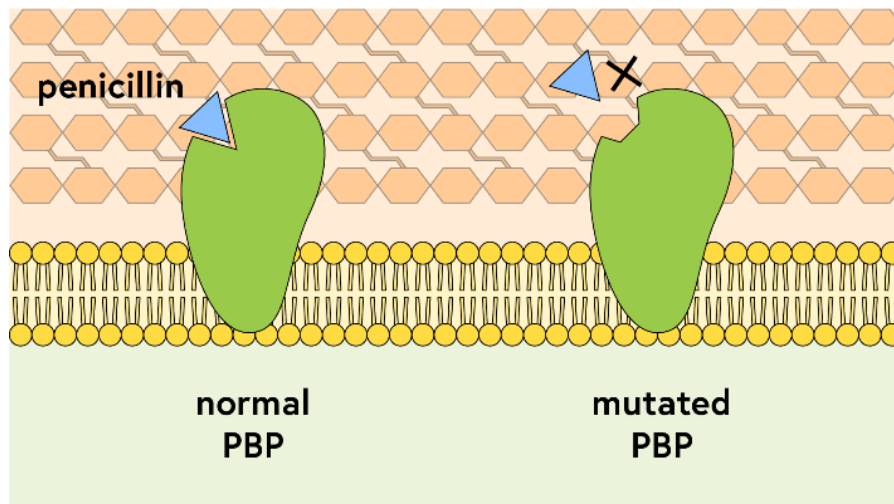


Nota. Adaptado de *Mechanisms of Resistance To β -Lactam Antibiotics in Staphylococcus aureus*, Castellano González & Perozo Mena, 2010, *Kasmera*, 38(1), 18–35.

La resistencia a Meticilina, se da por la adquisición de un elemento genético móvil, un casete de mec (SCCmec) en el cromosoma, este casete posee el gen mecA, que codifica un péptido P BP alterado P BP2a Figura 6, que cambia el sitio de unión al antibiótico (Sekizuka et al., 2019).

Figura 6

Esquema de modificación PBP



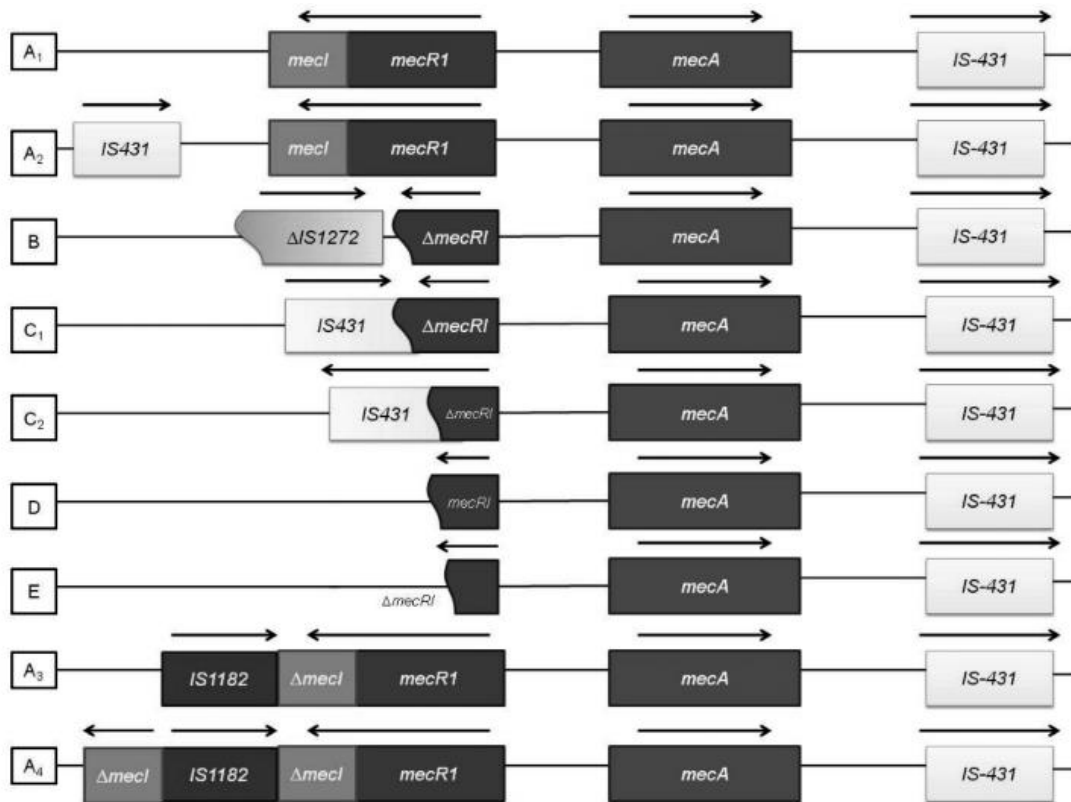
Nota. Adaptado de *What are the Mechanisms of Antimicrobial Resistance?*, por Genome Campus Advanced Courses and Scientific Conferences, 2020, Future Learn.

Posterior a la identificación de este primer mec, se encontraron variantes de este mecB, mecC y mecD Figura 7 (Schwendener, Cotting, & Perreten, 2017), las variantes mecB y mecD fueron reportadas en *Micrococcus*, mientras que mecC se reportó en primera ocasión de aislados de vacas lecheras (Lakhundi & Zhang, 2018).

El casete mec posee la parte estructural de P BP2 (gen mecA), represor (mecl) y un inhibidor de mecl (mecR1), cada variante del SCCmec tiene un cambio en el sitio de unión a la penicilina teniendo diferentes al mecl como Δ IS1272, IS431 o escisión del sitio; codifica una proteína de 30 a 50 kDa (Castellano González & Perozo Mena, 2010).

Figura 7

Esquema de variantes del casete SSCmec



Nota. – Adaptado de *Mechanisms of Resistance To β -Lactam Antibiotics in Staphylococcus aureus*, Castellano González & Perozo Mena, 2010, *Kasmera*, 38(1), 18–35.

En la mayoría de los casos representa al menos del 25 al 50% de las infecciones por *S. aureus* en entornos hospitalarios, son motivo de gran preocupación debido a la alta morbilidad y mortalidad, así como a su bioresistencia a todos los antimicrobianos disponibles (Lakhundi & Zhang, 2018).

La menor eficacia de los antibióticos ha impulsado a tomar acciones y en la actualidad se requiere la investigación de nuevos medicamentos efectivos y métodos de diagnóstico, teniendo como foco a los multirresistentes de prioridad crítica (Iredell, Brown, & Tagg, 2016). Acorde al reporte generado por la OMS (2018), *S. aureus* resistente a meticilina, se encuentra dentro de la

prioridad 2 en la “Lista de prioridades globales de bacterias resistentes a antibióticos para guiar la investigación, el descubrimiento y el desarrollo de nuevos antibióticos”

Técnicas moleculares de identificación

Gracias a la biología molecular, se ha podido desarrollar varias técnicas que permiten un análisis rápido y específico de una determinada enfermedad o presencia de microorganismo, como en el caso de la mastitis, estas pueden ayudar a la identificación de los microorganismos causales y encontrar genes de bioresistencia (Amer et al., 2015).

La PCR se usa como técnica “Gold estándar” para el diagnóstico de muchas enfermedades. Existen modificaciones para el establecimiento de nuevos métodos y técnicas como la PCR múltiple, mediante la cual, se puede lograr amplificar varias regiones que se requieran en un menor número de reacciones (Bolívar, Rojas, & García Lugo, 2014).

Consiste en la amplificación de una región con ayuda de la ADN polimerasa y el uso de primers específicos, ocurre la desnaturalización de la cadena molde, alineamiento del primer y la extensión, cada ciclo nos da varias copias del mismo fragmento de gen (Serrato, Flores, Aportela, & Sierra, 2008; Viljoen, Nel, & Crowther, 2005).

Capítulo III: Metodología

Zona de Estudio

El presente trabajo, parte de la investigación realizada por Andrade & Sánchez, (2018), donde obtuvieron aislados de agentes causales de mastitis bovina de fincas ganaderas, de la cooperativa de producción agropecuaria El Salinerito en la provincia de Bolívar, cantón Guaranda, parroquia Salinas. En el actual trabajo se utilizaron 12 cepas aisladas de *Staphylococcus aureus*.

Los análisis de la investigación se realizaron en los laboratorios de Investigación de Biotecnología Animal, Microbiología del Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura, Carrera de Ingeniería en Biotecnología, y el Laboratorio de Mejoramiento Genético y Sanidad Animal del de la Carrera de Ingeniería Agropecuaria de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

Procedimientos

Activación de cepas

Para la activación de los cultivos de *S. aureus*, se tomó las cepas identificadas de la tesis de Andrade & Sánchez, (2018) de las muestras del proyecto de vinculación "El empoderamiento y capacitación de las mujeres como estrategia contra la mastitis del ganado bovino en la cooperativa de producción agrícola El Salinerito, en la provincia de Bolívar en Ecuador".

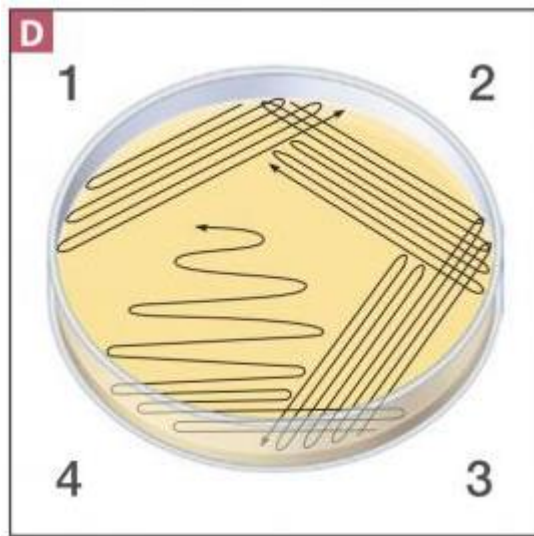
Se utilizó como cepas control las cepas C160 (*S. aureus*) (RNA 16S staph+, nuc+, mecA-, blaZ+), C216 (*S. epidermidis*) (RNA 16S staph+, nuc-, mecA+, blaZ+) y C199 (*S. aureus*) (RNA 16S staph+, nuc+, mecA+, blaZ-), autorizadas para su uso por el Departamento de Bacteriología de la Universidad de Liège, Bélgica.

Las cepas de *S. aureus* se recuperaron en primera instancia en medios altamente ricos que permita la regeneración de las muestras, siendo los más utilizados acorde a Cervantes et al., (2014) agar sangre BBL (40 g por litro de agua con 5% de sangre desfibrilada) y agar de infusión cerebro corazón BD Bbl™ (53 g por litro de agua), el cultivo se incubó a 37 °C de 18 a 24 h en la incubadora (Labnet Incubator Shaker 311-DS), los cultivos se los almacenó a -4 °C para posteriores análisis.

Se realizó la siembra con ayuda de un asa bacteriológica, para lo que se tomó el criovial, se procedió a realizar el estriamiento por agotamiento como lo indica la Figura 8 (Leboffe & Pierce, 2019).

Figura 8

Estriamiento por agotamiento



Nota. Adaptado de *Microbiology: Laboratory Theory and Application, Essentials*, por Leboffe & Pierce, 2019.

De los cultivos realizados, se diferenciaron formaciones de colonias bacterianas en el medio y se procedió a realizar la tinción de Gram siguiendo el protocolo de Becton Dickinson, (2014) primero se realizó la fijación de la bacteria en un portaobjetos, junto al mechero. Las muestras se aplicó el colorante cristal violeta por 1 minuto, se retiró el exceso y añade Lugol por

1 minuto, pasado este tiempo se procedió a decolorar la placa con solución (acetona/etanol 1:1) e inmediatamente se añadió safranina por 1 minuto, para culminar se retiraron los excesos, dejando secar las placas al ambiente, posterior a ello se observó las estructuras con ayuda de microscopio electrónico bajo lentes de 4x, 10 X y 100x con aceite de inmersión (Becton Dickinson, 2014).

Los cultivos observados con crecimiento mixto de colonias, se procedió a realizar el aislamiento en medios selectivos de *S. aureus* como Agar Sal Manitol Bbl™ (111 g por litro de agua destilada), medio Staphylococcus 110 Bbl™ (149.5 g por litro de agua), agar Vogel Jhonson Bbl™ (61 g por litro de agua), se incubaron a 37 °C por 18 a 24 h (Cervantes et al., 2014).

Extracción de ADN

Se subcultivaron las muestras en 3 ml de caldo soya tripticasa (TSB) Merk® (30 g por litro de medio) a 37 °C por 18 a 24 h, en agitación a 200 rpm. Se evaluó el crecimiento por la turbidez, verificando se registre una absorbancia superior a 0.5 en 600 nm, con ayuda del espectrofotómetro.

La extracción de ADN de las cepas en caldo TSB, se realizó con el kit de extracción de Wizard® Genomic DNA purification de Promega, siguiendo las recomendaciones y especificaciones del fabricante con modificaciones (Promega, 2019). Las diferentes soluciones del kit, se detallan en la Tabla 1.

Las muestras aisladas en caldo de cultivo se centrifugaron por completo en un eppendorf de 1.5 ml por 3 minutos a 13 000 rpm (Mikro 200 Hettich Zentrifugen), removiendo el sobrenadante y dejando el pellet. Este se resuspendió con 480 µL EDTA 50 mM y homogeneizándolo con ayuda de vórtex (Velp Scientifica).

Tabla 1

Componentes Kit de Extracción Wizard® Genomic DNA purification de Promega

Componentes del producto	Cantidad
Solución de lisis celular	500mililitros
Solución de lisis de núcleo	25mililitros
Solución de precipitación de proteínas	125mililitros
Solución de rehidratación de ADN	100mililitros
Solución de RNAsa A	1.25mililitros

Nota. Los reactivos vienen incluidos en el kit Wizard® Genomic DNA purification de Promega.

Lisis celular. A la suspensión se añadió 60 µL de lisosima 20 mg/ml, se incubó en termobloque (Thermo-Shaker 1-1.5 ml) a 37 °C por 40 minutos, pasado la incubación, se centrifugaron por 3 minutos a 13 000 rpm eliminando el sobrenadante y se añadió 600 µL de solución de lisis nucleica, homogeneizando con ayuda de la pipeta, se incubó nuevamente a 80 °C por 5 minutos.

Degradación de ARN y Precipitación de proteínas. Se añadió 3 µL de solución de RNAsa, con esta se incubó a 37 °C por 30 minutos. Al tubo con RNAsa se añadió 200 µL de solución de precipitación de proteínas y se homogeneizaron con vórtex por 20 segundos, las muestras se incubaron en hielo por 5 minutos y se procedieron a centrifugar a 13 000 rpm por 4 minutos, el sobrenadante es transferido a un tubo nuevo.

Precipitación y rehidratación de ADN. El sobrenadante transferido, se le añadió 600 µL de isopropanol a temperatura ambiente, este es invertido ligeramente, donde se pudo visualizar una masa fibrosa, lo que se centrifuga a 13 000 rpm por 3 min y cuidadosamente se retiró el sobrenadante, con ayuda de papel absorbente se secó el pellet.

Se hizo lavados del pellet con 600 μL de etanol al 70% a temperatura ambiente e invirtiendo el tubo, se centrifugaron nuevamente el tubo a 13 000 rpm por 3 minutos y cuidadosamente se secó el etanol, dejando los tubos invertidos de 10 a 15 minutos. Una vez seco, se añadió 50 μL de solución de rehidratación de ADN y se dejaron en incubación toda la noche a 4 °C. Para almacenamiento de las muestras se guardaron a -20 °C.

Los extractos de ADN se midieron su concentración y pureza con ayuda de Nano Drop (Thermo Scientific™ 2000), con blanco la solución de rehidratación del kit de Extracción Wizard® Genomic DNA purification de Promega. De los extractos se sacaron alícuotas muestras a concentración de 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Protocolo PCR

Para las diferentes PCR, se utilizaron las muestras identificadas de cocos Gram positivos y como controles las cepas de C160 (*S. aureus*) (RNA 16S staph+, nuc+, mecA-, blaZ+), C216 (*S. epidermidis*) (RNA 16S staph+, nuc-, mecA+, blaZ+) y C199, (*S. aureus*) (RNA 16S staph+, nuc+, mecA+, blaZ-), autorizadas para su uso por el departamento de Bacteriología de la Universidad de Liège, Bélgica.

Los genes en estudio fueron: gen 16S, nuc para identificación de *S. aureus* y los genes de resistencia blaZ, mecA y mecC detallados en la Tabla 2.

Estandarización de PCR dúplex

Para la estandarización de las PCR dúplex, primero se inició con una corrida simple de evaluación de los controles de los genes mecA y mecC, y posterior a ello se estableció la PCR probando genes de manera individual, para unir las condiciones en una PCR dúplex.

Tabla 2

Primers para PCR genes 16S, nuc y de resistencias BlaZ, mecA y mecC

Gen	Primer	Secuencia 5'-3'	Tamaño	Origen
mecC	MecC454-F	GTCCCTAACAAAACACCCAAAGA	454 bp	(Tchamba et al., 2021)
	mecC454-R	GAAGATCTTTTCCGTTTTTCAGC		
16S	27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1500 bp	(Lange et al., 2015)
	1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT		
mecA	mecA-F	AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC	533 bp	(Murakami et al., 1991)
	mecA-R	AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC		
Nuc	Nuc-F	GCGATTGATGGTGATACGGTT	279 bp	(Brakstad, Aasbakk, & Maeland, 1992)
	Nuc-R	AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC		
BlaZ	BlaZ-T	TAAGAGATTTGCCTATGCTT	377 bp	(Olsen, Christensen, & Aarestrup, 2006)
	BlaZ-R	TTAAAGTCTTACCGAAAGCAG		

Nota. Los primers son obtenidos de Macrogen, se reciben liofilizados y se sacan alícuotas de 10 µM para los ensayos. Donde bp son pares de base, mec gen de resistencia a meticilina variante A y C, nuc gen de termonucleasa, BlaZ gen de resistencia a betalactámicos.

PCR evaluación de los controles genes mecA y mecC. Se preparó una PCR de los genes mecA y mecC en referencia al protocolo del laboratorio nacional Tchamba et al., (2021), con adaptaciones a las condiciones del laboratorio de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. La reacción se llevó a un volumen final de 25 µL con las concentraciones de los reactivos acorde a la Tabla 3 y con concentraciones de cada primer de 0.5 µM de manera individual para cada gen.

Tabla 3

Concentraciones de reactivos para PCR Simple de gen mecA y mecC

Reactivo	Concentración final
Buffer+ mg (10 X)	1 X
MgSO ₄ (25 mM)	2.5 mM
dNTP (40 mM)	0.8 mM
Taq HS abm (5 U/μL)	1 U/μL
ADN (20 μg/μL)	20 μg

Nota. Se utiliza BlasTaq™ HotStart DNA Polimerasa de ABM, el buffer y demás son extractos de la misma enzima. Donde X es unidad de concentración de reactivo, mM milimolar, U/μL Unidad de enzima por microlitro de solución, μg/μL microgramos por microlitro de solución.

La amplificación de los genes, se llevó por 35 ciclos, con una desnaturalización inicial a 95 °C por 5 minutos, luego una desnaturalización a 95 °C de 30 segundos, para continuar con el annealing a 55 °C para mecA y 54 °C para mecC por 30 segundos, una extensión a 72 °C por 45 segundos y la extensión final a 72 °C por 10 minutos.

Protocolo PCR Dúplex– mecA y nuc. Para gen Nuc, se partió de las condiciones manejadas en el laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, con modificaciones acorde a la Tabla 4. Se realizó un gradiente de concentración para MgSO₄ y la reacción se llevó a un volumen de 25 μL, las variaciones se hicieron en rangos de 0.5. Como control positivo se utilizaron las cepas de C199, C216 y control negativo la reacción sin ADN.

La PCR para el gen mecA se llevó a cabo siguiendo el protocolo de Erasme en un total de 15 μL para cada reacción como se refleja en la Tabla 3, y para estandarizar el protocolo se usaron gradientes de concentración para la Taq de 0.5, 0.75 y 1 U/μL y de primers de 0.25, 0.30, 0.35, 0.40, 0.45 y 0.50 μM.

Tabla 4

Concentraciones de reactivos para PCR de gen Nuc

Reactivo	Concentración final
Buffer+ mg (10 X)	1 X
Nuc F (10 μ M)	0.4 μ M
Nuc R (10 μ M)	0.4 μ M
mgSO ₄ (25 mM)	1.5 - 3 mM
dNTP (40 mM)	0.8 mM
Taq HS abm (5 U/ μ L)	0.5 U/ μ L
ADN (20 μ g/ μ L)	20 μ g

Nota. Se utiliza BlasTaq™ HotStart DNA Polimerasa de ABM, el buffer y demás son extractos de la misma enzima. Donde X es unidad de concentración de reactivo, mM milimolar, U/ μ L Unidad de enzima por microlitro de solución, μ g/ μ L microgramos por microlitro de solución.

Las condiciones del termociclador para la PCR se llevaron a cabo por 35 ciclos, con una desnaturalización inicial a 95° C por 5 minutos, la desnaturalización a 95 °C de 30 segundos, con temperatura del annealing a 62 °C para gen nuc y 55 °C para mecA por 30 segundos, una extensión a 72 °C por 45 segundos y la extensión final a 72 °C por 10 minutos.

La reacción de PCR dúplex, se probó adaptando a un volumen de 15 μ L y se continuó con gradientes de concentración de primer bajando la concentración del mec A (de mayor intensidad) hasta el límite de 0.1 μ M, finalmente se llegó a las concentraciones de reactivos acorde a la Tabla 5.

La amplificación de los genes mecA y Nuc, mediante PCR Dúplex, se llevó a cabo por 35 ciclos, con una desnaturalización inicial a 94° C por 5 minutos, luego una desnaturalización a 94

°C de 30 segundos, para continuar con el Annealing a 59 °C por 30 segundos, una extensión a 72 °C por 45 segundos y la extensión final a 72 °C por 10 minutos.

Tabla 5

Concentraciones de reactivos para PCR dúplex de gen mecA y Nuc

Reactivo	Concentración final
Buffer+ mg (10 X)	1 X
mecA F (10 µM)	0.1 µM
mecA R (10 µM)	0.1 µM
Nuc F (10 µM)	0.25 µM
Nuc R (10 µM)	0.25 µM
mgSO ₄ (25 mM)	2.5 mM
dNTP (40 mM)	0.8 mM
Taq HS abm (5 U/µL)	1 U/µL
ADN (20 µg/µL)	20 µg

Nota. Se utiliza BlasTaq™ HotStart DNA Polimerasa de ABM, el buffer y demás son extractos de la misma enzima. Donde X es unidad de concentración de reactivo, mM milimolar, U/µL Unidad de enzima por microlitro de solución, µg/µL microgramos por microlitro de solución.

Protocolo PCR gen 16S. Protocolo extraído de (Lange et al., 2015) y adaptado por el proyecto de Mejía-Ortega, (2021) (datos no publicados). La reacción se llevó a cabo en un volumen de 25µL, con las concentraciones de reactivos acorde a la Tabla 6.

La amplificación de los genes 16S, se llevaron por 35 ciclos, con una desnaturalización inicial a 95° C por 5 minutos, luego una desnaturalización a 95 °C de 30 segundos, para continuar con el Annealing a 54 °C por 30 segundos, una extensión a 72 °C por 1.75 minutos y la extensión final a 72 °C por 10 minutos.

Tabla 6*Concentraciones Reactivos para PCR simple 16S*

Reactivo	Concentración final
Buffer+ mg (10 X)	1 X
16S 27F (10 μ M)	0.35 μ M
16S 1492R (10 μ M)	0.35 μ M
mgSO ₄ (25 mM)	1.5 mM
dNTP (40 mM)	0.8 mM
Taq HS abm (5 U/ μ L)	0.5 U/ μ L
ADN (20 μ g/ μ L)	20 μ g

Nota. Se utiliza BlasTaq™ HotStart DNA Polimerasa de ABM, el buffer y demás son extractos de la misma enzima. Estandarizado por Mejía-Ortega, (2021). Donde X unidad de concentración de reactivo, mM milimolar, U/ μ L Unidad de enzima por microlitro de solución, μ g/ μ L microgramos por microlitro de solución.

Protocolo PCR simple, gen blaZ. Protocolo adaptado de (Olsen et al., 2006). La reacción se llevó a cabo en un volumen de 25 μ L con las concentraciones de reactivos de la Tabla 7. Se utilizó como control positivo la cepa C160 y como control negativo una muestra de ADN de *Bacillus* y una sin ADN.

La amplificación de los genes BlaZ, mediante PCR simple, se llevó a cabo por 35 ciclos, con una desnaturalización inicial a 94 °C por 5 minutos, luego una desnaturalización a 94 °C de 30 segundos para continuar con el annealing a 54 °C por 30 segundos, una extensión a 72 °C por 30 segundos y la extensión final a 72 °C por 10 minutos.

Tabla 7*Concentraciones Reactivos para PCR simple BlaZ*

Reactivo	Concentración final
Buffer+ mg (10 X)	1 X
16S 27F (10 μ M)	0.5 μ M
16S 1492R (10 μ M)	0.5 μ M
mgSO ₄ (25 mM)	3 mM
dNTP (40 mM)	0.8 mM
Taq HS abm (5 U/ μ L)	0.5 U/ μ L
ADN (20 μ g/ μ L)	20 μ g

Nota. Se utiliza BlasTaq™ HotStart DNA Polimerasa de ABM, el buffer y demás son extractos de la misma enzima. Donde X unidad de concentración de reactivo, mM milimolar, U/ μ L Unidad de enzima por microlitro de solución, μ g/ μ L microgramos por microlitro de solución.

Análisis mediante electroforesis.

La corrida electroforética para evaluar la integridad de ADN se realizó en un gel de agarosa 0.8%; para el análisis de los amplicones, se tomó una alícuota de los productos de PCR, aproximadamente 6 μ L de ADN con buffer de carga BlueJuice (Invitrogen™ 10 X) y se realizó electroforesis en gel de agarosa al 2%, junto a un marcador molecular para comprobar el tamaño del mismo, estos fueron teñidos con Sybr safe (Invitrogen™ 6X). Para visualizar los productos amplificados se hizo uso de transiluminador UV (Felix 1040 de placa oscura, base oscura de luz UV y placa top de luz blanca).

Secuenciación Sanger

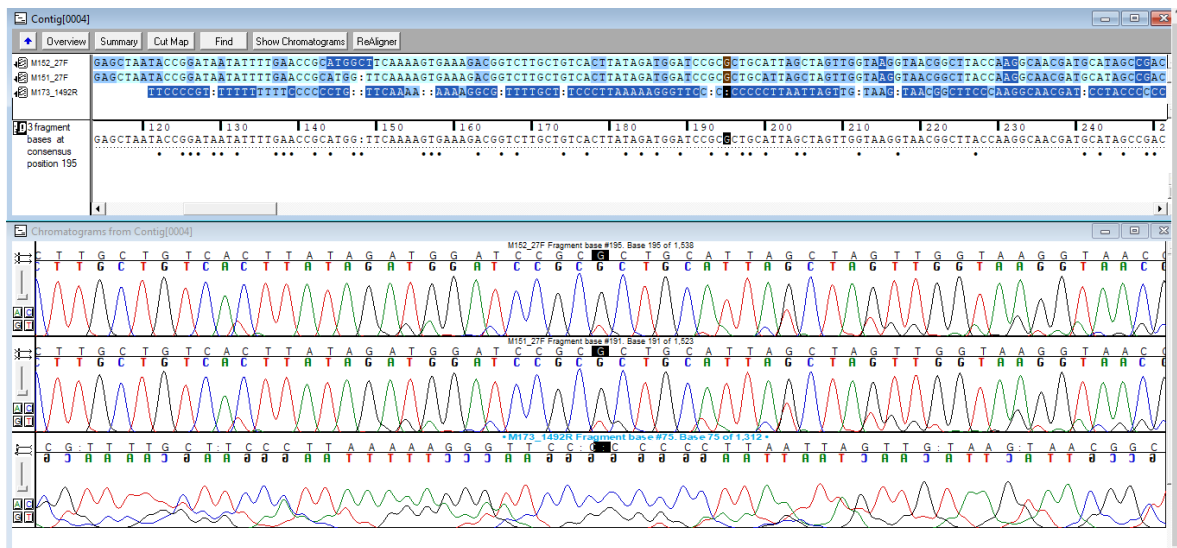
Para la secuenciación se tomaron los productos de PCR de 3 diferentes muestras y fueron secuenciados por la empresa MacroGen, Inc., utilizando el método descrito por Sanger (Sanger, Nicklen, & Coulson, 1977) y los primers blaZ y 16S.

Evaluación de Secuenciación y homología. Una vez obtenidas las secuencias, se procedió a analizarlas y curarlas con ayuda del programa Sequencher 5.4.6.; aquí se ve las secuencias y los cromatogramas que generan Figura 9 y se depuraron donde presentaban las interferencias. Las secuencias, se compararon con secuencia de referencia de la base de datos de GenBank de “NCBI nonredundant nucleotide database, nt” para la corrección de donde se determinaron incongruencias.

Se compararon porcentajes de identidad de las secuencias para el gen de antibioresistencia BlaZ con secuencias reportadas de *S. aureus* en el Ecuador, a través del sitio web Pathosystems Resource Integration Center (PATRIC), también se buscaron secuencias de *Staphylococcus coagulasa* negativos bajo las anotaciones del mismo se compararon las secuencias por alineamiento múltiple en MegaX y se determinó el distanciamiento por pares.

Figura 9

Esquema generado por el programa Sequencher



Nota. Se puede ver los alineamientos de las secuenciaciones entre los pares de primers, dando una secuencia consenso que corresponde al gen, en la parte inferior se ven los diferentes cromatogramas, donde en el último no se especifica con certeza a que nucleótido se refiere, debido a la interferencia de señal.

Análisis de filogenia

Con las secuencias del gen 16S obtenidas de las diferentes muestras, se procedió a comparar con secuencias reportadas en la base de datos de GenBank, a través del sitio web Pathosystems Resource Integration Center (PATRIC), donde se establecieron los criterios de búsqueda acorde a la Tabla 8.

Tabla 8

Criterios de búsqueda PATRIC

Parámetro	Característica
Organism	<i>Staphylococcus</i>
Genome Status	WSG
	Cow, Bos taurus
Host	Holstein
	Cattle

Se buscaron datos reportados en el Ecuador de aislados de *Staphylococcus* sin importar el hospedero y en demás zonas únicamente se tomaron secuencias de aislados de vaca, estudios de mastitis o provenientes de muestras de leche. Los organismos identificados, se buscó con las anotaciones de PATRIC los correspondientes a las secuencias de 16S o como SSU Ribosomal (Unidad pequeña Ribosomal).

Las secuencias obtenidas se procedieron a realizar el alineamiento múltiple y se construyó el árbol filogenético mediante el método de máxima verosimilitud y con la ayuda del software MEGA-X con 1000 bootstraps, se utilizó como grupo externo las secuencias de 16S de *Bacillus cerus* y *Lactobacillus helveticus*.

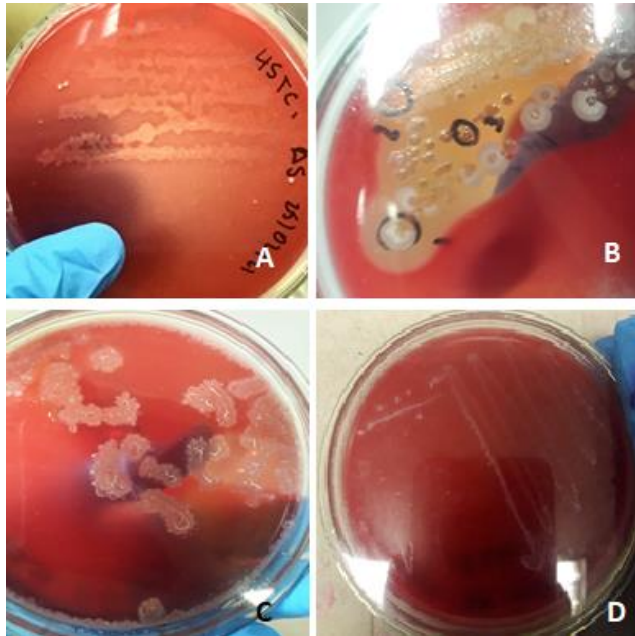
Capítulo IV: Resultados

Activación de cepas

De las 35 muestras identificadas como *S. aureus* por Andrade & Sánchez, (2018), se diferenció beta hemólisis en agar sangre Figura 10A y B, colonias irregulares con una estría blanca en la superficie Figura 10C y colonias uniformes grises Figura 10D.

Figura 10

Cultivos bacterianos en Agar Sangre

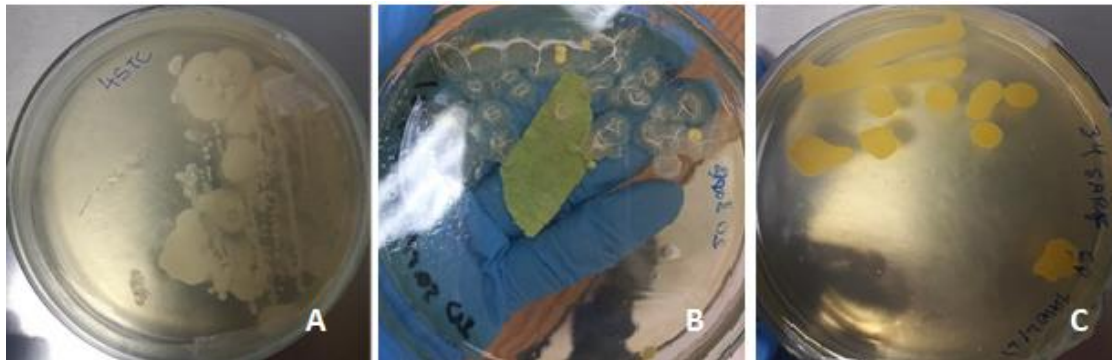


Nota. A) Beta hemólisis vista desde la parte posterior; B) Beta hemólisis y diferenciación de varias colonias; C) Colonias irregulares con estría parte superior; D) colonias uniformes grises, sin hemólisis.

De los cultivos en BHI se observaron muestras con crecimiento bacterianos blanquecinos entre colonias uniformes y otras con borde irregular Figura 11A, crecimientos irregulares con estrías blancas Figura 11B y cultivos de colonias amarillentas Figura 11C.

Figura 11

Cultivos Bacterianos en BHI

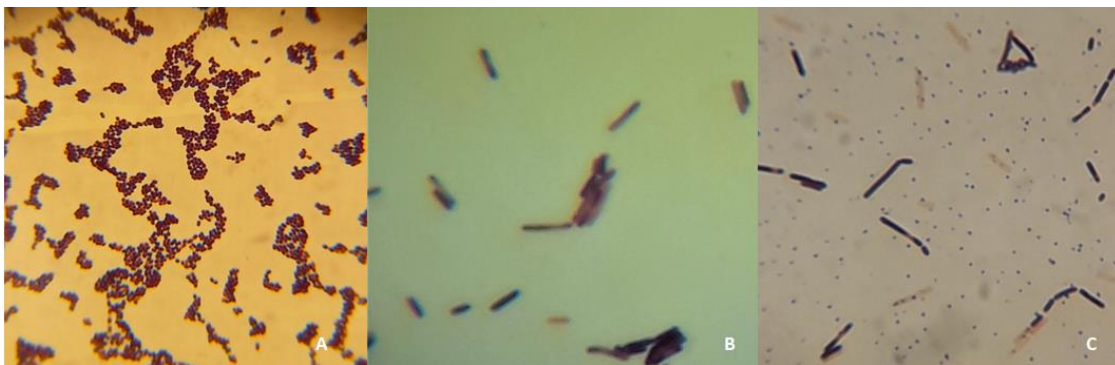


Nota. A) Crecimiento de dos diferentes colonias una borde irregular y una uniforme; B) Crecimiento dos colonias, una borde irregular blanquecino con una estría a lo largo y una colonia uniforme amarillenta; C) Cultivo bacteria amarillenta.

Estos cultivos se sometieron a tinción Gram, donde se observó la presencia de cocos Gram positivos Figura 12A, bacilos Gram positivos Figura 12B y placas con la presencia de ambos Figura 12C.

Figura 12

Muestras bacterianas en tinción Gram.



Nota. A) Cocos Gram positivos agrupados en racimos; B) Bacilos Gram positivos; C) cultivo mixto de cocos y bacilos Gram positivos.

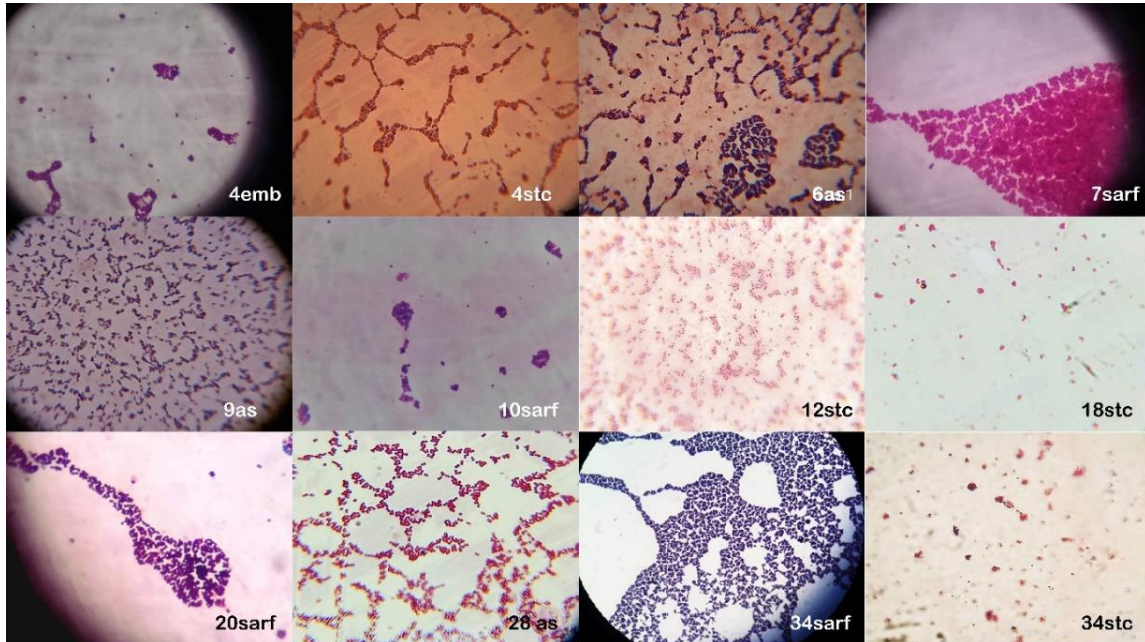
Del total de cultivos realizados, 5 muestras (13.89%) no presentaron crecimiento alguno en los medios.

Aislamiento de cultivos mixtos

De los cultivos mixtos se aislaron los cocos utilizando medios selectivos Sal manitol, Vogel Jhonson y Agar *Staphylococcus* 110. Se identificó 12 cultivos (33.33%) de cocos Gram positivos Figura 13, 19 cultivos (52.78%) de bacilos Gram positivos, mientras que los 5 restantes a pesar de ponerles en medio agua peptona como medio de mantenimiento para su recuperación, no presentaron crecimiento.

Figura 13

Tinción Gram de los cultivos aislados.



Nota. Cocos Gram positivos en disposición de racimos de los diferentes aislados obtenidos. 4emb, 4stc, 6as, 7sarf, 9as, 10sarf, 12stc, 18stc, 20sarf, 28as, 34sarf y 34stc es codificación de las diferentes muestras de *Staphylococcus*.

Extracción de ADN

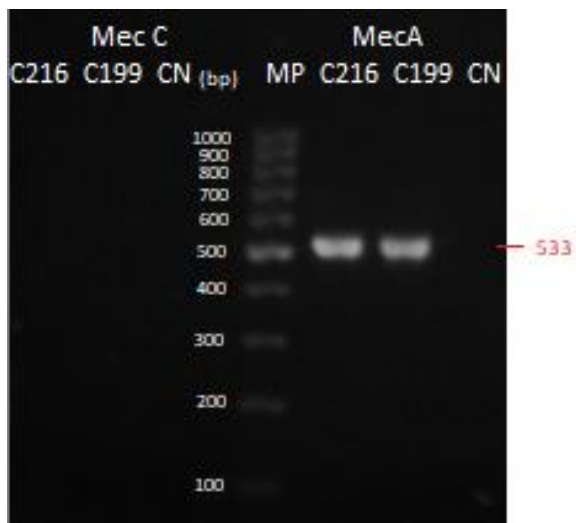
Las extracciones fueron evaluadas con ayuda de Nano Drop y se obtuvieron alícuotas de 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, las diferentes concentraciones medidas de ADN se muestra en el apéndice 1 las concentraciones obtenidas de las diferentes muestras aisladas.

Corridas Electroforesis genes de resistencia

Las corridas de las muestras control C216, correspondiente a (*S. epidermidis*) (RNA 16S staph+, nuc-, mecA+, blaZ+) y C199, (*S. aureus*) (RNA 16S staph+, nuc+, mecA+, blaZ-), con los primers mecA y mecC, se puede comprobar la presencia del gen mecA, pero no del mecC Figura 14.

Figura 14

Electroforesis de PCR controles gen mecA y mecC



Nota. Electroforesis en gel de agarosa al 2% (120V por 1h30min), para detección de la amplificación genes mecA y mecC, visualizado bajo luz UV después de la tinción con Sybr safe, muestra resultado positivo las muestras de PCR con primer mecA, no del mecC. bp pares de base, MP marcador de peso molecular, CN control negativo, mec gen de resistencia a meticilina, C216 *S. epidermidis*, C199 *S. aureus*.

En cuanto a la estandarización de la PCR para gen mecA y nuc, con las diferentes modificaciones en las concentraciones realizadas como se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9*Estandarización de PCR dúplex*

Tipo	Primer	Tamaño bp	[mgSO4] μ M	Taq U/ μ l	[Primer] μ M	Amplificación
Simple	nuc	279	1.5	0.5	0.4	33%
Simple	nuc	279	3	0.5	0.4	92%
Simple	mecA	533	2.5	0.75	0.5	100%
				1		
					0.25	
Simple	mecA	533	2.5	0.5	0.30	75%
					0.35	
					0.40	
Simple	mecA	533	2.5	0.5	0.45	100%
					0.50	
					0.1	
Dúplex	mecA	533	2.5	1	0.25	100%
	y nuc	279				

Nota. Las electroforesis se realizan en gel de agarosa al 2% (120V por 1h50 minutos), visualizado bajo luz UV después de la tinción con Sybr safe, por lo general se utilizan las cepas control para su determinación. bp pares de base, U/ μ L Unidad de enzima por microlitro de solución, μ M Concentración Micromolar.

Las corridas se muestran en el Apéndice B. En cuanto a la evaluación final de la PCR dúplex para los genes nuc y mecA, en la Figura 15 se ve que se amplificó la banda inferior correspondiente a las 279 bp del gen nuc, mientras que la banda de mecA en 533 bp únicamente se la observó en el control positivo.

Figura 15

Electroforesis PCR dúplex gen *mecA* y *nuc*



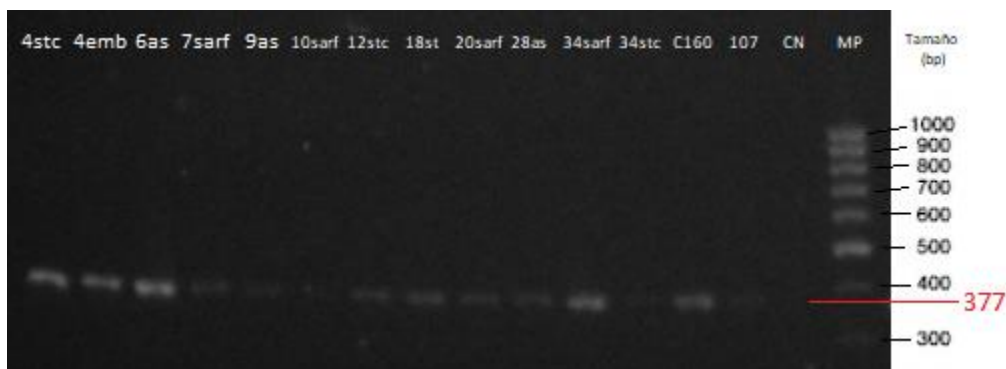
Nota. Electroforesis en gel de agarosa al 2% (120V por 1h50 minutos), para detección de la amplificación por PCR dúplex de genes *mecA* y *nuc*, visualizado bajo luz UV después de la tinción con Sybr safe, muestra resultado positivo a gen *nuc* y negativo a *mecA* en las muestras, a excepción del control positivo donde se ve ambas bandas. bp pares de base, *nuc* gen de termonucleasa, *mec* gen de resistencia a meticilina, CN control negativo, C199 *S. aureus*, 4emb, 4stc, 6as, 7sarf, 10sarf, 12stc, 18stc, 20sarf, 28as, 34sarf, 34stc muestras de *Staphylococcus aisladas*.

Para la PCR de identificación de presencia del gen *BlaZ*, todas las muestras corridas presentan las bandas a la misma altura del control C160 en 377 bp a excepción de 107 y CN

Figura 16.

Figura 16

Corrida electroforesis gen *BlaZ*



Nota. Electroforesis en gel de agarosa al 2% (120V por 1h30 minutos), para detección de la amplificación gen BlaZ y visualizado bajo luz UV después de la tinción con Sybr safe, todas las líneas muestran resultado positivo a excepción de 107 y CN que son muestras de controles negativos, se contrasta con C160 control positivo a BlaZ de *S. aureus*. bp pares de base, nuc gen de termonucleasa, BlaZ gen de resistencia a betalactámicos, 4emb, 4stc, 6as, 7sarf, 10sarf, 12stc, 18stc, 20sarf, 28as, 34sarf, 34stc muestras de *Staphylococcus*.

Evaluación de la secuenciación

Primer blaZ

Se obtienen las secuencias consenso de las muestras 4stc, 6as y 34stc; en formato FASTA Apéndice C, mismas que en comparación con secuencias de la base de datos de GenBank con la herramienta BLAST, determinando el porcentaje de identidad y Query como se ve en la Tabla 10.

Se evaluaron las secuencias obtenidas y se realizó el alineamiento de las mismas, donde se puede constatar que la secuencia correspondiente a 4stc varía en diferentes nucleótidos, sin embargo, al evaluar los cromatogramas correspondientes en la posición de estos nucleótidos se observó que mantienen un pico significativo para el mismo, sin interferencias en la señal del respectivo nucleótido Figura 17, por lo que se trató de una variante de la secuencia para BlaZ.

Figura 17

Alineamiento de secuencias obtenidas



Tabla 10

Relación de identidad con secuencias base de datos GenBank

Muestra	Organismo	Query	P. identidad
4 stc	<i>Staphylococcus aureus</i>	100%	100%
6 as	<i>Staphylococcus</i>	100%	100%
34 stc	<i>Staphylococcus</i>	100%	100%

Nota. Tabla resumen de la comparación mediante BLAST en la base de datos GenBank, 4stc, 6as y 34stc muestras secuenciadas de BlaZ.

Acorde al número de coincidencias mostradas en la base de datos se determinó que las muestras 6 as y 34stc asemejan con el género *Staphylococcus*, ya que se ve tuvieron identidad de 100% de identidad y query con *S. epidermis*, *S. caprae*, *S. warneri* perteneciente al gen de BlaZ; mostraron también alta relación con *Bacillus cerus* y *Nocardia veterana*. En cuanto a 4 stc y acorde al número de coincidencias mostradas, se determinó que es secuencia correspondiente

a gen de resistencia betalactámicos de BlaZ de *Staphylococcus aureus*, con 100% de identidad y query.

En la evaluación por pares de distanciamiento entre estas y secuencias del Ecuador, se obtuvo los datos presentados en la Tabla 11, con ayuda de MegaX.

Tabla 11

Valores de distanciamiento por pares.

	NVH97A	pMW2	U43087.1	pMS33	UE201	UE220	UE1146	34stc_BlaZ	6as_BlaZ	4sct_BlaZ
34stc_BlaZ	0.020	0.023	0.000	0.020	0.054	0.054	0.003			
6as_BlaZ	0.020	0.023	0.000	0.020	0.054	0.054	0.003	0.000		
4sct_BlaZ	0.014	0.000	0.023	0.014	0.041	0.041	0.026	0.023	0.023	

Nota. - Distanciamientos entre las cepas de estudios y secuencias de referencias a gen BlaZ. Donde NVH97A es Cepa de referencia *S. haemolyticus*, U43087.1 *Enterococcus faecalis*, pMS33 *Staphylococcus epidermidis*, pMW2, UE201, UE220, UE1146 cepas de *S. aureus* base de datos Genbank, registradas de aislados del Ecuador, 34stc, 6as y 4sct cepas de estudio.

Análisis de Filogenia gen 16S

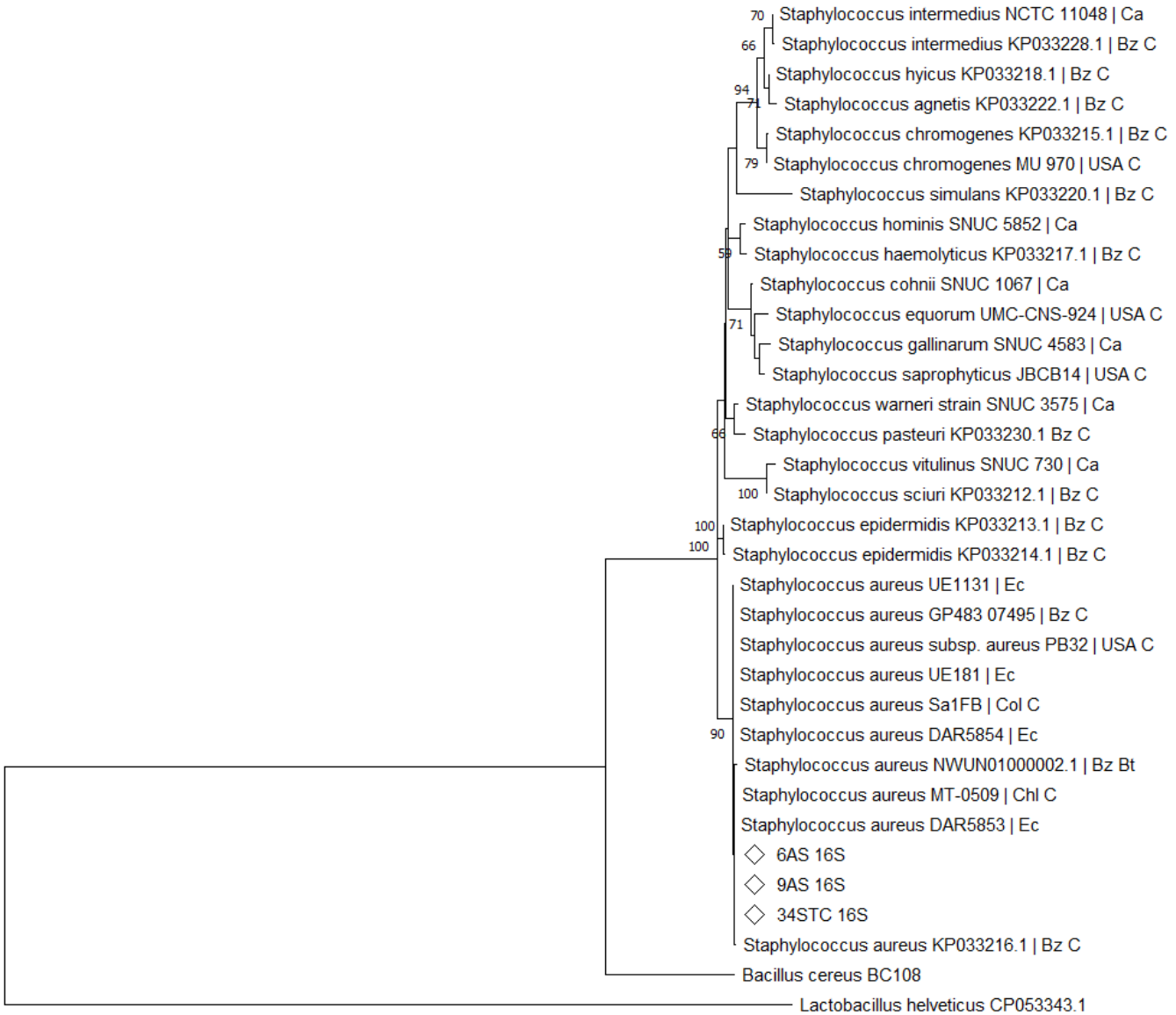
Las diferentes secuencias obtenidas, son alineadas en el programa MegaX, mismas que se reportan en el Apéndice 9, el alineamiento se realizó con ClustalW incluyendo los outgroups, para el ensamblaje del árbol, se ejecutó con 1000 bootstraps el método de máxima verosimilitud con una delección parcial en los sitios de gap. Se evidenció el árbol de probabilidad de registro más alta, por el modelo K2+G+I de -4315.384, y una tasa de sitios invariables del 64% Figura 18, determina en el árbol, donde se agrupa los taxones de *S. aureus*, de referencias registradas del Ecuador, incluyendo las muestras de estudio, muy cercano se diferencia a *S. epidermis*.

Los soportes de los clados se modificaron para verse sobre el 50%, observándose soportes de 70 para la diferenciación entre *S. intermedius*, *S. hyicus*, 79 para en *S. simulans* con 100 de diferencia *S. vitulinus* y *S. sciuri*; *Bacillus cerus* y *Lactobacillus helveticus*, forman grupos monofiléticos. Mientras que, no se logró diferenciar por completo entre *S. warneri* y *S. pasteurii*; *S. agnetis* y *S. hyicus*; *S. hominis* y *S. haemolyticus*, al igual que entre *S. cohnii*, *S. equorum*, *S.*

gallinarum y *S. saprolhyticus*, ya que se muestran dentro de un mismo clado con valores de soporte inferiores al 50.

Figura 18

Árbol filogenético 16S



0.10

Nota. – Ca muestra aislada de Canadá, Bz C muestra aislada en Brasil de vaca, USA C muestra aislada en Estados Unidos de vaca, Chl C muestra aislada en Chile de vaca, Ec muestras en Ecuador de aislados de Humanos.

Capítulo V: Discusión

S. aureus fue aislado en primera ocasión en 1880 por Alexander Ogston de una infección quirúrgica, ha sido ampliamente estudiado en muestras aisladas de provenientes de humanos y su capacidad de ocasionar múltiples infecciones a nivel de tejido blando, piel, sangre y tracto respiratorio, y sobre todo el factor de adquirir múltiples resistencias a antibióticos lo ha hecho un agente de estudio hasta la actualidad, ya que cada vez resulta de mayor complejidad su tratamiento (Lakhundi & Zhang, 2018; Ruegg, 2017; Ventola, 2015).

Andrade & Sánchez, (2018) determinaron una prevalencia del 84.5% de mastitis en las 58 vacas analizadas en las fincas estudiadas de la parroquia Salinas de Bolívar Ecuador, donde de los 67 aislados, el 55.2% representa a *S. aureus*, en estudios realizados en el Ecuador muestran prevalencias de infecciones de *S. aureus* como Guazha, (2020) reporta 44.7% de *S. aureus* en estudio realizado en Galápagos, Acuña & Rivadeneira, (2008) reporta un 55.5% en Pichincha, Amer et al., (2018) reporta un 25.8% en Machala, mientras que Chasi, (2015) reporta 30.77% en Cayambe. Acorde a Aguilar & Álvarez, (2019), los agentes causales de mastitis y la tasa de infección de varía de una zona a otra, lo que explica los porcentajes de prevalencia diferentes.

De los aislados, para el trabajo actual se recuperaron 12 de las muestras criopreservadas. Acorde a Guerra P. & Castro F, (2019) y Murray & Gibson, (2020), durante el proceso al someter al cambio de temperatura, en el medio tiende a darse la formación de cristales tanto intra como extra celular, cambiando la osmoralidad normal del medio, promoviendo la salida del agua y por ende afectación en estructuras internas, incluso puede llegar a tener modificaciones a nivel de ADN.

Del total de los aislados, en contraste con 4 muestras analizadas por Maya-Delgado A., (2019, datos no publicados), tomadas de los mismos aislados, se tiene un total de 16 muestras estudiadas. Se confirma la identificación generada por Andrade & Sánchez, (2018) por amplificación en de gen nuc de termonucleasa en 279 bp en la PCR dúplex .

La amplificación de gen nuc para identificación de *S. aureus*, va acorde a lo descrito inicialmente por Liebl, Rosenstein, Götz, & Schleifer, (1987) y amplificado por PCR por Brakstad et al., (1992), quienes determinan a este como gen de actividad extracelular como Tnasa específica para *S. aureus*. A pesar que se visualizaron bandas tenues en las muestras de 10sarf y 34sarf, la estandarización es sensible para la identificación de genes, Noboa (2020), muestra identificación de *S. aureus* con un 73.24%, los datos mostrados van acorde a Jayaratne & Rutherford, (1999) y Louie et al., (2002) que muestran sensibilidad de detección cercana al 100%.

En cuanto a los *Staphylococcus* resistentes a meticilina MRSA, en gran mayoría se registran reportes de aislados de muestras de humanos (Murakami et al., 1991; Jaffe, Lane, Albury, & Niemeyer, 2000), aunque hay reportes en varios países como China e India que se encuentra la presencia del gen mecA y relación en mastitis (Aguilar & Álvarez, 2019), Tchamba et al., (2021) presenta comparaciones de aislados en diferentes muestras de animales como vacas, perros, humano, caballos, gato y fomites. En el Ecuador hay reportes de aislados del Carlos Andrade Marín de cepas MRSA por Noboa, (2020) y también registros de secuencias en la base de datos de aislados de humanos. En las muestras estudiadas se encuentra la amplificación en los 533 bp en el control positivo, lo que quiere decir que en la zona no hay la existencia de la antibioresistencia por genotipo, lo mismo que va acorde al fenotipo mostrado mediante los antibiogramas presentados por Andrade y Sánchez, (2018) y lo analizado por Maya-Delgado A., (2019, datos no publicados).

De las muestras estudiadas en cuanto a la amplificación del gen blaZ se determina la amplificación de fragmento de 377 bp en el 100% de las muestras estudiadas, este dato es mayor

a lo mencionado por (Frank Møller Aarestrup & Jensen, (1998) que reporta rangos del 10 al 70% la presencia de este gen en muestras provenientes de bovinos, mientras que en provenientes de humanos este llega al 100%. Aunque en los últimos años estos han ido en aumento. Esta se reporta por primera ocasión en 1942 (Lakhundi & Zhang, 2018; Ruegg, 2017), solo dos años después de la aparición de la penicilina, este al ser el primer antibiótico descubierto y su uso efectivo para curar en la Segunda Guerra Mundial, no hizo se tenga control y conocimiento de periodos, dosis, vías de administración y demás, generando la resistencia y esparciéndola en gran parte de la población humana y animal. Esto generó 10 años de epidemia hasta la síntesis de las penicilinas semisintéticas. Actualmente la falta de higiene, malas prácticas de ordeño, mala administración de tratamientos mantiene se siga conservando la misma (Cervantes et al., 2014).

Las muestras comparadas con secuenciadas de gen BlaZ reportadas en la base de datos de muestras Ecuatorianas de aislados de humanos, se hace esta comparación ya que en el país no existen muestras de aislados de vacas o de leche y también con las secuencias de *Staphylococcus coagulasa* negativos CNS *S. haemolyticus*, *S. epidermis* y *Enterococcus Fecalis*, como se determina, existen variantes de este gen en el país, aunque muy relacionadas, ya que en los distanciamientos estos van del rango de 0.003 a 0.05, Frankham, Ballou, Briscoe, & McInnes, (2002) mencionan que valores cercanos al cero significa que hay una alta relación entre los genes comparados con las poblaciones. Incluso se registró una distancia de 0.000 con las muestras 34stc, 6as y *Enterococcus fecalis*, sin embargo no se trata de una muestra de este microorganismo, ya que como se determinó tuvieron la amplificación del gen nuc y secuenciación de BlaZ, determinando pertenece a *S. aureus*. La relación entre *S. aureus* y las muestras de CNS muestran evidencia de la transferencia horizontal de genes de resistencia entre las diferentes bacterias, esto va acorde a lo reportado por Olsen et al., (2006), donde muestra la evolución de

BlaZ y variantes del mismo, además de la relación entre los diferentes microorganismos estudiados por transferencia horizontal de genes.

Existen varios estudios realizados sobre *S. aureus*, su identificación y determinación de genes de resistencia, sin embargo en el Ecuador, los análisis a nivel molecular reportados, son de aislados de muestras de humanos o en el caso de Amer et al., (2018), quien presenta una filogenia de diferentes agentes causales de mastitis bovina en el Oro, las secuencias generadas no se han reportado, de igual manera las secuencias de referencia son de diferentes aislados, no específicamente de vacas, leche o derivados.

De la amplificación de 16S, se observó que las diferentes secuencias que se obtuvieron se agruparon con las secuencias consenso obtenidas de Genbank y PATRIC en un mismo clado con todas las referentes a *S. aureus*, no se logra diferenciar, si hay variantes por biogeografía o en cuanto a diferentes hospederos, ya que los aislados de humanos y las de vaca se agruparon en el mismo clado, de igual manera en diferencias por países se identifican las secuencias reportadas de aislados de Brasil, Chile, Colombia, Ecuador, USA y Canadá dentro del mismo clado, con soporte de 90, esto va acorde a lo mostrado por Amer et al., (2018) y Lange et al., (2015), ya que al usar el gen ribosomal 16S, es una secuencia muy conservada y no se logra determinar diferencias entre estos.

Las variaciones que más se han determinado en *S. aureus* han sido en las proteínas y factores de virulencia que difieren acorde a cada región y hospedero (Cervantes et al., 2014), sin embargo, por procesos de criopreservación o congelamiento, es posible se den afectaciones en la membrana y cambios a nivel de ADN, disminuyendo la cantidad de moléculas que la rodean, mismas que a más de protección le permite la adhesión y virulencia (Ohtomo, Yamada, & Yoshida, 1988).

Al haber tenido las muestras criopreservadas, es posible se haya perdido cierta información genética, Noboa, (2020) reporta cepas de bacterias que han perdido su resistencia

de *mecA*, en comparación a un estudio inicial con uno realizado dos años después con muestras criopreservadas, sin embargo ese no ocurre, ya que en relación a *BlaZ* este permanece en las cepas de *S. aureus*, como parte de la región de codificación a P BP regulado por un operón que se induce en presencia del antibiótico (Castellano González & Perozo Mena, 2010) y en cuestión a *mecA*, no se habían visto resistencias por antibiogramas.

Los datos no especifican la proveniencia de las diferentes muestras de *S. aureus*, ya que están muy relacionadas entre sí y acorde a lo generado por Ramos, (2015), determina canales de comercialización de animales siendo el de gran afluencia en la zona la mediada por el GAP en Guaranda, donde participan productores provenientes de Ambato, Chimbo, San Miguel, Caluma, Riobamba, Echeandía y en mayor proporción productores de Guaranda incluyendo en estos provenientes de Salinas, lo que muestra que los semovientes tienen diversas dinámicas y puede ser un factor determinante para el paso de factores infecciosos epidemiológicos, por lo que el seguimiento de estos y las interacciones entre productores resultan factores claves.

La presencia de genes de resistencia es de gran preocupación ante la salud pública, ya que acorde a la OMS (2020) en los últimos años, muchas de las infecciones causadas por bacterias multiresistentes en humanos tienen origen animal, sin embargo el estudio de *Staphylococcus* asociados a mastitis en el Ecuador, no ha sido explotado en su totalidad, en su mayoría los estudios van enfocados a resistencias en aislados humanos y resistencias por apariciones nosocomiales. Si bien como se determinó las cepas de *S. aureus* no presentan el gen *mecA* y por ende tienen la susceptibilidad a Bacitracina, Neomicina, Cefotaxima y Oxitetraciclina, es inminente la búsqueda de nuevas vías, controles que permita detener la infección generada por *S. aureus*.

Este trabajo presenta la importancia en la rapidez de identificación de antibioresistencias para un mejor planteamiento de la acción a tomar para los tratamientos o la búsqueda de alternativas Kraus & Peschel, (2008) proponen el uso de CAMPs como alternativa a la infección

por *S. aureus*, estos son enzimas catiónicas que recubren varias proteínas aniónicas de la superficie celular evitando se adhiera y produzca toxinas, a su vez Ruegg, (2017) y Ventola, (2015) mencionan el uso de vacunas como alternativas.

O como lo mencionado por VAM, (2020), Clavamox® que se presenta en conjunto con ácido clavulánico, el cual actúa como inhibidor suicida de la β -lactamasa ayudando que la amoxicilina se una al sitio de P BP. La OMS (2018) en el reporte de la lista global de prioridad de resistencia a antibióticos propone incentivar la investigación de nuevas combinaciones con inhibidores como el Ac. Clavulánico, sin embargo para esto es necesario tener una identificación previa y screen genético de antibioresistencias que permita dar esta investigación, ya que al tener el gen mec en alguna de sus variantes, resultaría innecesario la misma.

Capítulo VI: Conclusiones

Mediante la Estandarización de la PCR simple y múltiple se pudo identificar de manera rápida la identificación de *S. aureus* por amplificación de gen nuc, la existencia de antibioresistencia a betalactámicos de primera generación por presencia de gen BlaZ y la susceptibilidad a antibióticos semisintéticos de segunda por la ausencia de gen mecA, estos análisis mostraron una sensibilidad de identificación del 100% en las muestras estudiadas.

Los aislados de *S. aureus*, recuperados de las fincas ganaderas de Salinas de Guaranda, muestran un alto índice de resistencia a betalactámicos con la presencia del gen BlaZ, lo que implica riesgo en la salud pública, ya que como se observó en la relación con muestras de *Staphylococcus coagulasa* positivos y negativos, la transferencia horizontal de genes genera resistencias en diferentes bacterias, el estudio, presenta una ventaja para la propuesta de alternativas a los tratamientos en cuanto a las cepas resistentes.

Con la secuenciación del gen 16S y contrarrestando la amplificación nuc, se pudo determinar que el 100% de las muestras de estudio se trataban de *S. aureus*, ya que el gen nuc es de la enzima termonucleasa específico para este y en cuanto a 16S, lo que confirma la identificación microbiológica realizada en el estudio previo por Andrade & Sánchez, (2018). Las comparaciones con la base de datos de GenBank y las relaciones muestran alta similitud a *S. aureus*, agrupando las muestras de estudio bajo el mismo clado con los taxones de cepas registradas como *S. aureus* tanto en Ecuador, Brasil, Chile, USA, Colombia y Canadá, nos da un indicio de que estos están emparentados.

El gen mecA no se detectó en ninguna de las muestras de estudio, lo que hace factible el tratamiento con Cloxacilina, Norfloxacin, Sulfa con Trimetropim, Amoxicilina con Ácido Clavulánico continuar con el uso de antibióticos, sin embargo, se tiene que cumplir por completo los tratamientos, dosis y sobre todo la prevención.

Capítulo VII: Recomendaciones

Analizar el resto de aislados bajo secuenciación, que permita determinar si existen más variantes del gen de antibioresistencia BlaZ en la zona y prevalencias del mismo.

Se puede realizar un screen genético de las bacterias de *S. aureus*, para determinar los perfiles de resistencia, factores de virulencia y proteínas de membrana, para conocer a fondo el microorganismo que está afectando y poder generar un mecanismo de tratamiento. De igual manera, esto ayudaría a identificar una forma rápida de diagnóstico del agente causal diferenciando de otro tipo de *Staphylococcus*. Que incluso puede ayudar a determinar distribuciones por biogeografía debido a adaptaciones de los factores de virulencia, que son menos conservados.

Con la identificación molecular se puede generar alternativas como tratamiento a las muestras que presentan antibioresistencia, el trabajo actual muestra una manera rápida de identificación de genes BlaZ, mecA, lo que permitiría la generación de ya sea un tipo de vacuna o un antimastítico alternativo específico para su tratamiento. Sin el abuso de generar nuevas resistencias.

Bibliografía

- Aarestrup, Frank M. (2005). Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 96(4), 271–281. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2005.pto960401.x>
- Aarestrup, Frank Møller, & Jensen, N. E. (1998). Development of penicillin resistance among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Denmark and other countries. *Microbial Drug Resistance*, 4(3), 247–256. <https://doi.org/10.1089/mdr.1998.4.247>
- Acuña, V., & Rivadeneira, A. (2008). *Aislamiento, identificación y antibiograma de patógenos presentes en leche con mastitis en ganaderías bovinas de la provincia de pichincha*. Escuela Politécnica del Ejército, Departamento de Ciencias de la Vida.
- Aguilar, F., & Álvarez, C. (2019). *Mastitis Bovina*. Machala: UTMACH.
- Amer, S., Aguilar, F., Fukuda, Y., Tada, C., Jimenez, I. L., Maza, W., & Nakai, Y. (2018). Prevalence and etiology of mastitis in dairy cattle in El Oro Province , Ecuador. *Veterinary Medical Science*, 80, 861–868. <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0504>
- Amer, S., Aguilar, L., Maza, W., Na, Z., & He, H. (2015). *Epidemiología molecular de la bacteriana mastitis en el ganado vacuno en la provincia de El Oro, Ecuador: Impacto económico y medidas de control*.
- 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.
- Andresen, H. (2013). Mastitis: Prevención Y Control. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 12(2), 55–64. <https://doi.org/10.15381/rivep.v12i2.1634>
- ANEMBE. (2010). *Supervisión de Programas de Control de Mastitis: Aspectos Prácticos Pamela*

(C. I. A. de M. Bovina, Ed.). EEUU.

Bagcigil, A. F., Taponen, S., Koort, J., Bengtsson, B., Myllyniemi, A. L., & Pyörälä, S. (2012). Genetic basis of penicillin resistance of *S. aureus* isolated in bovine mastitis. *Acta Veterinaria Scandinavica*, *54*, 69. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-54-69>

Barkema, H. W., Schukken, Y. H., & Zadoks, R. N. (2006). Invited review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of Dairy Science*, *89*(6), 1877–1895. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72256-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72256-1)

Becton Dickinson. (2014). *BD Gram Stain Kits and Reagents*. United States of America.

Bedolla, C., Catañeda, H., & Wolter, W. (2007). Métodos de detección de la mastitis bovina. *Redvet*, (9), 265–270. Retrieved from http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_leche/12-mastitis.pdf

Bolivar, A. M., Rojas, A., & Garcia Lugo, P. (2014). PCR y PCR-Múltiple parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avances En Biomedicina*, *3*(1), 25–33.

Bradley, A. J. (2002). Bovine Mastitis : An Evolving Disease. *The Veterinary Journal*, 116–128. <https://doi.org/10.1053/tvjl.2002.0724>

Brakstad, O., Aasbakk, K., & Maeland, J. A. (1992). Detection of *Staphylococcus aureus* by PCR of nuc Gene. *Journal of Clinical Microbiology*, *30*(7), 1654–1660. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1629319>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC265359>

Carpio, A. (2018). *Evaluación del efecto de tres concentraciones de miel de abejas en el tratamiento de mastitis subclínica bovina*. Universidad Central del Ecuador, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

- Castellano González, M. J., & Perozo Mena, A. J. (2010). Mechanisms of Resistance To β -Lactam Antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *Kasmera*, 38(1), 18–35.
- Castro Ramírez, Á. (1999). *Producción Bovina* (Editoria Universida...). Retrieved from https://books.google.com.ni/books?id=fBTeYDDWIFQC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_su mMary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Cervantes, E., García, R., & Salazar, P. M. (2014, February). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 61(1), 28–40. Retrieved from <https://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2014/pt141e.pdf>
- Chamorro Chamorro, M. I. (2017). Implementación e Impacto de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) en la Quesera de la Cooperativa de Producción Agropecuaria el Salinerito (Universidad Politécnica Salesiana). Retrieved from <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>
- Chasi, E. (2015). *Prevalencia de mastitis bovina mediante la prueba de california mastitis test con identificación del agente etiológico, en el Centro de Acopio de leche de la comunidad de Muyurco, Cayambe – Ecuador*. Universidad Politécnica Salesiana, Ingeniería Agropecuaria.
- Corbellini, C. (2002). La mastitis bovina y su impacto sobre la calidad de la leche. *Seminario Internacional de Competitividad En Leche y Carne (3: Argentina)*. *Memorias. Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria*, 251–263. Retrieved from <http://en.agro.uba.ar/sites/default/files/agronomia/la-mastitis-bovina-y-su-impacto-sobre-calidad-de-leche.pdf>
- Coronel, D., & Espinosa, M. (2017). *Prevalencia de mastitis subclínica en ganado bovino lechero de la zona occidental de la provincia del Azuay*. Universidad de Cuenca, Facultad de

Ciencias Agropecuarias.

Elizondo, J. A. (2007). Periodo seco corto en ganado de leche (Short dry period in dairy cattle).

In *Redvet*.

Elizondo Salazar, J. A. (2010). Anatomía de la ubre y secreción de la leche. *ECAG*, 54, 1–4.

Retrieved

from

https://eeavm.ucr.ac.cr/Documentos/ARTICULOS_PUBLICADOS/2010/155.pdf

ESPAC. (2021). *Boletín Técnico Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua, 2020*. Retrieved from <https://www.ecuadorencifras.gob.ec/estadisticas-agropecuarias-2/>

Fetsch, A. (2017). *Staphylococcus aureus* (Primera; ELSEVIER, Ed.). London: Academic Press/Elsevier.

Frankham, R., Ballou, J. D., Briscoe, D. A., & McInnes, K. H. (2002). Introduction to Conservation

Genetics. In *Evolutionary Ecology Research* (Vol. 7).

<https://doi.org/10.1017/CBO9780511808999>

Genome Campus Advanced Courses and Scientific Conferences. (2020). What are the

Mechanisms of Antimicrobial Resistance? Retrieved August 9, 2021, from Future Learn

website: <https://www.futurelearn.com/info/courses/antimicrobial-resistance/0/steps/92121>

Guazha, C. (2020). 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

(Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE; Vol. 3). Retrieved from

<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=ip,shib&db=bth&AN=92948>

[285&site=eds-](https://www.futurelearn.com/info/courses/antimicrobial-resistance/0/steps/92121)

[live&scope=site%0Ahttp://bimpactassessment.net/sites/all/themes/bcorp_impact/pdfs/em_](https://www.futurelearn.com/info/courses/antimicrobial-resistance/0/steps/92121)

[stakeholder_engagement.pdf%0Ahttps://www.glo-bus.com/help/helpFiles/CDJ-Page3b](https://www.futurelearn.com/info/courses/antimicrobial-resistance/0/steps/92121)

Guerra P., M., & Castro F., J. (2019). *Evaluación de viabilidad de microorganismos*. Chile.

Haro, N. (2019). “ *Identificación de resistencia a antibióticos en aislados fecales de Escherichia coli procedentes de Cebus albifrons de la parroquia Puerto Misahuallí, Napo-Ecuador.*”
Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

Heifer Ecuador. (2018). Red de lácteos en los Andes del Ecuador (DNA). Retrieved August 16, 2021, from <https://www.heifer-ecuador.org/proyecto/red-de-lacteos-en-los-andes/>

INEN. *Normativa INEN, para calidad, producción y venta de leche cruda, NTE INEN 9:2012.* , (2012).

Iredell, J., Brown, J., & Tagg, K. (2016). Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: Mechanisms and clinical implications. *BMJ (Online)*, 352. <https://doi.org/10.1136/bmj.h6420>

Jaffe, R. I., Lane, J. D., Albury, S. V., & Niemeyer, D. M. (2000). Rapid extraction from and direct identification in clinical samples of methicillin-resistant staphylococci using the PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(9), 3407–3412. <https://doi.org/10.1128/jcm.38.9.3407-3412.2000>

Jayaratne, P., & Rutherford, C. (1999). Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from growth on mannitol salt oxacillin agar using PCR for nosocomial surveillance. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 35(1), 13–18. [https://doi.org/10.1016/S0732-8893\(99\)00060-7](https://doi.org/10.1016/S0732-8893(99)00060-7)

Kraus, D., & Peschel, A. (2008). *Staphylococcus aureus* evasion of innate antimicrobial defense. *Future Microbiology*, 3(4), 437–451. <https://doi.org/10.2217/17460913.3.4.437>

Kruze, J. (1988, November). Mastitis: Efectos en la Producción y calidad de leche. *Primer Seminario de Producción Animal (Bovinos de Carne y Leche)*.

Lakhundi, S., & Zhang, K. (2018). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *American Society for Microbiology*, 31(4), 1–103. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/CMR.00020-18>. Copyright

- Lange, C. C., Brito, M. A. V. P., Reis, D. R. L., Machado, M. A., Guimarães, A. S., Azevedo, A. L. S., ... Meurer, I. R. (2015). Species-level identification of staphylococci isolated from bovine mastitis in Brazil using partial 16S rRNA sequencing. *Veterinary Microbiology*, *176*(3–4), 382–388. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.01.024>
- Leboffe, M. J., & Pierce, B. E. (2019). *Microbiology: Laboratory Theory and Application, Essentials* (Morton; D. Ferguson, M. Pentecost, A. Jones, & S. Thomas, Eds.). Retrieved from https://books.google.com.ec/books?id=8ZOFDwAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_suumMary_r&cad=0#v=onepage&q&f=true
- Liebl, W., Rosenstein, R., Götz, F., & Schleifer, K. H. (1987). Use of staphylococcal nuclease gene as DNA probe for *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters*, *44*(2), 179–184. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1987.tb02264.x>
- López, J., Higuera, J., Ochoa, A., Chassin, O., Valdez, J., Bravo, A., & Baizabal, V. (2006). Caracterización molecular de aislamientos de *Staphylococcus* spp . asociados a mastitis bovina en Tarímbaro , Michoacán. *Vol. 44, Núm.1*, pp.91-106. Retrieved from <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=613/61344108>
- López Vásconez, D. A. (2006). *Diagnóstico sanitario de aplicación de buenas prácticas de manufactura en la empresa “El Salinerito” dedicada a la industria quesera*. Universidad Técnica de Ambato.
- Louie, L., Goodfellow, J., Mathieu, P., Glatt, A., Louie, M., & Simor, A. E. (2002). Rapid detection of methicillin-resistant staphylococci from blood culture bottles by using a multiplex PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, *40*(8), 2786–2790. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.8.2786-2790.2002>
- Maes, N., Magdalena, J., Rottiers, S., De Gheldre, Y., & Struelens, M. J. (2002). Evaluation of a triplex PCR assay to discriminate *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative

staphylococci and determine methicillin resistance from blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(4), 1514–1517. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.4.1514-1517.2002>

Mata, H. T. ., Corbellini, C. N. ., Pechin, G. H. ., Larrea, A. T. ., Otrosky, R. N. ., & Meglia, G. E. (2002). *Evaluación de la Efectividad de una Vacuna contra Mastitis por Staphylococcus aureus y Streptococcus agalactiae en Vacas Lecheras*. 116(6360), 7–16.

Mera, R., Muñoz, M., Artieda, J., Ortiz, P., González, R., & Vega, V. (2017). Mastitis bovina y su repercusión en la calidad de la leche. *Revista Electronica de Veterinaria*, 18(11). Retrieved from <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111117.html>

Murakami, K., Minamide, W., Wada, K., Nakamura, E., Teraoka, H., & Watanabe, S. (1991). Identification of methicillin-resistant staphylococci by multiplex polymerase chain reaction assay. *American Journal of Clinical Pathology*, 29(10), 2240–2244. <https://doi.org/10.1093/ajcp/107.3.368>

Murray, K. A., & Gibson, M. I. (2020). Post-Thaw Culture and Measurement of Total Cell Recovery Is Crucial in the Evaluation of New Macromolecular Cryoprotectants. *Biomacromolecules*, 21(7), 2864–2873. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00591>

National Mastitis Council. (2020). *Recommended mastitis control program*.

Noboa, K. (2020). *Estudio de expresión génica de factores de virulencia de aislados clínicos de Staphylococcus aureus causantes de bacteremia*. (Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE). Retrieved from http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=ip,shib&db=bth&AN=92948285&site=eds-live&scope=site%0Ahttp://bimpactassessment.net/sites/all/themes/bcorp_impact/pdfs/em_stakeholder_engagement.pdf%0Ahttps://www.glo-bus.com/help/helpFiles/CDJ-Pa

Ohtomo, T., Yamada, T., & Yoshida, K. (1988). Outermost-cell-surface changes in an

encapsulated strain of *Staphylococcus aureus* after preservation by freeze-drying. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(10), 2486–2491.
<https://doi.org/10.1128/aem.54.10.2486-2491.1988>

Oikonomou, G., Machado, V. S., Santisteban, C., Schukken, Y. H., & Bicalho, R. C. (2012). Microbial Diversity of Bovine Mastitic Milk as Described by Pyrosequencing of Metagenomic 16s rDNA. *PLoS ONE*, 7(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047671>

Olguín, A. (2007). Enfermedades de la glandula mamaria. *Clinica de Bovinos I*, 193–216. Retrieved from http://www.aMmveb.net/clinica/enfermedades_de_la_glandula_mamaria.pdf

Olsen, J. E., Christensen, H., & Aarestrup, F. M. (2006). Diversity and evolution of blaZ from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(3), 450–460. <https://doi.org/10.1093/jac/dki492>

OMS. (2018). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. *JMS - Journal of Medical Society*, 32(1), 76–77. https://doi.org/10.4103/jms.jms_25_17

OMS. (2020, October 13). Resistencia a los antimicrobianos. Retrieved August 8, 2021, from Organización Mundial de la Salud website: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>

Ordóñez, C. (2015). *Evaluación del efecto antimicrobiano de la miel de abeja pura y dos concentraciones, administradas vía intramamaria, en ganado lechero con mastitis subclínica; en San José Pinula, Guatemala*. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Medicina y Zootecnia.

Peeler, E. J., Green, M. J., Fitzpatrick, J. L., Morgan, K. L., & Green, L. E. (2000). Risk factors associated with clinical mastitis in low somatic cell count British dairy herds. *Journal of Dairy*

- Science*, 83(11), 2464–2472. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75138-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75138-1)
- Promega. (2019). Techinal Manual Wizard® Genomic DNA Purification Kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit. *Technical Bulletin*, 1–19. Retrieved from www.promega.com
- Ramos, J. (2015). *Determinación de los canales de comercialización de ganado bovino en la ciudad de Guaranda, provincia de Bolívar* (Universidad Estatal de Bolívar). Retrieved from <http://190.15.128.197/bitstream/123456789/1230/1/0.24.pdf>
- Rojas, C. (2017). Factores asociados con la mastitis subclínica bovina en fincas lecheras de Zipaquirá, Cundimarca. Universidad del Rosario, Universidad CES.
- Ruegg, P. (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., & Reinemann, D. (2002). Milk quality and mastitis. *Pamela L. Ruegg*, (June), 1–33.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, R. (1977). The role and use of progestogens. *Obstetrics and Gynecology*, 75(4), 59S-76S. <https://doi.org/10.1097/00006250-199004001-00013>
- Saran, A., & Chaffer, M. (2000). *Mastitis y calidad de leche* (Universidad de Buenos Aires). Retrieved from <http://catalogosuba.sisbi.uba.ar/vufind/Record/201603170441121774>
- Schwendener, S., Cotting, K., & Perreten, V. (2017). Novel methicillin resistance gene mecD in clinical *Micrococcus caseolyticus* strains from bovine and canine sources OPEN. *Nature Publishing Group*. <https://doi.org/10.1038/srep43797>
- Sekizuka, T., Niwa, H., Kinoshita, Y., Uchida-fujii, E., Inamine, Y., & Hashino, M. (2019). Identification of a mecA / mecC -positive MRSA ST1-t127 isolate from a racehorse in Japan. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1–4. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz459>
- Serrato, A., Flores, L., Aportela, J., & Sierra, E. (2008). Reaccion en cadena de la Polimerasa. *Revista Chilena de Neuro-Psiquiatria*, 35(2), 247–249. Retrieved from

<http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/pcr.pdf>

Solís, M. (2007). *Utilización de la Solución Hipertónica (agua de mar) en el Tratamiento de la Mastitis Bovina en la Finca “Guadalupana” del Municipio de Nagarote, Departamento de León*. Universidad Nacional Agraria.

Suárez, C., & Gudiol, F. (2009). Beta-lactam antibiotics. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(2), 116–129. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.001>

Tchamba, C. N., Duprez, J. N., Lucas, P., Blanchard, Y., Boyen, F., Haesebrouck, F., ... Thiry, D. (2021). Comparison of the staphylococcal chromosome cassette (Scc) mec in methicillin-resistant staphylococcus aureus (mrsa) and non-aureus staphylococci (mrnas) from animals and humans. *Antibiotics*, 10(3), 1–10. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10030256>

Timón, R., & Jiménez, L. M. (2016). Importancia del periodo seco en el control de mamitis. *SERVET Talavera SL*, 46–49. Retrieved from http://axonveterinaria.net/web_axoncomunicacion/criaysalud/2/cys_2_Control_mamitis.pdf

Uchuari, I. (2018). *Evaluación de la lidocaína clorhidrato como tratamiento alternativo de la mastitis subclínica bovina en animales de mediana producción láctea*. Universidad Técnica de Machala, Unidad de Ciancias Agropecuarias.

VAM. (2020). *Vademécum Médico Farmacológico* (6ta ed.; N. Facultad, Ed.).

Vayas, R., & Carrera, L. (2012). Actualización en el manejo de las Mastitis Infecciosas durante la Lactancia Materna. *Scielo*, 5(1), 25–29. Retrieved from <http://scielo.isciii.es/pdf/albacete/v5n1/especial1.pdf>

Ventola, C. L. (2015). The Antibiotic Resistance Crisis Part 1: Causes and Threats. *Pharmacy and Therapeutics*, 40(4). Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4378521/>

VETCORP. (2011). El Tratamiento de la Mastitis Durante la Lactancia – Perulactea. Retrieved January 16, 2020, from Perulactea website: <http://www.perulactea.com/2011/04/01/el-tratamiento-de-la-mastitis-durante-la-lactancia/>

Viljoen, G., Nel, L., & Crowther, J. (2005). *Molecular Diagnostic PCR Handbook* (IAEA & FAO, Eds.). Netherlands: Springerlink.

Wang, X., Meng, J., Zhang, J., Zhou, T., Zhang, Y., & Yang, B. (2012). International Journal of Food Microbiology Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from powdered infant formula milk and infant rice cereal in China. *International Journal of Food Microbiology*, 153(1–2), 142–147. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.030>

Zoetis. (2013a). Clavamox LC | Zoetis AR. Retrieved January 16, 2020, from Zoetis website: <https://ar.zoetis.com/products/bovinos/clavamox-lc.aspx>

Zoetis. (2013b). Orbenin Extra | Zoetis AR. Retrieved January 16, 2020, from Zoetis website: <https://ar.zoetis.com/products/bovinos/orbenin-extra.aspx>