



**Resistencia antibiótica de *Staphylococcus aureus* en vacas con mastitis en tres estratos lecheros
del cantón Mejía**

Anangonó Martínez, Dayana Thalía

Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

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

PhD. Proaño Pérez, Freddy

08 de septiembre del 2020



Document Information

Analyzed document	TESIS DAYANA ANANGONO.docx (D79012980)
Submitted	9/12/2020 3:15:00 PM
Submitted by	
Submitter email	fwproano@espe.edu.ec
Similarity	4%
Analysis address	fwproano.espe@analysis.orkund.com

Sources included in the report

W	URL: https://docplayer.es/114990432-Unidad-academica-de-ciencias-agropecuarias-carrera- ... Fetched: 9/12/2020 3:07:33 PM		2
W	URL: https://www.redalyc.org/pdf/636/63617098002.pdf Fetched: 9/12/2020 3:16:00 PM		3
W	URL: https://docplayer.es/96309458-Universidad-de-san-carlos-de-guatemala-facultad-de-m ... Fetched: 6/17/2020 12:06:25 AM		1
W	URL: https://rdu.unc.edu.ar/bitstream/handle/11086/11269/Evaluaci%C3%B3n%20y%20diagn%C3 ... Fetched: 8/7/2020 6:51:51 PM		2
W	URL: https://cenida.una.edu.ni/Tesis/tni73r457.pdf Fetched: 8/1/2020 12:30:30 AM		4
W	URL: https://repositorio.cientifica.edu.pe/bitstream/handle/UCS/474/TL_Villanueva-Tejad ... Fetched: 6/8/2020 6:31:11 AM		2
W	URL: https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/2553/1/T-ESPE-IASA%20I-003435.pdf Fetched: 9/30/2019 2:56:20 AM		7
W	URL: https://docplayer.es/90274881-Universidad-de-el-salvador-facultad-de-ciencias-agro ... Fetched: 10/22/2019 11:22:07 PM		1
W	URL: https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/15261/1/UPS-QT12420.pdf Fetched: 12/10/2019 1:28:51 PM		1

Proaño Pérez, Freddy
TUTOR DE TESIS
 C. C. 1002081162



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERIA AGROPECUARIA**

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “**Resistencia antibiótica de *Staphylococcus aureus* en vacas con mastitis en tres estratos lecheros del cantón Mejía**” fue realizado por la señorita **Anangonó Martínez, Dayana Thalía**, el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 11 de septiembre del 2020

Firma:

Proaño Pérez, Freddy

C. C. 1002081162



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERIA AGROPECUARIA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, *Anangonó Martínez, Dayana Thalía*, con cédula de ciudadanía n°1726567835, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: “**Resistencia antibiótica de *Staphylococcus aureus* en vacas con mastitis en tres estratos lecheros del cantón Mejía**” es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es veraz.

Sangolquí, 17 de septiembre del 2020

Firma

Anangonó Martínez, Dayana Thalía
C.C.: 1726567835



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERIA AGROPECUARIA

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo, **Anangonó Martínez, Dayana Thalía**, con cédula de ciudadanía n°1726567835, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: “**Resistencia antibiótica de *Staphylococcus aureus* en vacas con mastitis en tres estratos lecheros del cantón Mejía**” en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 17 de septiembre del 2020

Firma

.....
Anangonó Martínez, Dayana Thalía

C.C.: 1726567835

Dedicatoria

Este proyecto de investigación lo dedico de corazón a Dios, que lo es todo.

A mi abuela Delia Vizcaíno que fue la persona que me inspiró el gusto por el campo, la tierra, amor a la magia de la naturaleza.

A mí misma por el crecimiento y desarrollo que he tenido en este periodo de tiempo, realmente ha sido un gran aprendizaje, para mi formación como profesional y como persona.

La dedico también a mi madre María del Carmen Martínez principalmente por siempre estar dispuesta a ayudar, por confiar en mis capacidades y fortalezas por su amor incondicional, a mi padre Jorge Anangón por su amor, paciencia, comprensión y estar orgulloso de mis resultados, a mi hermano George por ser y estar siempre.

Agradecimiento

Agradezco a todas las personas que me brindaron apoyo en este camino de formación como persona y profesional; a las instituciones que fueron parte de esta hermosa experiencia de titulación.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, en especial al IASA, donde me transmitieron el amor a los animales y el respeto al campo, a los maestros que influyeron positivamente, como el Ing. Vela, Dr. Ulloa, por haber sido inspiración, Ing. Soria por impartirnos valores y despertar nuestra curiosidad, a los profesores que fueron consejeros y amigos Ing. Larrea, Tigrero, Pazmiño, y Dr. Carlos Cárdenas.

A mi tutor Dr. Freddy Proaño, por impulsarme a tomar el tema de mi investigación, le agradezco su valioso apoyo, colaboración, paciencia, sus conocimientos, experiencia y sobre todo por confiar en mí.

A mis revisores Dr. Jorge Ron, Ing. Julio Pazmiño por guiarme, aconsejarme, estar pendiente de mi proceso y colaboración de sus experiencias en el campo.

A Agrocalidad, al laboratorio de microbiología, por colaborar con el uso de sus instalaciones y equipos, para realizar la parte de laboratorio, en especial al Dr. Jorge Irazábal, Ing. Luis Fernández, a la Dr. Mercy Falconí por su colaboración, guía e incentivar me.

A La Holandesa, a el área de asesoramiento ganadero, a los ingenieros Patricio Núñez y Catalina Gómez por colaborar y ser parte del 40% de los muestreos de mi investigación y por compartir sus conocimientos y experiencias en la ganadería.

A mis padres, por su ayuda y paciencia, a mis tíos Gilberto, Margarita, Cecilia, Leonardo Martínez y Armando Jácome, por siempre apoyarme en mi carrera en mis decisiones, gustos y por creer en mí y estar orgullosos de quien soy.

A mis amigos del IASA, en especial a Karolina, Samantha, Alejandra, por brindarme su amistad incondicional, a las amigas que me acompañaron en el camino de mi Tesis Jenny, Paola, Kathy, Karla, Nashell gracias por su apoyo y compañía.

Dayana Thalía Anangonó Martínez

Índice de contenidos

Carátula.....	1
Análisis Urkund.....	2
Certificación.....	3
Responsabilidad de autoría	4
Autorización de publicación	5
Dedicatoria	6
Agradecimiento	7
Índice de contenidos	8
Índice de tablas.....	13
Índice de figuras.....	14
Resumen.....	15
Abstract.....	16
Capítulo I	17
Introducción	17
Antecedentes.....	17
Justificación	19
<i>Problema</i>	19
<i>Causas</i>	20
<i>Efectos</i>	21
Objetivos	21
<i>Objetivo general</i>	21
<i>Objetivos específicos</i>	21

Hipótesis.....	22
Capítulo II	23
Revisión de literatura	23
Mastitis bovina	23
<i>Etiología</i>	23
<i>Agentes etiológicos causantes de mastitis bovina</i>	24
Mastitis causada por patógenos contagiosos.	24
Mastitis causada por patógenos oportunistas.	24
Mastitis causada por patógenos ambientales.....	25
<i>Tipos de Mastitis</i>	25
Mastitis subclínica.....	25
Mastitis clínica.....	26
<i>Patogenia</i>	27
<i>Staphylococcus aureus</i>	28
<i>Patogenicidad de Staphylococcus aureus</i>	29
Cápsula (CPs).	29
Pared celular.....	29
Proteínas de superficie.....	29
Toxinas....	29
Enzimas.....	29
<i>Métodos de diagnóstico de mastitis</i>	30
<i>Pruebas físicas</i>	30
Prueba de mastitis california (CMT).	30

	10
Prueba de fondo oscuro.	31
Prueba de palpación o examen físico de la ubre.	31
Prueba del papel indicador.	31
Pruebas en tanque o recuento de células somáticas del tanque (RCS-T).	31
<i>Pruebas bioquímicas de bacterias Gram positivas</i>	32
Tinción Gram.	32
Prueba de la coagulosa.	32
Prueba de catalasa.	33
<i>Pruebas de laboratorio</i>	33
Cultivo microbiológico.	34
Pruebas de sensibilidad.	34
Capítulo III	36
Metodología	36
Ubicación del estudio	36
<i>Ubicación geográfica</i>	36
Materiales	37
<i>Materiales de campo</i>	37
<i>Materiales de laboratorio</i>	37
Reactivos.	38
Equipos.	38
Métodos	38
<i>Muestreo</i>	39

	11
<i>Aislamiento de patógenos</i>	40
Siembra en caja Petri.	41
Aislamiento de <i>S. aureus</i>	41
<i>Pruebas de confirmación</i>	42
Tinción Gram.	42
Tinción del frotis bacteriano.	42
Comprobación agar cromogénico.	42
Prueba de catalasa.	43
Prueba de coagulasa.	43
Sistema de identificación bacteriana “Bis-Plus”	44
<i>Conservación de cepas</i>	46
<i>Antibiogramas</i>	47
<i>Análisis de datos</i>	50
Identificación de presencia o ausencia de <i>S. aureus</i>	50
Determinación de la prevalencia de <i>S. aureus</i> en las muestras tomadas.	50
Evaluación de la resistencia o susceptibilidad de <i>S. aureus</i>	50
Multiresistencia.	50
Capítulo IV	51
Resultados y Discusión	51
Resultados	51
<i>Prevalencia de Staphylococcus aureus en los tres estratos lecheros</i>	52
<i>Resultados de los puntos críticos de las buenas prácticas sanitarias de ordeño</i>	55
<i>Resultados de los puntos críticos detallados por tipo de estrato, ordenados por la relevancia</i>	55

	12
Puntos críticos del pequeño estrato.....	55
Puntos críticos del estrato grande	57
Puntos críticos del mediano estrato.....	59
<i>Resistencia Antimicrobiana</i>	61
<i>Resistencia antimicrobiana por tipo de estrato lechero</i>	61
Resistencia antimicrobiana en el estrato grande	61
Resistencia antimicrobiana en el estrato mediano	62
Resistencia antimicrobiana en el estrato pequeño	63
<i>Multiresistencia</i>	66
<i>Resultados de los agares utilizados.....</i>	69
Discusión	70
Capítulo V	76
Conclusiones y Recomendaciones.....	76
Conclusiones.....	76
Recomendaciones	77
Bibliografía	79

Índice de tablas

Tabla 1	<i>Tipos de mastitis clínica, descripción y signos visibles</i>	27
Tabla 2	<i>Descripción de los diferentes tratamientos</i>	49
Tabla 3	<i>Presencia de Staphylococcus aureus en tres estratos lecheros del cantón Mejía.</i>	52
Tabla 4	<i>Prevalencia de Staphylococcus aureus en cada uno de los tres estratos lecheros</i>	53
Tabla 5	<i>Referencia de los puntos críticos en común en los estratos lecheros</i>	54
Tabla 6	<i>Los factores de índices problemáticos observados en el pequeño estrato</i>	55
Tabla 7	<i>Los factores de índices problemáticos observados en el estrato grande.</i>	57
Tabla 8	<i>Los factores de índices problemáticos observados en el estrato mediano.</i>	59
Tabla 9	<i>Antibióticos utilizados en los antibiogramas y los rangos del diámetro del halo en (mm)</i>	60
Tabla 10	<i>Antibióticos comerciales más usados por los productores agropecuarios de la zona</i>	61
Tabla 11	<i>Resistencia antimicrobiana de S. aureus aislamientos en los estratos grandes</i>	62
Tabla 12	<i>Resistencia antimicrobiana de S. aureus aislamientos en los estratos medianos</i>	63
Tabla 13	<i>Resistencia antimicrobiana de S. aureus aislamientos en los estratos pequeños</i>	64
Tabla 14	<i>Representación de los tres estratos lecheros de susceptibilidad in vitro de S. aureus.</i>	65
Tabla 15	<i>Resistencia múltiple a los antibióticos para S. aureus aislamientos de los tres estratos</i>	67

Índice de figuras

Figura 1 <i>Mapa político del cantón Mejía e identificación de las fincas muestreadas</i>	37
Figura 2 <i>Aplicación de la prueba CMT y toma de muestra.</i>	40
Figura 3 <i>Pruebas bioquímicas de confirmación e identificación Bis Plus</i>	46
Figura 4 <i>Descripción de la disposición de los discos en cada caja Petri.</i>	49
Figura 5 <i>Distribución de la presencia de S. aureus, en muestras positivas</i>	52
Figura 6 <i>Representación de la prevalencia de S. aureus en los tres diferentes estratos.</i>	53
Figura 7 <i>Prácticas e instalaciones de los pequeños productores</i>	56
Figura 8 <i>Representación de la resistencia antimicrobiana de S. aureus en los tres distintos estratos</i>	64
Figura 9 <i>Representación de la sensibilidad antimicrobiana de S. aureus en los tres distintos estratos</i> ..	64
Figura 10 <i>Representación de la multiresistencia antimicrobiana de S. aureus, (MAR).....</i>	67
Figura 11 <i>Antibiogramas donde se observó multiresistencia antimicrobiana de S. aureus (MAR).....</i>	68
Figura 12 <i>Antibiogramas de sepa ATCC.</i>	68

Resumen

Staphylococcus aureus es uno de los principales agentes aislados en infecciones de la glándula mamaria en bovinos y se caracteriza por su bajo porcentaje de curación. El objetivo de este estudio fue identificar la prevalencia y resistencia antimicrobiana de *S. aureus* en vacas con mastitis de tres estratos lecheros del cantón Mejía. 1105 vacas en producción fueron sometidas a la prueba California Mastitis Test (CMT) provenientes de 6 parroquias del cantón Mejía, y distribuidas en los tres estratos diferentes. Se tomaron en total 125 muestras que presentaban mastitis bovina, para ser analizadas en laboratorio, las cuales fueron cultivadas en agar Baird Parker, para el aislamiento del patógeno y para confirmar la presencia de *S. aureus*, se empleó pruebas bioquímicas tradicionales y un kit que identifica género y especie de bacterias Gram positivas. Finalmente, se empleó la técnica Kirby-Bauer para determinar la resistencia antimicrobiana. Los resultados de las pruebas bioquímicas confirmaron 41/125 (32.8%) de muestras positivas a *S. aureus*. La prevalencia por estrato lechero fueron 66.66%, 32.69% y 21.82% en las fincas pequeñas, grandes y medianas respectivamente. Se evaluó las buenas prácticas de ordeño, mostrando como problemática principal al personal capacitado en salud y cuidado de la ubre. El resultado general de resistencia antimicrobiana en los tres estratos, fue presentado por la resistencia más elevada a penicilina con 39.02%, seguido de tetraciclina 21.95% y clindamicina, gentamicina, bacitracina, con un porcentaje similar de resistencia del 17.07% y sensibilidad del 97.56% con Ciprofloxacina, seguidos de 95.12% Linezolid, 92.68% Neomicina, 90.24% Cefoxitin, y 87.80% Trimetoprim/sulfametoxazol. La multiresistencia (RAM) se presentó en el 19.5% del total de las muestras positivas a *S. aureus*, de los individuos multiresistentes en su totalidad resistencia a la penicilina, seguido de bacitracina y tetraciclina. En conclusión, este estudio demuestra la necesidad de establecer nuevas terapias antibióticas para los casos de mastitis en la zona muestreada, para evitar casos de multiresistencia.

Palabras clave: *mastitis bovina, resistencia antimicrobiana, S. aureus, Ecuador*

Abstract

Staphylococcus aureus is one of the main isolated agents in infections of the mammary gland in cattle and is characterized by its low cure rate. The objective of this study was to identify the prevalence and antimicrobial resistance of *S. aureus* in cows with mastitis from three dairy strata of the Mejía cantón. 1105 cows in production were subjected to the California Mastitis Test (CMT), coming from 6 parishes of the Mejía cantón, and distributed in the three different strata. A total of 125 samples showing bovine mastitis were taken to be analyzed in the laboratory, which were cultured on Baird Parker agar, for the isolation of the pathogen and for confirmation, traditional biochemical tests and a kit that identifies the genus and species of bacteria was used. Gram positive. Finally, the Kirby-Bauer technique was used to determine antimicrobial resistance. The results of the biochemical tests confirmed 41/125 (32.8%) of samples positive to *S. aureus*. The prevalences by milk stratum were 66.66%, 32.69% and 21.82% in the small, large and medium farms respectively. Good milking practices were evaluated, showing personnel trained in health and udder care as the main problem. The general result of antimicrobial resistance in the three strata was presented by the highest resistance to penicillin 39.02%, followed by tetracycline 21.95% and clindamycin, gentamicin, bacitracin, with a similar percentage of resistance with 17.07%. multi-resistance was presented in 19.5% of the samples positive to *S. aureus*, of the multi-resistant individuals in its totality resistance to penicillin, followed by bacitracin and tetracycline. In conclusion, this study demonstrates the need to establish new antibiotic therapies for mastitis cases in the sampled area.

Key words: mastitis, antimicrobial resistance, *S. aureus*, Ecuador.

Capítulo I

Introducción

Antecedentes

La mastitis es la inflamación de la glándula mamaria, que va de la mano de un aumento en el conteo de células somática (CCS), ya que las células somáticas son la presencia de glóbulos blancos en respuesta a una agresión causada por microorganismos patógenos (Hoque et al., 2018). Esta enfermedad se clasifica en mastitis subclínica y mastitis clínica, esto según el grado de infección y lesiones locales visibles e implicaciones sistémicas en la vaca, en varios estudios se han identificado más de 140 especie de patógenos, *Staphylococcus aureus* es uno de los principales agentes aislados de casos de mastitis bovina y se caracteriza por tener un bajo porcentaje de curación respecto a otros patógenos causantes de mastitis (Aslantas et al., 2016). La resistencia microbiana es la principal explicación a este fenómeno, ocasionado por el uso indiscriminado de antibióticos o por no contar con el criterio de un técnico responsable (Fernández et al., 2012).

La reducción del 70 a 80% de la productividad es asociada a mastitis subclínicas, mientras que la mastitis clínica ocasiona reducciones del 20 a 30% (Philpot et al., 2002). Por otra parte, el uso de medicamentos para el tratamiento de la mastitis aumenta los costos de producción en las ganaderías. Para un control efectivo de la enfermedad se administra un antibiótico parenteral, a más de un antibiótico intramamario (Conlago, 2013).

En el estudio realizado por Barkema, (2010), denotan que los factores que influyen en la curación de la mastitis causado por *S. aureus*, dependen de la cepa de la bacteria, de los tratamientos utilizados, y del individuo (*Bos taurus*). Por otro lado la probabilidad de curación

disminuye cuando aumenta, la edad de la vaca, el recuento de células somáticas, duración de la infección, el recuento de colonias de bacterias en la leche antes del tratamiento y el número de cuartos infectados (Barkema et al., 2010).

En Argentina en 1998 fueron investigadas alrededor de 206 cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de mastitis clínica y subclínica, para observar su susceptibilidad *in vitro* a varios agentes antimicrobianos, en este estudio se valoró los siguientes compuestos: penicilina, oxacilina, gentamicina, eritromicina, clindamicina y ampicilina, sulfato de ampicilina, mostrando como resultado que *S. aureus*, mostro una alta resistencia a la penicilina, seguido de: eritromicina, penicilina y gentamicina (Gentilini et al., 2000).

En el 2018 se realizó un estudio en Bangladesh, se seleccionó 175 vacas al azar de las cuales 50 presentaron mastitis. La mastitis ocasionada por *Staphylococcus aureus* representó en un 74.0%. El patógeno se asoció a los cuartos traseros derechos (Hoque et al. 2018). Se realizaron pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, y se demostró que el 79,3% de las cepas de *Staphylococcus aureus* fueron resistentes por lo menos un antibiótico, 49% presentaron resistencia a dos o más antibióticos probados en el antibiograma. Entre los antibióticos a los cuales presentó mayor resistencia fueron oxitetraciclina, meticilina y sensibilidad a ceftriaxona y azitromicina. Es preocupante la alta prevalencia de *S. aureus* en la industria láctea, ya que las cepas de este patógeno, van tomando resistencia a los antimicrobianos comerciales disponibles (Hoque et al., 2018).

En Ecuador, se realizó un estudio en 4 fincas de la provincia de Bolívar, en el que se aislaron 68 patógenos causantes de la mastitis en los cuales se distingue *Staphylococcus aureus*, como más frecuente agente patógeno, estos patógenos fueron resistentes a penicilina y

ampicilina, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp*, *Enterobacter spp.*, *Streptococcus spp.* son sensibles a bacitracina, oxitetraciclina y neomicina (Andrade, 2018).

Justificación

En Ecuador y a nivel mundial la antibioresistencia representa una problemática en la salud pública, consecuencia de aplicar incorrectamente la terapia antibiótica para erradicar la mastitis, sin identificar el agente causal de esta infección y posteriormente realizar pruebas de sensibilidad microbiana. *Staphylococcus aureus* es el agente causal más común de la mastitis bovina, patógeno de fácil transmisión en el ordeño y de difícil control y prevención, también tiene la capacidad de causar infecciones crónicas, por sus factores de virulencia que lo distinguen de otros patógenos.

En el país son escasos los estudios realizados a la resistencia antibiótica que presenta este patógeno de gran importancia en la ganadería de leche, Calvino, 2013 menciona que algunas estructuras virulentas de *Staphylococcus aureus* como las proteínas de la superficie de la bacteria y de **CPs** (polisacáridos capsulares), que le otorgan propiedades antifagocíticas y su capacidad de encapsularse y se adhiere a la pared del tejido del hospedero e impiden que el sistema inmune reconozca la bacteria y la elimine, por esta razón se originan los *S. aureus* multiresistentes por aplicación poco eficiente e indiscriminada de antibióticos.

Problema

La mastitis es una enfermedad infecciosa común y considerada como la más costosa a nivel de producción de leche, ya que afecta al ganado bovino en un 80% a nivel mundial. Esta enfermedad aqueja a muchos de los productores ganaderos, ya que se considera que representa un 70% de los gastos, resultando una pérdida representativa cada año. Su control en

el animal implica tener conocimientos en la edad del animal, localización de la infección (cuartos traseros o delanteros) y tipo de mastitis haciendo énfasis al microorganismo causal en especial cuando se trata de *S. aureus* (Bedolla, 2007).

S. aureus se encuentra en una proporción mayor al 50% a comparación de otras bacterias causantes de la mastitis en bovinos; siendo esta bacteria considerada la más difícil de diagnosticar debido a que se encuentra mayoritariamente en la mastitis subclínica sumando a un bajo porcentaje de curación debido a su resistencia a los antimicrobianos (Taponen, 2009). Además, el uso indiscriminado de antimicrobianos en animales a fin de controlar infecciones bacterianas como es el caso de la mastitis, ha generado residualidad de los antibióticos en productos de consumo humano y animal, los cuales afectan de forma directa el comportamiento inmunológico de los mismos.

Causas

La resistencia antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* originada por el uso inapropiado de los antimicrobianos causada por:

La aplicación incorrecta de tratamientos antibióticos por parte de los profesionales a cargo y en los casos de productores pequeños la aplicación empírica.

La aplicación antibióticos sin conocer el agente causal de la infección y menos aun identificando la sensibilidad microbiana del patógeno a los antibióticos que más se emplean en el sector lechero.

Falta de seguimiento de las infecciones, para evitar casos crónicos a futuro.

Efectos

La bioresistencia representa una amenaza para la salud pública, tanto de los individuos infectados, operarios en el ordeño y los profesionales de la salud involucrados en el entorno.

La eficacia de tratamientos de prevención y erradicación de la infección se verían reducidas.

Prolongación en el tiempo de tratamiento y eleva la posibilidad de descarte del individuo.

La atención sanitaria aumenta su costo, por la necesidad de pruebas más específicas, la utilización de fármacos más costosos, profesionales especializados.

Los tratamientos antimicrobianos dependiendo de su manejo pueden dejar residualidad que permanece como metabolito en la leche, tiene efectos nocivos para el consumidor (Russi, 2008).

Objetivos**Objetivo General**

Identificar la resistencia antibiótica de *Staphylococcus aureus*, en vacas con mastitis de tres estratos lecheros del cantón Mejía.

Objetivos Específicos

Aislar *Staphylococcus aureus* de vacas afectadas con mastitis clínica de tres estratos lecheros del cantón Mejía mediante el uso de Agares específicos.

Identificar la presencia de *Staphylococcus aureus*, mediante pruebas bioquímicas de confirmación.

Determinar la prevalencia de *S. aureus* en los tres diferentes estratos del cantón Mejía.

Identificar los aislados de *Staphylococcus aureus* que presenten multiresistencia.

Hipótesis

Hipótesis nula

H0 Las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de glándula mamaria de vacas con mastitis no presentan resistencia a los antibióticos recomendados por el CLSI y a los más utilizados por los productores: Penicilina, cefoxitin, gentamicina, clindamicina, bacitracina, neomicina, eritromicina, tetraciclina, ciprofloxacina, trimetoprim/sulfametoxazol, linezolid.

Hipótesis alterna

H1 Las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de glándula mamaria de vacas con mastitis presentan resistencia a los antibióticos recomendados por el CLSI y a los más utilizados por los productores: Penicilina, cefoxitin, gentamicina, clindamicina, bacitracina, neomicina, eritromicina, tetraciclina, ciprofloxacina, trimetoprim/sulfametoxazol, linezolid.

Capítulo II

Revisión de literatura

Mastitis bovina

La mastitis es una de enfermedades más importantes en el ámbito productivo y representa una de las causas de pérdidas económicas importantes para el productor ganadero (San Martín et al., 2002). La mastitis afecta el bienestar animal y un gran impacto productivo, debido a una producción decreciente y deterioro de calidad en la leche (Pellegrino, 2011). Todo esto debido que la mastitis se define como la inflamación de las glándulas mamarias a una agresión (Fernández, 2012). Esta enfermedad, es reconocida comúnmente por signos clínicos, elementalmente por las anomalías en la leche y la ubre. Los síntomas clínicos incluyen, composición y apariencia alterada (grumos) de la leche, fiebre, cuartos mamarios enrojecidos, hinchados en cambio vacas con mastitis subclínica no muestran ninguna señal obvia de la enfermedad (Bedolla, 2007). La mastitis bovina puede clasificarse de acuerdo al grado de la inflamación y a las lesiones locales e implicaciones sistémicas en la vaca. En términos generales; se clasifica en mastitis subclínica y mastitis clínica (Fernández et al., 2012).

Etiología

Los causantes de mastitis son agentes patógenos ambientales, contagiosos y oportunistas. Los principales agentes etiológicos son los *Staphylococcus*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma spp.*, *coliformes*, *Pseudomonas spp.* y levaduras; siendo su principal vía de entrada es el canal del pezón. Se asevera que existen alrededor de 140 patógenos causantes de mastitis (Alvarado, 2012).

Agentes etiológicos causantes de mastitis bovina

Mastitis causada por patógenos contagiosos. Este tipo de patógenos, se diseminan de los cuartos infectados a los otros cuartos y de animal a animal, siendo el reservorio primario que alberga al patógena la ubre o el animal infectado, las manos del ordeñador y equipo de ordeño como (pezoneras) mal desinfectadas, pueden actuar también como fuente de infección. Estos patógenos son controlados a través del uso de prácticas de manejo que utilizan la desinfección de los pezones después de la ordeña, terapia de la vaca seca, desecho, mantenimiento del equipo de ordeño, y terapia antibiótica de las infecciones intramamaria (Fernández et al., 2012).

Los patógenos contagiosos de primera importancia incluyen al *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium* spp. y *Mycoplasma* spp. Estos organismos se transmiten de vaca a vaca (Giannechini et al., 2014).

Mastitis causada por patógenos oportunistas. Estos patógenos provenientes del ambiente, puede colonizar la piel del pezón, penetrar hasta los tejidos secretores y también otros lugares del cuerpo del animal como el pelaje, la vagina y el canal de paso (Navarro, 2011).

Especies de bacterias que actúan en este tipo de infección son comúnmente estafilococos coagulasa negativos (ECN), su patogenicidad y la resistencia a tratamientos antimicrobianos varían dependiendo de la especie de ECN, se investigan mediante técnicas de diagnóstico molecular (Zadoks & Schukken, 2006). Las especies más comunes de ECN aisladas de mastitis bovina son *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus epidermis*, *Staphylococcus hyicus* y *Staphylococcus simulans* (Bonetto et al., 2014).

Las infecciones por ECN suelen ser leves o de tipo subclínico, se ha demostrado también que pueden causar procesos más graves y persistentes y provoca un aumento en el recuento de

células somáticas y una disminución en la calidad y producción de la leche debido al daño causado al tejido mamario (Acuña et al., 2008).

Mastitis causada por patógenos ambientales. Estas bacterias se encuentran en el medio ambiente, en las zonas de establos camas, pasturas, alimento, que representan la fuente de infección, por un inadecuado manejo de instalaciones, falta de higiene, camas húmedas, poco control de moscas, también mal manejo de la limpieza de las ubres antes del ordeño, y presencia de heridas en estas zonas (Kruze, 2008). Los animales más propensos a este tipo de infección son vacas secas y a vacas que se encuentran en la última etapa de la gestación (Smith et al., 2005). En este tipo de infección están presentes los siguientes grupos de bacterias:

- Coliformes: Principalmente *E. coli* y *Klebsiella spp.*
- *Streptococcus spp.* ambientales: *S. disgalactiae* y *S. uberis*.
- *Arcanobacterium pyogenes*.

Tipos de Mastitis

Mastitis subclínica. Este tipo de mastitis está presente más en el ganado de leche, conduce a pérdidas económicas por la reducción de la producción de leche y por el elevado conteo de células somáticas en los tanques de leche (Schrack et al., 2001). Este tipo de mastitis se percibe en una disminución en el rendimiento de la cantidad de leche por ordeño dada por la presencia de componentes inflamatorios y bacterias no tiene cambios físicos visibles en la ubre ni en el aspecto de la leche (Fernández et al., 2012), se diferencia la mastitis subclínica por la presencia de microorganismos y conjunto con el conteo de células somáticas. La mastitis subclínica es poco detectado por los técnicos ya que necesita de pruebas de laboratorio, como la medición del conteo de células somáticas y el cultivo bacteriológico (Schreiner, 2003).

Mastitis clínica. Es el tipo de infección más visible ya que las anormalidades se presentan en ubre o glándula mamaria y o en leche, partes y elementos que manifiestan una irregularidad, cuya severidad va variando en el transcurso de la enfermedad (Gröhn et al., 2004). Los cuartos afectados se observan enrojecidos, hinchados, y endurecidos al tacto, en la sintomatología produce dolor en el animal, fiebre depresión y anorexia y una baja producción de leche y su calidad disminuye debido a que hay presencia de grumos y coágulos con consistencia acuosa (Barker et al., 1998). Los agentes causales son generalmente patógenos como: estafilococos, estreptococos y coliformes, en un 70% de las muestras cultivadas. En los controles de mastitis contagiosas, los casos más numerosos son dados por *Streptococcus* ambientales y coliformes. Las prácticas de manejo en el ordeño como el sellado puede erradicar la presencia de *Streptococcus agalactiae* y reducir la prevalencia del *Staphylococcus aureus*, pero los patógenos ambientales no se pueden controlar (Bedolla, 2007). En la Tabla 1 se muestra la clasificación de la mastitis clínica, en función del grado de severidad.

Tabla 1*Tipos de mastitis clínica, descripción y signos visibles*

Tipo mastitis clínica	Descripción	Signos visibles		
		Vaca	ubre	Leche
Subaguda	Etapa inicial del cuadro clínico, sin alteraciones visibles.	No hay cambios observables.	El cuarto afectado puede estar inflamado.	No se ven cambios, pero se reduce la producción.
Aguda	Aparición súbita, leche de apariencia anormal, enrojecimiento, tumefacción.	No hay cambios observables.	Cuarto afectado se muestra duro, rojo e inflamado.	Purulenta, como suero y acuosa.
Crónica	Infección de la ubre de larga duración y leche anormal.	Muy enferma, puede morir, no tiene coordinación muscular.	Fibrosis mamaria, puede perder el cuarto.	Aguada y con manchas de sangre.

Adaptado de Andrade, (2018).

Patogenia

La infección de la glándula mamaria siempre ocurre a través del conducto glandular. Luego de la invasión del agente infeccioso, sigue la infección y la inflamación. La invasión es la etapa en que los microorganismos pasan del exterior de la ubre al conducto glandular (Ruiz et al., 2013). En la etapa de infección, los gérmenes proliferan e invaden el tejido mamario (Morales, 2011). El daño causado al tejido crea una inflamación y se produce la mastitis clínica. Dependiendo de la severidad y la duración, en uno o varios de los cuartos de la ubre se puede encontrar fibrosis, edema inflamatorio y atrofia del tejido mamario. Puede haber aumento difuso de tejido conjuntivo. En casos graves puede haber gangrena o abscesos en el tejido

glandular. La etapa terminal de la mastitis crónica es la atrofia de la glándula (Pedersen et al., 2003).

Staphylococcus aureus

Se destaca como uno de los patógenos más importante agente infeccioso, causantes de la mastitis, pertenece a la familia *Staphylococcace* (DATABIO, 2012). En griego "staphylo" que quiere decir en racimo de uvas, su forma se asemeja a un coco, oscila entre 0,8 a 1,5 micras de diámetro, aparecer en parejas, en cadenas o en racimos, es inmóvil, no forma esporas, generalmente no capsulados, aunque en ocasiones pueden aparecer aislamientos con cápsula, dependiendo de la cepa de la bacteria (Taponen & Pyorala, 2009).

Este organismo rápidamente forma colonias en los canales de los pezones, especialmente si existe lesión cerca de las puntas de las mismas, lo cual facilita su penetración al interior de la ubre y la invasión de los tejidos de la misma, ocasionando la formación de un tejido, que obstruye la penetración de medicamentos en los lugares infectados (Hosseinzadeh, 2014). *Staphylococcus aureus* son patógenos contagiosos y son transmitidos por los tejidos infectados durante el proceso de ordeño. Este patógeno puede producir gangrena y afectar otros tejidos; sin embargo, no puede sobrevivir grandes periodos en el medio ambiente (Taponen & Pyorala, 2009).

S. aureus netamente en su primera fase de infección cumple con colonizar, seguidamente de expandirse en los tejidos del hospedero y la secreción de toxinas y enzimas; las adhesinas estructuras patogénicas de la bacteria para mantenerse constante intracelularmente, debe evitar la respuesta inmune del hospedero, este mecanismo que forma una red regulatoria de reconocimiento por el sistema inmune, es deduciblemente la clave de la patogénesis de la infección, ocasionando cronicidad de la infección y esto permite la adaptación del microorganismos a cambios micro ambientales y su supervivencia. Por su capacidad de evadir el

sistema inmune con sus estructuras, se explicaría que las vacas que no presentan mastitis ya tienen presencia de *S. aureus* (C. Camussone et al., 2012).

Patogenicidad de *Staphylococcus aureus*

Las estructuras virulentas es lo que lo distingue a *S. aureus*, de otros patógenos y su relación con la gravedad de la infección intramamaria (IIM), según Camussone & Calvino, (2013), las estructuras virulentas que intervienen en una (IIM) son:

Cápsula (CPs). Estructura formada de la mezcla de polisacáridos que otorgan propiedades antifagocíticas por neutrófilos polimorfonucleares (PMN), es decir se adhieren con facilidad a las células y evitan ser reconocidas por el sistema inmune del hospedero. La presencia o formación de *CPs* (polisacáridos capsulares) depende del serotipo o biotipo del *S. aureus*, de 11 biotipos, los más comunes los CPs5 y CPs8 aislados de bovinos y humanos (Manjarrez et al., 2012). La tasa de infección patológica está en pacientes con sistemas inmune deprimidos.

Pared celular. Compuesta por el peptidoglicano mureína, puede presentar actividad endotóxica, es decir, liberación de toxinas cuando se lisa la pared celular.

Proteínas de superficie. Proteína A antifagocíticas que impide que el sistema inmune la reconozca y la elimine.

Toxinas. La alfa-toxina, produce inflamación en las células, responsable de la septicemia, citotóxica, que degrada las células, exfoliativas, leucocidina.

Enzimas. Proteasas, lipasas e hialuronidasas que destruyen tejidos. Estos productos bacterianos pueden facilitar la diseminación de la infección a los tejidos adyacentes. La β -

lactamasa es una enzima que inactiva la penicilina y la coagulasa es un estimula la protrombina que transforma el fibrinógeno en fibrina (Hurtado et al., 2002).

Métodos de diagnóstico de mastitis

El método de diagnóstico cumple un rol fundamental dentro de cualquier análisis de mastitis en el hato ganadero, para lo cual se debe conocer los factores para conocer el tipo de mastitis que cada individuo bovino puede presentar; para este fin existen diferentes métodos que se pueden realizar tanto en campo como en laboratorio, para de esta manera poder tratar la infección (Morales, 2011). En la mastitis se puede realizar un monitoreo, para encontrar el lugar o el tipo de infección para aplicar el tratamiento preciso como son las pruebas de campo, laboratorio, en Tanque y bioquímicas (Acuña & Rivadeneira, 2008).

Pruebas físicas

Son consideradas como un método de detección de mastitis bovina económico y práctico, cuando la mastitis se encuentra en un estado avanzado, detecta solo la mastitis subclínica. Dentro de estas pruebas se encuentran Prueba de Mastitis California (CMT), prueba de palpación, prueba de Wisconsin, prueba con papel indicador, prueba de fondo negro (Bedolla, 2007).

Prueba de mastitis california (CMT). La prueba (CMT) se basa en el uso de un detergente (lauril sulfato de sodio) y un indicador de pH, que, al ser agregado a una muestra de leche, promueve la lisis celular, la liberación de ácido nucleico y la formación de una matriz "similar a un gel". Cuando el recuento de células está por encima de un cierto umbral (400.000 células/ml o más) (CBMR, 2013). La interpretación de la viscosidad de la muestra es subjetiva y puede dar lugar a falsos positivos o negativos, dependiendo del número de células somáticas

que se encuentren en la leche. La principal ventaja del CMT es una prueba rápido, económica, simple para la detección de infecciones subclínicas de cada cuarto de la ubre (Duarte & Bexiga, 2015).

Prueba de fondo oscuro. Consiste en la utilización de un recipiente de color negro u oscuro (strip cup), en donde se toma los primeros chorros de leche o el despunte de cada ordeño. Los coágulos, escamas, hilos, materia fibrosa, secreciones acuosas, o color anormal indican anomalías en la leche (Bedolla, 2007). Esta prueba ayuda a identificar la presencia de mastitis clínica (Yáñez, 2018).

Prueba de palpación o examen físico de la ubre. Al examinar de manera física las ubres de los bovinos, se puede apreciar, inflamación de los cuartos con temperatura elevada a partir de 39°C, dolor al tacto, muestra enrojecimiento, variabilidad del tamaño, presencia de tejido cicatrizal, alteraciones de la piel y pezón y lesiones traumáticas (Bolaños et al., 2012) En la zona de transición de la cisterna mamaria al canal del pezón pueden observarse estrechamientos (aumento del grosor del epitelio) que originan trastornos en la emisión de leche (Kleinschroth et al., 1991).

Prueba del papel indicador. Comprueban las modificaciones del pH de la leche. Según la gravedad de la mastitis, el pH de la leche evoluciona de normal (6.6) a alcalino. Se utiliza cuando las alteraciones son visibles (Acuña et al., 2008). Esta prueba solo tiene un 50% de efectividad (Bedolla, 2007).

Pruebas en tanque o recuento de células somáticas del tanque (RCS-T). Esta prueba genera un indicador de mastitis a nivel del hato, ya que se realiza esta práctica en el tanque de leche. Se asocia un alto conteo de células somáticas con cuartos infectados y pérdida en la

producción de leche, el indicador de la ausencia de la infección o de mastitis es de menos 200.000 por ml (CCS/ml= Conteo de células somáticas por mililitros) (Andrade, 2018).

Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas mediante una reacción determinada, resultado de la aplicación de test químicos aplicados a medios biológicos, inoculados con colonias aisladas, que nos permite identificar la presencia de distintos microorganismos, específicamente bacterias (Acuña & Rivadeneira, 2008).

Pruebas bioquímicas de bacterias Gram positivas

Tinción Gram. Es una técnica diferencial empleado que permite diferenciar microorganismos como bacterias según sus características morfológicas en dos grandes grupos. Se llama bacterias Gram positivas a aquellas que retienen la tinción azul-violeta, y se denomina bacterias Gram negativas a las que se decoloran y después se tiñen con safranina. Esta diferencia de tinciones se debe a la estructura de las paredes celulares de ambos tipos de bacterias. Las bacterias Gram positivas tienen una pared gruesa compuesta de peptidoglicano y polímeros, e impermeable, que hace que resista la decoloración. En cambio, las bacterias Gram negativas tienen una capa delgada de peptidoglicano más una bicapa de lipoproteínas que se puede deshacer con la decoloración.

Prueba de la coagulasa. Esta prueba consiste en confirmar si la bacteria analizada contiene la enzima coagulasa o no, también determina la capacidad de la bacteria de coagular el plasma, por acción de la coagulasa. Esta prueba es muy utilizada, para identificar la presencia de *Staphylococcus*. Al obtener resultados positivos con la aplicación de la prueba de coagulasa, se asegura que se trata de *Staphylococcus aureus* (Seija, 2002). Esta prueba tiene como objetivo,

separar *S. aureus*, que posee coagulasa, de las otras especies de estafilococos (Galeano, 2017).

S. aureus posee dos tipos de coagulasa:

- Endocoagulasa, coagulasa ligada o "clumping factor" que está unida a la pared celular. Esta actúa directamente sobre el fibrinógeno provocando la formación de coágulos o grumos cuando se mezcla una suspensión bacteriana con plasma citratado.
- Exocoagulasa o coagulasa libre que actúa mediante la activación de un factor (CRF), formándose un complejo coagulasa-CRF, el cual reacciona con el fibrinógeno produciéndose un coágulo de fibrina (test en tubo) (Seija, 2002).

Prueba de catalasa. El objetivo de esta prueba bioquímica es confirmar, con la reacción que provoca la enzima catalasa, para la distinción entre *Streptococcus* y *Staphylococcus*, ya que son dos bacterias de tipo cocos Gram positivas, a pesar de tener morfología diferente, al ser examinadas en un microscopio, se dificulta su diferenciación, este método es rápido y facilita la interpretación de los resultados observando el desprendimiento de burbujas se considera una prueba positiva (Fernández et al., 2010). Teniendo en cuenta que *Staphylococcus* porque es catalasa positivo y *Streptococcus* son catalasa negativa (Seija, 2002). Fundamento de esta prueba es que la enzima catalasa descompone el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua y oxígeno, es así como las bacterias se protegen del efecto tóxico del peróxido de hidrógeno (Fernández et al., 2010).

Pruebas de laboratorio

Estas pruebas son fiables y confirmatorias, al momento de identificar el grado de la infección y los agentes causales de la mastitis. Dentro de las pruebas de laboratorio se realizan:

recuentos de células somáticas (RCS), cultivos microbiológicos, caracterización del microorganismo, pruebas de sensibilidad antimicrobiana (Acuña & Rivadeneira, 2008).

Cultivo microbiológico. El cultivo microbiológico es un método de aislamiento y multiplicación de microorganismos patógenos, en una superficie sólida (agar) o en medio líquido (caldo) en condiciones controladas de laboratorio (Andrade & Sánchez, 2018). Con el estudio de un cultivo microbiológico, se logra aislar, identificar el agente causal de la infección, ya sea una bacteria, hongo, virus, parásitos, algas, para poder tratar de forma efectiva, rápida, mediante pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos (antibiograma), y así evaluar la resistencia o efectividad de una serie de antibióticos con la finalidad de optimizar el tratamiento de las infecciones (Santambrosio et al., 2009).

La identificación de *S. aureus*, se realiza por medio del empleo de diversas técnicas como pruebas bioquímicas: tinción Gram, pruebas de la catalasa, fermentación de glucosa; estas pruebas permiten diferenciar el género *Staphylococcus* del género *Micrococcus*. *S. aureus* también puede identificarse a través de técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y PCR en tiempo real, utilizando genes específicos de especie (González et al., 2014). La importancia de la oportuna y correcta identificación del agente patogénico, de la infección ayuda a proporcionar un tratamiento correcto y obtener un alto porcentaje de curación (Russi, 2008).

Pruebas de sensibilidad. El objetivo de realizar pruebas de sensibilidad, es poder realizar un control específico, después de realizarse el aislamiento e identificación del agente causal, como es el caso de bacterias, estrictamente se selecciona antimicrobianos que además de su fácil administración, buena penetración, baja toxicidad, y sean de mayor uso por los

técnicos a cargo de la sanidad de los animales que presentan patologías y sean realmente activos contra el microorganismo causal, al implementar este manejo, permitirá establecer un manejo más confiable evitando su uso indiscriminado de antibióticos, para evitar crear una resistencia de parte de las bacterias al medicamento (Bernal & Guzman, 1984).

La aplicación correcta de la metodología, asegura resultados confiables, para que el técnico tenga un buen manejo de la curación de su paciente. La prueba de sensibilidad utilizando el procedimiento del disco es una modificación de la técnica descrita por Bauer, Kirby, Sherris y Turk. La prueba es rápida, práctica y reproducible (Ranzola et al., 2010).

Capítulo III

Metodología

Ubicación del estudio

La fase de campo del presente estudio se realizó en la provincia de Pichincha, cantón Mejía, parroquias El Chaupi, Aloasí, Alóag, Tambillo, Uyumbicho, Machachi, Manuel Cornejo Astorga, en 13 fincas ganaderas, estratificadas por el tamaño del hato, en grandes, medianos y pequeños, el 50% de estas propiedades muestreadas son proveedores directos de la empresa La Holandesa, el otro 50% restante del muestreo fue autónomo de proveedores de distintas pasteurizadoras.

Ubicación geográfica

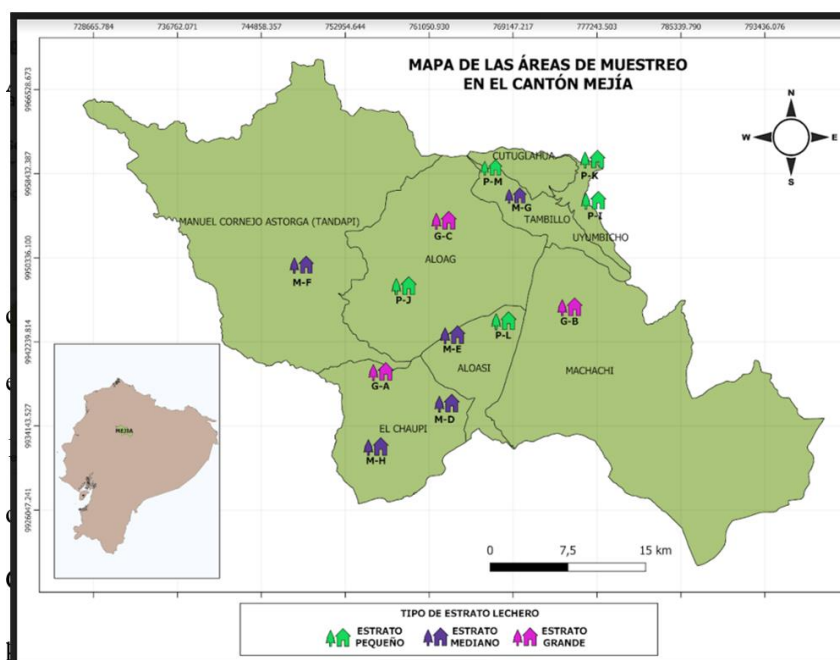
Los puntos de referencia de las 13 fincas en las diferentes parroquias del cantón Mejía se muestran en la Figura 1, a una altura de 2182 m.s.n.m, en las coordenadas, Longitud: W78° 45', Latitud: S 0° 35'.

El cantón Mejía tiene una temperatura media anual de 10 °C, una precipitación anual de 1043 mm y una humedad relativa del 0 %. Pertenece a la zona de vida bosque húmedo Montano (Holdridge, 1967).

Se desarrolló la fase de laboratorio, en las instalaciones de La Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitaria, en el laboratorio de diagnóstico animal en el área de microbiología de alimentos, ubicada en Tumbaco, Av. Interoceánica s/n Km. 14 ½ y Eloy Alfaro. Sector La Granja, lugar donde se realizó el procesamiento de las muestras de leche fresca por cada vaca, para el presente estudio.

Figura 1

Mapa político del cantón Mejía e identificación de las fincas muestreadas en las diferentes parroquias



Nota. Adaptado de Mapa Político del cantón Mejía, diferenciando simbólicamente los estratos y la ubicación de cada propiedad muestreada.

Materiales

Materiales de campo

frascos estériles, guantes de látex desechables, rollo de papel toalla, torundas con alcohol, termo, gel frío y registro de campo.

Materiales de laboratorio

Cajas Petri de vidrio 30 ml de capacidad, azas de platino, mechero Bunsen, probetas de 250 ml, 500 ml y 1000 ml, frascos de vidrio de 100 ml, 250 ml, 500 ml y 1000 ml, para las

diluciones, tubos de vidrio con tapa rosca, puntas de 1000 μ l y 100 μ l para micro pipeta, vasos de precipitación de 100 ml, 250 ml, 600 ml de capacidad, gradillas plásticas, agitadores magnéticos, bandejas de pesaje, parafilm, micro túbulos, guantes de látex y de calor, picetas, pinzas, pipetas.

Reactivos. Agar Baird Parker 500g, Telurito y yema de huevo BP, Agar cromogénico *S. aureus*, agua destilada, alcohol 70%, agua peptona, Agar Mueller Hinton, Agar nutritivo, plasma de conejo con EDTA, Glicerol, Agua oxigenada de 3 volúmenes, cloro, sablón, cepas ATCC- bacterianas control de *S. aureus*. Discos de antibióticos, placas BIS.PLUS; bioquímicas identificadoras de género y especie de bacterias Gram positivas.

Equipos. Balanza analítica, calibrador pie de rey, termómetro Max-Min, cámara de flujo, autoclave, Balanza electrónica, plancha de calor con agitación magnética, vórtex, micropipeta de rango 100 μ L a 100 L, incubadora, cámara fotográfica, computadora, vehículo.

Métodos

El estudio se lo realizó en 13 fincas de sectores lecheros representativos del cantón Mejía- Pichincha- Ecuador, seleccionadas con el método de muestreo estratificado, 3 fincas grandes de 101 animales en adelante, 4 medianas de 21 animales a 100 y 5 pequeñas de 1 a 20 animales. En el muestreo se contabilizo 1105 vacas de ordeño, de las cuales se tomaron 125 muestras de leche de vacas positivas a la prueba CMT (California mastitis test), que fueron valoradas microbiológicamente en laboratorio, para evaluar presencia de *S. aureus* en las muestras de leche con mastitis, prevalencia de la bacteria, y resistencia antibiótica, la metodología se describirá a continuación. Con el muestreo estratificado, se evitará que por azar se tomen más individuos de un grupo que otro y esto pueda condicionar los resultados de los datos de interés (Saenz et al., 2014).

Muestreo

Para realizar una buena toma de muestra se preparó con anterioridad todos los materiales e instrumentos y principalmente se filtró la toma de la muestra de las vacas, aplicando la prueba de California Mastitis Test (CMT) (Figura 2) que mostrará el grado de mastitis que presenta cada cuarto de la ubre del animal:

- Al tomar la muestra de leche, se utilizó guantes de látex o nitrilo y realizó la desinfección localizada.
- Posteriormente para la toma de muestra de leche, se utilizó de manera cuidadosa un frasco estéril y se receptó la leche al menos un volumen aproximado de 25 ml, para el análisis en laboratorio.
- Se procedió a etiquetar cada frasco con el nombre o número de arete del animal, el cuarto infectado, y predio.

Finalmente, las muestras se colocaron en un recipiente de espuma Flex con gel frío para mantener una temperatura aproximada de 4 a 6 °C.

Figura 2

Aplicación de la prueba CMT y toma de muestra



Nota. Aplicación de la prueba CMT a las muestras tomadas a las vacas en ordeño, para la toma de muestra.

Aislamiento de patógenos

Los medios de cultivo específicos fueron preparados con anterioridad, de que las muestras sean llevadas al laboratorio.

Se procedió a pesar los agares específicos, Baird Parker 63g por litro de agua destilada estéril, Manitol salado 111g por litro de agua destilada y agar Cromo génico *S. aureus* 111g por litro de agua destilada; el agua se midió con una probeta graduada de 1000 ml, el agar se pesó en la balanza de precisión.

Al estar listo el medio (hervido durante 1 min) se lo esterilizó en autoclave a 121 °C y 15 psi durante 15 minutos junto a las cajas Petri, después se dispensaron los medios en presencia del mechero. Se dosificó aproximadamente 25 ml en cada caja Petri.

En el caso del Agar específico Baird Parker, después de sacarlo de la autoclave, se lo enfrió a un rango de 50-40 grados centígrados, para añadirle Telurito y yema de huevo, un complemento del agar, para generar la reacción específica de colonias negras, con halos amarillos.

Siembra en caja Petri. El proceso para la siembra de las muestras en caja Petri, frente del mechero fue el siguiente:

- Se diluyó cada muestra de leche en 90 ml de agua peptona obteniendo una dilución 1:9
- Se tomó 0.1 ml de dilución con la micro pipeta, y se lo colocó en el centro de cada medio de cultivo (Baird Parker).
- Colocado el volumen de dilución en el medio de cultivo, se esparció con un asa de vidrio (esterilizada con alcohol al 70% y exposición breve al fuego) o a su vez un asa de digralsky autoclavable, dentro de la caja Petri para la correcta homogenización de la dilución por todo el medio en forma circular por 20 veces. se selló con parafilm y etiquetó.
- Se incubó los medios a 37°C, y se observó si existió crecimiento microbiano a las 18, 24, 42 y 48 horas de incubación.

Aislamiento de *S. aureus*. Al ser Baird Parker un medio de cultivo específico, 24 horas después con un máximo de 48 horas a 37° C, si en la muestra sembrada había presencia de *S. aureus*, se observarán colonias negras circulares, con halos brillantes, si hay una variación del color negro brillante, se tratara de otro tipo de *Staphylococcus* o por consiguiente si la forma y el color varían se puede tratar de un estreptococo.

Pruebas de confirmación

Tinción Gram. Este método consiste en realizar un frotis bacteriano: se coloca una gota de agua en la placa, con el asa en condiciones asépticas se toma una pequeña cantidad de una colonia bacteriana, se forma una suspensión homogénea y se extiende por toda la placa. Fija las bacterias al portaobjetos: pasar la placa porta objetos sobre la flama del mechero.

Tinción del frotis bacteriano. A continuación, se detallan los procesos realizados:

- Cubrir el frotis con el colorante cristal violeta durante 1 minuto y después se realizó un lavado ligeramente con agua destilada.
- Cubrir el frotis con yodo (Lugol) durante 1 minuto y posteriormente se lavó con agua destilada.
- Decolorar con alcohol-acetona (1:1) durante 15 segundos y luego lavar con agua destilada.
- Cubrir con safranina durante 30 segundos y se realizó un último lavado agua destilada.
- Finalmente secar y observar al microscopio.

Comprobación agar cromogénico. Se tomó una caja Petri con agar cromogénico *S. aureus*, se la dividió en 8 partes iguales, y se procedió hacer un picado con el asa de platino en una de las colonias aisladas en el medio Baird Parker, que se asumió que era *S. aureus*, posterior a esto se identifica la muestra, al rotularla en el espacio de la caja y se espera su incubación durante máximo 24 horas a 37° C. Si después de la incubación la colonia aislada, mostraba una coloración azul metálica, se confirmaba la presencia de *S. aureus* y solo así se procedía con la siguiente comprobación que es la prueba de la coagulasa y la catalasa.

Prueba de catalasa. Proceso realizado de la siguiente manera:

- Se tomó con el asa de platino una colonia bacteriana, aislada del medio específico para *S. aureus* (Baird Parker), estriarla en una placa porta objetos.
- Colocar una gota de peróxido de hidrogeno al 3% sobre la colonia bacteriana estriada.
- Agitar con un palillo o punta estéril el peróxido con la colonia bacteriana, en sentido de las manecillas del reloj; Esperar la reacción.
- Si la colonia bacteriana es efectivamente un *Staphylococcus aureus*, se apreciará una reacción efervescente. De caso contrario, la colonia es una especie *Streptococcus* (Fernandez et al., 2010).

Prueba de coagulasa. Realizada de la siguiente manera:

- Con una pipeta estéril de 1 ml, agregar 0,5 ml de BD BBL Coagulase Plasma, Rabbit o BD BBL Coagulase Plasma, Rabbit with EDTA rehidratado en un tubo de prueba de 10 x 75 mm en una gradilla.
- Con una pipeta serológica estéril de 1 mL, agregar aproximadamente 0,05 mL de cultivo de caldo del día anterior del organismo de prueba al tubo con plasma. Con un asa bacteriológica estéril o asa de platino, también se pueden emulsionar a conciencia varias colonias (asa llena de 1 µL mínimo) de una placa de agar no inhibidor en el tubo de plasma.
- Mezclar suavemente.
- Incubar en baño María o incubadora o en la incubadora a 37 °C durante un máximo de 6 horas. Examinar los tubos inclinándolos periódicamente con suavidad. Evitar sacudir o agitarlos, ya que esto podría causar la desintegración del coágulo y, como consecuencia,

resultados de pruebas negativos falsos o dudosos. Cualquier nivel de coagulación en el período de 6 h se consideró resultado positivo.

- Si no se ve ningún coágulo transcurridas 6 horas, mantenga la incubación a 37 °C durante un máximo de 24 horas. Muchas cepas productoras de enzimas débiles producirán una coagulación del plasma sólo después de una incubación de 24 horas.
- Registrar los resultados (Dickinson, 2017).

Sistema de identificación bacteriana “Bis-Plus”. El sistema de identificación bacteriana BIS-Plus (Figura 3), considerado como una prueba bioquímica que proporcionan resultados claros y precisos en 24 horas, donde podemos identificar género y especie de más de 241 bacterias Gram positivas entre ellas el *Staphylococcus aureus* (Cypress diagnostics, 2018). Para utilizar esta prueba se necesita previamente cumplir con los siguientes requisitos:

- Tinción Gram, para comprobar si son bacterias Gram positivas
- Prueba de Catalasa
- Prueba de Coagulasa

Identificados estos parámetros, se procede a la preparación de las muestras:

- Obtener un cultivo puro de 18 – 24 horas.
- Colocar 4 – 5 ml de solución salina 0.85% en los tubos de ensayo necesarios.
- Realizar una suspensión con una turbidez de 2 McF con un asa o hisopo estéril.
- Homogenizar la suspensión con la ayuda de un vórtex.
- Homogenizar la suspensión bacteriana 2 McF con la ayuda de un vórtex.
- Inocular 100 µl de la suspensión bacteriana en cada pocillo de las tres primeras columnas.
- Cubrir las celdas H1 (URE), F1 (ARG), E1 (NITR), con 3 gotas de aceite de parafina.

Incubación de las placas que contienen la suspensión bacteriana:

- Colocar la placa dentro de una funda plástica sellada para evitar que esta se seque.
- Incubar en aerobiosis a $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.
- Dentro de la incubadora, colocar la base de una caja Petri destapada con agua para mantener la humedad.

Test adicional: Vogues – Proskauer (VP). Test de confirmation de parámetros de identificación bacteriana del Kit:

- Homogenizar la suspensión bacteriana 2 McF con la ayuda de un vórtex.
- Colocar 1 ml de la suspensión en un tubo pequeño.
- Insertar la tira reactiva en el tubo.
- Incubar a $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 2 horas.
- Añadir 3 gotas del reactivo VP1 y 3 gotas del reactivo VP2.
- Incubar a $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos.

Interpretación de Resultados:

Positivo: Presencia de color rojo o rosado-Negativo: Sin desarrollo de color.

Test Adicional. Pirrolidonil arilamidasa (PYR). Test de confirmation de parámetros de identificación bacteriana del Kit:

- Homogenizar la suspensión bacteriana 2 McF con la ayuda de un vórtex.
- Colocar 1 ml de la suspensión en un tubo pequeño.
- Insertar la tira reactiva en el tubo.
- Incubar a $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 2 – 4 horas.

- Añadir 3 gotas del reactivo PYR.
- Esperar 2 minutos y observar los resultados.

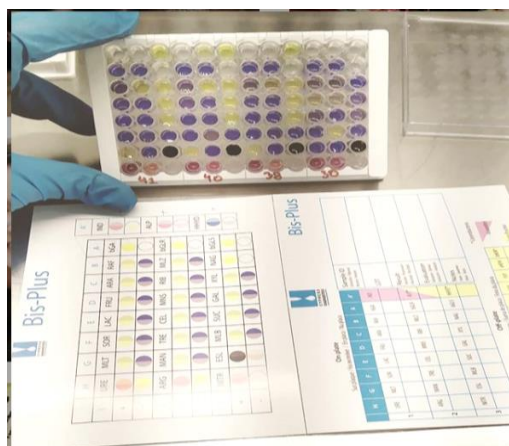
Interpretación de resultados:

- Positivo: Presencia de color rojo o naranja.
- Negativo: Sin desarrollo de color o color amarillo – café.

Evaluación de resultados: Introducir los datos obtenidos de las bioquímicas y los test adicionales en el programa Cypress Diagnostics Identificación Software.

Figura 3

Pruebas bioquímicas de confirmación e identificación Bis Plus



Nota. Lectura de las placas de las pruebas “Bis-Plus”

Conservación de cepas

Para la conservación de las colonias puras de la bacteria, se utilizará: glicerol y BHI caldo infusión cerebro corazón:

Se colocó en un tubo de ensayo estéril 4.5 ml de BHI (Caldo infusión cerebro corazón), posterior a esto se tomó con un aza de platino una cantidad considerable de colonias puras de *S. aureus*,

hasta llegar a la escala de Mc Farland de 2 a 5, se agitó en un vórtex esta mezcla, al obtener la mezcla indicada se añadió 1.5ml de glicerol estéril, se agitó con vórtex hasta tener una mezcla homogénea y se procedió a dispensar en tubos ependorf y a etiquetar con el respectivo código.

Antibiogramas

Se seleccionaron los biales confirmados positivos a *Staphylococcus aureus*, luego se los incubó con BHI (Caldo cerebro corazón) durante 24 horas a 37 °C, se los volvió a sembrar en un medio específico de *Staphylococcus aureus*, para descartar algún tipo de contaminación en la conservación de la bacteria, al comprobar que las colonias están puras, se continuo con el proceso de la técnica de Kirby-Bauer:

- Se seleccionó una colonia aislada, pura, para hacer la dilución en solución salina y ajustar una turbidez de 0.5 de la escala de Mc. Farland en el turbidímetro.
- Se introdujo un hisopo estéril en la suspensión después de 15 minutos de haber ajustado la escala 0.5 de Mc. Farland. Para inocular la muestra con el hisopo en la placa, rotar el hisopo contra la pared del tubo para eliminar el exceso de suspensión.
- Se incubó la placa de Mueller-Hinton, de forma uniforme, sin dejar zonas libres o limpias, se realiza un estriado por cuadrantes rotando la placa y por la periferia del agar.
- Se dejó secar el inoculo en la placa durante 3 a 5 minutos con la tapa cerrada, para colocar los discos.
- Se colocó 6 discos o más dependiendo del diámetro de la caja Petri, en el caso del estudio presente se utilizó la caja Petri de 10cm de diámetro en donde se colocaron 5 discos en la periferia y uno en el centro dejando más de 2cm de distancia entre discos, para evitar que los halos de inhibición se transpongan uno sobre otro y eviten una buena lectura de los

- resultados. Se tomó en cuenta el diámetro del halo de inhibición de cada disco de antibiótico y la acción del principio activo, para no causar falsas lecturas o resistencias inducidas como el caso de la Clindamicina y la Eritromicina, que van una junto a la otra.
- En la colocación los discos se utilizó un dispensador de discos de antibióticos y pinzas estériles; las pinzas ayudaron a fijar con ligeros toques a los discos sobre el agar.
 - Se incubó de 18 a 24 horas a 37 °C, para obtener la lectura de los resultados de los antibiogramas. Se evaluó la resistencia o sensibilidad de cada agente microbiano de acuerdo al halo de inhibición que presento, que fue medido con un calibrador para mayor precisión.
 - La selección de los antibióticos se realizó de acuerdo a los principios activos más utilizados en la zona para el control de mastitis Figura 4.

En las fincas ya establecidas, se aplicará la prueba CMT, donde identificaremos las vacas con presencia de mastitis, para proceder al muestreo respectivo, para luego aislar de las muestras tomadas la bacteria *S. aureus*, y de las muestras positivas a *S. aureus* se procederá a realizar un antibiograma para determinar la resistencia antibiótica de este patógeno. La unidad experimental será una caja Petri inoculado *S. aureus*, sobre estas se asignarán los tratamientos Tabla 2.

Después de sembrar las muestras de leche de vacas con mastitis en el agar específico y confirmar la presencia de *S. aureus*. Las colonias puras de la bacteria serán conservadas para realizar los antibiogramas. En donde se emplearan cajas Petri de 45 ml y de 15cm de diámetro, donde se colocaran como máximo 6 discos con una dosis ya establecida del ingrediente activo del antibiótico, por caja (Taroco et al., 2006). Para el análisis de la resistencia antibiótica, se tomarán los biales confirmados positivos a *S. aureus*. En la fase final de laboratorio de pruebas

de sensibilidad antibiótica, el antibiótico se dispondrá bajo un orden específico, alternando los sensibilizadores según sus propiedades farmacodinámicas.

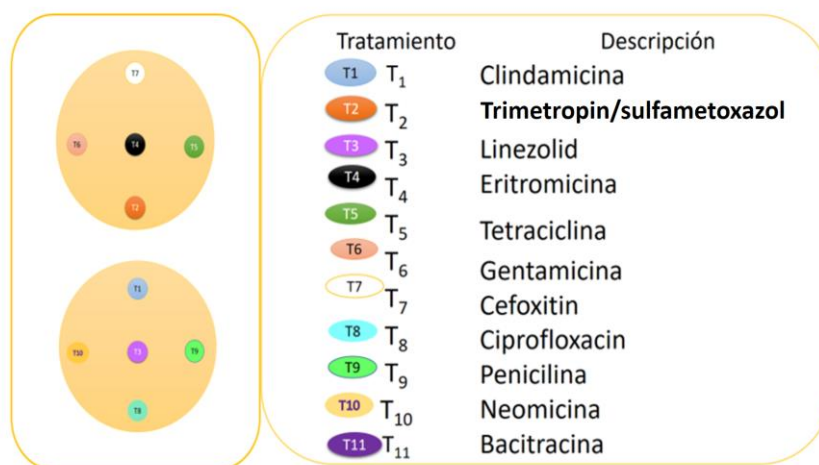
Tabla 2

Descripción de los diferentes tratamientos

Tratamiento	Descripción
T ₁	Clindamicina
T ₂	Trimetropin/sulfametoxazol
T ₃	Linezolid
T ₄	Eritromicina
T ₅	Tetraciclina
T ₆	Gentamicina
T ₇	Cefoxitin
T ₈	Ciprofloxacina
T ₉	Penicilina
T ₁₀	Neomicina
T ₁₁	Bacitracina

Figura 4

Descripción de la disposición de los discos en cada caja Petri



Análisis de datos

Se empleó estadística descriptiva, para obtener las siguientes variables:

Identificación de presencia o ausencia de *S. aureus*. En las muestras de leche tomadas de vacas con mastitis. Para determinar la ausencia o presencia de *S. aureus* se utilizaron dos agares específicos Baird Parker y Manitol saldo conjunto con las pruebas de confirmación bioquímicas catalasa y coagulasa, tinción Gram y serán purificadas las colonias aislando en un agar cromogénico específico para *S. aureus*.

Determinación de la prevalencia de *S. aureus* en las muestras tomadas. Al confirmar las muestras positivas a *S. aureus*, se aplicó la siguiente fórmula $[(N^\circ \text{ de vacas positivas} / N^\circ \text{ de vacas muestreadas}) * 100]$, se determinó la prevalencia en general con el total del número de las muestras y por estrato para comparar la diferencia porcentual entre estos.

Evaluación de la resistencia o susceptibilidad de *S. aureus*. Se observó el diámetro del halo de inhibición, este halo fue medido utilizando un calibrador. Estos datos se reportaron en mm, en el caso que no haya halo se registrara el diámetro del disco que es 6mm; la interpretación del diámetro alrededor del disco se basó en guías publicadas por el CLSI 2019 (Clínical and Laboratory Standards Institute) y el organismo fue reportado como sensible, intermedio o resistente al antibiótico que será probado. Cada antibiótico tiene su halo de inhibición específico y éste depende del tamaño de la molécula del antibiótico y su polaridad (Taroco et al., 2006).

Multiresistencia. se identificó los biales resistentes a tres o más antibióticos, categorizados como multiresistentes.

Capítulo IV

Resultados y Discusión

Resultados

Presencia de S. aureus en los tres estratos lecheros

En este estudio se incluyeron 1105 vacas en ordeño del cantón Mejía de seis parroquias diferentes. Antes de la toma de muestra se realizó una prueba de CMT, para verificar el cuarto afectado de la ubre de cada vaca, e identificar el grado de mastitis. De acuerdo al resultado de la prueba CMT, se tomaron 125 muestras por vaca (11.3%) que fueron analizadas en el laboratorio, Tabla 4. De las cuales se sometieron a una identificación tradicional, sometida a un aislamiento en Baird Parker, luego tinción Gram, confirmación en un Agar cromogénico y coagulasa (Plasma de conejo), con este método se obtuvo 68 muestras positivas a *S.aureus* un (54.4%) de las 125 muestras procesadas; seguido de esto se confirmó las muestras positivas con el kit Bis Plus; una prueba bioquímica de alta sensibilidad que identifica género y especie de bacterias Gram positivas, con esta prueba confirmatoria se identificaron otros *Staphylococcus* Gram positivos como *S. intermedius*, *S. echerfeir*, *S. hyicus*, entre otros, de los cuales se confirmaron 41 cepas (32.8%) a *S. aureus*. Este 32.8% tomando en cuenta el total de muestras positivas, el estrato grande representa el 13.60% seguido del estrato mediano y pequeño un 9.60% cada uno Tabla 3.

Tabla 3

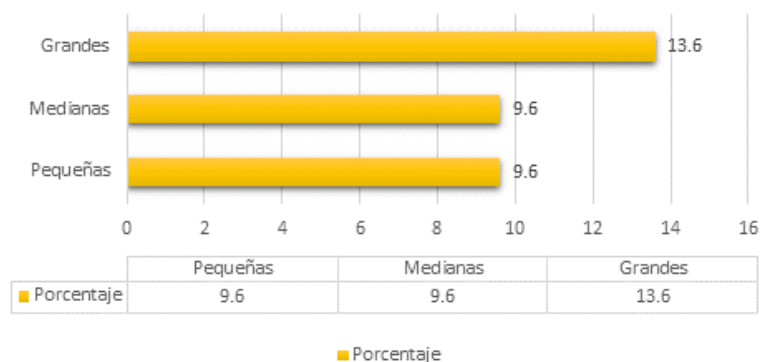
Presencia de Staphylococcus aureus en tres estratos lecheros del cantón Mejía

Tipo de estrato	Muestras analizadas	Muestras positivas a <i>S. aureus</i>	%
Grandes	52	17	13.6
Medianas	55	12	9.60
Pequeñas	18	12	9.60
Total	125	41	32.8

Nota. N%: porcentaje, N: número, %: porcentaje; el porcentaje de la presencia de *S. aureus* por tipo de estrato, se obtuvo tomando como referencia el porcentaje total de positivas (n=41), frente al número de positivas por cada estrato.

Figura 5

Distribución de la presencia de S. aureus, en muestras positivas



Prevalencia de Staphylococcus aureus en los tres estratos lecheros

El estrato pequeño se presentó el mayor porcentaje de prevalencia de *S. aureus*, ya que de las 18 muestras tomadas 12 de ellas fueron positivas, representando el 66.6%; seguidamente en el estrato grande de 52 muestras tomadas 17 fueron positivas representando un 32.6%. Finalmente, en el estrato mediano de 55 muestras tomadas 12 fueron positivas siendo este el estrato con el menor porcentaje de prevalencia de *S. aureus* 21.82%, como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4

Prevalencia de Staphylococcus aureus en cada uno de los tres estratos lecheros del cantón Mejía

Tipo de estrato	Parroquia	Identificación del predio	# total de vacas	#Muestras tomadas	#Positivas confirmadas	Positivas %
Grande	El Chaupi	G- A	177	22	3	13.64
Grande	Machachi	G-B	150	7	3	42.86
Grande	Alóag	G-C	310	26	11	42.31
Prevalencia			637	52	17	32.69
Mediano	El Chaupi	M-D	91	18	0	0
Mediano	Aloasí	M-E	85	10	0	0
Mediano	Tandapi	M-F	100	10	4	40
Mediano	Tambillo	M-G	88	9	8	77.78
Mediano	El Chaupi	M-H	77	12	0	0
Prevalencia			441	55	12	21.818
Pequeño	Uyumbicho	P-I	10	4	4	100
Pequeño	Alóag	P-J	6	4	2	50
Pequeño	Alóag	P-K	5	5	4	80
Pequeño	Aloasí	P-L	3	2	0	0
Pequeño	Tambillo	P-M	3	3	2	66.67
Prevalencia			27	18	12	66.66
Total			1105	125	41	32.80

Nota. N; número de muestras, %; porcentaje.

Figura 6

Representación de la prevalencia de S. aureus en los tres diferentes estratos

lecheros, el número de las muestras tomadas, frente al número de positivas

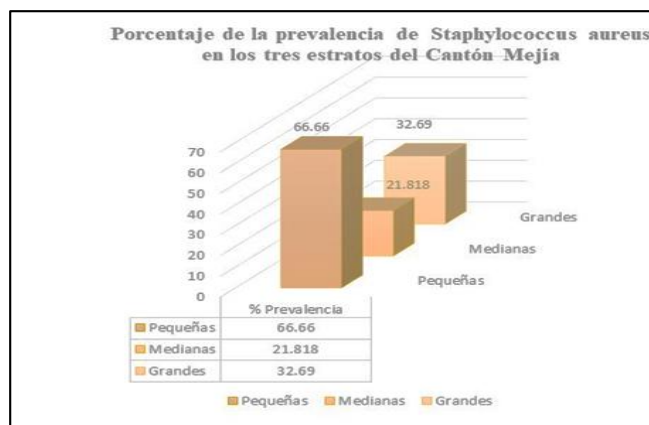


Tabla 5

Referencia de los puntos críticos en común según la encuesta aplicada a cada una de las propiedades de los estratos

lecheros grandes, medianos, pequeños del Cantón Mejía

Estratos	Propiedad	Tipo de ordeño	Personal capacitado	Calidad de agua	Sala de ordeño	Correcto lavado de la ubre	Despunte	Sellado de ubre	Correcto sellado
Grandes	G-A	A	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si
Grandes	G-B	A	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si
Grandes	G-C	Mc	Si	No	Si	No	Si	Si	No
Medianos	M-D	Mc	No	Si	Si	Si	Si	Si	No
Medianos	M-E	Mc	Si	Si	Si	Si	Si	No	No
Medianos	M-F	Mc	Si	No	Si	No	Si	Si	No
Medianos	M-G	Mc	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No
Medianos	M-H	Mc	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No
Pequeños	P-I	Mc	Si	Si	Si	No	Si	Si	No
Pequeños	P-J	Mn	No	Si	No	No	Si	No	No
Pequeños	P-K	Mn	No	Si	No	No	Si	No	No
Pequeños	P-L	Mn	No	No	No	No	Si	No	No
Pequeños	P-M	Mn	No	Si	No	No	Si	No	No

Nota. Tipos de ordeño (A) automático; (Mc) mecánico; (Mn) manual.

Resultados de los puntos críticos de las buenas prácticas sanitarias de ordeño

Los puntos críticos de cada hacienda y estrato están resumidos en la Tabla 5, se especifica los puntos para evaluar las buenas prácticas de ordeño, donde se hace referencia a las condiciones de la infraestructura, transporte, alimentación y manejo de los animales, de tal modo que garanticen su calidad de vida y manejo apropiado, bienestar animal.

Resultados de los puntos críticos detallados por tipo de estrato, ordenados por la relevancia de La problemática

Puntos críticos del pequeño estrato. Como reflejan los resultados anteriores de la relación de Muestras totales frente a las muestras positivas el pequeño estrato es el que presenta una prevalencia más alta de *S. aureus* con un (66.66%); a pesar que en su mayoría estos pequeños productores mostraban vacas con ubres sanas, buena alimentación, buen trato al animal y con bajos signos de mastitis subclínica y mastitis clínica nula. Los factores de índices problemáticos en este estrato comúnmente se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6

Los factores de índices problemáticos observados en el pequeño estrato

Factores	Descripción
Tipo de ordeño	Manual
Personal capacitado	No - información empírica sobre el cuidado de la ubre y el manejo en la producción lechera
Calidad de agua	No - reutilización del agua contaminada para todo el ordeño - falta de agua potable
Sala de ordeño	No
Correcto lavado de la ubre	No - utilización de material no limpio como telas, ropa, para todas las vacas, y la utilización del mismo recipiente para el enjuague

Factores		Descripción
Despunte	Si	
Sellado de ubre	No	No - la falta del sellado post ordeño, por falta de recursos y por falta de información de la importancia de un sellador comercial o yodo, el ordeño en el 90% de los productores pequeños (1-20)
Correcto sellado	No	
Medidas de bio seguridad y sanitarias	No	No - el personal no utiliza guantes, ni se desinfectan las manos, presencia de otras especies animales en el área del ordeño
Manejo		Buen trato al animal cumple con las 5 libertades especificadas por la (OIE)
Medidas de bio seguridad y sanitarias	No	

Figura 7

Prácticas e instalaciones de los pequeños productores



Nota. Ordeño manual, sala de ordeño improvisada, prácticas y conocimientos empíricos del cuidado y limpieza de la ubre.

Puntos críticos del estrato grande. En el estrato grande con un 32.69% en la presencia de *S. aureus*, los resultados dependieron de dos panoramas diferentes; en los cuales dos de las tres haciendas cumplían con estrictas normas de bioseguridad y cuidado animal (Buenas practicas pecuarias de ordeño), lo contrario de la tercera hacienda donde se observaron varios problemas sanitarios, manejo animal y capacitación del personal estas propiedades se muestran detalladas en la Tabla 7.

Tabla 7

Los factores de índices problemáticos observados en el estrato grande

Factores	Descripción hacienda# 1 y 2	Descripción hacienda #3
Tipo de ordeño	Mecánico Automático	Mecánico (sobre ordeño)
Personal capacitado	SI- Presencia de operarios capacitados, ordenados y eficientes	Si- Presencia de médico veterinario, de paso. Operarios no capacitados desordenados, con mal manejo de los animales, maltrato, cuidados y limpieza deficiente de la ubre
Agua limpia	Fuentes y reservorios de agua limpia y fresca (no potable)	No/si- Cantidad limitada y escasa o deficiente de agua para la limpieza en general.
Sala de ordeño	Estructura correcta, iluminada, eficiente	Sala de ordeño espaciosa con espaciamientos incorrectos para el bienestar animal; espacios muy amplios entre vacas y entre el comedero y las rejas.
Correcto lavado de la ubre	Si	No
Despunte	Si	SI
Sellado de ubre	Si	si
Correcto sellado	Si	Si
Manejo	Buen trato al animal cumple con las 5 libertades especificadas por la (OIE)	Maltrato animal, No cumple con las 5 libertades especificadas por la (OIE)

Factores	Descripción hacienda# 1 y 2	Descripción hacienda #3
Medidas de bio seguridad y sanitarias	Si	Utilizadas incorrectamente

Observaciones de las otras dos propiedades, estimulaban a los animales con música en el ordeño, dietas alimenticias específicas para el requerimiento de cada animal, con un ordeño automatizado para evitar el sobre ordeño, en la otra contaban con un brazalete que monitorea las condiciones del animal número de litros de leche dados, cantidad de alimento dependiendo del animal, distancia que camina el animal, cantidad de agua que necesita, entre otras condiciones, profesionales de la salud animal que se ocupan por evitar la aparición de mastitis, y controlan la rotación de antibióticos, vacunación y preñez.

Observaciones de los animales en la propiedad con problemas eran vacas de temperamento nervioso, vacas de aspecto poco saludable, pero de condición corporal 3.

Figura 8

Hacienda#3 prácticas e instalaciones de los grandes productores; ordeño mecánico, sala de ordeño, prácticas, conocimientos de cuidado y limpieza de la ubre incorrectos



Puntos críticos del estrato mediano. El estrato mediano presento el menor porcentaje con 21,88% de *S. aureus*, este estrato pese a que hubo una variación de tipos de propiedades donde sí se cuidaban los animales y en otras había presencia de descuido podemos concluir que hay presencia de otro agente causal de la mastitis. No contaban con alta tecnología, ni personal capacitado, pero si con más cuidado y consideración a los animales. Los factores de las buenas prácticas de ordeño en estas propiedades se muestran detalladas en la Tabla 8.

Tabla 8

Los factores de índices problemáticos observados en el estrato mediano

Factores	Descripción
Tipo de ordeño:	Automático
Personal capacitado:	En el 50% de las haciendas si y en el 50% no
Agua limpia	Si en un 90%
Sala de ordeño	Si
Correcto lavado de la Ubre	Si en un 80%
Despunte	Si
Sellado de ubre	Si
Correcto sellado	En un 80%
Manejo	Buen trato al animal cumple con las 5 libertades especificadas por la (OIE) en la mayoría de propiedades muestreadas.
Medidas de bio seguridad y sanitarias	Si

Tabla 9

Antibióticos utilizados en los antibiogramas y la especificación de susceptibilidad según los rangos del diámetro del halo en (mm)

Ingredientes de los antibióticos comerciales utilizados en las haciendas	Antibiótico	Siglas	Concentración de los discos (µg)	Sensible	Intermedio	Resistente
	Penicilina	P	10	>=29		<=28
Oxacilina – cloxacilina	Cefoxitin	FOX	30	>=22		<=21
Kanamicina - Estreptomicina	Gentamicina	CN	10	>=15	13-14	<=12
	Eritromicina	E	15	>=23	14-22	<=13
	Tetraciclina	TE	30	>=19	15-18	<=14
	Ciprofloxacina	CIP	5	>=21	16-20	<=15
Lincomicina	Clindamicina	CC	2	>=21	15-20	<=14
	Trimetropin/ Sulfametoxazol	SXT	25(1.25/23.75)	>=16	nov-15	<=10
	Linezolid	LNZ	30	>=21		<=20
	Bacitracina	B	10	>=8		<=9
	Neomicina	N	109+	>=17		<=12

(CLSI, 2019)

Resistencia Antimicrobiana

Los resultados de la resistencia y susceptibilidad frente a los once antibióticos elegidos según los antibióticos comerciales utilizados por los productores Tabla 10, para controlar la mastitis y los más utilizados por profesionales de la salud animal basándose en el CLSI actual, los rangos de distancia para determinar la sensibilidad y resistencia se muestran en la Tabla 9.

Tabla 10

Antibióticos comerciales más usados por los productores agropecuarios de la zona

Nombre del antibiótico comercial	Ingredientes activos
Orbenin	Cloxacina = Cefoxitin
Clordelin	Lincomicina = Clindamicina
Mamin	Kanamicina= Gentamicina + Penicilina
Mastiyej	Tetraciclina+Neomicina+Bacitracina
Cloxazol	Amoxicilina + Cloxacilina= Cefoxitin
Shotapein	Penicilina+ Estreptomicina= gentamicina
Neoclordelin	Lincomicina+Neomicina+Betametasona

Resistencia antimicrobiana por tipo de estrato lechero

Resistencia antimicrobiana en el estrato grande. El número de biales confirmados positivos de género y especie *Staphylococcus aureus* correspondientes a propiedades del estrato Grande fueron n=17, La resistencia en este estrato fue más fuerte o alta a la penicilina (P) con 9 (52.94%), seguido de clindamicina(CC) con 6 (35.29%), tetraciclina(TE) con 6 (35.29%), gentamicina(CN) con 5 (29.41%), bacitracina(B) con 4 (23.53%) y totalmente susceptible a

Trimetropin/sulfametoxazol(SXT), ciprofloxacina (CIP) y neomicina (N) con 0 (0.00%), los resultados detallados en porcentaje y número(de individuos resistentes o susceptibles se muestra en la Tabla 11.

Tabla 11

Resistencia a los antibióticos para Staphylococcus aureus aislamientos de Leche de vaca obtenida de los estratos grandes del cantón Mejía (n = 17)

Nombre del antibiótico	Numero de Individuo resistente %	Individuo Intermedio	Individuo sensible
Clindamicina (CC)	6(35.29)		11(64.71)
Trimetropin/Sulfa(SXT)	0(0.00)		17(100.00)
Linezolid (LNZ)	2(11.76)		15(88.24)
Eritromicina (E)	2(11.76)	2(11.76)	13(76.47)
Tetraciclina (TE)	6(35.29)	2(11.76)	9(52.94)
Gentamicina (CN)	5(29.41)		12(70.59)
Cefoxitin (FOX)	2(11.76)		15(88.24)
Ciprofloxacina (CIP)	0(0.00)		17(100.00)
Penicilina (P)	9(52.94)		8(47.06)
Neomicina (N)	0(0.00)		17(100.00)
Bacitracina (B)	4(23.53)		13(76.47)

?: porcentaje

Resistencia antimicrobiana en el estrato mediano. El número de biales confirmados positivos de género y especie *Staphylococcus aureus* correspondientes a propiedades del estrato mediano fueron n=12, La resistencia en este estrato fue más fuerte o alta a la penicilina (P) con 4(33.33), seguido de tetraciclina (TE) con 2 (18.6%) y neomicina(N) con 2 (18.6%), totalmente susceptible a clindamicina(CC), trimetropin/sulfametoxazol(SXT), linezolid (LNZ), eritromicina(E), gentamicina(CN), ciprofloxacina(CIP), bacitracina(B) con 0(0%). En este estrato fue el que se mostró el mejor índice de bienestar animal en todos sus aspectos. Los resultados detallados en porcentaje y número de individuos resistentes o susceptibles se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12

Resistencia a los antibióticos para Staphylococcus aureus aislamientos de leche de vaca obtenida de los estratos medianos del cantón Mejía (n = 12)

Nombre del antibiótico	Numero de Individuo resistente %	Individuo Intermedio %	Individuo sensible %
Clindamicina (CC)	0(0)		12(100)
Trimetropin/Sulfa(SXT)	0(0)		12(100)
Linezolid (LNZ)	0(0)		12(100)
Eritromicina (E)	0(0)		12(100)
Tetraciclina (TE)	2(18.6)	2(18.6)	8(66.6)
Gentamicina (CN)	0(0)		12(100)
Cefoxitin (FOX)	1(8.33)		11(91.66)
Ciprofloxacina (CIP)	0(0)	1(8.33)	11(91.66)
Penicilina (P)	4(33.33)		8(66.6)
Neomicina (N)	2(18.6)		10(83.33)
Bacitracina (B)	0(0)		12(100)

%; porcentaje

Resistencia antimicrobiana en el estrato pequeño. En el estrato pequeño se obtuvo porcentajes bajos de resistencia generalmente, por razones de manejo sanidad animal y planes de rotación de antibióticos y del manejo animal. La resistencia en porcentajes iguales con los siguientes antibióticos: trimetropin/sulfametoxazol (SXT), eritromicina (E), penicilina (P), bacitracina (B) con 3 (25%), y totalmente susceptibles a linezolid (LNZ), ciprofloxacina (CIP) con 0%. Los resultados detallados en porcentaje y número de individuos resistentes o susceptibles se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13

Resistencia a los antibióticos para Staphylococcus aureus aislamientos de leche de vaca obtenida de los estratos pequeños del cantón Mejía (n = 12)

Nombre del antibiótico	Numero de Individuo resistente	Individuo Intermedio	Individuo sensible
Clindamicina (CC)	1(8.33)	1(8.33)	10(83.33)
Trimetropin/Sulfa(SXT)	3(25)	2(16.66)	7(58.33)
Linezolid (LNZ)	0(0.00)	0(0.00)	12(100)
Eritromicina (E)	3(25)	0(0.00)	9(75)
Tetraciclina (TE)	1(8.33)	1(8.33)	10(83.33)
Gentamicina (CN)	2(16.66)	0(0.00)	10(83.33)
Cefoxitin (FOX)	1(8.33)	0(0.00)	11(91.66)
Ciprofloxacina (CIP)	0(0.00)	0(0.00)	12(100)
Penicilina (P)	3(25)	0(0.00)	9(75)
Neomicina (N)	1(8.33)	0(0.00)	11(96.66)
Bacitracina (B)	3(25)	0(0.00)	9(75)

‰: porcentaje

Figura 8

Representación de la resistencia antimicrobiana de S. aureus en los tres distintos estratos lecheros

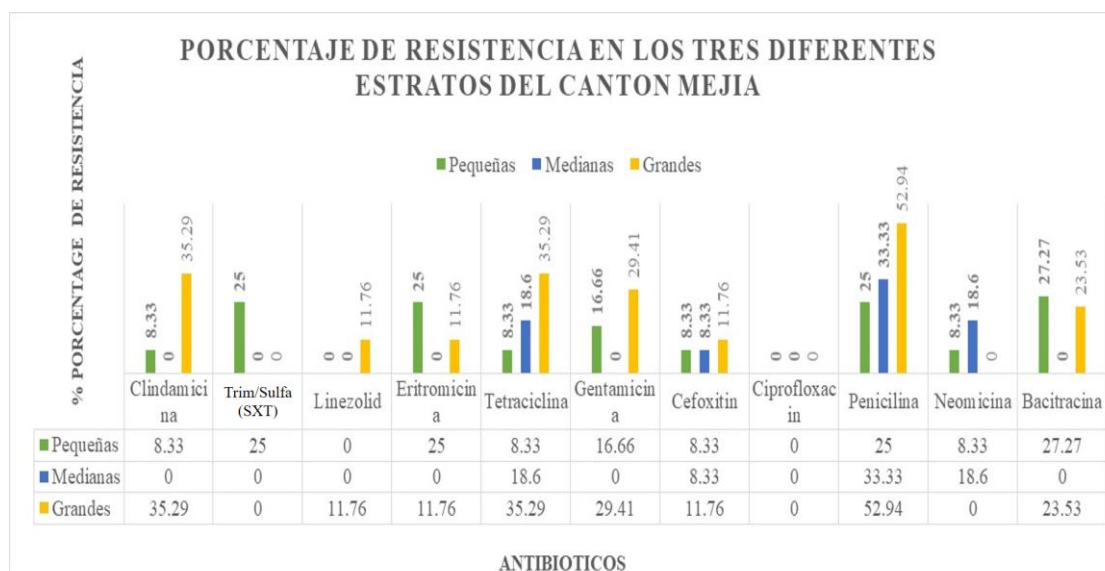


Figura 9

Representación de la sensibilidad antimicrobiana de *S. aureus* en los tres distintos estratos lecheros

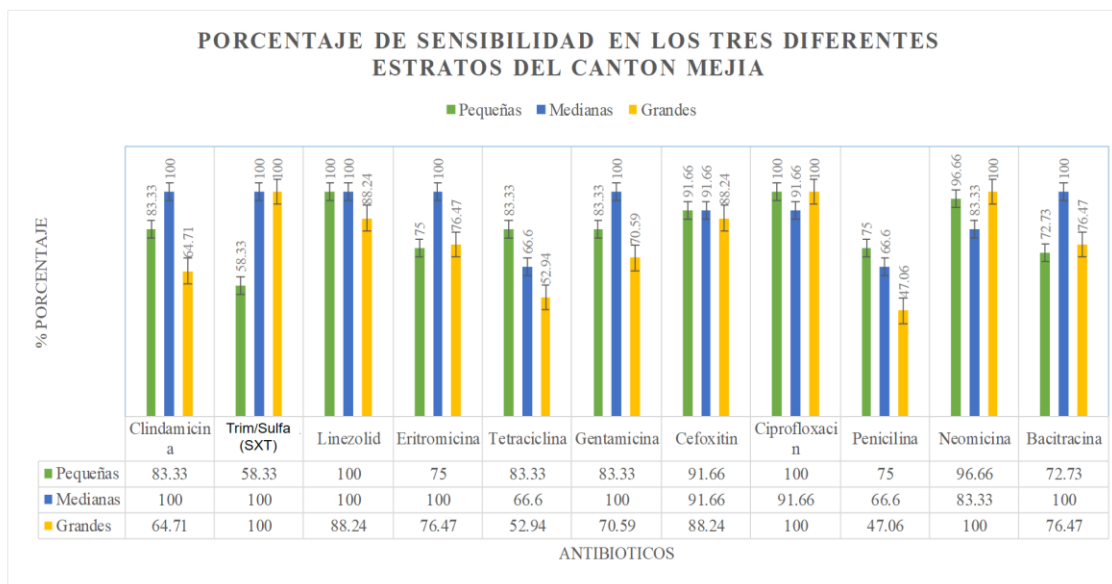


Tabla 14

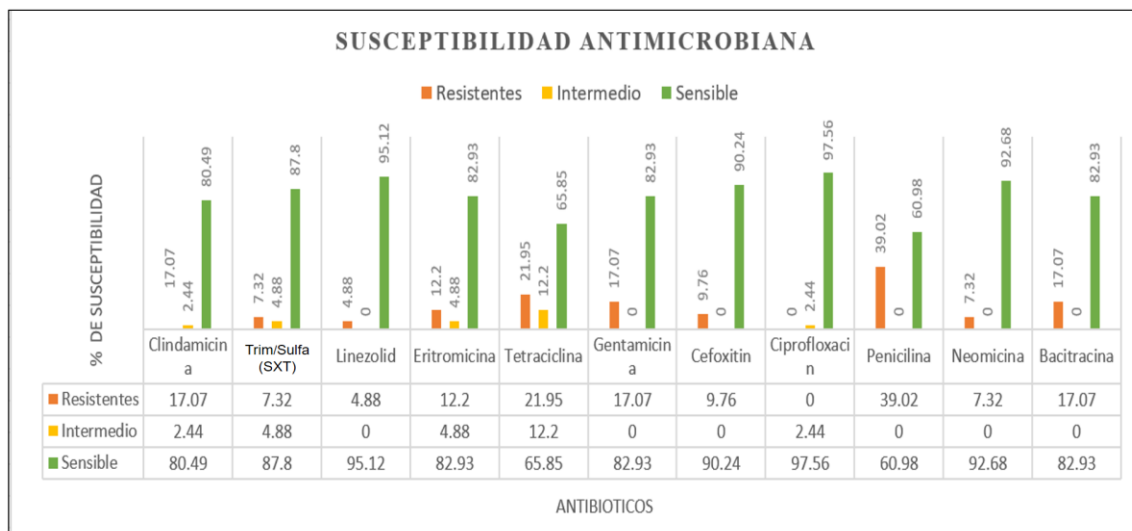
Representación del porcentaje y número en conjunto de los tres estratos lecheros del cantón Mejía (n=41) de susceptibilidad y resistencia in vitro de *Staphylococcus aureus*

Nombre del antibiótico	# de individuos resistente	# de individuos resistencia Intermedia	# de individuos sensible
Clindamicina (CC)	7(17.07)	1(2.44)	33(80.49)
Trimetropin/Sulfa(SXT)	3(7.32)	2(4.88)	36(87.80)
Linezolid (LNZ)	2(4.88)	0(0.00)	39(95.12)
Eritromicina (E)	5(12.20)	2(4.88)	34(82.93)
Tetraciclina (TE)	9(21.95)	5(12.20)	27(65.85)
Gentamicina (CN)	7(17.07)	0(0.00)	34(82.93)
Cefoxitin (FOX)	4(9.76)	0(0.00)	37(90.24)
Ciprofloxacina (CIP)	0(0.00)	1(2.44)	40(97.56)
Penicilina (P)	16(39.02)	0(0.00)	25(60.98)
Neomicina (N)	3(7.32)	0(0.00)	38(92.68)
Bacitracina (B)	7(17.07)	0(0.00)	34(82.93)

#: porcentaje

Figura 12

Representación de susceptibilidad antimicrobiana de *S. aureus*, frente a los once antibióticos probado



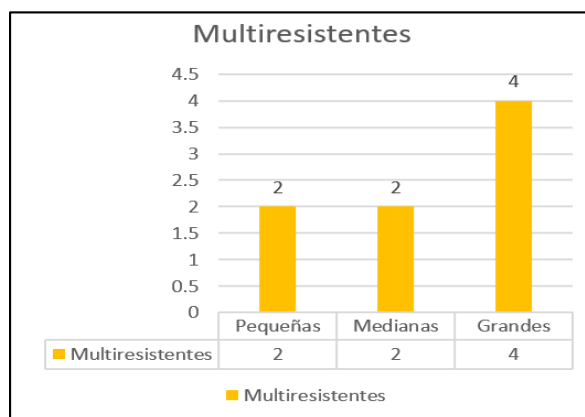
Multiresistencia

Los individuos resistentes a 3 o más antibióticos se denomina multiresistente. Se encontró que los individuos multiresistentes están en propiedades o predios específicos, de los cuales los pequeños por información del propietario se verificó que son animales problema (crónicos) o de descarte adquiridos de un estrato grande, por lo cual presentan resistencia hasta 7 antibióticos.

De los individuos multiresistentes ocho de ocho son resistentes a la penicilina (P) representando un 100%, le sigue bacitracina (B) con un 87.5%, tetraciclina (TE) 75%, clindamicina (CC) 62.5%, cefoxitin (FOX) 50%, eritromicina (E) 37.5%, gentamicina (CN) y linezolid (LNZ) 25% respectivamente, trimetropin/sulfametoxazol (SXT) 12.5%.

Figura 10

Representación de la multiresistencia antimicrobiana de *S. aureus*, (MAR), en los tres estratos lecheros del cantón Mejía

**Tabla 15**

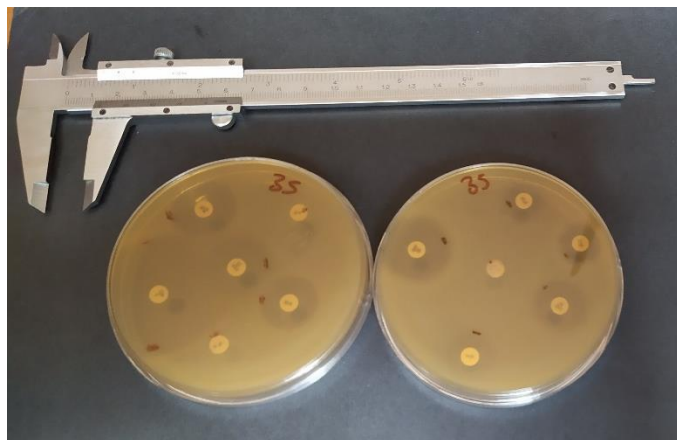
Resistencia múltiple a los antibióticos para *S. aureus* aislamientos de leche de vaca obtenida de los estratos pequeños, medianos y grandes del cantón Mejía (n = 11)

Tipo de estrato	Identificación de la vaca	Edad/años	CC	SXT	LNZ	E	TE	CN	FOX	CIP	P	N	B
Grande	23-G-A	3.5	R		R	R	R				R		R
	35-G-C	8	R				R		R		R		R
	36-G-C	6	R		R		R		R		R		R
	43-G-C	3	R			R					R		R
Mediana	11-M-G	4					R		R		R		
	12-M-G	7					R				R		R
Pequeño	46-P-I	5					R	R			R		R
	47-P-I	6	R	R		R		R	R		R		R

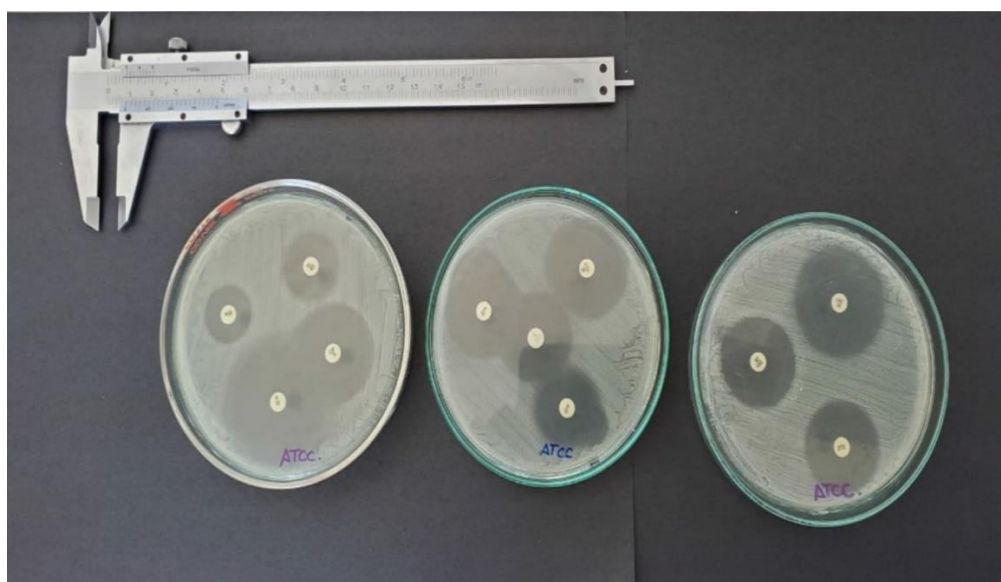
Antibióticos a los cuales *S. aureus* responde a una resistencia múltiple (RAM): CC_clindamicina, SXT_Trimetropin/sulfametoxazol, LNZ_linezolid, E_eritromicina, TE_tetraciclina, CN_gentamicina, FOX_cefoxitin, CIP_ciprofloxacina, P_penicilina, N_neomicina, B_bacitracina.

Figura 11

Antibiogramas donde se observó multiresistencia antimicrobiana de S. aureus

**Figura 12**

Antibiogramas de cepa Staphylococcus aureus ATCC, probada con once antibióticos probados en la investigación



Resultados de los agares utilizados

En este estudio se obtuvieron resultados efectivos en cuanto al aislamiento del patógeno procedente de la muestra recolectada; al inicio se utilizó Manitol salado como medio selectivo, sin embargo, se determinaron múltiples falsos positivos en la fermentación del manitol, así como cambio en el color del manitol, ocasionado por bacilos y no por cocos, motivo por el cual se optó utilizar Baird-Parker; con el cual se obtuvieron resultados favorables y un alto porcentaje de efectividad y selectividad por los cocos Gram positivos. Las colonias de *S. aureus* en este agar específico se caracterizaban por ser redondas de un color negro profundo y brillantes, que se notaban desde la primera siembra que es la dilución de la muestra directa en el agar Figura19. La única dificultad con este medio de cultivo fue encontrar fácilmente el suplemento de telurito y yema de huevo, ya que este medio de cultivo es utilizado comúnmente solo en grandes industrias de alimentos para determinar la presencia de *S. aureus* y es un suplemento costoso. El agar Baird-Parker es utilizado en el análisis microbiológico de alimentos para el consumo humano y animal según la normativa UNE-EN ISO 6888-1:200.

Como método de confirmación para *S. aureus* se utilizó agar cromogénico el cual como lo indica (Zayas, Barreras, & Álvarez, 2013) detecta de manera selectiva las colonias de *Staphylococcus*, las cepas que dieron positivas en agar Baird-Parker fueron sembradas en este medio e incubadas a 37°C por 24 h. las colonias aisladas en el agar cromogénico se tiñeron de color azul intenso, debido al azul de anilina. A las cepas que fueron confirmadas como positivas se les realizó la prueba de coagulasa, (*S. aureus*, es coagulasa positivo) (Sejas, Zurita, Rodríguez, Espinoza, & Sejas, 2016). Las cepas de coagulasa positiva se confirmaron mediante la prueba Bis Plus.

Se utilizó coagulasa liofilizada con EDTA y coagulasa casera obtenida de plasma de conejo, se comparó la eficiencia de estas con una cepa control y se obtuvieron equivalentes; las cepas resultaron coagulasa negativa, se reportaron como negativas a *S. aureus*.

La conservación de las cepas positivas *S. aureus* se realizó mediante el método de congelación. Primero se utilizó agua peptona y una escala McFarlan de 2 a 5, sin embargo, se presentaron problemas en la reactivación de las bacterias, por lo cual se conservó en BHI (Infusión cerebro-corazón), para evitar problemas en la reactivación de las cepas y una mejor conservación y como sustancia crioprotectora se utilizó glicerol. El caldo Brain Heart Infusión (BHI) es recomendado como medio base debido a que este permite el crecimiento de una gran variedad de microorganismos (Naranjo, Ortiz, & Bueno, 2016).

Discusión

Staphylococcus aureus es un patógeno frecuente en las infecciones de la glándula mamaria bovina, que tiene gran relevancia debido a su difícil erradicación según su biotipo, cuando se encuentra como agente causal de mastitis (De Vlieghe et al., 2012).

Como objetivo de este estudio se planteó identificar el perfil de resistencia antimicrobiana de *S. aureus* en tres diferentes estratos lecheros

Tuscherr et al., (2010) asegura que *Staphylococcus aureus*, puede evitar la respuesta inmune e inflamatoria del huésped, y regularía inversamente los factores de virulencia. Esto justifica que el estudio, que algunas muestras negativas a mastitis a la prueba CMT fueron tomadas como control para comparar con las muestras que presentaban mastitis en grado dos y tres que hayan resultado positivas a *S. aureus* en el cultivo en medio Baird Parker y confirmadas con pruebas bioquímicas.

En esta investigación, se incluyó a trece haciendas lecheras que fueron clasificaron según el número de animales en producción, en tres estratos lecheros. De manera similar Acuña & Rivadeneira (2008), realizaron una clasificación en 20 propiedades muestreadas con el fin encontrar múltiples diferencias entre el número y el manejo de los animales, se realizó una categorización por el nivel tecnológico y las buenas prácticas de ordeño, creando un formato con los diferentes factores de las BPA y colocándoles una calificación a cada ítem, para clasificar en cuatro categorías A,B,C y D; donde A representaba un excelente manejo en BPA y D un deficiente. En la clasificación de hatos por nivel tecnológico, donde el 60% de las haciendas de la zona fueron tipo C (manejo regular de BPAs) y solo un 5% de tipo A (excelente manejo de BPAs), lo cual muestra que hubo un numero desigual de hatos por cada categoría y diferentes grados de mastitis por cada propiedad. Determinaron que el grado de infección y la presencia de los patógenos responsables de la mastitis, dentro de estos *S. aureus*, que no tienen relación al tipo de hacienda, pues la infección intramamarias (IIM) es de origen multifactorial, y está presente en todas las haciendas muestreadas.

En el presente estudio al analizar las 125 muestras de leche de vacas con mastitis, de diferentes fincas ubicadas en el cantón Mejía, 41 fueron confirmadas como, positivas a *S. aureus*, se determinó que la prevalencia de mastitis en los tres estratos fue de 32,8%, y por estrato con 66.66%, 21,81% y 32,69%, en estratos pequeños, medianos y grandes, respectivamente. En el año 2008 Acuña y Rivadeneira, realizaron un estudio en la provincia de pichincha incluyendo la zona del cantón Mejía, reportan en su estudio una prevalencia de *S. aureus* del 34,64%, con un total de 141 animales muestreados con mastitis y 49 muestras positivas a *S. aureus*, resultado similar al encontrado en nuestro estudio. En Tolima, Colombia, Sánchez et al., (2018), muestrearon 12 propiedades, donde determinaron la prevalencia de 193

cuartos mamarios con IIM de vacas Normando, de los cuales 60 cuartos fueron positivos a *S. aureus* que representa una tasa del (31,1%). En Guaranda, se estimó una tasa del 26,9% de prevalencia del patógeno, del muestreo de 58 vacas en producción, de cuatro diferentes propiedades Andrade, (2018). Sin embargo, en Santa Fe, Argentina se reportó una prevalencia mayor que la encontrada en este estudio, con un *S. aureus*, resultante de 129 muestras procesadas y caracterizándose como el patógeno predominante en las IIM estudiada en esta zona (Neder, 2015); En Riobamba, Ecuador reportaron, una frecuencia elevada del (83,3%), resultado de un total de 18 muestras de 6 lugares diferentes, dando como positivas a coagulasa 15 de ellas (Landi et al., 2018), mostrándose como la prevalencia más alta, en comparación con los trabajos vistos.

Los resultados de la prevalencia de *S. aureus*, son muy variados no solo dependiendo de una zona o de diferentes países, en los resultados del presente trabajo en un mismo cantón en puntos diversos de las siete parroquias del cantón Mejía, se distinguió una prevalencia según el tipo de estrato lechero y dentro de cada estrato se observó variaciones en la implementación de las buenas prácticas agrícolas (BPA), donde intervienen la sanidad animal, higiene en el ordeño, bienestar animal y medio ambiente; la FAO (2011) y Agrocalidad (2012), mencionan en sus manuales de BPAs, por este motivo se puede explicar la gran diferencia en la prevalencia entre los estratos lecheros.

A nivel mundial se reportan que las infecciones intramamarias más comunes son causadas por *S. aureus*, este patógeno es muy contagioso y está vinculado con el manejo del proceso de ordeño, clima, altura y sensibilidad antimicrobiana (Espinoza et al., 2013). La alta prevalencia de *S. aureus* es una clara consecuencia de la una mala utilización de tratamientos antibióticos y fallas en el manejo provocando la contaminación del área de ordeño (Morales et al., 2017). Según

Massawe et al., (2019), la negligencia de las haciendas en la higiene de la leche, desde el uso de insumos necesarios para limpiar el área del ordeño, la ubre y hasta la limpieza y desinfección del equipo mecánico de ordeño y los recipientes de almacenamiento, son las principales causas de la infección.

Andrade & Sánchez (2018) aplicaron una encuesta identificando los puntos críticos de BPA de las cuatro propiedades de su estudio; los lugares de estudio, concuerdan con no cumplir con personal capacitado, agua potable, secado, despunte, sellado; la diferencia de la prevalencia de mastitis por animal, que determinaron ser de origen contagioso con presencia de *Staphylococcus* spp. y *Streptococcus* spp, se presentó en Producoop con 43,1%, propiedad que no contaba con instalaciones (ordeño al aire libre), la única que no cumplía con el lavado de ubre ni cuidado en general de la higiene mamaria de las vacas; por lo contrario, Garza Pamba 13,8%, con la tasa más baja de prevalencia de mastitis; esta propiedad la única del estudio que contaba con un establo para el ordeño y un manejo relativamente mejor de BPAs, marcando como diferencia frente a la propiedad anterior, el lavado de la ubre antes del ordeño.

Sin embargo, en la mayor parte de los estudios realizados no se hizo una clasificación de este tipo, ni categorización por número de animales o por el tipo de manejo. La clasificación realizada en este estudio fue en base a la población bovina de las 13 fincas que aceptaron participar.

En general respecto a los datos de los tres estratos lecheros, se pudo determinar que *Staphylococcus aureus*, en el cantón Mejía, provincia de Pichincha, Ecuador en el periodo Mayo - septiembre del 2019, presentó su más alta resistencia antimicrobiana a la penicilina (P) 39,02%, seguido de la tetraciclina (TE) 21,95%, y un 17,07% de resistencia a la clindamicina (CC),

gentamicina (CN) Y bacitracina (B), la eritromicina (E) con 12,20 %; los cinco restantes antibióticos tienen una resistencia bajo el 10% excepto ciprofloxacina (CIP) que represento una resistencia nula y solo 2,44% de resistencia intermedia.

Los resultados del perfil de resistencia de *S. aureus*, aislado de leche bovina de diferentes lugares de Colombia, coincidió que su tasa de resistencia elevada a la penicilina con respecto a los otros antibióticos utilizados con un 23,1%, seguido por tetraciclina 18,5%, que se asimilan al orden del perfil de resistencia al *S. aureus*, aislado en este estudio. En Guaranda, Ecuador se reportó a *S. aureus*, con una resistencia alta a la penicilina (Andrade et al., 2018); en otros estudios la penicilina presenta una resistencia mucho más elevada del 74%, seguido de eritromicina 47%, y una tasa del 21% a trimetoprim/sulfa y tetraciclina (Sánchez et al., 2018) en la región de Anaime, región lechera en Colombia, resultados similares se presentaron en Lurín, Perú aquí encontraron una tasa del 65,62% frente a la penicilina, tetraciclina 34,37% y cefalexina 37,50% como tasas significativas de resistencia (Morales et al., 2017).

La resistencia a la penicilina es alta en todos los estudios comparados en a la región y en países representativos lecheros. la mayoría de estudios siguen un patrón de orden de la resistencia de penicilina en primer lugar, seguido de tetraciclina como los antibióticos a los cuales *S. aureus* es resistente, en la zona de Sudamérica países vecinos a Ecuador.

La eficiencia de agares específicos o no específicos para aislar *S. aureus*, es variada, dependen del protocolo a utilizarse y de cómo el investigador convenga, ya que en varios estudios aseguran una alta eficiencia de Manitol salado (Acuña et al., 2008; Massawe et al., 2019), Agar base *S. aureus* (Andrade, 2018) que son agares específicos para aislar esta bacteria; mientras que

otros estudios simplemente aislaban con agar sangre entre otros más tradicionales, no específicos como (Sánchez et al., 2018; Bonifaz, 2016; Morales, 2017).

En el presente estudio se descartó el uso de Manitol Salado, por dar falsos positivos, se encontraban bacilos en las áreas de fermentación del manitol, por lo que se tomó la decisión de implementar Baird Parker, que mostro gran eficiencia para aislar específicamente solo a *S. aureus* y alta especificidad, por su suplemento de telurito y yema de huevo que daban la caracterización de colonias negras redondas y brillantes. Finalmente, para confirmación se utilizaba el agar cromogénico *S. aureus* con 100% de especificidad; cave recalcar que la implementación de estos agares de aislamiento excelente a esta bacteria son costosos y Baird Parker necesita de un suplemento de venta no muy común; así mismo varios estudios que implementaron a Baird Parker afirmando su especificidad y eficiencia como (Neder et al., 2015; Landi et al., 2018; Jiménez et al., 2020).

Capítulo V

Conclusiones y Recomendaciones

Conclusiones

En base a los resultados obtenidos en la presente investigación se concluye que:

El análisis de la susceptibilidad *in vitro* de las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de infecciones intramamarias, mediante el método de Kirby Bauer (difusión en disco), se identificó la resistencia antimicrobiana más alta con (39.02%) a penicilina, (21.95%) tetraciclina y en igual proporción del (17.07%) a clindamicina, bacitracina y gentamicina, y una resistencia baja de (4.88%) a linezolid y nula en el caso del (0%) a ciprofloxacina, en los tres estratos lecheros.

El porcentaje de resistencia de *Staphylococcus aureus*, varía en cada estrato lechero analizado en todos los antibióticos empleados en este estudio por ejemplo el caso de la penicilina en los estratos: grande (52.94%), mediano (33.33%), pequeño (25%), y diferentes variaciones por cada antibiótico.

Los antibióticos como bacitracina y neomicina, ingredientes activos de antimastiticos comerciales, en la actualidad el CLSI (Instituto de estándares para el laboratorio clínico) no reporta como antibióticos de uso para el control de infecciones intramamarias, pero son de uso común por los productores.

La presencia de *S. aureus* y otros agentes causales de mastitis, así como su grado de infección, dependen múltiples factores, por lo que al separar resultados de las muestras tomadas por estratos o por nivel tecnológico y de capacitación del personal, no determinan un patrón específico para saber qué factor es el causante de la presencia de la infección.

En este trabajo se aisló exitosamente *Staphylococcus aureus* de vacas afectadas con mastitis subclínica de tres estratos lecheros del cantón Mejía mediante el uso del agar específico Baird Parker, ya que presenta mayor eficiencia, frente a manitol y agar base *S. aureus* y cumple con la norma NTE. INEN 1528-2012.

La prueba bioquímica de confirmación permitió asegurar la presencia de la bacteria y conservarla sin contaminación de otros patógenos presentes en el aislamiento de la muestra, seguido de esto se reforzó la confirmación con el kit bioquímico Bis Plus que identificaba género y especie de las bacterias y así se confirmó de manera confiable los Biales de *S. aureus*, y proceder a realizar los antibiogramas.

Para reactivar y conservar biales de *S. aureus*, se implementó BHI (caldo cerebro, corazón), como medio de cultivo efectivo, para una mayor preservación de la bacteria; ya que en este trabajo los biales conservados con agua peptonada, mostraron dificultad para la reactivación y viabilidad de conservación.

Recomendaciones

Para un control efectivo de la mastitis, es importante identificar mediante el análisis de laboratorio, los agentes causantes de la mastitis.

Se recomienda utilizar agares eficientes como en este estudio lo fue Baird Parker y kits de identificación a nivel de género y especie, para identificar con una certeza del 100%, la presencia de la bacteria.

Se recomienda a los profesionales que asesoran las ganaderías, realizar análisis de laboratorio para determinar el patógeno específico causante de la mastitis en el hato y realizar un antibiograma, para evitar crear resistencia antibiótica en los animales que presentan problemas.

Se recomienda seguir con estudios de este tipo para evaluar la situación sanitaria de los sectores lecheros representativos del país.

Se recomienda a los profesionales de la salud animal, y a los organismos que intervienen en el bienestar animal, a las empresas que se abastecen de leche fresca a capacitar a los productores en el manejo de buenas prácticas de ordeño, la importancia de la sanidad del lugar de ordeño, la limpieza de la ubre, y el bienestar animal, para mejorar la salud y producción de los animales y así evitar pérdidas económicas y cuidar hasta de la salud de las personas involucradas en la cadena productiva.

Bibliografía

- Acuña, L., & Rivadeneira, A. (2008). *Aislamiento, identificación y Antibiograma de patógenos presentes en leche con mastitis en ganaderías bovinas de la provincia de pichincha*. 175. Retrieved from <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/2553/1/T-ESPE-IASA I-003435.pdf>
- Agrocalidad. (2012). *Guía de buenas prácticas pecuarias de producción de leche resolución técnica N° 0217* (p. 50). p. 50. Retrieved from <http://web.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/Manuales-de-aplicabilidad-de-BPP-de-ganadería-de-leche.pdf>
- Alvarado, M. (2012). Determinación de mastitis en hatos lecheros del cantón Daule, mediate los reactivos: sulfato de trietanolamina y purpura de bromocresol (C.M.T). *Universidad De Guayaquil Facultad De Medicina Veterinaria Y Zootecnia Tesis*, 1–81. Retrieved from [file:///C:/Users/PC/Downloads/Alvarado Bajaña Mariuxi Consuelo216 \(2\).pdf](file:///C:/Users/PC/Downloads/Alvarado%20Bajaña%20Mariuxi%20Consuelo216%20(2).pdf)
- Ana María Manjarrez López, Soledad Díaz Zarco, F. S. G. (2012). Staphylococcus aureus biotypes in cows presenting subclinical mastitis from family dairy herds in the Central-Eastern State of Mexico. *Revista Mexico Ciencia Pecuarias*, 3(2), 265–274. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmcp/v3n2/v3n2a8.pdf>
- Anderson, K. L., Lyman, R. L., Bodeis-Jones, S. M., & White, D. G. (2006). Genetic diversity and antimicrobial susceptibility profiles among mastitis-causing *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk samples. *American Journal of Veterinary Research*, 67(7), 1185–1191. <https://doi.org/10.2460/ajvr.67.7.1185>
- 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. Pichincha, Ecuador*.
- Aslantas, O., & Cemil, D. (2016). Investigación de la resistencia a los antibióticos y la capacidad de formación de biopelículas de *Staphylococcus aureus* en casos de mastitis subclínica bovina. *Ciencia Lechera- Journal of Dairy Science*, 99(11), 8607–8613. <https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2016-11310>
- Barkema, H. W., Schukken, Y. H., & Zadoks, R. N. (2010). Invited Review: The Role of Cow, Pathogen, and Treatment Regimen in the Therapeutic Success of Bovine *Staphylococcus aureus* Mastitis. *Journal of Dairy Science*. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(06\)72256-1](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(06)72256-1)
- Barker, A. R., Schrick, F. N., Lewis, M. J., Dowlan, H. H., & Oliver, S. P. (1998). Influence of Clinical Mastitis During Early Lactation on Reproductive Performance of Jersey Cows. *Journal of Dairy Science*, 81(5), 1285–1290. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75690-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75690-5)
- Bedolla, C. (2007). Métodos de detección de mastitis bovina. *REDVET. Revista Electronica Veterinaria*, 8(9). <https://doi.org/ISSN 1695-7504>
- Blood, C., Radostist, O., Arundel, J., & Gay, C. (2002). patologías en la Ubre. In E. M. H. Interamericana. (Ed.), *Medicina Veterinaria* (7ma ed.).

- Bolaños, F., Fernando, O., Graffe, T., Eduardo, J., Cabrera, P., Jaiver, J., ... Tatiana, Y. (2012). Mastitis bovina: generalidades y métodos de diagnóstico. In *Revista Veterinaria REDVET* (Vol. 13). Retrieved from www.produccion-animal.com.ar
- Bonetto, A. , & Celestino, C. (2014). *Mastitis bovina causada por Staphylococcus coagulasa negativos*. Retrieved from http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/40427/Documento_completo.pdf?sequence=1
- Bonifaz, N., & Conlago, F. (n.d.). Prevalencia e incidencia de mastitis bovina mediante la prueba de california mastitis test con identificación del agente etiológico, en paquiestancia, ecuador prevalence and incidence of bovine mastitis by etiologic agent identification in california mastitis test at paquiestancia, Ecuador. *Universidad politécnica salesiana artículo científico / scientific paper* <https://doi.org/10.17163/lgr.n24.2016.04>
- Camussone, C. M., & Calvino, L. F. (2013a). Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* asociados con infecciones mamarias en bovinos: relevancia y rol como agentes inmunógenos. *Revista Argentina de Microbiología*, 45(2), 119–130. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(13\)70011-7](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(13)70011-7)
- Camussone, C. M., & Calvino, L. F. (2013b). Virulence factors of *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infections in cows: Relevance and role as immunogens. *Revista Argentina de Microbiología*, 45(2), 119–130. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(13\)70011-7](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(13)70011-7)
- Camussone, C., Rejf, P., Pujato, N., Schwab, A., Marcipar, I., & Calvino, L. F. (2012). Genotypic and phenotypic detection of capsular polysaccharides in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections in Argentina. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(3), 1010–1014. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000300023>
- CLSI. (2019). *M100 Performance Standards for Antimicrobial* (29th ed.). <https://doi.org/ISBN978-1-68440-032-4> - Ord-377115-
- Conlago, F. (2013). *Prevalencia e incidencia de la mastitis bovina mediante la prueba de CMT con identificación de agentes etiológicos, Cayambe - Ecuador*. UPS - Ecuador.
- DATABIO. (2012). Instituto nacional de seguridad e higiene en el trabajo. Retrieved from [http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas de agentes biologicos/Fichas/Bacterias/Staphylococcus aureus.pdf](http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas%20de%20agentes%20biologicos/Fichas/Bacterias/Staphylococcus%20aureus.pdf)
- De Vlieghe, S., Fox, L. K., Piepers, S., McDougall, S., & Barkema, H. W. (2012, March 1). Invited review: Mastitis in dairy heifers: Nature of the disease, potential impact, prevention, and control. *Journal of Dairy Science*, Vol. 95, pp. 1025–1040. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-4074>
- Del Pilar Sánchez Bonilla, M., Murillo, N. P. G., & Almanza, I. J. P. (2018a). Prevalence of bovine mastitis in the anaima canyon, a colombian dairy region, including etiology and antimicrobial resistance. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 29(1), 226–239. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i1.14084>

- Del Pilar Sánchez Bonilla, M., Murillo, N. P. G., & Almanza, I. J. P. (2018b). Prevalence of bovine mastitis in the anaima canyon, a colombian dairy region, including etiology and antimicrobial resistance. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 29(1), 226–239. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i1.14084>
- Duarte, C. M., Freitas, P. P., & Bexiga, R. (2015). Technological advances in bovine mastitis diagnosis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 27(6), 665–672. <https://doi.org/10.1177/1040638715603087>
- El-Jakee, J. K., Aref, N. E., Gomaa, A., El-Hariri, M. D., Galal, H. M., Omar, S. A., & Samir, A. (2013). Emerging of coagulase negative staphylococci as a cause of mastitis in dairy animals: An environmental hazard. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 1(2), 74–78. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2013.05.006>
- Espinoza Salazar, M. G., & Mier Jiménez, J. P. (2016). Universidad central del ecuador facultad de medicina veterinaria y zootecnia carrera de medicina veterinaria y zootecnia determinación de la prevalencia de mastitis mediante la prueba california mastitis test e identificación. *LA GRANJA:Revista de Ciencias de La Vida*, 24(2), 43–52. Retrieved from <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/1281>
- FAO. (2011). Buenas prácticas de ordeño. *Buenas Practicas de Ordeño*, Vol. 1, p. 20. Retrieved from <http://www.fao.org/3/a-bo952s.pdf>
- Fernandez, A., Garcia, C., Saez, J., & Valdezate, S. (2010). Metodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Procedimientos En Microbiologia Clinica*, 1–52. <https://doi.org/CEP: 14884-900>
- Fernández Bolaños, O. F., Trujillo Graffe, J. E., Peña Cabrera, J. J., Cerquera Gallego, J., & Granja Salcedo, Y. T. (2012). Mastitis bovina: Generalidades y métodos de diagnostico. *Revista Veterinaria REVET*, 13(11), 1–11. Retrieved from http://www.produccionanimal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_leche/78-mastitis.pdf
- Galeano Prada, D. M. (2017). Aislamiento e identificación de *Staphylococcus aureus* en muestras de leche cruda procedente de diferentes predios del departamento de Risaralda. 19. Retrieved from [http://repositorio.unilibrepereira.edu.co:8080/pereira/bitstream/handle/123456789/832/Aislamiento e identificación](http://repositorio.unilibrepereira.edu.co:8080/pereira/bitstream/handle/123456789/832/Aislamiento_e_identificación).
- Gentilini, E., Denamiel, G., Llorente, P., Godaly, S., Rebuelto, M., & DeGregorio, O. (2000). Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitis in Argentina. *Journal of Dairy Science*, 83(6), 1224–1227. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)74988-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)74988-5)
- Giannechini, R., Concha, C., Delucci, I., Gil, J., Salvarrey, L., & Rivero, R. (2014). Bovine mastitis, distribution of pathogens and antimicrobial resistance in the Southern Dairy Basin of Uruguay. / Mastitis bovina, reconocimiento de los patógenos y su resistencia antimicrobiana en la Cuenca Lechera del Sur de Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, 50(196), 4–32. Retrieved from <http://ezproxy.lib.ucalgary.ca/Ahttp://www.revi>

- González, R., Cervantes, E., & Salazar, P. (2014). Características generales de *Staphylococcus aureus*. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 1(64), 28–40. <https://doi.org/04510>
- Gröhn, Y. T., Wilson, D. J., González, R. N., Hertl, J. A., Schulte, H., Bennett, G., & Schukken, Y. H. (2004). Effect of Pathogen-Specific Clinical Mastitis on Milk Yield in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 87(10), 3358–3374. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73472-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73472-4)
- Hoque, M. N., Das, Z. C., Rahman, A. N. M. A., Haider, M. G., & Islam, M. A. (2018a). Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* strains in bovine mastitis milk in Bangladesh. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 6(1), 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2018.03.008>
- Hoque, M. N., Das, Z. C., Rahman, A. N. M. A., Haider, M. G., & Islam, M. A. (2018b). Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* strains in bovine mastitis milk in Bangladesh. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 6(1), 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2018.03.008>
- Hoque, M. N., Das, Z. C., Rahman, A. N. M. A., Haider, M. G., & Islam, M. A. (2018c). Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* strains in bovine mastitis milk in Bangladesh. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 6(1), 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2018.03.008>
- Hosseinzadeh, S., & Dastmalchi Saei, H. (2014). Staphylococcal species associated with bovine mastitis in the North West of Iran: Emerging of coagulase-negative staphylococci. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 2(1), 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2014.02.001>
- Hurtado, M. P; de la Parte, M. A. y Brito, A. (2002). *Staphylococcus aureus*: Revisión de los mecanismos de patogenicidad y la fisiopatología de la infección estafilocócica. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 22(2), 112-118. <https://doi.org/ISSN 1315-2556>
- Jiménez Velásquez, S. del C., Torres Higuera, L. D., Parra Arango, J. L., Rodríguez Bautista, J. L., García Castro, F. E., & Patiño Burbano, R. E. (2020). Profile of antimicrobial resistance in isolates of *Staphylococcus* spp. obtained from bovine milk in Colombia. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(2), 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.05.004>
- Kleinschroth, E., Rabold, K., & Deneke, J. (1991). *La mastitis*. Barcelona: (Bilbao; Ediciones medicas, Ed.)_ISBN: 8487308007
- Kruze, J. (2008). La rutina de ordeño y su rol en los programas de control de mastitis bovina. *Archivos de Medicina Veterinaria*. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X1998000200001>
- Landi, A. A., Arrieta, S. E., Iñiguez, L. G., Leal, F. A., Pilamunga, P. Y., & Hernández, P. A. (2018). Resistencia antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* aislado en quesos frescos artesanales elaborados en zonas rurales del Ecuador Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus aureus* Isolated In Fresh Handmade Cheeses Made In Rural Zones of Ecuador. *Perfiles Revista Científica*, 2(20), 76–81. Retrieved from <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/17301>

- Massawe, H. F., Mdegela, R. H., & Kurwijila, L. R. (2019). Antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolates from milk produced by smallholder dairy farmers in Mbeya Region, Tanzania. *International Journal of One Health Available at Wwww.Onehealthjournal.Org*, 5. <https://doi.org/10.14202/IJOH.2019.31-37>
- Morales C., S., & Villanueva T., G. (2017). Resistencia antibiótica de patógenos bacterianos aislados de mastitis clínica en bovinos de crianza intensiva - Antibiotic resistance of bacterial pathogens isolated from clinical mastitis in intensive bovine breeding). *REDVET - Revista Electrónica de Veterinaria* -, 18(12), 1–12. Retrieved from <https://www.redalyc.org/pdf/636/63654640046.pdf>
- Morales, H. (2011). Patogenia de la mastitis bovina. In *Mastitis bovina : Enfoque biotecnológico* (11th ed., p. 225). <https://doi.org/ISSN 2027-6850>
- Nancy Bonifaz1, * y Fabián Conlago2. (2016). Prevalence and incidence of bovine mastitis by etiologic agent identification in california mastitis test at paquiestancia, ecuador. *LA GRANJA:Revista de Ciencias de La Vida*, 24(2), 43–52. Retrieved from <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/9834>
- Navarro, C. (2011). Mastitis bovina causada por ECN. Retrieved from <https://www.portalveterinaria.com/articoli/articulos/6414/mastitis-bovina-causada-por-ecn.html>
- Neder, V. E., Signorini, M. L., Cuatrin, A., Gianre, V., & Calvino, L. F. (2015). Prevalencia de bacterias patógenas de mastitis bovina en leche de tanque de frío y evaluación de medios de cultivo para el recuento y la identificación de *Staphylococcus aureus*. *FAVE Sección Ciencias Veterinarias*, 13(1/2), 20–27. <https://doi.org/10.14409/favecv.v13i1/2.4972>
- NMC, National Mastitis Council. (2012). *Procedimiento para la toma de muestras de leche de un cuarto individual*. pp 14-15.
- Pedersen, L. H., Aalbæk, B., Røntved, C. M., Ingvarsen, K. L., Sorensen, N. S., Heegaard, P. M. H., & Jensen, H. E. (2003). *Early Pathogenesis and Inflammatory Response in Experimental Bovine Mastitis Due to Streptococcus uberis*. *Journal of Comparative Pathology*, 128(2–3), 156–164. <https://doi.org/10.1053/jcpa.2002.0620>
- Pellegrino, Odierno, Lm, Bogni, & Ci. (2011). Mastitis Bovina: Resistencia a antibióticos de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de leche (Bovine Mastitis: Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* strains isolated from milk). Retrieved from <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet2011Volumen12Nº7-> <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n070711.html>
- Philpot, W., & Nickerson, S. (2002). Venciendo a Luta contra a mastite. *Wesfalia Surge Inc.*
- Ruiz-Romero, R., Cervantes-Olivares, R., Martínez-Gómez, D., Ducoing-Watty, A., & Hernández-Andrade, L. (2013). Desarrollo de una PCR múltiple para la identificación de *Staphylococcus* spp. como causa de mastitis caprina. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 45(3), 327–331. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2013000300015>
- Russi, M. V. N. (2008). *Susceptibilidad a Antibioticos De Staphylococcus Aureus*. Retrieved from

<http://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8080/tesis/bitstream/handle/11185/259/tesis.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- SAE. (2018). *Calidad e inocuidad de la leche cruda. Pichincha-Ecuador.*
- Saenz Lopez, K., & Tamez González, G. (2014). *Métodos y técnicas cualitativas y cuantitativas aplicables a la investigación en ciencias sociales.* Tirant Humanidades México.
- San Martin, B., Kruze, J., Morales, A., Agüero, H., Leon, B., Espinoza, S., ... C. (2002). Resistencia bacteriana en cepas patógenas aisladas de mastitis en vacas lecheras. *Archivos de Medicina Veterinaria*. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2002000200008>
- Santambrosio, E., Ortega, M., & Garibaldi, P. (2009). *Catedra de Biotecnología, Trabajo práctico nº3 "Siembra y recuento de microorganismos."* 1, 1–9.
- Schreiner, D. A., & Ruegg, P. L. (2003). Relationship Between Udder and Leg Hygiene Scores and Subclinical Mastitis. *Journal of Dairy Science*, *86*(11), 3460–3465. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73950-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73950-2)
- Schrick, F. N., Hockett, M. E., Saxton, A. M., Lewis, M. J., Dowlen, H. H., & Oliver, S. P. (2001). Influence of Subclinical Mastitis During Early Lactation on Reproductive Parameters. *Journal of Dairy Science*, *84*(6), 1407–1412. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)70172-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)70172-5)
- Seija, V. (2002). *COCOS GRAM POSITIVOS: Aspectos prácticos.*
- Smith, K. L., Todhunter, D. A., & Schoenberger, P. S. (2005). Environmental Mastitis: Cause, Prevalence, Prevention. *Journal of Dairy Science*, *68*(6), 1531–1553. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(85\)80993-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(85)80993-0)
- Taponen, S., & Pyörälä, S. (2009). Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis—Not so different from *Staphylococcus aureus*? *Veterinary Microbiology*, *134*(1–2), 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.011>
- Taroco, R., Seija, V., & Vignoli, R. (2006). *TEMAS DE BACTERIOLOGÍA Y VIROLOGÍA MÉDICA Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica.*
- Tuscherr, L., Lffler, B., Buzzola, F. R., & Sordelli, D. O. (2010, December). *Staphylococcus aureus* adaptation to the host and persistence: Role of loss of capsular polysaccharide expression. *Future Microbiology*, *5*(12), 1823–1832. <https://doi.org/10.2217/fmb.10.147>