



Valoración del estado microbiológico de los agentes causales de mastitis presentes en el hato de la

Hacienda El Prado – IASA I

Untuña Morocho, Daniela Carolina

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

Trabajo de titulación, previo a la obtención de título de Ingeniera Agropecuaria

Dr. Ron Román, Jorge Washington, MSc.

15 de agosto del 2023



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

Certificación:

Certifico que el trabajo de titulación: **Valoración del estado microbiológico de los agentes causales de mastitis presentes en el hato de la Hacienda El Prado – IASA I**, fue realizado por la señorita: **Untuña Morocho, Daniela Carolina**; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta para verificación y/o análisis de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 15 de agosto del 2023



Dr. Jorge Ron Román MSc

1709505125

Resultados de la herramienta para verificación y/o análisis de similitud de contenidos



Daniela_Untuña_IASA_V1.docx

Scan details

Scan time:
August 15th, 2023 at 19:56 UTC

Total Pages:
37

Total Words:
9063

Plagiarism Detection



Types of plagiarism		Words
Identical	3.9%	353
Minor Changes	0%	0
Paraphrased	0%	0
Omitted Words	4.4%	399

AI Content Detection



Text coverage
● AI text
○ Human text

Plagiarism Results: (28)



DR- JORGE RON ROMÁN MSc
CI: 1709505125



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

Responsabilidad de Autoría:

Yo, **Daniela Carolina, Untuña Morocho**, con cédula de ciudadanía No 1725171613, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo titulación: **Valoración del estado microbiológico de los agentes causales de mastitis presentes en el hato de la Hacienda El Prado – IASA I**, es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 15 de agosto del 2023

Untuña Morocho, Daniela Carolina

C.C.: 1725171613



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

Autorización de Publicación:

Yo, **Untuña Morocho, Daniela Carolina**, con cédula de ciudadanía No.1725171613 autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **Valoración del estado microbiológico de los agentes causales de mastitis presentes en el hato de la Hacienda El Prado – IASA** I en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios es de mi responsabilidad.

Sangolquí, 15 de agosto del 2023

Untuña Morocho, Daniela Carolina
C.C.: 1725171613

DEDICATORIA

Dedico con todo mi corazón mi tesis a mi madre, Rosa pues sin ella no lo habría logrado. Su bendición, amor y paciencia a lo largo de mi vida me ha llevado hasta este momento.

A mis hermanas Jacqueline y Lorena por su apoyo incondicional.

A mis sobrinos Elena, Jonathan, Alejandra, Alexis y Domenicque por siempre creer en mí.

Y a mis tíos por su apoyo en los momentos más difíciles a lo largo de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE y a la Carrera de Ingeniería Agropecuaria por recibirme y formarme no solo en lo académico sino como persona.

A la Academia de Investigación y Enseñanza Superior ARES, por el financiamiento en diversos proyectos como el de “Empoderamiento de las mujeres como estrategia de control de la mastitis bovina en Salinas de Bolívar” y la Universidad de Lieja, de Bélgica, por el apoyo técnico-científico pues a través de estos fue posible el desarrollo de la línea de investigación sobre mastitis bovina en la ESPE.

Al Dr. Jorge Ron Román MSc por haberme dado la oportunidad de desarrollar esta investigación.

A la Ing. Gabriela Morales MSc e Ing. Cristina Cholota MSc por su apoyo, conocimiento y paciencia brindada a lo largo de la investigación.

A mis compañeros del Laboratorio de Mejoramiento Genético y Sanidad Animal que fueron de vital importancia para el desarrollo óptimo de la investigación.

A mis amigos Damian, Bratt, Sofía y Jennifer por su apoyo durante mi vida estudiantil y mi trabajo de titulación.

A Jhonatan por su apoyo, confianza y paciencia brindada a lo largo de mis estudios.

Índice de Contenidos

Carátula	1
Certificación	2
Resultados de la herramienta para verificación y/o análisis de similitud de contenidos.....	3
Responsabilidad de autoría.....	4
Autorización de publicación.....	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimientos	7
Índice de Contenidos	8
Índice de tablas	12
Índice de Figuras	14
Resumen	16
Abstract.....	17
CAPÍTULO I	18
INTRODUCCIÓN	18
Antecedentes.....	18
Justificación	19
Objetivos.....	19
Objetivo general.....	19
Objetivos específicos.....	19
Hipótesis	20
CAPÍTULO II	21
REVISIÓN DE LA LITERATURA	21

Mastitis bovina	21
Mastitis Subclínica	21
Mastitis clínica	22
Métodos para detección de mastitis	22
Conteo de células somáticas (SCC).....	22
California mastitis test (CMT).....	23
Conductividad de la leche	23
Etiología de mastitis.....	23
Agentes causales y prevalencia en el Ecuador	24
Identificación de agentes causales de mastitis	26
Aislamiento microbiológico	26
Índice de perfil analítico (API).....	27
Antibiogramas.....	27
CAPÍTULO III.....	28
METODOLOGÍA.....	28
Ubicación del área de investigación	28
Descripción del hato	28
Tratamientos a evaluar	28
Recolección de las muestras.....	30
Aislamiento de agentes	30
Siembra en medios selectivos	30
Aislamiento de cultivos puros	32
Tinción Gram	32

Pruebas bioquímicas.....	33
Pruebas bioquímicas para bacterias Gram positivas.....	33
Catalasa	33
Coagulasa	34
ADNasa.....	34
Agar sangre:	35
Agar Sal manitol:	36
Medio Maltosa	37
Metodología para la realización de Pruebas API.....	38
Microgen Staph-ID System.....	38
Microgen® STREP-ID.....	40
Metodología para la realización de antibiogramas	43
Variables por medir	44
Análisis estadístico	44
CAPÍTULO IV	45
RESULTADOS	45
Aislamiento de microorganismos	45
Identificación de microorganismos con pruebas bioquímicas.	46
Pruebas API.....	52
Antibiogramas.....	54
CAPÍTULO V	58
DISCUSIÓN	58
Microorganismos identificados	58

Pruebas API.....	60
Antibiogramas.....	60
CAPÍTULO VI	62
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	62
Conclusiones.....	62
Recomendaciones.....	63
Bibliografía	64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 <i>Agentes causales de mastitis identificados en el Ecuador</i>	24
Tabla 2 <i>Protocolo aplicado</i>	29
Tabla 3 <i>Tratamientos a evaluar</i>	29
Tabla 4 <i>Concentración de los diferentes medios a ser preparados con los microorganismos que crecen en ellos</i>	31
Tabla 5 <i>Concentración de los ingredientes activos a utilizar en los sensidiscos</i>	43
Tabla 6 <i>Interpretación de sensibilidad de bacterias causantes de mastitis en vacas a diferentes ingredientes activos.</i>	44
Tabla 7 <i>Número de microorganismos obtenidos de los cuartos muestreados de vacas positivas a mastitis.</i>	46
Tabla 8 <i>Nombre de los factores para el programa Infostat</i>	48
Tabla 9 <i>Estadísticas por tratamiento de Estafilococos Gram + (Media, Valor H de la prueba Kruskal Wallis y respectivos valores p) para vacas positivas a mastitis de la Hacienda El Prado – IASA I</i>	49
Tabla 10 <i>Ranks \pm desviación estándar de la cantidad de Estafilococos Gram + encontrados en los diferentes tratamientos pre y pos protocolo.</i>	50
Tabla 11 <i>Estadísticas por Tratamiento de Staphylococcus aureus (Media, Valor H de la prueba Kruskal Wallis y respectivos valores p) para vacas positivas a mastitis de la Hacienda El Prado – IASA I</i>	51
Tabla 12 <i>Ranks \pm desviación estándar de la cantidad de Staphylococcus aureus encontrados en los diferentes tratamientos pre y pos protocolo.</i>	52
Tabla 13 <i>Resultados de las pruebas API realizadas tanto para Estafilococos (Microgen Staph-ID System) y para Estreptococos (Microgen® STREP-ID).</i>	53

Tabla 14 *Susceptibilidad y resistencia de microorganismos causantes de mastitis a antibióticos en*

vacas de La Hacienda El Prado - IASA I 54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 <i>Microorganismos sembrados en diferentes medios</i>	31
Figura 2 <i>Cultivo de microorganismo puro sembrado por estría en tubo con agar nutriente inclinado</i>	32
Figura 3 <i>Diferenciación de cultivos por tinción Gram 100X</i>	33
Figura 4 <i>Reacción de catalasa positiva (izquierda) y negativa (derecha)</i>	34
Figura 5 <i>Reacción de ADNasa</i>	35
Figura 6 <i>Bacterias con crecimiento en Agar sangre</i>	36
Figura 7 <i>Crecimiento en medio sal manitol</i>	37
Figura 8 <i>Reacción de Maltosa</i>	38
Figura 9 <i>Resultado de las tirrillas de Microgen™ Staph ID MID-69 a las 24 horas de incubación</i>	39
Figura 10 <i>Tabla de colorimetría Microgen™ Staph ID MID-69</i>	39
Figura 11 <i>Ejemplo de hoja de resultados</i>	40
Figura 12 <i>Resultado de las tirrillas de Microgen® STREP-ID a las 24 horas de incubación</i>	41
Figura 13 <i>Tabla de colorimetría Microgen® STREP-ID</i>	42
Figura 14 <i>Ejemplo de hoja de resultados</i>	42
Figura 15 <i>Porcentaje de microorganismos aislados de las vacas muestreadas positivas para mastitis en la Hacienda El Prado- IASA I.</i>	45
Figura 16 <i>Número de microorganismos aislados pre y posprotocolo en vacas positivas para mastitis en la Hacienda El Prado- IASA I.</i>	46
Figura 17 <i>Número de microorganismos identificados pre y posprotocolo en vacas en producción y en seco positivas para mastitis en la Hacienda El Prado- IASA I.</i>	47
Figura 18 <i>Halo de inhibición de 5 antibióticos ante los microorganismos identificados, preprotocolo en vacas en producción positivas a mastitis en La Hacienda El Prado – IASA I.</i>	56

Figura 19 *Halo de inhibición de 5 antibióticos ante los microorganismos identificados, preprotocolo en vacas en seco positivas a mastitis en La Hacienda El Prado – IASA I. 56*

Figura 20 *Halo de inhibición de 5 antibióticos ante los microorganismos identificados, posprotocolo en vacas en producción positivas a mastitis en La Hacienda El Prado – IASA I..... 57*

Figura 21 *Halo de inhibición de 5 antibióticos ante los microorganismos identificados, posprotocolo en vacas en seco positivas a mastitis en La Hacienda El Prado – IASA I. 57*

RESUMEN

La mastitis bovina es una enfermedad inflamatoria, considerada una de las principales afecciones que presenta el ganado lechero, es importante porque afecta tanto la calidad como a la cantidad de producción de leche y causa problemas económicos a los ganaderos. Causada por microorganismos que infectan la ubre o por lesiones químicas, físicas o térmicas. El objetivo de este estudio fue valorar el estado microbiológico de los agentes causales de mastitis presentes en el hato de la Hacienda El Prado – IASA I. El estudio se realizó en 16 vacas que fueron positivas a mastitis, no se detectó mastitis clínica, de los 128 cuartos muestreados se obtuvo un total de 255 aislamientos donde se encontró *Staphylococcus epidermis* en 37.86% seguido de Estreptococos en 30.76%, estafilococos coagulasa negativos en 24.26%, *Staphylococcus aureus* en 23.67%, *Staphylococcus saprophyticus* en 13%, bacilos Gram Positivos en 3.5% y bacilos Gram negativos 1.78%. Se puede observar una diferencia del número de microorganismos entre vacas en producción y en seco, número de partos y aplicación de antibiótico. Las pruebas rápidas son una manera eficiente y eficaz de corroborar la identificación de microorganismos. Para bacterias Gram positivas se puede utilizar cualquier antibiótico evaluado excepto para *Staphylococcus epidermidis* que presento resistencia a cefalaxina y *Staphylococcus saprophyticus* que presento resistencia a cloxacilina y ceftiofur.

Palabras clave: MASTITIS BOVINA, AISLAMIENTOS, PRUEBAS API, ANTIBIOGRAMAS

ABSTRACT

Bovine mastitis is an inflammatory disease, considered one of the main affections of dairy cattle, it is important because it affects both the quality and quantity of milk production and causes economic problems to farmers. It is caused by microorganisms that infect the udder or by chemical, physical or thermal lesions. The objective of this study was to evaluate the microbiological status of the causal agents of mastitis present in the herd of Hacienda El Prado - IASA I. The study was carried out in 16 cows that were positive for mastitis, no clinical mastitis was detected, of the 128 quarters sampled a total of 255 isolates were obtained where *Staphylococcus epidermis* was found in 37.86% followed by Streptococcus in 30.76%, coagulase negative staphylococcus in 24.26%, *Staphylococcus aureus* in 23.67%, *Staphylococcus saprophyticus* in 13%, Gram positive bacilli in 3.5% and Gram negative bacilli in 1.78%. A difference in the number of microorganisms can be observed between cows in production and dry cows, number of calvings and antibiotic application. Rapid tests are an efficient and effective way to corroborate the identification of microorganisms. For Gram-positive bacteria, any antibiotic evaluated can be used except for *Staphylococcus epidermidis* which showed resistance to cephalaxin and *Staphylococcus saprophyticus* which showed resistance to cloxacillin and ceftiofur.

Keywords: BOVINE MASTITIS, ISOLATION, API TESTS, ANTIBIOGRAMS

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Antecedentes

La ganadería en el Ecuador es una actividad que contribuye con el 0.5% del PIB nacional (Alvarado y Iglesias, 2017), según el INEC (2021), en el Ecuador existen 4,34 millones de cabezas de ganado a comparación de porcino (1,06 millones de cabeza), ovinas (497 mil cabezas), caballar (173 mil cabezas) y mular (63 mil cabezas). De los 4,34 millones de cabezas el 57,61% son vacas; siendo la sierra ecuatoriana la principal región con 49,11% de producción de ganado vacuno del total nacional. En la sierra según Cil (2020) se encuentran diferentes provincias consideradas como las más destacadas en producción lechera, entre ellas se encuentra Pichincha (16% de la producción lechera), Carchi (6% de la producción lechera), Cotopaxi (12% de la producción) y Chimborazo (12% de la producción).

Una de las enfermedades de mayor preocupación en el sector ganadero es la mastitis bovina, patología de origen multifactorial, provocada por microorganismos, que ingresan del ambiente exterior por el conducto del pezón y desarrollándose en las glándulas mamarias, afectando sobre todo a vacas de alta producción, presentándose de forma sintomática (clínica) y asintomática (subclínica). Esta inflamación provoca lesiones en las ubres del animal, presencia de fibrosis, pus y un aumento en el conteo de células somáticas (Viguiet *et al.*, 2009).

En el caso de mastitis bovina existen cambios importantes en la composición química de la leche, disminución de la producción del cuarto afectado y pérdida progresiva general de leche y la calidad de la misma, con consecuencias en la economía de la industria y la producción de ganadería de leche (Rodríguez *et al.*, 2020).

En el Ecuador los principales microorganismos causantes de mastitis bovina son: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus*

pasteuri, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli* siendo responsables de aproximadamente el 80% de los casos de mastitis (Amer *et al.*, 2018).

Cuando se aplica un tratamiento antibiótico a la mastitis bovina, es de vital importancia identificar el antimastítico a utilizar ya que, algunos microorganismos pueden presentar antibioresistencia como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp. y *Staphylococcus* coagulasa negativo resistentes a amoxicilina, ampicilina, penicilina, estreptomina y lincomicina (San Martín *et al.*, 2002) principales antibióticos utilizados para su tratamiento.

Justificación

La prevalencia de mastitis en el Ecuador es del 80% (Amer *et al.*, 2018) y específicamente en la provincia de Pichincha es del 64% (Bonifaz y Conlago, 2016). El impacto económico de la mastitis está determinado por los cambios en calidad de leche y la reducción de la producción, ya que la enfermedad puede llegar a un nivel crónico, volviendo el sacrificio del animal algo necesario para evitar un gasto en tratamiento y por ende mayor inversión económica (Hogeveen *et al.*, 2011).

La presente investigación contribuye con la base de datos de los agentes causales de mastitis identificados en la provincia de Pichincha, su resistencia a diferentes antimastíticos y a la reducción de gastos relacionados al tratamiento.

Objetivos

Objetivo general

Valorar el estado microbiológico de los agentes causales de mastitis presentes en el hato de la Hacienda El Prado, de la Carrera de Ingeniería Agropecuaria de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

Objetivos específicos

- Identificar a través de pruebas bioquímicas y pruebas API (Índice de perfil analítico) los agentes

causales, en vacas con mastitis sub clínica, pre y pos aplicación de dos antibióticos (Cloxacilina benzatina y amoxicilina).

- Evaluar la resistencia de agentes causales, frente a cinco antibióticos (Cefalaxina, ceftiofur, cloxacilina, novobiocin y oxytetraciclina) utilizados para el tratamiento de mastitis, a través de la técnica de halos de inhibición.

Hipótesis

H0: No existe diferencia de distribución de agentes causales de mastitis y su antiobio resistencia, en vacas con y sin tratamiento en la Hacienda El Prado.

H1: Si existe diferencia de distribución de agentes causales de mastitis y su antiobio resistencia, en vacas con y sin tratamiento en la Hacienda El Prado.

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LA LITERATURA

Mastitis bovina

La mastitis se define como la inflamación de la glándula mamaria (Zhao y Lacasse, 2008) en respuesta a una infección causada generalmente por bacterias y algunas veces por microplasma, hongos o algas; el trauma mecánico, trauma térmico y la agresión química, son factores que predisponen a la glándula a la infección intramamaria (IMI) (Bolaños *et al.*, 2012). La aparición de mastitis depende de la interacción del huésped, el agente y los factores ambientales (Bradley, 2002).

Los síntomas clínicos incluyen disminución de la producción de leche, aumento de recuento de glóbulos blancos, cambio en la composición y apariencia de la leche, fiebre, enrojecimiento, hinchazón e hipertermia en la ubre (Wellenberg *et al.*, 2002).

La mastitis bovina es una enfermedad de alta prevalencia en el ganado lechero, y una de las enfermedades más importantes que afectan a la industria láctea mundial; supone una pesada carga económica para los productores de leche de todo el mundo (Hogeveen *et al.*, 2011).

El ganado lechero que padece esta enfermedad, presenta cambios en la leche, tanto químicos, físicos y bacteriológicos; en consecuencia, presenta un menor porcentaje de sólidos totales, proteínas, grasa y calcio (Verwaart y Valeeva, 2011).

Mastitis Subclínica

La mastitis subclínica se caracteriza por la presencia de un microorganismo asociado a un gran número de células somáticas en la leche, que fácilmente puede convertirse en una inflamación y no tener tratamiento. Este tipo de mastitis, no presenta cambios visibles en la leche o ubre; apenas se nota una disminución en la producción de la leche, siendo alterada su composición por la presencia de componentes inflamatorios y bacterianos (Bolaños *et al.*, 2012).

Esta presentación de la enfermedad es la más persistente en el ganado lechero; ocurre frecuentemente, y puede conducir a grandes pérdidas económicas no solo por la reducción de la producción, también por los elevados conteos de células somáticas presentes en los tanques de leche (Gonzalo *et al.*, 2002). En la práctica, los casos de mastitis subclínica con frecuencia no son detectados rápidamente, incluso pasan desapercibidos por el ordeñador (Wellenberg *et al.*, 2002).

Mastitis clínica

La mastitis clínica es definida como una anomalía en la glándula mamaria de la vaca o la leche, que puede ser fácilmente observada (Tollersrud *et al.*, 2008). Se caracteriza por la tumefacción o dolor en la ubre, enrojecimiento de la misma, la leche puede presentar una apariencia anormal y, en algunos casos, hay aumento de la temperatura rectal, letargo, anorexia e incluso la muerte. En el caso de mastitis clínica, las bacterias están presentes en la leche, lo que reduce el rendimiento y la calidad considerablemente (Heringstad *et al.*, 2000).

Métodos para detección de mastitis

Conteo de células somáticas (SCC)

El recuento de células somáticas se ha utilizado por décadas para diagnosticar la mastitis subclínica y es un parámetro importante para la industria láctea (Duarte *et al.*, 2015). El contador de células somáticas en leche funciona añadiendo un surfactante (Ekoprim), polvo que disuelve la membrana de las células somáticas, elevando la viscosidad de la leche. Existe una relación proporcional entre la viscosidad de la mezcla (leche – Ekoprim) y el número de células somáticas de la leche analizada así midiendo el tiempo de fluido de la leche a través de un capilar determinado el número de células de acuerdo a este tiempo (Bulteh, 2017). Un número de conteo normal oscilan entre 200000 células/ mL, valores mayores a 800000 células/ mL se asocian a la respuesta inflamatoria a mastitis e indicativo de la presencia de microorganismos (Pilla *et al.*, 2012).

California mastitis test (CMT)

Es un método indirecto común para la medición de SCC. La prueba se realiza agregando un detergente a una muestra de leche con un alto recuento de células, lo que promueve la lisis celular, la liberación de ácidos nucleicos y la formación similar a un gel o apariencia gelatinosa (Viguiet *et al.*, 2009). Cuando el conteo de células está por encima o debajo de cierto umbral ($SCC \leq 200,000$ o $SCC \geq 800,000$ células/mL), la interpretación de la viscosidad de la muestra es subjetiva y puede dar como resultado falsos positivos o negativos (Duarte *et al.*, 2015).

Conductividad de la leche

Un efecto de la mastitis, son los cambios en las concentraciones de iones causados por el aumento de la permeabilidad vascular que conduce a modificaciones en la conductividad eléctrica de la leche. La conductividad eléctrica se puede medir mediante el aumento de la conductancia en la leche causado por un aumento en los niveles de sodio, potasio, calcio, magnesio y cloruro (Kitchen, 1981). Los valores normales de CE de la leche están entre 4.0 y 5.5 mS / cm a 25 °C. En la mastitis, la glándula mamaria tiene una mayor permeabilidad capilar, lo que provoca lecturas superiores a 6.0 mS / cm (Mejía, 2021).

Etiología de mastitis

Los estafilococos (*Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus coagulans* negativos) son los agentes causantes de mastitis más comunes en vacas, búfalos, ovejas, cabras, llamas, dromedarios, conejos. Le siguen de cerca los estreptococos y *Escherichia coli* que en algunas especies o entornos puede tener una prevalencia similar o superior a la de la mastitis estafilocócica (Zhao y Lacasse, 2008).

Con menos frecuencia, otros Gram-positivos (*Actinomyces* spp., *Corynebacterium* spp., *Bacilo* spp., *Micobacteria* spp., *Enterococo* spp., *Clostridium* spp.) y Gram-negativas (*Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteo* spp., *Pasteurella* spp., *Mannheimia*

haemolytica) las bacterias y el micoplasma pueden estar involucrados en la etiología de la mastitis, mientras que los casos debidos a mohos o levaduras son raros (Contreras y Rodríguez, 2011).

Agentes causales y prevalencia en el Ecuador

Estudios realizados en diferentes provincias del Ecuador (Bolívar, El Oro, Galápagos, Napo y Pichincha) donde se utilizaron California mastitis test (CMT) para la detección de mastitis y pruebas microbiológicas y moleculares, concuerdan en los organismos identificados, a continuación, detallados.

Tabla 1

Agentes causales de mastitis identificados en el Ecuador

Provincia	Microorganismos identificados	Referencia
Bolívar	<i>Bacillus licheniformis</i>	(Navarrete García, 2019)
	<i>Bacillus subtilis</i>	
	<i>Bacillus velezensis</i>	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	(Andrade Cerón y Sánchez Galarza, 2018)
	<i>Bacillus</i> spp	
	<i>Enterobacter</i> spp	
	<i>Escherichia coli</i>	
	<i>Klebsiella</i> spp	
	<i>Shigella</i> spp	
	<i>Staphylococcus</i> spp	
	<i>Streptococcus</i> spp	
El Oro	<i>Staphylococcus</i> <i>coagulasa</i> negativos	(Amer <i>et al.</i> , 2018)
	<i>Bacillus</i> spp	
	<i>Streptococcus</i>	
	<i>Klebsiella</i> spp	(Mejía, 2021)
	<i>Staphylococcus coagulasa</i> positivo	
	<i>Staphylococcus coagulasa</i> positivo	
	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	
<i>Arthrobacter</i> spp		
Galápagos	<i>Bacillus megaterium</i>	
	<i>Bacillus subtilis</i>	
	<i>Bacillus licheniformis</i>	
	<i>Cellulomonas flavigena</i>	
	<i>Enterobacter cloacae</i>	
	<i>Enterobacter tabaco</i>	

Provincia	Microorganismos identificados	Referencia
Galápagos	<i>Escherichia coli</i>	
	<i>Staphylococcus coagulasa</i> negativo	
	<i>Lactococcus garvieae</i>	
	<i>Micrococcus bohemicus</i>	
	<i>Micrococcus caseolyticus</i>	
	<i>Micrococcus luteus</i>	
	<i>Pseudomonas putida</i>	
	<i>Rothia terrae</i>	
	<i>Staphylococcus agnetis</i>	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	
	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	
	<i>Staphylococcus equorum</i>	
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	
	<i>Staphylococcus aereus</i>	(Guazha Herrera, 2020)
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
<i>Staphylococcus coagulasa</i> negativo		
<i>Streptococcus</i> spp		
Bacilo Gram positivo		
Bacilo Gram negativo		
Napó	<i>Staphylococcus aureus</i>	(Espinoza Salazar y Mier Jiménez, 2013)
	<i>Citrobacter</i>	
	<i>Escherichia coli</i>	
	<i>Klebsiella</i>	
	<i>Staphylococcus coagulasa</i> positivo	
	<i>Staphylococcus intermedius</i>	
	<i>Staphylococcus</i> spp	
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	
	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	
	<i>Streptococcus</i> spp	
Pichincha	<i>Staphylococcus intermedius</i>	(Bonifaz y Conlago, 2016)
	<i>Corynebacterium</i> spp	
	<i>Escherichia coli</i>	
	<i>Micrococcus</i>	
	<i>Staphylococcus áureos</i>	
	<i>Staphylococcus epidermis</i>	
	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	
	<i>Aeromona cavia</i>	(Acuña Molina y Rivadeneira Espinosa, 2008)
	<i>Bacillus cereus</i>	
	<i>Bacillus</i> spp	
	<i>Corynebacterium</i> spp	
<i>Enterobacter</i>		

Provincia	Microorganismos identificados	Referencia
	<i>Escherichia coli</i>	
	<i>Pseudomona fluorescens</i>	
	<i>Pseudomona spp</i>	
	<i>Shewanella putrefasciens</i>	
	<i>Shigella spp</i>	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	
	<i>Staphylococcus coagulasa</i> negativo	
	<i>Staphylococcus coagulasa</i> positivo	
	<i>Staphylococcus haemolitycus</i>	
	<i>Staphylococcus simulans</i>	
	<i>Streptococcus spp</i>	

Nota. Autoría propia.

En cuanto a la prevalencia en la provincia de Pichincha se tuvo un 64% (Bonifaz y Conlago, 2016). La provincia de Napo, tiene una prevalencia presente en uno o más cuartos con mastitis de 79.66 % (Espinoza Salazar y Mier Jiménez, 2013). En la provincia del Oro, la prevalencia de mastitis clínica es del 12% (Amer *et al.*, 2018). En la provincia de Galápagos, la prevalencia de mastitis subclínica es de 33.33% (Guazha Herrera, 2020). Todos los microorganismos identificados se encuentran detallados en la Tabla 1.

Identificación de agentes causales de mastitis

Las pruebas diagnósticas se caracterizan por ser rápidas, económicas, replicables, sensibles y específicas. Entre las más aceptadas y usadas tenemos el aislamiento microbiológico por otra parte la PCR y otras técnicas basadas en ADN se usan menos ya que solo se las utiliza como pruebas confirmatorias (Acuña Molina y Rivadeneira Espinosa, 2008).

Aislamiento microbiológico

Los aislamientos microbianos causantes de esta enfermedad, se aíslan desde las muestras de leche tomadas de cada cuarto infectado, la primera siembra se realiza en medios diferenciales y selectivos los cuales permiten la diferenciación de colonias por morfología o permiten inhibir el

crecimiento de microorganismo que no pertenecen a los de interés. Además, las colonias aisladas deben pasar por tinción Gram y por último por pruebas bioquímicas (catalasa, coagulasa, maltosa, ADNasa, sangre, Sal manitol) estas permiten identificar hasta la especie (Aguilar Gálvez y Álvarez Díaz, 2019).

La principal desventaja de la identificación bacteriana es que el periodo de tiempo de crecimiento es variable en algunas bacterias y hongos, al tratar de prolongar la tendencia de cultivo en medio refrigerados da paso a la contaminación de estos, así, generando menor especificidad y además usar pruebas bioquímicas repercuten en tiempo y recursos generando falsos negativos ya que, detectan solo células viables (Aguilar Gálvez y Álvarez Díaz, 2019).

Índice de perfil analítico (API)

Los sistemas miniaturizados API son métodos rápidos que permiten la identificación de microorganismos a través de la realización de diferentes pruebas bioquímicas. Estos sistemas consisten en un dispositivo de plástico con varios micro tubos que contienen diferentes medios de cultivo deshidratados o diferentes sustratos de enzimas de acuerdo al tipo de prueba que se requiere (Julio *et al.*, 2014; Apiweb, 2010).

Antibiogramas

Los antibiogramas permiten determinar la susceptibilidad de microorganismos a antibióticos y la evolución de las resistencias bacterianas bajo condiciones de laboratorio específicas y estandarizadas; son una herramienta importante en el control de mastitis ya que, proveen la información necesaria para tratar los patógenos de una manera adecuada y así disminuir el riesgo de generar resistencia (Andrade Cerón y Sánchez Galarza, 2018).

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

Ubicación del área de investigación

El estudio se llevó a cabo en el área de ganadería de la Carrera de Ingeniería Agropecuaria IASA I, hacienda “El Prado”, ubicada en la provincia de Pichincha, cantón: Rumiñahui, parroquia: Sangolquí, barrio San Fernando, con una descripción ecológica de latitud: 78°24'44" E y longitud: 0°23'20" S a 2748 m.s.n.m; en un piso altitudinal montano bajo, zona de vida: bosque húmedo y una clasificación bioclimática: húmedo temperado (Arce y Pozo, 2015).

Descripción del hato

El hato lechero de la hacienda El Prado está conformado por 209 bovinos: 77 en reño, 27 preñadas, 16 inseminadas y 34 vacías, del cual se tomaron 8 vacas en producción y 8 vacas en seco.

Tratamientos a evaluar

Se evaluaron 2 factores: tipo de vaca (vacas en producción y secado), y el número de partos (1-3 y 4-6 partos). La unidad experimental fue la vaca y se utilizaron 32 unidades experimentales, donde se utilizaron los mismos tratamientos, antes y después de la aplicación del protocolo (Tabla 2), obteniendo un total de 8 tratamientos (Tabla 3). El experimento se dispuso con un diseño completamente al azar con 2 repeticiones.

Los antimastíticos utilizados fueron: Clavamox LC siendo un antimastítico de vacas en lactancia y su principal ingrediente activo es amoxicilina (Zoetis, 2022); y Obernin Extra siendo un antimastítico de vacas secas y compuesto por Cloxacilina benzoatínica (Zoetis, 2021).

Tabla 2*Protocolo aplicado*

Lactancia	Secado
<p>1. Se separó a las vacas seleccionadas del rejo para la aplicación del protocolo.</p> <p>2. Lavar la ubre con agua y jabón previo a la desinfección con alcohol al 70%.</p> <p>3. Una vez limpia y desinfectada la ubre y los pezones se procedió a preparar las jeringas para la aplicación del antibiótico intramamario a utilizarse (Clavamox).</p> <p>4. Se retiró el capuchón de la cánula y se insertó en el canal del pezón. Se presionó el émbolo de la jeringa para introducir todo el medicamento en la cisterna del pezón.</p> <p>5. Finalmente se masajeó desde la parte inferior a la superior del pezón para asegurar que el medicamento se encuentre bien aplicado.</p> <p>6. Una vez aplicado el medicamento se respetó el tiempo de retiro (76 horas) de la leche y se verificó que la misma no llegue al tanque recolector de leche.</p>	<p>1. Lavar la ubre con agua y jabón previo a la desinfección con alcohol al 70%.</p> <p>2. Una vez limpia y desinfectada la ubre y los pezones se procedió a preparar las jeringas para la aplicación del antibiótico intramamario a utilizarse (Orbenin).</p> <p>3. Se retiró el capuchón de la cánula y se insertó en el canal del pezón.</p> <p>4. Se presionó el émbolo de la jeringa para introducir todo el medicamento en la cisterna del pezón.</p> <p>5. Finalmente se masajeó desde la parte inferior a la superior del pezón para asegurar que el medicamento se encuentre bien aplicado.</p> <p>6. Una vez aplicado el medicamento las vacas entran al periodo seco por aproximadamente dos meses.</p>

Nota. (Alomoto y Crisanto, 2023)

Tabla 3*Tratamientos a evaluar*

Tratamiento	Descripción
T1	Vacas en producción con aplicación del protocolo (1-3 partos)
T2	Vacas en producción sin aplicación del protocolo (1-3 partos)
T3	Vacas en producción con aplicación del protocolo (4-6 partos)
T4	Vacas en producción sin aplicación del protocolo (4-6 partos)
T5	Vacas al secado con aplicación del protocolo (1-3 partos)
T6	Vacas al secado sin aplicación del protocolo (1-3 partos)
T7	Vacas al secado con aplicación del protocolo (4-6 partos)
T8	Vacas al secado sin aplicación del protocolo (4-6 partos)

Nota. Autoría propia.

Recolección de las muestras

La muestra fue de al menos 5 ml de leche, fue tomada por cuarto, dando un total de 128 muestras analizadas. Para la recolección, se limpió la piel de la ubre y de manera especial el pezón para evitar la contaminación de la muestra con patógenos no relacionados a la leche. Se lavó la ubre con agua y jabón, y se secó con papel toalla. Se colocó guantes de látex y mascarilla, desinfectándolos con alcohol al 70% y con una torunda se froto cada pezón para evitar al máximo la contaminación. Después de la desinfección y con nuevos materiales (guantes de látex y mascarilla), se abrió el frasco estéril a lado del pezón evitando tocar la parte interna de la tapa y la boca del frasco (AGROCALIDAD, 2020).

Las vacas que fueron tomadas para el experimento fueron vacas que presentaron mastitis diagnosticadas por una tesis en paralelo, (Alomoto y Crisanto, 2023). Las muestras para microbiología de las vacas que entraron al seco fueron tomadas el mismo día, antes de ordeñarlas a fondo.

Aislamiento de agentes

Para la primera parte del experimento se trabajó con 64 muestras las que pertenecían a vacas en producción y secas antes de la aplicación del protocolo, y para la segunda parte del experimento se trabajó con 64 muestras las que pertenecían a vacas en producción y secas después de la aplicación del protocolo.

Siembra en medios selectivos

Los medios de cultivo se prepararon 3 días antes de la toma de muestras, estos fueron colocados en cajas Petri con agar Sal manitol, MacConkey, EMB y Sangre, cada uno con su respectiva concentración y según el presunto microorganismo a ser identificado (Tabla 4).

Tabla 4

Concentración de los diferentes medios a ser preparados con los microorganismos que crecen en ellos

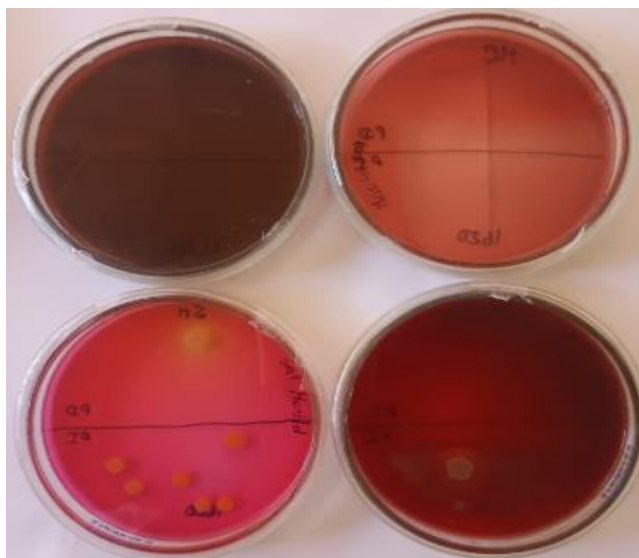
Medio	Concentración (g/L)	Microorganismo
Agar Mac Conkey	51.5	Bacilos Gram negativos
Agar Sal Manitol	111	Estafilococos Gram positivos
Agar EMB	37.5	Gram negativas
Agar Sangre	40	Gram positivas y negativas

Nota. g/L: Gramos por litro. Recuperado de (Andrade Cerón y Sánchez Galarza, 2018; Guazha Herrera, 2020).

Se desinfecto el mesón y se colocó mecheros, con una micropipeta calibrada a 50 µl, se tomó la muestra de leche la cual fue colocada en cada medio de cultivo, se distribuyó con un triángulo de siembra esterilizado con alcohol al 70%; se incubó las cajas Petri a 37°C y se observó los resultados (Figura 1) a las 24, 48 y 72 h (Acuña Molina y Rivadeneira Espinosa, 2008).

Figura 1

Microorganismos sembrados en diferentes medios



Nota. A: EMB, B: Mac Conkey, C: Sal Manitol, y D: Sangre. Autoría propia.

Aislamiento de cultivos puros

Para el aislamiento se preparó agar nutriente (13 gr/L) en tubos inclinados. Se seleccionó las cajas Petri que presentaron crecimiento, se tomó una muestra de cada colonia aislada tras la siembra en caja Petri en los medios selectivos y se sembró en zigzag de manera homogénea en los tubos. Se incubó a 37°C durante 24 h (Navarrete García, 2019).

Figura 2

Cultivo de microorganismo puro sembrado por estría en tubo con agar nutriente inclinado



Nota. Autoría propia.

Tinción Gram

Para la verificación de la pureza del cultivo, se tomó un portaobjetos que debe estar limpio, desinfectado y seco; se colocó una gota de agua destilada que fue mezclada con una cantidad considerable de muestra del cultivo sólido la cual fue esparcida y fijada al calor del mechero. Posteriormente se procedió a inundar con cristal violeta por un minuto, se lavó con agua destilada; se agregó lugol por un minuto, se lavó con agua destilada; se colocó solución decolorante por 15 segundos, se lavó con agua destilada y se colocó safranina por 30 segundos y un último lavado con agua destilada (Guazha Herrera, 2020; Rodríguez *et al.*, 2020).

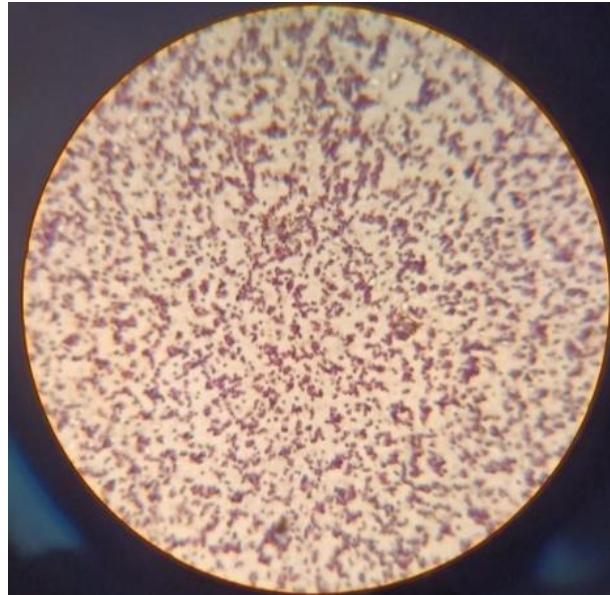
Las placas secas fueron llevadas al microscopio donde se observó con el lente 100X y aceite de inmersión, para diferenciar bacterias Gram positivas (Azul – Violeta) de Gram negativas (Rojo-Rosado).

La forma y la agrupación de los microorganismos permitieron diferenciar entre bacilos (forma alargada y cilíndrica), coco bacilos (forma rectangular con filos bordeados), cocos (forma circular),

estreptococos (cocos agrupados en cadenas de al menos 7 unidades) y estafilococos (cocos agrupados en forma de racimos) (Smeltzer y Beenken, 2013).

Figura 3

Diferenciación de cultivos por tinción Gram 100X



Nota. Cocos Gram positivos. Autoría propia.

Una vez que los microorganismos de los cultivos puros se identificaron como Gram positivos o Gram negativos se procedió a realizar las pruebas bioquímicas respectivas.

Pruebas bioquímicas

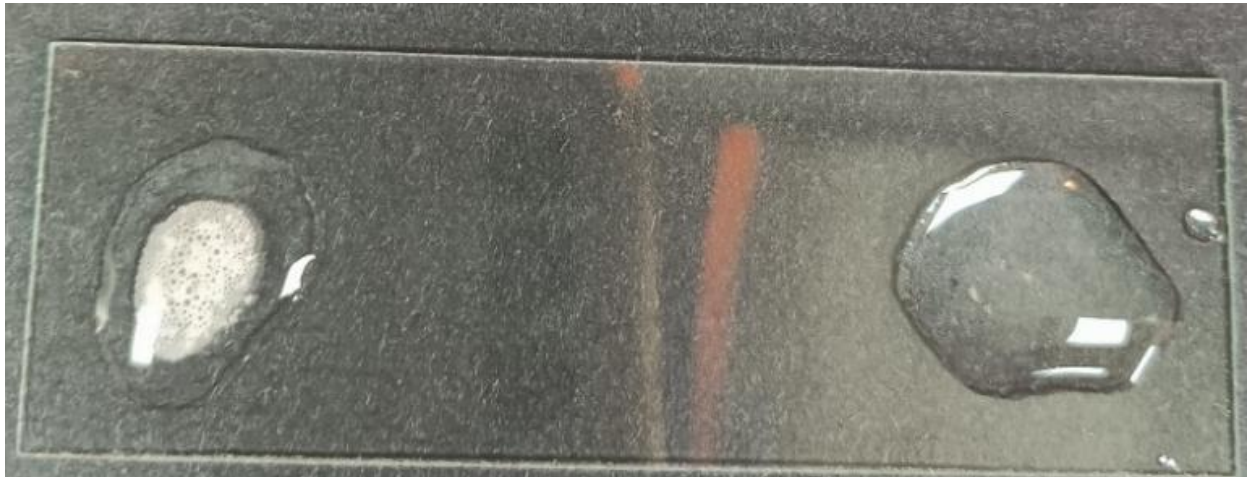
Pruebas bioquímicas para bacterias Gram positivas.

Catalasa

En un portaobjetos se colocó una gota de peróxido de hidrógeno 3%, se agregó la muestra del cultivo aislado puro tomado del agar nutriente con un asa de platino esterilizada, se mezcló y se observó la reacción, todo el proceso se realizó con el máximo cuidado para no contaminar la muestra (Shoaib *et al.*, 2020). Si en los primeros 20 segundos se observó formación de burbujas este es catalasa positiva.

Figura 4

Reacción de catalasa positiva (izquierda) y negativa (derecha)



Nota. Autoría propia.

Coagulasa

Esta prueba se realizó mezclando el plasma sanguíneo de conejo con una colonia de bacterias. Las bacterias producirán la enzima coagulasa que coagulará el plasma sanguíneo indicativo de reacción positiva a coagulasa la que permitió identificar a *Staphylococcus aureus* (Bergey y Holt, 1994).

ADNasa

Para la preparación del medio ADNasa, se colocó 42 g del medio y 0,05 g de azul de toluidina en un litro de agua, se esterilizó y se dispensó en cajas Petri. Se sembraron dos muestras por caja, mediante una sola estría gruesa, se incubó a 37°C por 24 h. Para la observación de resultados, se cubrió la caja con ácido clorhídrico hasta cubrir todo el medio y se observó la formación de un halo transparente alrededor del crecimiento dando positivo a ADNasa así permitiendo identificar a *Staphylococcus aureus* (Guazha Herrera, 2020).

Figura 5

Reacción de ADNasa



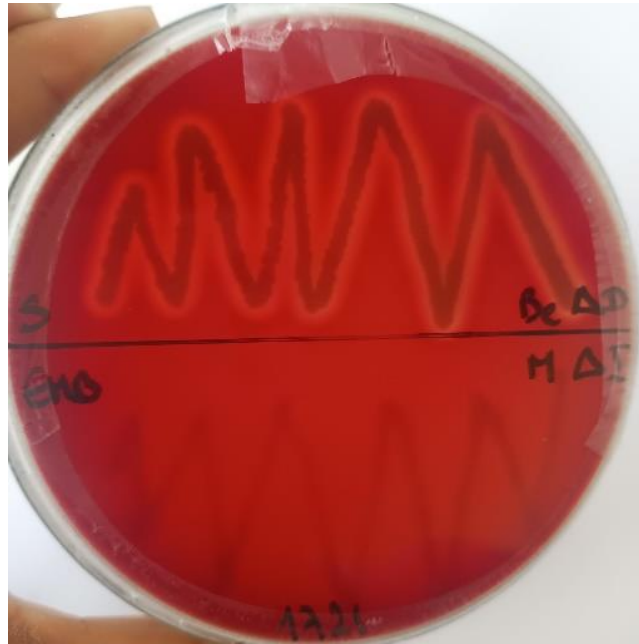
Nota. (A) positiva y (B) negativa. Autoría Propia.

Agar sangre:

Para la elaboración del medio sangre se colocó 40 g de base sangre en un litro de agua, se esterilizó y se agregó del 5 al 8% de sangre al medio a 40°C. Se dispensó y se sembraron dos muestras por caja, por estriado simple. Se incubó a 37°C por 24 h y se observó el tipo de hemólisis. Hemólisis beta se da por la lisis total de glóbulos rojos, formando un halo claro alrededor de las colonias. Hemólisis gamma se da por la ausencia de hemólisis, el medio no presenta cambios de coloración (Boerlin *et al.*, 2003).

Figura 6

Bacterias con crecimiento en Agar sangre



Nota. (A) Bacterias beta hemolíticas y (B) bacterias gamma hemolíticas. Autoría Propia.

Agar Sal manitol:

Es un medio altamente selectivo por la alta concentración salina y diferencial debido a la capacidad de fermentación del manitol por los microorganismos. Las bacterias que crecen en un medio con alta concentración de sal y fermentan el manitol, producen ácidos, con lo que se modifica el pH del medio y vira el indicador de pH del color rojo al amarillo. Estafilococos coagulasa positivos, como *Staphylococcus aureus*, producen cambio en el medio circundante de color amarillo, estafilococos coagulasa negativos, como *Staphylococcus epidermidis*, producen colonias de color rojo y no hay cambio de coloración del medio (Bou *et al.*, 2011). Para la siembra, se dividió la caja en 2 partes, en cada una se realizó la siembra de una muestra por estriado simple. Se incubó a 37°C por 24 horas y se observó el cambio de coloración en el medio.

Figura 7

Crecimiento en medio sal manitol



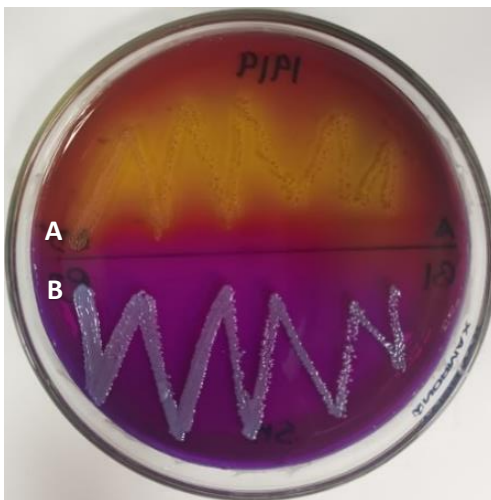
Nota. estafilococos sal manitol positivo (1) y estafilococos sal manitol negativo (2) y (3). Autoría propia.

Medio Maltosa

El medio contiene púrpura de bromocresol que permite la identificación del cambio de pH por la fermentación de maltosa, produciendo una coloración amarillenta en el medio circundante (Brown y Benson, 2007). Para la elaboración del medio, se colocó en un litro de agua 40 g de maltosa, 15 g de agar, 10 g de extracto de levadura, 10 g de peptona y 0,1 g de púrpura de bromocresol. Se autoclavó y dispensó en cajas Petri. Se sembraron dos muestras por caja, por estriado simple, se incubaron a 37°C por 24 h y se observó el cambio en la coloración del medio.

Figura 8

Reacción de Maltosa



Nota. (A) positiva y (B) negativa. Autoría propia.

Una vez identificados los microorganismos con todas las pruebas bioquímicas se procedió a seleccionar los microorganismos de interés para la realización de las pruebas API y los antibiogramas.

Metodología para la realización de Pruebas API

Microgen Staph-ID System

Se realizó tinción Gram (Gram positivos), una prueba de catalasa (catalasa positiva) y una prueba de coagulasa (coagulasa positiva) para confirmar que pertenece al género *Staphylococcus*.

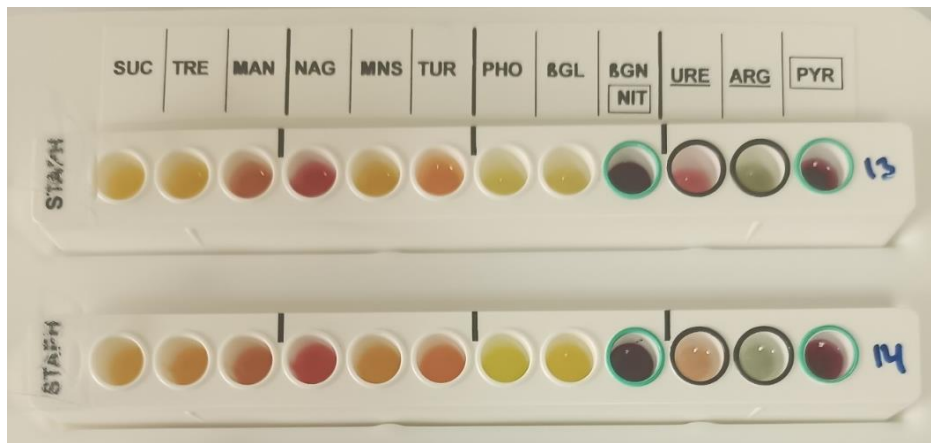
Se tomó una sola colonia de los tubos con agar nutriente inclinado e incubado de 18 a 24 horas, se mezcló en el medio que suministra el kit.

Se retiró la cinta adhesiva que cubre los pocillos, se tomó de 3 a 4 gotas del medio con una pipeta Pasteur estéril y se colocó en cada pocillo de la tira, después se cubrió con 3 a 4 gotas de aceite mineral al pocillo 10 y 11 (señalados con un círculo negro). Se selló con la cinta adhesiva retirada y se incubó a 37°C por 24 horas. Se adicionó los reactivos necesarios (Nitrato A, Nitrato B y PYR) en los

pocillos que así lo ameritaron, es decir donde la guía rápida del producto señaló. Se realizó la lectura final de resultados (Figura 9), observando en la tabla de colores (Figura 10) indicada en la guía rápida del producto. Se llenó la hoja de resultados de Microgen (Figura 11), según los valores descritos en la misma, para obtener un valor numérico de 5 dígitos.

Figura 9

Resultado de las tirrillas de Microgen™ Staph ID MID-69 a las 24 horas de incubación



Nota. Autoría propia.

Figura 10

Tabla de colorimetría Microgen™ Staph ID MID-69

WELL/NAPFCHEN /GODET	1 to 6	7	8	9	9a	10	11	12
Reaction	Carbohydrate Fermentation	PHS	β GL	β GN	(β GN) Nitrate	Urease	Arginine	PYR
Negative	Red	White	White	White	Green	Yellow	Yellow	Green Pink
Positive	Orange Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Pink Red	Pink Purple	Teal Blue	Red Dark Red

Nota. Recuperado de (Microgen, 2021).

Se digitó el perfil numérico en el Software Microgen Identification System, este genera un informe de los cinco microorganismos más parecidos en una base de datos selectiva.

Figura 11

Ejemplo de hoja de resultados

**MICROGEN STAPHYLOCOCCUS-ID 12 TEST
REPORT FORM**

Lab. No. 11239 Specimen Type: Wound Swab MICROGEN BIOPRODUCTS
Date: 13th October 2005

Well Number	Staphylococcus ID														
	LAT	CPG	NIT	SUC	TRE	MAN	NAG	MNS	TUR	PHO	βGL	βGN NIT	URE	ARG	PYR
24 hours	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-
Reaction Index	4	2	1	4	2	1		2	1	4	2	1	4	2	1
Sum of Positive Reactions	1			4			0			4			6		

Profile No: 14046 Final Identification: Staph. epidermidis

Nota. Recuperado de (Microgen, 2021).

Microgen® STREP-ID

Se realizó tinción Gram (cocos Gram positivos en cadenas o pares), prueba de catalasa (catalasa negativa) y agar sangre (hemólisis α o β).

Se tomó una cantidad considerable de colonia de los tubos con agar nutriente inclinado e incubado de 18 a 24 horas, se mezcló en el medio que suministra el kit hasta lograr una suspensión equivalente a 2.0 en la escala de MacFarland.

Se añadió tres gotas de hipurato en un tubo vacío suministrado por el kit, se tomó un barrido de la colonia solida se realizó una emulsión de hipurato en el tubo, se cerró el tubo y se incubo a 37°C de 18 a 24 horas.

Se retiró la cinta adhesiva que cubre los pocillos, se tomó de 3 a 4 gotas del medio con una pipeta Pasteur estéril y se colocó en cada pocillo de la tira, después se cubrió con 3 a 4 gotas de aceite mineral al pocillo 12 (señalado con un círculo negro). Se selló con la cinta adhesiva retirada y se incubó a 37°C por 24 horas. Se adicionó los reactivos necesarios (VP I, VP II, PYR y Ninhydrin) en los pocillos que así lo ameritaron, es decir donde la guía rápida del producto señaló. Se realizó la lectura final de resultados (Figura 12), observando en la tabla de colores (Figura 13) indicada en la guía rápida del producto. Se llenó la hoja de resultados de Microgen (Figura 14), según los valores descritos en la misma, para obtener un valor numérico de 5 dígitos.

Figura 12





















Resultado de las tirillas de Microgen® STREP-ID a las 24 horas de incubación



Nota. Autoría propia.

Figura 13

Tabla de colorimetría Microgen® STREP-ID

WELL/NAPFCHEN /GODET	1 to 6	7	8	9 to 10	11	12	
Reaction	Carbohydrate Fermentation	Esculin	Voges Proskauer	PHS, βGA	PYR	Arginine	Hippurate
Negative		 					
Positive	 		 	 	 	 	

Nota. Recuperado de (Microgen, 2021).

Se digitó el perfil numérico en el Software Microgen Identification System, este género un informe de los cinco microorganismos más parecidos en una base de datos selectiva.

Figura 14

Ejemplo de hoja de resultados

MICROGEN STREP-ID															
REPORT FORM															
Lab. No. B7365				Specimen Type: Brain Abscess				MICROGEN BIOPRODUCTS							
				Date: 2/7/07											
Strep-ID															
Well Number	HIP	AHE	BHE	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Reaction	MEL	SOR	INU	LAC	ARA	RIB	ESC	VP	PHS	βGA	PYR	ARG			
24 hours	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
Reaction Index	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Sum of Positive Reactions	2			0			4			0			4		
Profile No: 20404							Final Identification: S. mitis biovar 1								

Nota. Recuperado de (Microgen, 2021).

Una vez identificados los agentes causales por medio de Tinción Gram, las pruebas bioquímicas y API se procedió a realizar los antibiogramas.

Metodología para la realización de antibiogramas

Se preparó caldo peptona 24 horas antes del procedimiento se tomó una cantidad considerable de cultivo solido tomado de los tubos con agar nutriente inclinado de 18 – 24 h de incubación. Se ajustó la turbidez equivalente al estándar 0,5 de la escala de Mc. Farland.

En agar Muller Hilton (34g/L) que se preparó 24 horas previo al procedimiento, se sembró con un triángulo de inoculación las cepas aisladas de los microorganismos en una caja Petri para cada cultivo puro, en presencia del mechero se colocó con pinzas metálicas 5 sensibiliscos con ingrediente activo dispuestos de manera uniforme (separadas la misma distancia, y sin estar muy cerca al borde de la caja) dentro de la caja Petri (Tabla 5) (Bernal y Guzmán, 1984).

Tabla 5

Concentración de los ingredientes activos a utilizar en los sensibiliscos

Antibióticos	Concentración
Novobiocin	30 µg
Cloxacilina	5 µg
Ceftiofur	30 µg
Oxytetraciclina	30 µg
Cefalaxina	30 µg

Nota. µg: Micro gramos. Recuperado de (Acuña Molina y Rivadeneira Espinosa, 2008; Andrade Cerón y Sánchez Galarza, 2018; Bernal y Guzmán, 1984).

Se evaluará la resistencia o sensibilidad de cada agente microbiano de acuerdo al halo de inhibición que forma cada cultivo (Tabla 6).

Tabla 6

Interpretación de sensibilidad de bacterias causantes de mastitis en vacas a diferentes ingredientes activos

Ingrediente activo	Microorganismo	Diámetro de inhibición (mm)		
		R	I	S
Novobiocin	<i>Staphylococcus</i> sp.			≥22,0
Oxitetraciclina		≤14,0	15-18	≥19,0
Cloxacilina	<i>Staphylococcus aureus</i>	≤10,0	11-12	≥13,0
	<i>Staphylococcus</i> sp.	≤17,0		≥18,0
Ceftiofur	<i>Staphylococcus</i> sp..	≤17,0		
Cefalaxina	<i>Staphylococcus</i> sp.	≤14,0	15-17	≥18,0

Nota. R: resistente, I: intermedio, S: sensible, mm: milímetros, ≤: menor o igual que, ≥: mayor o igual que. Recuperado de (Bernal y Guzmán, 1984; CLSI, 2022; Devriese *et al.*, 1985).

Variables por medir

El agente causal se identificó y tipificó por Tinción Gram y pruebas bioquímicas (Catalasa, Coagulasa, ADNasa, Agar Sangre, Agar Sal manitol, Maltosa y pruebas API) en donde se utilizó 5 mL de la muestra de leche. Para la resistencia a antibióticos se utilizó la técnica de sensidiscos sumergidos en ingredientes activos (Cefalaxina, ceftiofur, cloxacilina, novobiocin y oxytetraciclina) la cual se evaluó por el diámetro del halo de inhibición de cada ingrediente activo.

Análisis estadístico

Las variables riqueza y diámetro del halo de inhibición se analizaron por medio de estadística descriptiva (promedio, error estándar, coeficiente de variación, prueba no paramétrica y diferentes técnicas gráficas).

Una vez obtenidos los valores se realizó una prueba de comparación de medias de a pares al 5%. Este procesamiento de datos se realizó en EXCEL y el programa estadístico InFostat

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

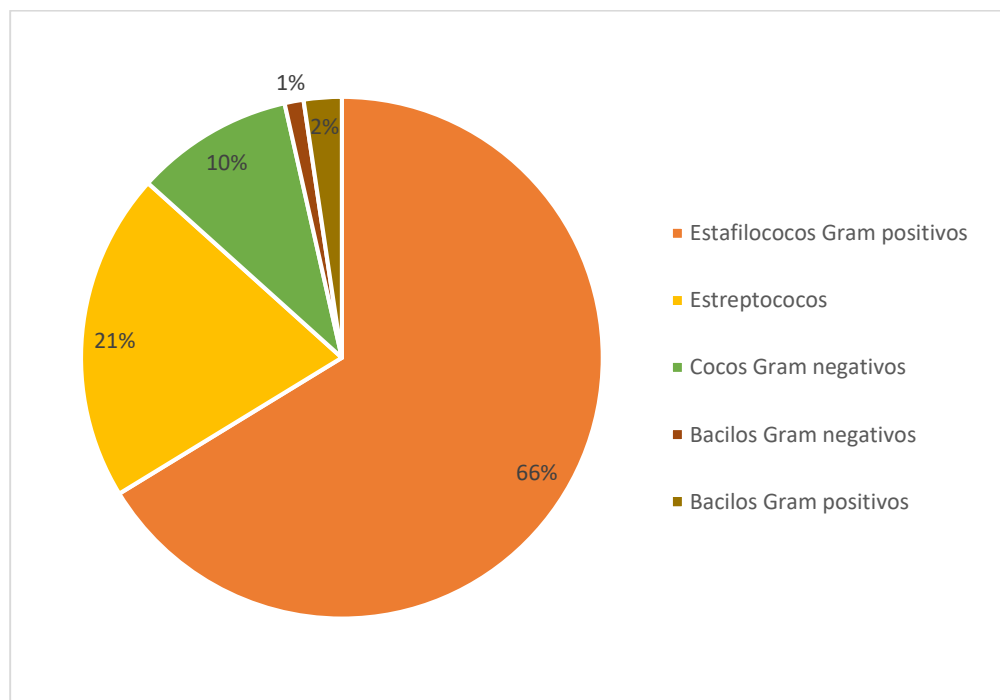
Aislamiento de microorganismos

Después de la siembra en los medios agar sangre, sal manitol, EMB y MacConkey se obtuvieron un total de 255 aislamientos cuya morfología y tinción Gram se detallan a continuación (Figura 15).

Figura 15

Porcentaje de microorganismos aislados de las vacas muestreadas positivas para mastitis en la Hacienda

El Prado- IASA I



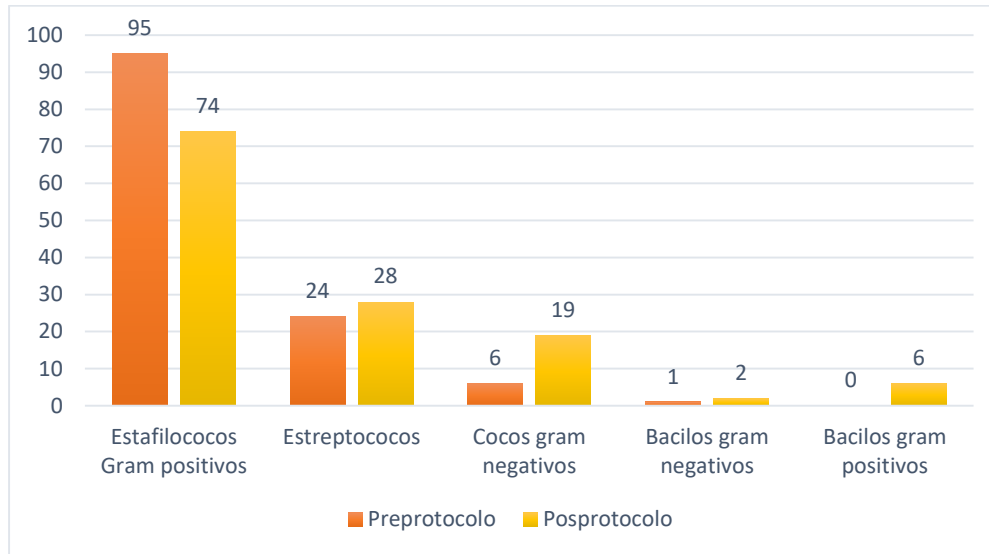
Nota. Autoría Propia.

Después de la siembra en los medios se obtuvieron 126 aislamientos antes de la aplicación del protocolo y 129 aislamientos después de la aplicación del protocolo cuya morfología y tinción Gram se detallan a continuación.

Figura 16

Número de microorganismos aislados pre y posprotocolo en vacas positivas para mastitis en la Hacienda

El Prado- IASA I



Nota. Autoría Propia.

De los 255 aislamientos 169 fueron Estafilococos Gram positivos, así se procedió a realizar una identificación por especie de estafilococos con pruebas bioquímicas y pruebas API.

Identificación de microorganismos con pruebas bioquímicas.

Tabla 7

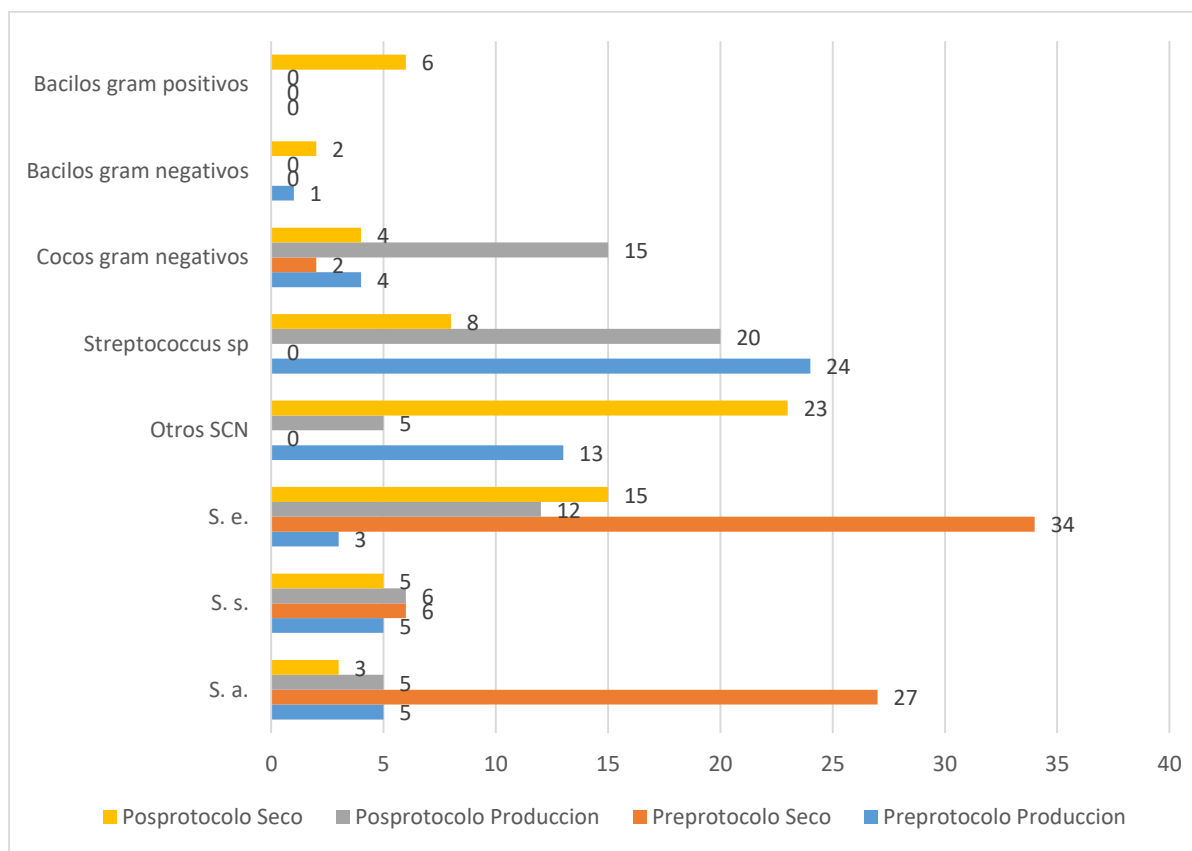
Número de microorganismos obtenidos de los cuartos muestreados de vacas positivas a mastitis

Protocolo	Producción	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Staphylococcus epidermis</i>	Otros SCN	<i>Streptococcus sp</i>	Cocos Gram negativos	Bacilos Gram negativos	Bacilos Gram positivos
Preprotocolo	Producción	5	5	3	13	24	4	1	0
	Seco	27	6	34	0	0	2	0	0
Posprotocolo	Producción	5	6	12	5	20	15	0	0
	Seco	3	5	15	23	8	4	2	6

Nota. Autoría Propia.

Figura 17

Número de microorganismos identificados pre y posprotocolo en vacas en producción y en seco positivas para mastitis en la Hacienda El Prado-IASA I



Nota. S.e.: Staphylococcus epidermis; S.s.: Staphylococcus saprophyticus; S.a.: Staphylococcus aureus. Autoría Propia.

Para el procesamiento de datos en el programa estadístico Infostat se procedió a nombrar a los factores de la siguiente manera (Tabla 8).

Tabla 8

Nombre de los factores para el programa Infostat

Factores	Programa
Tipo de vaca	Producción
En producción	Pro_Si
En seco	Pro_No
Número de partos	Partos
De 1 a 3	De 1 a 3
De 4 a 6	De 4 a 6
Antibiótico	Antibiótico
Si	Ant_Si
No	Ant_No

Nota. Autoría Propia.

Para obtener los resultados de interés se procedió a clasificar a los datos en presencia de Estafilococos Gram + (PEG+) y ausencia (AEG+); presencia de Staphylococcus aureus (SA+) y ausencia (SA-), y a su vez presencia con el valor de 1 y ausencia con el valor de 0 para poder cambiar los datos de categóricos a reales y así poder realizar una prueba no paramétrica con un nivel de significancia del 95%.

Los microorganismos representativos causantes de mastitis se encuentran en el grupo general de Estafilococos Gram +, el específico derivado del anterior grupo mencionado es Staphylococcus aureus y los resultados se presentan a continuación (Tabla 9).

Tabla 9

Estadísticas por tratamiento de Estafilococos Gram + (Media, Valor H de la prueba Kruskal Wallis y respectivos valores p) para vacas positivas a mastitis de la Hacienda El Prado – IASA I

Protocolo	Tratamiento	Producción	Partos	Antibiótico	Media	H	p		
Pre	T1	Si	De 1 a 3	Si	0,38	26,3	0,0001		
	T3	Si	De 4 a 6	Si	0,57				
	T5	No	De 1 a 3	Si	1				
	T7	No	De 4 a 6	Si	0,96				
	T2	Si	De 1 a 3	No	0,44			21,5	0,0001
	T4	Si	De 4 a 6	No	0,57				
	T6	No	De 1 a 3	No	0,95				
	T8	No	De 4 a 6	No	1				
Pos	T1	Si	De 1 a 3	Si	0,27	26,3	0,0001		
	T3	Si	De 4 a 6	Si	0,67				
	T5	No	De 1 a 3	Si	0,90				
	T7	No	De 4 a 6	Si	0,79				
	T2	Si	De 1 a 3	No	0,36			21,5	0,0001
	T4	Si	De 4 a 6	No	0,6				
	T6	No	De 1 a 3	No	0,25				
	T8	No	De 4 a 6	No	0,61				

Nota. Autoría Propia.

El análisis de las tendencias de los tratamientos mediante la prueba de Kruskal Wallis puso de manifiesto que había diferencias significativas, dependientes de la producción, partos, aplicación de antibiótico, antes y después de la aplicación del protocolo ($H=26,3$; $p=0,0001$) y ($H=2,5$; $p=0,0001$) (Tabla 9) para la variable de interés Estafilococos Gram +.

Se procedió a realizar una prueba de comparación de medias de a pares al 0.05 (Tabla 10).

Tabla 10

Ranks ± desviación estándar de la cantidad de Estafilococos Gram + encontrados en los diferentes tratamientos pre y pos protocolo

Protocolo	Tratamiento	Numero de microorganismos	
Pre	T1	45,12±0,51	AB
	T3	57,07±0,51	ABC
	T5	84,50±0,00	C
	T7	81,72±0,21	C
	T2	51,28±0,51	A
	T4	59,79±0,51	AB
	T6	83,66±0,23	BC
	T8	87,00±0,00	C
Pos	T1	37,95±0,46	A
	T3	63,17±0,49	ABC
	T5	78,40±0,30	C
	T7	70,79±0,43	BC
	T2	46,18±0,50	A
	T4	61,60±0,51	AB
	T6	39,38±0,46	A
	T8	62,15±0,50	AB

Nota. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p>0,05$). Autoría Propia.

Tabla 11

Estadísticas por Tratamiento de Staphylococcus aureus (Media, Valor H de la prueba Kruskal Wallis y respectivos valores p) para vacas positivas a mastitis de la Hacienda El Prado – IASA I

Protocolo	Tratamiento	Producción	Partos	Antibiótico	Media	H	p		
Pre	T1	Si	De 1 a 3	Si	0,08	9,18	0,0004		
	T3	Si	De 4 a 6	Si	0,00				
	T5	No	De 1 a 3	Si	0,22				
	T7	No	De 4 a 6	Si	0,43				
	T2	Si	De 1 a 3	No	0,06			8,62	0,0054
	T4	Si	De 4 a 6	No	0,21				
	T6	No	De 1 a 3	No	0,32				
	T8	No	De 4 a 6	No	0,44				
Pos	T1	Si	De 1 a 3	Si	0,05	9,18	0,0004		
	T3	Si	De 4 a 6	Si	0,00				
	T5	No	De 1 a 3	Si	0,01				
	T7	No	De 4 a 6	Si	0,00				
	T2	Si	De 1 a 3	No	0,14			8,62	0,0054
	T4	Si	De 4 a 6	No	0,13				
	T6	No	De 1 a 3	No	0,00				
	T8	No	De 4 a 6	No	0,00				

Nota. Autoría Propia.

El análisis de las tendencias de los tratamientos mediante la prueba de Kruskal Wallis puso de manifiesto que había diferencias significativas, dependientes de la producción, partos, aplicación de antibiótico, antes y después de la aplicación del protocolo ($H=8,62$; $p=0,0054$) y ($H=8,62$; $p=0,0054$) (Tabla 11) para la variable interés *Staphylococcus aureus*.

Se procedió a realizar una prueba de comparación de medias de a pares al 0.05 (tabla 12).

Tabla 12

Ranks ± desviación estándar de la cantidad de Staphylococcus aureus encontrados en los diferentes tratamientos pre y pos protocolo.

Protocolo	Tratamiento	Numero de microorganismos	
Pre	T1	60,92±0,28	AB
	T3	56,00±0,00	A
	T5	70,22±0,44	AB
	T7	83,83±0,51	B
	T2	56,97±0,25	A
	T4	66,61±0,43	A
	T6	73,05±0,48	A
	T8	81,22±0,51	A
Pos	T1	58,91±0,21	A
	T3	56,00±0,00	A
	T5	65,14±0,36	AB
	T7	56,00±0,00	A
	T2	62,07±0,36	A
	T4	61,47±0,35	A
	T6	53,00±0,00	A
	T8	53,00±0,00	A

Nota. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p>0,05$). Autoría Propia.

Pruebas API

Para la realización de pruebas API se procedió a seleccionar los microorganismos identificados por pruebas bioquímicas en cada grupo de datos, y los resultados son los siguientes.

Tabla 13

Resultados de las pruebas API realizadas tanto para *Estafilococos* (Microgen Staph-ID System) y para *Estreptococos* (Microgen® STREP-ID)

PROTOCOLO	PRODUCCION	MICROORGANISMO	
		PRUEBAS BIOQUIMICAS	PRUEBAS API
PRE	SECO	<i>Streptococcus</i> sp	<i>Streptococcus agalactiae</i>
PRE	PRODUCCIÓN	<i>Streptococcus</i> sp	<i>Streptococcus agalactiae</i>
PRE	SECO	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
PRE	PRODUCCIÓN	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
PRE	SECO	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
PRE	PRODUCCIÓN	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
PRE	SECO	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
PRE	PRODUCCIÓN	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
POS	SECO	<i>Streptococcus</i> sp	<i>Streptococcus uberis</i>
POS	PRODUCCIÓN	<i>Streptococcus</i> sp	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>
POS	SECO	<i>Staphylococcus</i> sp	<i>Staphylococcus simulans</i>
POS	PRODUCCIÓN	<i>Staphylococcus</i> sp	<i>Staphylococcus warneri</i>
POS	SECO	<i>Staphylococcus</i> sp	<i>Staphylococcus simulans</i>
POS	PRODUCCIÓN	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
POS	SECO	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
POS	PRODUCCIÓN	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

Nota. Autoría Propia.

Tanto para la identificación por pruebas bioquímicas y las pruebas API tenemos identificado al mismo microorganismo, para los microorganismos generales como *Streptococcus* sp y *Staphylococcus* sp tenemos la identificación específica con las pruebas API para los 2 géneros.

Antibiogramas

Para la realización de los antibiogramas se procedió con los microorganismos identificados por pruebas bioquímicas y API.

Los 5 antibióticos son: Oxitetraciclina (30 µg), Cloxacilina (5 µg), Cefalaxina (30 µg) que son los antibióticos más utilizados para el tratamiento de mastitis; Novobiocin (30 µg) y Ceftiofur (30 µg) que son antibióticos menos utilizados así prospectando su antibioresistencia en estos microorganismos.

Tabla 14

Susceptibilidad y resistencia de microorganismos causantes de mastitis a antibióticos en vacas de La Hacienda El Prado - IASA I

PROTOCOLO	PRODUCCIÓN	MICROORGANISMO	NOVOBIOCIN 30 µg	CLOXACILINA 5µg	CEFTIOFUR 30 µg	OXYTETRACYCLINA 30µg	CEFALAXINA 30µg
PRE	SECO	<i>Streptococcus agalactiae</i>	S	S	S	S	S
PRE	PRODUCCIÓN	<i>Streptococcus agalactiae</i>	S	S	S	S	S
PRE	SECO	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	S	S	S	S	S
PRE	PRODUCCIÓN	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	S	S	S	S	R
PRE	SECO	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	S	R	R	S	S
PRE	PRODUCCIÓN	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	S	S	S

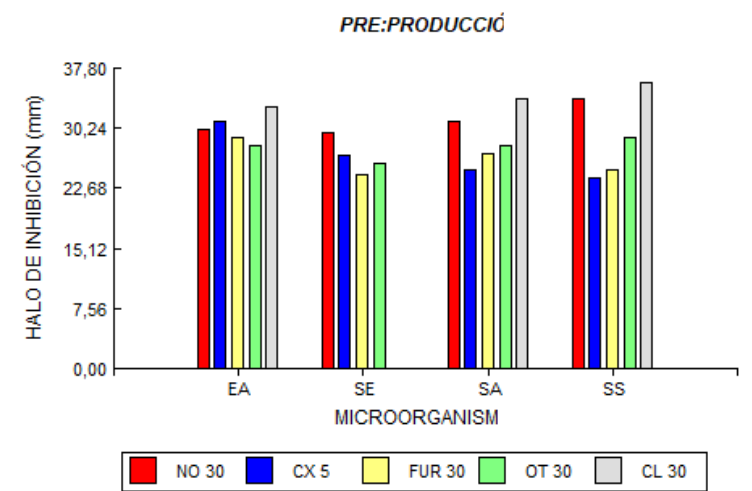
PROTOCOLO	PRODUCCIÓN	MICROORGANISMO	NOVOBIOCIN 30 µg	CLOXACILINA 5µg	CEFTIOFUR 30 µg	OXYTETRACYCLIN A 30µg	CEFALAXINA 30µg
PRE	SECO	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	S	S	S
PRE	PRODUCCIÓN	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	S	S	S	S	S
POS	SECO	<i>Streptococcus uberis</i>	S	S	S	S	S
POS	PRODUCCIÓN	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	S	S	S	S	S
POS	SECO	<i>Staphylococcus simulans</i>	S	S	S	S	S
POS	PRODUCCIÓN	<i>Staphylococcus warneri</i>	S	S	S	S	S
POS	SECO	<i>Staphylococcus simulans</i>	S	S	S	S	S
POS	PRODUCCIÓN	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	S	S	S	S	S
POS	SECO	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	S	S	S
POS	PRODUCCIÓN	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	S	S	S

Nota. R: resistente; S: sensible. Autoría Propia.

El microorganismo *Staphylococcus epidermidis* aislado antes de la aplicación del protocolo de vacas en producción presenta resistencia a Cefalaxina (30 µg) y *Staphylococcus saprophyticus* aislado antes de la aplicación del protocolo de vacas en seco presenta resistencia a Cloxacilina (5 µg) y Ceftiofur (30 µg). La mayor parte de los microorganismos aislados son sensibles a todos los antibióticos evaluados.

Figura 18

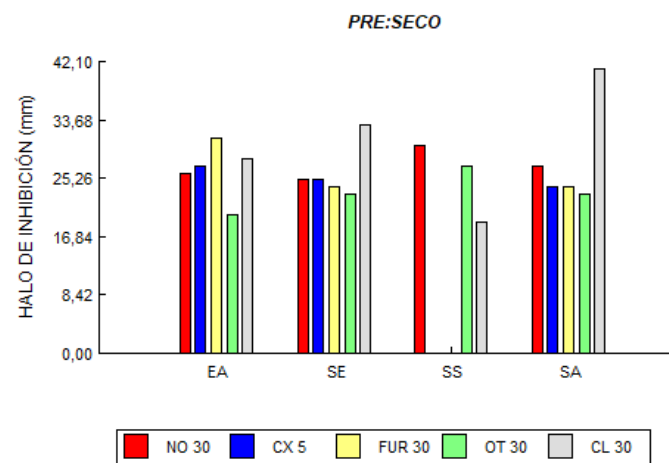
Halo de inhibición de 5 antibióticos ante los microorganismos identificados, preprotocolo en vacas en producción positivas a mastitis en La Hacienda El Prado – IASA I



Nota. EA: *Streptococcus agalactiae*; SE: *Staphylococcus epidermis*; SA: *Staphylococcus aureus*; SS: *Staphylococcus saprophyticus*. NO 30: Novobiocin (30 µg); Cloxacilina (5 µg); FUR 30: Ceftiofur (30 µg); OT 30: Oxitetracilina (30 µg); CL 30: Cefalaxina (30 µg). Autoría Propia.

Figura 19

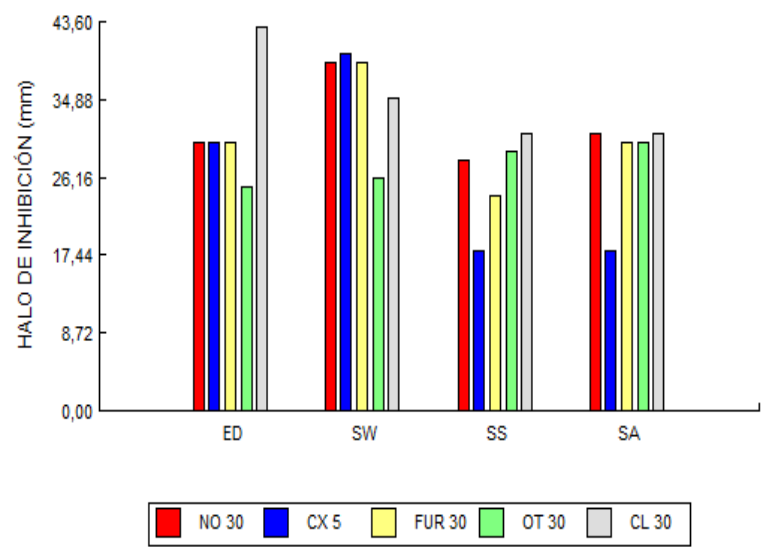
Halo de inhibición de 5 antibióticos ante los microorganismos identificados, preprotocolo en vacas en seco positivas a mastitis en La Hacienda El Prado – IASA I



Nota. EA: *Streptococcus agalactiae*; SE: *Staphylococcus epidermis*; SA: *Staphylococcus aureus*; SS: *Staphylococcus saprophyticus*. NO 30: Novobiocin (30 µg); Cloxacilina (5 µg); FUR 30: Ceftiofur (30 µg); OT 30: Oxitetracilina (30 µg); CL 30: Cefalaxina (30 µg). Autoría propia.

Figura 20

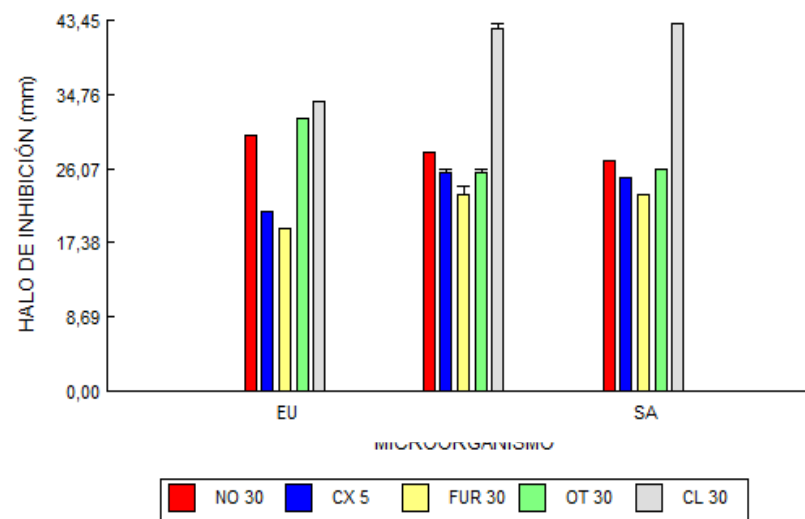
Halo de inhibición de 5 antibióticos ante los microorganismos identificados, posprotocolo en vacas en producción positivas a mastitis en La Hacienda El Prado – IASA I



Nota. ED: *Streptococcus dysgalactiae*; SW: *Staphylococcus warneri*; SA: *Staphylococcus aureus*; SS: *Staphylococcus saprophyticus*. NO 30: Novobiocin (30 µg); Cloxacilina (5 µg); FUR 30: Ceftiofur (30 µg); OT 30: Oxitetracilina (30 µg); CL 30: Cefalaxina (30 µg). Autoría propia.

Figura 21

Halo de inhibición de 5 antibióticos ante los microorganismos identificados, posprotocolo en vacas en seco positivas a mastitis en La Hacienda El Prado – IASA I



Nota. EU: *Streptococcus uberis*; SA: *Staphylococcus aureus*. NO 30: Novobiocin (30 µg); Cloxacilina (5 µg); FUR 30: Ceftiofur (30 µg); OT 30: Oxitetracilina (30 µg); CL 30: Cefalaxina (30 µg). Autoría propia

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

Microorganismos identificados

Según Calvino (2005), la higiene de la ubre, el tamaño del establo, periodo y número de lactación, higiene de la sala del ordeño y el uso de sellador son factores determinantes en la presencia de mastitis subclínica. En La Hacienda El Prado – IASA I se tiene buenas prácticas de ordeño (BPO) lo que podría explicar la similitud de porcentajes (79% Estafilococos Gram +) con Guazha Herrera (2020) en el aislamiento de microorganismos ya que, las fincas muestreadas tienen conocimientos de BPO.

El grupo general de Estafilococos Gram + fueron los microorganismos aislados que representaron el 66% en vacas positivas a mastitis, valores similares han sido reportados por Guazha (2020) en la provincia de Galápagos, en el cual el 79% de todos los aislados fueron Estafilococos Gram + en vacas positivas a mastitis. Esta similitud puede deberse a que se utilizó la misma metodología en cuanto a la toma de muestras e identificación de agentes causales.

Staphylococcus aureus, el principal agente causal de mastitis se encontró en un 23,67% siendo una presencia menor en contraste con lo reportado por Guazha (2020) con un 47,37% en Galápagos y Andrade Cerón y Sánchez Galarza (2018) con un 55,2% en Bolívar, de los aislados de vacas positivas a mastitis, esto podría explicarse por el número de muestras tomadas, la provincia donde fueron tomadas y las buenas prácticas de ordeño aplicadas en la Hacienda El Prado, según Morales Cuichan (2021) se sellan los pezones con un sellador a base de Yodo cuando se termina el ordeño esto puede representar una diferencia abismal al momento de controlar o combatir infecciones por *Staphylococcus aureus*.

El 37,86% de los aislados de muestras con mastitis corresponden a *Staphylococcus epidermis*, el 13,00% a *Staphylococcus saprophyticus* y el 24,26% a otros estafilococos coagulasa negativos, valores inferiores fueron encontrados por Amer *et al.* (2018) en la provincia de El Oro, donde el 55,3%

de los aislados causantes de mastitis subclínica corresponden a estafilococos coagulasa negativos (SCN) tales como *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. sciuri*, *S. arlettae* y *S. gallinarum*, esto podría deberse a que los microorganismos en dado estudio fueron identificados por métodos moleculares siendo diagnósticos definitivos por tener una mayor sensibilidad y especificidad que los otros métodos según lo menciona Franco Zetina *et al.* (2019).

Estreptococos y bacilos Gram negativos fueron identificado en el 30,76% y 1,78% de los aislados respectivamente en el presente estudio. Estos valores son similares a los reportados por Bonifaz y Conlago (2016) en Cayambe, que identificaron *Streptococcus dysgalactiae* en el 13% y *E. coli* en el 13% de aislados, esto podría deberse a que el estudio fue enfocado en la identificación de Estreptococos causantes de mastitis y de *E. coli*; pero son altos comparados con los reportados por Andrade y Sánchez (2018) en Bolívar, que identificaron 1.5% de *Streptococcus sp.*, 15% *E. coli*, 1.5% *Shigella sp.*, 3% *Klebsiella sp.* y 1.5% *Enterobacter sp.*, esto puede ser porque utilizaron técnicas de identificación tanto para bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Bacilos Gram positivos se identificaron en el 3.5% de los aislados de muestras con mastitis, encontrando un evidente contraste con el estudio realizado por Andrade Cerón y Sánchez Galarza (2018) en Bolívar, donde *Bacillus sp* se aisló en el 26.9% de muestras, esta diferencia posiblemente se debe a que utilizaron técnicas de identificación exclusivas para bacilos Gram positivos; en el estudio realizado por Amer *et al.* (2018) en El Oro, se encontró bacilos Gram positivos como *B. cereus*, *B. licheniformis* y *B subtilis* en un 22.1% de casos mencionando que son patógenos importantes de mastitis clínica y subclínica la identificación de estos se realizó por métodos moleculares lo que provee un nombre exacto al microorganismo.

Los factores estudiados en el presente estudio fueron: tipo de vaca (en producción y en secado), número de partos (1 a 3 y 4 a 6) estos factores son estadísticamente significativos para Estafilococos

Gram+ y *Staphylococcus aureus* siendo de importancia en el padecimiento de mastitis en vacas lecheras tal como lo menciona Detilleux (2018), con el período de secado, Heringstad *et al.* (2000) con la etapa de lactancia y (Liu *et al.*, 2020) con número de partos. También se indica una diferencia entre aplicar o no algún tratamiento antibiótico, y en el antes y después de la aplicación de dicho protocolo (antibiótico), ya que se observó una disminución de Estafilococos Gram+ y *Staphylococcus aureus*.

Pruebas API

Al momento de identificar los microorganismos aislados se pudo corroborar por medio de pruebas API a Estafilococos específicos (Microgen Staph-ID System) e identificar otros como los reportados por Bonetto (2014) causantes de mastitis que son *Staphylococcus simulans* y *Staphylococcus warneri* la identificación de diferentes microorganismos posiblemente se debe a que el estudio estaba enfocado en identificar agentes causales no comunes de mastitis.

Al identificar Estreptococos (Microgen® STREP-ID) se pudo identificar a *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* y *Streptococcus uberis* causantes de mastitis según lo reportado por Julio *et al.* (2014) donde se utilizó Vitek® 2 , aun así teniendo una similitud aceptable de identificación entre el método manual y el rápido, hay que recalcar que los métodos de identificación rápida difieren entre autor ya que son diferentes casas comerciales.

Antibiogramas

Para *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus warneri*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* y *Streptococcus agalactiae* siendo estos englobados en Bacterias Gram positivas, no presentan resistencia a ningún antibiótico en ninguno de los grupos, hallazgo similar a Acuña Molina y Rivadeneira Espinosa (2008) en Pichincha, que reportaron que en bacterias Gram positivas la mayoría de antibióticos podrán ayudar eficientemente en el control, esto se debe a buenas

prácticas de ordeño, al uso de medicamentos respetando dosis y tiempo de aplicación; y que se trabajó en la misma provincia.

Staphylococcus saprophyticus es sensible a la mayoría de antibióticos y en su mayoría de grupos excepto para cloxacilina y ceftiofur en el grupo preprotocolo en seco; según Tollersrud *et al.* (2008) en Noruega, donde ceftiofur fue utilizado para el tratamiento de mastitis y no presentó resistencia en ningún microorganismo, la diferencia de resultados puede deberse a la cantidad de antibiótico utilizado y a la diferencia de manejo en el tratamiento de mastitis.

Staphylococcus epidermidis es sensible a la mayoría de antibióticos y en su mayoría de grupos excepto para cefalaxina en el grupo preprotocolo en producción; hallazgo similar reportado por Andrade Cerón y Sánchez Galarza (2018) en Bolívar, donde el antibiótico que presentó mayor resistencia en los diferentes microorganismos fue cefalaxina. La similitud de resultados posiblemente es porque se utilizó la misma metodología para la realización de los antibiogramas y por la zona (Sierra ecuatoriana).

Novobiocin y Ceftiofur son antibióticos eficaces para tratar bacterias Gram Positivas así prospectando un uso eficiente en el tratamiento de mastitis.

En los 2 únicos microorganismos que presentaron resistencia se recalca que *Staphylococcus epidermidis* pertenece a vacas en producción y *Staphylococcus saprophyticus* a vacas en el seco esto puede deberse a que se utilizan diferentes productos para el control de mastitis, hallazgo reportado por (Mainau *et al.*, 2014).

Las diferencias del estudio con los citados, fueron las condiciones medioambientales, protocolo en la toma de muestras, diferencia de agentes causales de mastitis, diferentes niveles de resistencia, prácticas y condiciones de manejo, tipo, uso y cantidad de antibiótico suministrado.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- Los agentes causales de mastitis subclínica preprotocolo tanto en vacas en producción como en seco en general fueron: Estafilococos Gram positivos, Estreptococos y Bacilos Gram negativos, en específico fueron *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus* y *Staphylococcus epidermis*; para posprotocolo tanto en producción y en seco en general fueron Estafilococos Gram positivos, Estreptococos, Bacilos Gram negativos y Bacilos Gram positivos en específico fueron *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus* y *Staphylococcus epidermis*.
- El número de aislados de estafilococos Gram positivos y *Staphylococcus aureus* es mayor antes de la aplicación del protocolo en vacas en seco y con un número de partos de 4 a 6.
- Todos los agentes causales identificados son sensibles a los antibióticos utilizados en el estudio a excepción de *Staphylococcus epidermidis*, aislado antes de la aplicación del protocolo de vacas en producción que presenta resistencia a Cefalaxina, y *Staphylococcus saprophyticus* aislado antes de la aplicación del protocolo de vacas en seco que presenta resistencia a Cloxacilina y Ceftiofur.
- La aplicación del protocolo (antibiótico) se debe enfocar en vacas que han tenido de 4 a 6 partos y especialmente cuando entran al seco, ya que, se tiene una disminución considerable de Estafilococos Gram positivos y una eliminación casi total de *Staphylococcus aureus* en las muestras positivas a mastitis. En vacas que han tenido de 1 a 3 partos en producción, no muestran mayor carga bacteriana ni tampoco una mejora con la aplicación del protocolo, esto podría deberse a que la cantidad de antibiótico aplicado no es el óptimo.

- La baja resistencia a antibióticos puede deberse a las buenas prácticas de ordeño y al uso adecuado de antibióticos en La Hacienda El Prado – IASA I.

Recomendaciones

- Se recomienda realizar la aplicación de diferentes antibióticos en vacas con números de partos diferentes o con un intervalo de 1 parto (1 parto – 2 partos – 3 partos - 4 partos – 5 partos – 6 partos) y evaluar si los agentes causales de mastitis difieren entre número de partos.
- Se recomienda realizar la tipificación molecular de agentes causales de mastitis para así obtener una base de datos precisa y confiable.
- Se recomienda prospectar genes de antibioresistencia a Cefalaxina, Cloxacilina y Ceftiofur en *Staphylococcus saprophyticus* y *Staphylococcus epidermidis* y así corroborar la antibioresistencia.

Bibliografía

Acuña, V. L., y Rivadeneira, A. P. (2008). *Aislamiento, identificación y antibiograma de patógenos presentes en leche con mastitis en ganaderías bovinas de la provincia de Pichincha*. [Trabajo de titulación, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE].

<http://repositorio.espe.edu.ec/jspui/handle/21000/2553>

AGROCALIDAD. (2020). *Toma y envío de muestras de animales domésticos*.

<https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2020/04/11-INT-DA-19-Rev-4.pdf>

Aguilar, F., y Álvarez, C. A. (2019). *Mastitis Bovina*. UTMACH.

<http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/15205>

Alomoto, I., y Crisanto, P. (2023). *Evaluación de la calidad de leche en el hato bovino de la hacienda “El Prado” a través del seguimiento longitudinal en el diagnóstico y tratamiento de mastitis clínica y subclínica*. (Trabajo de titulación) Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Sangolquí.

Alvarado, R., y Iglesias, S. (2017). Sector externo, restricciones y crecimiento económico en Ecuador.

Problemas del Desarrollo, 83–106. <https://doi.org/10.1016/j.rpd.2017.11.005>

Amer, S., Gálvez, F. L. A., Fukuda, Y., Tada, C., Jimenez, I. L., Valle, W. F. M., y Nakai, Y. (2018). Prevalence and etiology of mastitis in dairy cattle in El Oro Province, Ecuador. *Journal of Veterinary Medical Science*, 861-868. <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0504>

Andrade, C. F., y Sánchez, A. D. (2018). *Estudio clínico, microbiológico y estimación económica de mastitis bovina, en la Cooperativa de Producción Agropecuaria “El Salinerito”, provincia Bolívar - Ecuador*. [Trabajo de titulación, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE].

<http://repositorio.espe.edu.ec/jspui/handle/21000/14267>

- Apiweb. (2010), Re. (12 de marzo del 20232). *Sistemas miniaturizados API*. BioMérieux.
http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_SistemasAPI.pdf
- Arce, M., y Pozo, W. (2015). Variabilidad en la producción lechera del agrosistema IASA, según las categorías de intensidad de lluvias de Trojer. *Boletín Técnico, Serie Zoológica*, 2(10-11),1-10.
<https://journal.espe.edu.ec/ojs/index.php/revista-serie-zoologica/article/view/1462>
- Bergey, D. H., y Holt, J. G. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. The Williams y Wilkins Company. <https://www.biodiversitylibrary.org/item/41848#page/7/mode/1up>
- Bernal, M., y Guzmán, M. (1984). El antibiograma de discos. Técnica de KIRBY-BAUER. *Revista Biomedica*, 112-121.
<https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/download/1891/1917/>
- Boerlin, P., Kuhnert, P., Hüsey, D., y Schaellibaum, M. (2003). Methods for identification of *Staphylococcus aureus* isolates in cases of bovine mastitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(2), 767–771. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.2.767-771.2003/ASSET/180FD4C0-9B14-4BD5-8C63-4A648201C258/ASSETS/GRAPHIC/JM0231004001.JPEG>
- Bolaños, F., Fernando, O., Graffe, T., Eduardo, J., Cabrera, P., Jaiver, J., y Gallego, C. (2012). *Mastitis bovina: generalidades y métodos de diagnóstico*. www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infeciosas/bovinos_leche/78-mastitis.pdf
- Bonetto, C. C. (2014). *Mastitis bovina causada por Staphylococcus coagulasa negativos*. [Tesis de doctorado: Universidad Nacional de la Plata]. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/40427>
- Bonifaz, N., y Conlago, F. (2016). Prevalencia e incidencia de mastitis bovina mediante la prueba decaliforniamastitis test con identificación del agente etiológico, en paquiestancia, Ecuador. *LA GRANJA. Revista de Ciencias de la Vida*, 24(2), 43–52.
<https://www.redalyc.org/journal/4760/476051632003/html/>

- Bou, G., Fernández, A., García, C., Sáez, J. A., y Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8), 601–608. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Bradley, A. J. (2002). Bovine Mastitis: An Evolving Disease. *The Veterinary Journal*, 164(2), 116–128. <https://doi.org/10.1053/tvjl.2002.0724>
- Brown, A., y Benson, H. (2007). *Benson's Microbiological Applications, Laboratory Manual in General Microbiology*.
- Bulteh. (2017), Re. (9 de agosto de 2023). *Eko – milk | Maquinaria Utilizada en industria Láctea*. Industriadelacteosblog. <https://industriadelacteosblog.wordpress.com/maquinas/eko-milk/>
- Calvinho, L. (2005), Re. (10 de marzo de 2023). *Diagnóstico bacteriológico de mastitis y su importancia en los programas de control*. Aprocal. http://www.aprocal.com.ar/wp-content/uploads/diagnostico_de_mastitis.htm.pdf
- CLSI. (2022). *Publishes M100—Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 32nd Edition*. <https://clsi.org/about/press-releases/clsi-publishes-m100-performance-standards-for-antimicrobial-susceptibility-testing-32nd-edition/>
- Contreras, G. A., y Rodríguez, J. M. (2011). Mastitis: Comparative Etiology and Epidemiology. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 16(4), 339–356. <https://doi.org/10.1007/s10911-011-9234-0>
- Detilleux, J. (2018). Tolerance to bovine clinical mastitis: Total, direct, and indirect milk losses. *Journal of Dairy Science*, 101(4), 3334–3343. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13976>
- Devriese, L. a., Schleifer, K. h., y Adegoke, G. o. (1985). Identification of coagulase-negative staphylococci from farm animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 58(1), 45–55. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1985.tb01428.x>

- Duarte, C. M., Freitas, P. P., y Bexiga, R. (2015). Technological advances in bovine mastitis diagnosis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 27(6), 665–672.
<https://doi.org/10.1177/1040638715603087>
- Espinoza, M. G., y Mier, J. P. (2013). *Determinación de la prevalencia de mastitis mediante la prueba California mastitis test e identificación y antibiograma del agente causal en ganaderías lecheras del Cantón el Chaco, provincia del Napo*. [Trabajo de grado, Universidad Central del Ecuador]
<http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/1281>
- Franco, M., Adame, J., y Dzul, K. (2019). Efectividad de los métodos diagnósticos para la detección de ehrlichiosis monocítica humana y canina. *Revista Chilena de Infectología*, 36(5), 650–655.
<https://doi.org/10.4067/S0716-10182019000500650>
- Gonzalo, C., Ariznabarreta, A., Carriedo, J. A., y San Primitivo, F. (2002). Mammary Pathogens and Their Relationship to Somatic Cell Count and Milk Yield Losses in Dairy Ewes. *Journal of Dairy Science*, 85(6), 1460–1467. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74214-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74214-8)
- Guazha Herrera, C. D. (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*. [Trabajo de titulación, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE].
<http://repositorio.espe.edu.ec/jspui/handle/21000/23029>
- Heringstad, B., Klemetsdal, G., y Ruane, J. (2000). Selection for mastitis resistance in dairy cattle: A review with focus on the situation in the Nordic countries. *Livestock Production Science*, 64, 95–106. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(99\)00128-1](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(99)00128-1)
- Hogeveen, H., Huijps, K., y Lam, T. J. G. M. (2011). Economic aspects of mastitis: new developments. *New Zealand Veterinary Journal*, 59(1), 16–23. <https://doi.org/10.1080/00480169.2011.547165>

INEC. (2021). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua*.

<https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web->

[inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac-2020/Presentacion%20ESPAC%202020.pdf](https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac-2020/Presentacion%20ESPAC%202020.pdf)

Julio, J., Hernández, J., y Suárez, M. C. (2014). *Identificación Manual y Automatizado de Aislamientos de la Familia Streptococcacea Provenientes de Muestras de Leche de Vacas con Mastitis*.

https://www.researchgate.net/publication/272621471_Identificacion_Manual_y_Automatizado_de_Aislamientos_de_la_Familia_Streptococcacea_Provenientes_de_Muestras_de_Leche_de_Vacas_con_Mastitis

Kitchen, B. J. (1981). Bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. *Journal of Dairy Research*, 48(1), 167–188. <https://doi.org/10.1017/S0022029900021580>

Liu, K., Tao, L., Li, J., Fang, L., Cui, L., Li, J., Meng, X., Zhu, G., Bi, C., y Wang, H. (2020). Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolates From Cases of Clinical Bovine Mastitis on Large-Scale Chinese Dairy Farms. *Frontiers in Veterinary Science*, 7.

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2020.580129>

Mainau, E., Temple, D., y Manteca, X. (2014). *Re. (20 de julio del 2023). Welfare issues related to mastitis in dairy cows*. Fawec. <https://www.fawec.org/en/technical-documents-cattle/130-welfare-issues-related-to-mastitis-in-cows>

Mejía, C. (2021). *Identificación molecular de agentes causales de mastitis en ganado bovino de las islas Santa Cruz e Ivela, provincia de Galápagos*. [Trabajo de titulación, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE]. <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/26783/1/T-ESPE-O50898.pdf>

Microgen. (2021). *Re. (20 de julio del 2023). Home - Microgen*. <http://www.microgenbioproducts.com/>

Morales, M. J. (2021). *Determinación de las pérdidas económicas por mastitis bovina, en un hato de la sierra ecuatoriana, a través del seguimiento longitudinal de la producción, calidad de leche y*

- determinación de células somáticas*. [Trabajo de titulación, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE]. <http://repositorio.espe.edu.ec/jspui/handle/21000/26771>
- Navarrete, K. V. (2019). *Identificación molecular de bacilos Gram positivos aislados de muestras de leche de vacas con mastitis, en la cooperativa de producción agropecuaria "El Salinerito", provincia Bolívar-Ecuador*. [Trabajo de titulación, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE]. <http://repositorio.espe.edu.ec/jspui/handle/21000/21251>
- Pilla, R., Schwarz, D., König, S., y Piccinini, R. (2012). Microscopic differential cell counting to identify inflammatory reactions in dairy cow quarter milk samples. *Journal of Dairy Science*, 95(8), 4410–4420. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5331>
- Rodríguez, M. del S. O., Cancino, A. M., y Meseguer, N. B. (2020). Actualización de la clasificación y manejo de mastitis. *Revista Médica Sinergia*, 5(6), 510–510. <https://doi.org/10.31434/rms.v5i6.510>
- San Martín, B., Kruze, J., Morales, M. A., Agüero, H., Leon, B., Espinoza, S., Iragüen, D., Puga, J., y Borie, C. (2002). Resistencia bacteriana en cepas patógenas aisladas de mastitis en vacas lecheras de la V Región, Región Metropolitana y Xª Región, Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 34(2), 221–234. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2002000200008>
- Shoab, M., Muzammil, I., Hammad, M., Bhutta, Z. A., y Yaseen, I. (2020). A Mini-Review on Commonly used Biochemical Tests for Identification of Bacteria. *A Mini-Review on Commonly Used Biochemical Tests for Identification of Bacteria*, 54(1), 8. <https://ijrp.org/paper-detail/1225>
- Smeltzer, M., y Beenken, A. (2013). *Veterinary Microbiology*. Ed. Inc. John Wiley y Sons.
- Tollersrud, K., Kenny, K., Caugant, D., y Lund, A. (2008). *Caracterización de aislamientos de Staphylococcus aureus de mastitis aguda, crónica y subclínica en vacas en Noruega - Tollersrud - 2000 - APMIS - Wiley Online Library*. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1034/j.1600-0463.2000.d01-98.x>

Verwaart, T., y Valeeva, N. I. (2011). An Agent-based Model of Food Safety Practices. *Emergent Results of Artificial Economics*. 652, 103–114. Springer Berlin Heidelberg.

http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-21108-9_9

Viguiet, C., Arora, S., Gilmartin, N., Welbeck, K., y O’Kennedy, R. (2009). Mastitis detection: current trends and future perspectives. *Trends in Biotechnology*, 27(8), 486–493.

<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.05.004>

Wellenberg, G. J., van der Poel, W. H. M., y Van Oirschot, J. T. (2002). Viral infections and bovine mastitis: a review. *Veterinary Microbiology*, 88(1), 27–45. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00098-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00098-6)

Zhao, X., y Lacasse, P. (2008). Mammary tissue damage during bovine mastitis: Causes and control1.

Journal of Animal Science, 86(13), 57–65. <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0302>

Zoetis. (2021). Re. (20 de julio del 2023). *ORBENIN EXTRA*. Zoetis.

<https://ar.zoetis.com/products/bovinos/orbenin-extra.aspx>

Zoetis. (2022). Re. (20 de julio del 2023). *CLAVAMOX*. Zoetis.

<https://www.zoetis.com.co/products/ganaderia/antimastiticos/clavamox-lc.aspx>