



Identificación molecular de agentes causales de mastitis en ganado bovino de las islas Santa Cruz e

Isabela, provincia de Galápagos.

Mejía Ortega, Claudia Tamara

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

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

Ron Román, Jorge Washington Ph.D.

27 agosto de 2021






Document Information

Analyzed document	TESIS_C_MEJIA_VF.docx (D111763902)
Submitted	8/27/2021 10:31:00 PM
Submitted by	
Submitter email	biblioteca@espe.edu.ec
Similarity	3%
Analysis address	ilbbioteca.GDC@analysis.arkund.com



El medio electrónico pertenece a:
JORGE
WASHINGTON RON
ROMAN

Sources included in the report

W	URL: http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/21251/1/T-ESPE-039868.pdf Fetched: 8/6/2021 11:27:45 PM	 16
W	URL: http://www.scielo.org.co/pdf/rccp/v21n4/v21n4a06.pdf Fetched: 8/28/2021 1:53:00 AM	 4
W	URL: https://xdoc.mx/documents/guia-de-trabajos-practicos-5e6fe06d795d3 Fetched: 7/30/2021 11:42:26 PM	 2



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

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, **“Identificación molecular de agentes causales de mastitis en ganado bovino de las islas Santa Cruz e Isabela, provincia de Galápagos”** fue realizado por la señorita **Mejía Ortega, Claudia Tamara** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 13 de agosto del 2021



.....
Jorge Washington Ron Román Ph.D.

C.C. 1709505125



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, **Mejía Ortega, Claudia Tamara**, con cédula de ciudadanía n° 1723242671, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Identificación molecular de agentes causales de mastitis en ganado bovino de las islas Santa Cruz e Isabela, provincia de Galápagos”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 10 de agosto del 2021

Mejía Ortega, Claudia Tamara

C.C.: 1723242671



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

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo **Mejía Ortega, Claudia Tamara**, con cédula de ciudadanía n° 1723242671, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **"Identificación molecular de agentes causales de mastitis en ganado bovino de las islas Santa Cruz e Isabela, provincia de Galápagos"** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 10 de agosto del 2021

Mejía Ortega, Claudia Tamara

C.C.: 1723242671

Dedicatoria

A mis padres Segundo David y Martha por su amor, su constancia y lucha por darnos lo mejor, a mis hermanos y sobrinos que llegaron he hicieron completa nuestra familia, a mi compañero de vida y a mí.

Claudia Tamara Mejía Ortega

Agradecimientos

A mi papá Segundo David Mejía, el mejor padre y hombre del mundo. Él se merece el mayor reconocimiento, ha luchado toda su vida por darnos lo mejor, nos ha dado siempre su amor y se ha entregado a su familia con la vida. Se lo debo todo a él, mi mayor ejemplo a seguir.

A mi mamá Martha Ortega, por darme la vida, su amor, la paciencia y entrega que da a sus hijos, es mi compañera en todo momento.

Gracias a Dios porque tengo a mis viejitos a mi lado y a toda mi familia.

A mi segunda familia, Pame y Juan, mis mejores amigos.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, este segundo hogar y a la Universidad de Liège por brindar ese apoyo para generar investigación y ciencia en el país.

A profesores y tutores, Dr. Ron, Almita, amigos que conocí en el laboratorio de Biotecnología Animal durante mi formación y a la Ing. Cristina Cholota, una persona valiosa que sin duda fue la guía para muchos y le agradezco de corazón por su apoyo en el laboratorio y su amistad.

A Rommel, Kari, Jaime y Carlos del ABG, excelentes personas que nos apoyaron en todo momento.

A todos los que se cruzaron en mi vida, los que están y los que se fueron, los que se quedaron y seguirán ahí para vernos crecer.

Agradezco caídas, noches de desveladas, errores y malos momentos, todo lo que he pasado me ha hecho mejor.

Me agradezco a mí, por mi esfuerzo y porque me enseñé a tener la ñata en alto.

¡GRACIAS!

Claudia Tamara

Tabla de contenido

<i>Certificación</i> _____	3
<i>Responsabilidad</i> _____	4
<i>Autorización</i> _____	5
<i>Dedicatoria</i> _____	6
<i>Agradecimientos</i> _____	7
<i>Tabla de contenido</i> _____	8
<i>Índice de tablas</i> _____	11
<i>Índice de figuras</i> _____	12
<i>Listado de abreviaturas</i> _____	13
<i>Resumen</i> _____	14
<i>Abstract</i> _____	15
<i>Capítulo 1: Introducción</i> _____	16
Formulación del Problema _____	16
Justificación del problema _____	18
Objetivos de investigación _____	19
Objetivo general _____	19
Objetivos específicos _____	20
Marco Teórico _____	20
La Industria Lechera _____	20
Mastitis _____	21
Etiología de Mastitis Bacteriana _____	24
Agentes Causales y Prevalencia de Mastitis en el Ecuador _____	25
Identificación de Agentes Causales de Mastitis _____	27

Gen ARNr 16s bacteriano _____	34
Tipos de PCR para diagnóstico De mastitis _____	36
Secuenciación _____	37
Ensamblaje y alineamiento de secuencias _____	41
Árboles evolutivos _____	42
Hipótesis _____	43
Capítulo 2: Materiales y métodos _____	43
Obtención de cepas aisladas _____	43
Crecimiento masivo de cepas bacterianas _____	43
Extracción de ADN _____	44
Lisis celular _____	45
Precipitación de proteínas _____	45
Precipitación y Rehidratación de ADN _____	45
Cuantificación e integridad de ADN _____	46
Amplificación del gen ARNr 16s por PCR _____	46
Análisis por electroforesis _____	48
Secuenciación y análisis bioinformático _____	48
Capítulo 3: Resultados _____	49
Extracción de ADN bacteriano _____	49
Amplificación del gen ARNr 16S bacteriano por PCR utilizando Taq Hot Start _____	50
Alineamiento de secuencias _____	50
Árbol utilizando el método de máxima verosimilitud _____	51
Agentes causales de mastitis en las islas Galápagos _____	53
Capítulo 4: Discusión _____	55

Capítulo 5: Conclusiones	60
Capítulo 6: Recomendaciones	61
Capítulo 7: Bibliografía	62
Capítulo 8: Anexos	73

Índice de tablas

Tabla 1 <i>Microrganismos identificados como agentes causales de mastitis en el Ecuador</i> _____	26
Tabla 2 <i>Compuestos utilizados en el proceso de Secuenciación Química</i> _____	38
Tabla 3 <i>Composición de Medio de cultivo LB para inóculos de bacterias</i> _____	44
Tabla 4 <i>Reactivos para extracción con kit Wizard® Genomic DNA Purification Promega</i> _____	44
Tabla 5 <i>Primers generales para gen ARNr 16S de bacterias</i> _____	47
Tabla 6 <i>Máster Mix de PCR para el gen ARNr 16s bacteriano</i> _____	47

Índice de figuras

Figura 1 Ciclos de Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR) _____	33
Figura 2 Gen de ARNr 16S del Ribosoma Procariota _____	35
Figura 3 Procesos de secuenciación química y enzimática _____	39
Figura 4 Sistema Automático de marcaje fluorescente para secuenciación _____	41
Figura 5 Electroforesis de Integridad de ADN con kit Wizard de Promega _____	49
Figura 6 Amplificación por PCR del gen ARNr 16S del ADN obtenido de aislados de muestras de leche de ganado bovino de las islas Galápagos. _____	50
Figura 7 Árbol consenso obtenido por análisis de máxima verosimilitud _____	52
Figura 8 Representación de los microorganismos identificados como agentes causales de mastitis en las islas Galápagos _____	53
Figura 9 Distribución de agentes causales de mastitis distribuidos en las islas Santa Cruz, Isabela y Floreana. _____	54

Listado de abreviaturas

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
SCN	Staphylococcus coagulase negatives
CMT	California Mastitis Test
mS/mL	milisiemens sobre mililitro
CM	mastitis clínica
SCM	mastitis subclínica
CE	conductividad eléctrica
ML	Máxima verosimilitud (siglas en inglés)
SVC	Variantes de colonias pequeñas
ddNTPs	didesoxinucleótidos
dNTPs	desoxinucleótidos

Resumen

La industria lechera en el Ecuador se encuentra afectada por la mastitis, una enfermedad bacteriana capaz de generar cambios en el estado del animal, de sus productos y subproductos. Las islas Galápagos cuentan con hatos lecheros que han sido reportados con esta infección, la identificación de microorganismos por métodos tradicionales presenta limitaciones al ser menos sensible y específica, es por eso, que el objetivo del presente estudio fue utilizar herramientas moleculares para la identificación de los agentes causales de mastitis. Se utilizó el análisis mediante PCR del gen ARNr 16S para caracterizar 56 cepas aisladas de leche de ganado bovino positivo para mastitis subclínica de las islas Santa Cruz, Isabela y Floreana. Se identificó al *Staphylococcus aureus* como el mayor agente causal de mastitis con 21%, seguido de *Staphylococcus haemolyticus* y *Staphylococcus chromogenes* (14%), los aislados de *Bacillus licheniformis* y *Staphylococcus agnetis* (5%), *Lactococcus garvieae*, *Micrococcus luteus*, *Enterobacter cloacae*, *Macrococcus caseolyticus*, *Enterobacter tabaci*, *Bacillus megaterium* y *Pseudomonas putida* (4%) cada uno. En el resto de aislados se identificó a *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Macrococcus bohemicus*, *Arthrobacter sp*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Cellulomonas flavigena*, el estafilococo coagulasa negativo *Staphylococcus equorum* y *Rothia terrae* representados en menor número (2%). La identificación molecular permitió establecer a *Staphylococcus spp.* y *Bacillus spp.* como principales causantes de mastitis, siendo *S. aureus* el patógeno prevalente en casos de mastitis subclínica.

Palabras clave:

- **MASTITIS BOVINA**
- **GEN ARNR 16S**
- **IDENTIFICACIÓN MOLECULAR**
- **ISLAS GALÁPAGOS, ECUADOR**

Abstract

The dairy industry in Ecuador is affected by mastitis, which is a bacterial disease capable of generating changes in the health of the animal and milk derivatives. Galapagos Islands have dairy herds that have been reported with this infection, the identification of microorganisms by traditional methods has limitations as it is less sensitive and specific. The objective of this study was to use molecular tools for the identification of the causal agents of mastitis. PCR analysis of the 16S rRNA gene was used to characterize 56 strains isolated from milk of subclinical mastitis-positive cattle from Santa Cruz, Isabela and Floreana islands. *Staphylococcus aureus* was identified as the major causative agent of mastitis with 21%, followed by *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus chromogenes* (14%), isolates of *Bacillus licheniformis* and *Staphylococcus agnetis* (5%), *Lactococcus garvieae*, *Micrococcus luteus*, *Enterobacter cloacae*, *Macrococcus caseolyticus*, *Enterobacter tabaci*, *Bacillus megaterium* & *Pseudomonas putida* (4%). The remaining isolates included *Bacillus subtilis*, *Macrococcus bohemicus*, *Escherichia coli*, *Arthrobacter* sp, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Cellulomonas flavigena*, *Rothia terrae* and *Staphylococcus equorum* represented in smaller numbers (2%). Molecular identification allowed establishing *Staphylococcus* spp. and *Bacillus* spp. as the main causes of mastitis. *S. aureus* was the prevalent pathogen in cases of subclinical mastitis.

Key words:

- **BOVINE MASTITIS**
- **16S RRNA GENE**
- **MOLECULAR IDENTIFICATION**
- **GALÁPAGOS ISLANDS, ECUADOR**

Capítulo 1: Introducción

Formulación del Problema

La industria láctea es un sector de gran importancia económica para el país. Los datos del Instituto Nacional Ecuatoriano de Censos (INEC), indican que se ordeñan 962 528 vacas por día y que producen aproximadamente 6.15 millones litros de leche cruda por día. La distribución en el sector formal es del 53%, para autoconsumo un 37 % y con un 10 % para el mercado artesanal (INEC, 2021).

Ecuador cuenta con la Agencia de Regulación y control Fito y zoonosanitario, Agrocalidad, que se encarga de controlar el estado sanitario del animal, de sus productos y subproductos, y desde tiempo atrás se enfoca en detener la propagación de enfermedades relacionadas a esta industria. Este es el caso del programa nacional de control de brucelosis y tuberculosis bovina implementado desde el año 2008, el programa contra la fiebre aftosa, una enfermedad viral que con estrategias de vacunación ha sido erradicada desde 2015 y protocolos como la guía de buenas prácticas pecuarias de producción de leche (Agrocalidad, 2012).

El Centro de la Industria Láctea del Ecuador (CIL) refleja una distribución por regiones en donde: la Sierra es el mayor productor de leche con el 64 %, la Costa con 9 % y el resto con un 27 % (Gallegos, 2018). Si se toma la región insular, el registro del ganado bovino de las Galápagos es aproximadamente de 10 000 animales distribuidos en las cuatro islas pobladas (Santa Cruz, San Cristóbal, Isabela y Floreana). El primer estudio epidemiológico fue en 1997 a raíz de un brote de fiebre aftosa y para el 2012 la Agencia de Regulación y Control de la Bioseguridad y Cuarentena para Galápagos (ABG) realizó un levantamiento de línea base de enfermedades y determinó la presencia o ausencia de enfermedades como: fiebre aftosa, brucelosis bovina, leucosis bovina, neosporosis bovina, rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) y

diarrea viral bovina. Aunque se han logrado establecer programas y protocolos de manejo de ganado a grandes y pequeños productores, actuales estudios reflejan la prevalencia de enfermedades como mastitis, una enfermedad registrada a nivel nacional (Cruz et al., 2016).

La mastitis bovina es una patología de origen multifactorial, provocada por un sin número de microorganismos, que ingresan del ambiente exterior por el conducto de las ubres al organismo del animal y se desarrollan en las glándulas mamarias, afectando sobre todo a las vacas de alta producción, presentándose de forma sintomática donde el animal manifiesta signos visibles de deterioro en su salud (clínica) y asintomática(subclínica) que necesita de metodologías más específicas para determinar la enfermedad. Esta inflamación provoca lesiones en las ubres del animal, presencia de fibrosis, pus y un aumento en el conteo de células somáticas, relacionados con cambios importantes en la composición química de la leche, disminución de la producción del cuarto afectado y pérdida progresiva general de leche y la calidad de la misma, con consecuencias que impactan la economía de la industria (Brisuela Raygosa et al., 2018).

Las principales bacterias relacionadas con mastitis del Ecuador son: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus pasteurii*, *Streptococcus dysgalactiae* y *Escherichia coli*, ya que, son responsables de aproximadamente el 80% de los casos de mastitis (Amer et al., 2018). Esta información y estadísticas aún no han sido registradas en las islas Galápagos, por ello, se hace imperativo el aislamiento e identificación de los agentes causales, tratamiento a los animales enfermos y control de enfermedades del ganado bovino para evitar sacrificio de estos y por ende pérdidas en el sector ganadero.

El presente estudio contribuye con la generación del conocimiento sobre los microorganismos que provocan la mastitis del ganado bovino en las Galápagos - Ecuador, iniciado con una línea base a seguir para determinar mejoras en protocolos de ordeño, control de la enfermedad, estudios del efecto con las especies nativas y seguir con programas de diagnóstico, prevención y control de la enfermedad a fin de garantizar la disminución en pérdidas económicas para el sector ganadero y lechero.

Justificación del problema

La incidencia de mastitis en el Ecuador bordea el 80 %, poniendo en evidencia la problemática de la enfermedad en el país (Amer et al., 2018). El impacto de la mastitis a nivel económico está determinado por cambios en calidad de leche de manera temporal o permanente y la disminución de producción, porque la inflamación puede llegar a un nivel crítico, volviendo el sacrificio del animal algo necesario para evitar un gasto en tratamiento y por ende mayor inversión económica (Halasa et al., 2007). Sobre

Según el Censo de Unidades de Producción Agropecuaria de Galápagos, se ha determinado un consumo anual de leche y sus derivados en los hogares de 1 324.84 toneladas (CGREG; INEC; MAGAP, 2014). Se debe tomar en consideración que el ganado bovino, es una especie introducida a las islas desde 1900, siendo un competidor en pastoreo con animales nativos, que al convivir, estarían frente a enfermedades presentes en los bovinos (CIL, 2015). De aquí el enfoque de fortalecer la producción ganadera en todos los ámbitos como: control de enfermedades y control de calidad de leche, respaldados de estudios de agentes causales de la mastitis, para evitar pérdidas económicas en las islas.

La identificación de agentes causales de mastitis mediante cultivo y pruebas bioquímicas han sido utilizada como la metodología “gold standard”, a pesar, de tener

limitaciones por el tiempo requerido y mayores riesgos de contaminación (Taponen et al., 2009). El uso de métodos moleculares representa un respaldo al tener mayor sensibilidad y especificidad debido a su capacidad para detectar organismos viables y muerto, el requerimiento de una pequeña cantidad de ADN objetivo, lo cual permite identificar a los microorganismos a nivel de familia, género y especie (Preethirani et al., 2015).

Estudios realizados en Ecuador, identificaron por PCR y secuenciación a algunos microorganismos relacionados con la mastitis como son: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis* y resaltando en la Sierra a *Staphylococcus coagulasa negativo* (SCN), un grupo bacteriano formado por varias especies consideradas flora oportunista de la piel y agentes patógenos menores de mastitis bovina (Amer et al., 2018). Este tipo de información no han sido reportada en fincas ganaderas de las islas Galápagos.

Para el estudio se utilizaron técnicas moleculares como: extracción del ADN de los microorganismos aislados, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), secuenciación para identificar las bacterias aisladas de ganado con mastitis y el análisis bioinformático para organizar esta información en un árbol filogenético. Con el objetivo de recopilar información sobre diversidad de microorganismos encontrados en casos de mastitis en la región de las Galápagos, establecer una biblioteca genética como línea base de futuras investigaciones y monitorear la severidad de la infección a nivel de islas.

Objetivos de investigación

Objetivo general

Identificar mediante métodos moleculares los agentes causales de mastitis en ganado bovino de las islas Santa Cruz e Isabela, provincia de Galápagos.

Objetivos específicos

- Amplificar el gen 16S de los agentes causales de mastitis mediante PCR convencional.
- Caracterizar las bacterias causantes de mastitis mediante secuenciación Sanger de los productos de PCR.
- Realizar análisis filogenético con los segmentos obtenidos de la secuenciación.

Marco Teórico

La Industria Lechera

La industria ganadera y lechera son unas de las más importantes en el Ecuador, la información disponible en el INEC para territorio continental indica un total de 962 520 cabezas de ganado que se ordeñan con una producción diaria de leche de 6.15 millones de litros destinados principalmente para venta y un pequeño porcentaje para autoconsumo (INEC, 2021).

En las islas Galápagos se tiene 10 000 animales distribuidos en las cuatro islas pobladas, que abastecen anualmente para consumo de los hogares con 1 324.84 toneladas de leche y sus derivados (CGREG; INEC; MAGAP, 2014). Sin embargo, se recalca a la producción de leche de los pequeños productores locales que se destina para autoconsumo, alimentación de los terneros y el excedente para la venta a la comunidad como leche fresca.

El manejo sanitario del ganado bovino debe cumplir con requerimientos mínimos para garantizar cumplimiento de normativa y el beneficio económico. La disponibilidad de agua, alimento balanceado, sales minerales, suplementos, vacunas y desparasitación, son algunas medidas que permite el desarrollo normal del animal, de ahí, control de reproducción exitosa y tecnologías de ordeño son recursos a usar para obtener buena calidad de leche y disminuir el prematuro sacrificio del animal por gastos que se puedan presentar por enfermedades y que no justifiquen el costo-beneficio para los ganaderos (PESA & FAO, 2010).

Agrocalidad se encarga de controlar el estado sanitario del animal, de sus productos y subproductos, y desde años se enfoca en detener la propagación de enfermedades relacionadas a la industria ganadera y lechera, el programa nacional de control de brucelosis y tuberculosis bovina implementado desde el año 2008, el programa contra la fiebre aftosa, una enfermedad viral que con estrategias de vacunación ha sido erradicada desde 2015 y protocolos como la guía de buenas prácticas pecuarias de producción de leche, son recursos que han logrado afianzar los compromisos con el sector y mantener la industria (Agrocalidad, 2012).

Mastitis

La mastitis bovina es una inflamación localizada que afecta conductos, glándulas y tejido mamario en respuesta a una infección relacionada a factores como: el hospedador, presencia de agentes infecciosos y condiciones del medio ambiente. Después de que un agente infeccioso ingresa del exterior por el conducto del pezón hacia el interior de la cisterna en las glándulas del animal, se desencadena la reproducción de los microorganismos y la infección como respuesta del organismo, desde la sangre empiezan a multiplicar y movilizar células somáticas, en especial de neutrófilos polimorfos nucleares para proteger el tejido, provocando así la inflamación, problemas en ubres y en consecuencia cambios en la química y calidad de la leche (Fernández, 2012).

Dependiendo del grado de infección, se presentan trastornos en el animal desde presencia de fibrina y pus, enrojecimiento en las ubres, fibrosis, aparición de verrugas, cambio en el tamaño de las ubres, disminución en la síntesis de lactosa hasta pérdida parcial o total de la producción de leche, presencia de microabscesos y sintomatologías que traen como consecuencia deterioro completo del animal si se deja avanzar a la enfermedad (Bedolla et al., 2007).

Tipos de Mastitis.

Mastitis Clínica. La mastitis clínica (CM) es caracterizada por una aparición notoria de la infección, se presenta inflamación y enrojecimiento de las ubres, presencia de pus y fibrosis, dolor o malestar que aqueja al animal, fiebre, falta de apetito y estado anímico inestable, se disminuye la producción de leche del cuarto afectado y baja su calidad al presentar grumos, coágulos, consistencia líquida, cambios evidentes de coloración. Una necesidad que se genera por la enfermedad es el uso de inseminación artificial para granjas que no lo utilizan, debido a la disminución en la tasa de reproducción por monta natural (Dalanezi et al., 2020).

Para el diagnóstico de CM se utilizan métodos de observación de verrugas o lesiones, palpación de la ubre y pruebas utilizando paleta de fondo oscuro. Esto con el fin de evaluar las cualidades de la leche, variaciones en color o consistencia y presencia de grumos (Acuña & Rivadeneira, 2008).

Mastitis Subclínica. La mastitis subclínica (SCM) es un tipo de infección sutil y difícil de corregir, donde el animal no muestra incomodidad o dolor, parece saludable, la ubre no muestra signo de inflamación visible o signos de lesiones y la leche tiende a un aspecto normal, aunque, si se presenta una disminución en la producción diaria. Los efectos de este caso de mastitis alteran a la leche cuando el sistema de defensa del animal produce células somáticas, comprometiendo la calidad, sus constituyentes y valores nutricionales (Kumari et al., 2019).

El desarrollo de la SCM empieza cuando células somáticas migran de la sangre hacia los conductos de la ubre y se presentan en la leche, como respuesta a la infección, aumentando con la severidad del proceso. Las pruebas que se realizan en campo y laboratorio para detectar este tipo de mastitis son: prueba de California para mastitis (CMT), la prueba de Wisconsin, el diagnóstico bacteriológico por los métodos de aislamiento, cultivo, tinción, pruebas bioquímicas

e identificación y el conteo de células somáticas por microscopía directa o la utilización de equipos de medición como Ekomilk Scan (Fernández, 2012).

Métodos para detección de mastitis

Electroconductividad. En leche, la conductividad eléctrica (CE) que mide la capacidad de una solución para conducir una corriente eléctrica, se determina por la concentración de aniones y cationes. La CE de la leche de una vaca sana está entre 4.0 y 5.5 mS / cm a 25 °C. En casos de mastitis, la glándula mamaria sufre un aumento de permeabilidad capilar, lo que provoca lecturas sobre los 6.0 mS / cm. Este valor sobre el rango normal se puede generar por factores externos a la infección, por ende, es una prueba que sugiere sospecha de casos de mastitis y necesita más análisis complementarios (Aguilar & Álvarez, 2019).

California Mastitis Test. La prueba “gold standard” aplicada en campo es CMT, esta emplea un surfactante aniónico, el alquil aril sulfonato de sodio, que al estar en contacto con el ADN de las células somáticas de la leche forma un coagulo (Whyte et al., 2005). Consiste en el agregado del detergente a la leche, causando la liberación del ADN de los leucocitos presentes en la ubre y este, se convierte con las proteínas en emulsión, mientras mayor cantidad de ADN esté presente, mayor el grado de evaluación para esta prueba, considerando 1 como nivel de viscosidad bajo y 4 cuando se logra un coagulo (Bedolla et al., 2007). Este es un método muy visual y depende de la pericia del operador para determinar el nivel de mastitis en cada uno de los cuartos.

Conteo de Células somáticas. En laboratorio Ekomilk Scan es un instrumento de medición donde se realiza un conteo del número de células somáticas en una muestra de leche, midiendo su viscosidad cuando el líquido tratado con un detergente atraviesa un sensor láser, un número de conteo normal oscilan entre 200×10^3 células/ mL, valores mayores a 800×10^3

células/ mL se asocian a la respuesta inflamatoria a mastitis e indicativo de la presencia de microorganismos (Ruiz et al., 2011).

Etiología de Mastitis Bacteriana

La mastitis es una patología de origen multifactorial, que se presenta en un animal que tuvo una herida no tratada o por contaminación del sitio donde es criado. Su contagio se puede dar por contacto con heces, agua, suelo y también en el ordeño, si es manual por el no lavado de manos del operario o máquinas de ordeño mal higienizadas (Calderón & Rodríguez, 2008).

Los patógenos de la mastitis suelen ser bacterias en su mayoría, sin embargo, moho y levaduras también pueden estar presentes. Es importante identificar el microorganismo que provoca la mastitis para seleccionar los tratamientos adecuados, las medidas higiénicas y preventivas adecuadas a la hora de ordeño y velar por el bienestar del hato lechero (El-Sayed et al., 2019).

La infección por bacterias es la más complicada, ya que, estos organismos pueden tener adaptaciones como la resistencia a los antibióticos, resultado del abuso de estos para tratar la enfermedad, haciendo más difícil la aplicación de un tratamiento al ganado. Las bacterias identificadas en glándulas mamarias y en muestras de leche de bovinos consideradas como contagiosas de vaca a vaca durante el ordeño son: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus dysgalactiae* y los microorganismos identificados patógenos ambientales son *Streptococcus uberis*, *Enterococcus sp.*, *coliformes*, *Arcanobacterium pyogenes* y estafilococos coagulasa negativos (SCN) (Bi et al., 2016).

Algunos patógenos ambientales como *Streptococcus uberis* y *Enterococcus sp.*, ocasionan mastitis leves y moderadas. Estos agentes han sido reportados en ubres con lesiones en la piel, en genitales externo y de las heces de las mismas vacas. *Escherichia coli*,

Corynebacterium pyogenes y *Bacillus* sp. son considerados patógenos ambientales, encontrados en suelo y siendo habitantes normales del tracto digestivo de animales, están asociados a mastitis (Almeida, 2016).

Agentes Causales y Prevalencia de Mastitis en el Ecuador

Estudios realizados en fincas ganaderas de cuatro provincias de Ecuador (Bolívar, El Oro, Pichincha y Napo), donde se utilizó la prueba de CMT para detectar mastitis y pruebas microbiológicas y moleculares, muestran congruencia en los organismos identificados, detallados en la **Tabla 1**. Los agentes causales de mastitis en el Ecuador son: *Staphylococcus coagulasa* positivos, *Staphylococcus coagulasa* negativo (CNS), *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus* sp., *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus* sp., *Bacillus* sp., *Corynebacterium* sp., *Citrobacter*, *Enterobacter* sp., *E. coli*, *Klebsiella* sp., *Micrococcus* y *Shigella* sp.

En la Sierra, los resultados de Bonifaz & Colango (2016) reflejan una prevalencia del 64% de mastitis, identificando a: *Escherichia coli*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Staphylococcus epidermis*, *Bacillus* sp., y *Corynebacterium* sp. como principales agentes causales de la enfermedad (Navarrete, 2019).

En la Amazonía, para ganado de Napo se tiene una prevalencia presente en uno o más cuartos con mastitis de 79.66 % y los microorganismos identificados son: *Escherichia coli*, *Staphylococcus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* sp., *Staphylococcus intermedius*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Klebsiella* y *Citrobacter* sp. como agentes causales (Espinoza & Mier, 2013).

Tabla 1

Microrganismos identificados como agentes causales de mastitis en el Ecuador

Provincia	Organismos identificados	Referencia
El Oro	<i>Staphylococci</i> coagulasa positivos <i>Staphylococci</i> coagulasa negativo (CNS) <i>Streptococci</i> <i>Bacillus</i> spp. <i>Klebsiella</i> spp.	(Amer et al., 2018)
Pichincha	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermis</i> <i>Staphylococcus intermedius</i> <i>Staphylococcus</i> coagulasa negativo <i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Micrococcus</i> <i>Corynebacterium</i> sp.	(Bonifaz & Conlago, 2016) (Acuña & Rivadeneira, 2008)
Bolivar	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus</i> sp. <i>Streptococcus</i> sp. <i>Bacillus</i> sp. <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus velezensis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella</i> sp. <i>Shigella</i> sp. <i>Enterobacter</i> sp.	(Navarrete, 2019) (Andrade & Sánchez, 2018)
Napo	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus intermedius</i> <i>Staphylococcus coagulasa positivos</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>Streptococcus</i> spp. <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella</i> sp. <i>Citrobacter</i>	(Espinoza & Mier, 2013)

En el estudio realizado en 2018 en la provincia del Oro, la prevalencia de mastitis clínica es del 12% y en resultados de identificación, las bacterias ambientales, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus chromogenes*, *Streptococcus uberis* y *Escherichia coli* predominaron. Para mastitis subclínica con una prevalencia de 60 % se identificaron las bacterias *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* y patógenos contagiosos *Streptococcus uberis* y *Staphylococcus aureus* (Amer et al., 2018).

Identificación de Agentes Causales de Mastitis

Una prueba diagnóstica debe ser rápida, económica, replicable, sensible y específica. El aislamiento en microbiología para la identificación de aislados ha sido considerado como prueba de oro (Gold standard) mientras que la PCR y otras técnicas basada en ADN son usadas como pruebas confirmatorias o en caso de presentarse resultados ambiguos que no pueden determinarse de la manera tradicional (El-Sayed et al., 2019). Obteniendo como función principal el diagnóstico de enfermedades causada por patógenos.

Identificación por microbiología. Para el aislamiento de bacterias que estén involucradas con la enfermedad, se necesita las muestras de leche de cada cuarto infectado, la primera siembra se realiza en medios diferenciales y selectivos, que permiten la diferenciación de colonias por morfología o permiten inhibir el crecimiento de bacterias que no pertenezcan al grupo de bacterias de interés (Aguilar & Álvarez, 2019). Además de brindar el sustrato y respetar condiciones de tiempo y temperatura para su óptimo crecimiento, las colonias aisladas deben pasar por tinción Gram, es ahí donde se discriminarán según su morfología y tipo de agrupación y por coloración Gram positivas o Gram negativas. Como pasos finales pruebas bioquímicas como catalasa, coagulasa, ureasa, entre otras, permiten una identificación hasta especie

dependiendo de los resultados a dichas pruebas (Andrade & Sánchez, 2018). Los antibiogramas también son usados en este tipo de identificación.

La identificación por microbiología presenta limitaciones, una de estas es el periodo variable de tiempo de crecimiento en caso de bacterias y algunos hongos, prolongar la tenencia de cultivo en medios refrigerados, no es recomendable porque da paso a que organismos Gram negativos proliferen sin ser originarios de la muestra de interés, generando disminución de especificidad y adicionalmente el costo de usar pruebas bioquímicas complementarias que también requieren tiempo y recursos (Aguilar & Álvarez, 2019). Además que solo detectan células viables, lo que genera falsos negativos en los resultados (Ashraf & Imran, 2020).

Debido a los limitantes que se tiene al momento de hacer cultivo, surge un complemento de pronta identificación utilizando herramientas moleculares, como es el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que brinda mayor sensibilidad al reconocer bajas cantidades de ADN en la muestra aumentando sensibilidad que le da el potencial de ofrecer mayor especificidad disminuyendo los falsos negativos (Oikonomou et al., 2012).

Identificación molecular. Las técnicas moleculares se desarrollan a partir de estudios de la información genética, que es considerada como ventaja frente a métodos fenotípicos, ya que permite la detección de células viables como muertas y discriminar entre grupos de microorganismos a pesar de estar estrechamente relacionados (Deb et al., 2013).

Las técnicas actuales utilizadas para la detección de enfermedades causadas por patógenos son la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), donde se amplifican los ácidos nucleicos cada técnica con sus condiciones (Ashraf & Imran, 2020). Luego de obtener las secuencias específicas del genoma,

se utilizan bases de datos y herramientas bioinformáticas para ensamblarlas e identificar el organismo dependiendo de la similitud encontrada (Brisuela Raygosa et al., 2018).

Extracción de ADN. El ácido desoxirribonucleico (ADN) es una molécula estable y manipulable que contiene la información genética única de cada organismo. Para obtener el ADN molde, se puede utilizar la muestra de leche directamente, provocar la ruptura de membranas de las bacterias contenidas y acceder al material genético o se puede realizar un cultivo, obtener colonias y someterlas a la lisis (Elhaig & Selim, 2014).

Existen métodos de extracción manual y utilización de Kit comercial, las diferencia entre estos dos métodos se basa en el tiempo que requiere cada uno de ellos y costo, una extracción manual lleva más horas de trabajo mientras que, el Kit será más rápido, lo esencial es garantizar el cumplimiento del protocolo establecido, y evitar residuos de los compuestos químicos utilizados, que juegan un papel importante en la pureza del producto final (El-Sayed et al., 2019).

El paso previo de la extracción consiste digirir la membrana celular mediante enzimas para tener acceso al material genético, el tratamiento difiere entre bacterias Gram negativas y Gram positivas, ya que, Gram positivas requiere un paso adicional para la lisis de membrana (Bazzicalupo & Fancelli, 1997).

La extracción tiene cuatro pasos principales indiferentes del tipo de extracción que se haga; la lisis celular que rompe las membranas celulares y libera los ácidos nucleicos, la precipitación de proteínas donde se separa el ADN de las proteínas y lípidos mediante solventes orgánicos y centrifugación, la precipitación de los ácidos nucleicos donde se adiciona alcoholes como solución de lavado y soluciones con altas concentraciones de iones de sodio o amonio que se unen a los grupos fosfato del ADN plegándolo sobre sí mismo, haciéndolo insoluble y por

último la hidratación de ADN para posterior uso en la amplificación de la PCR (Wang et al., 2011).

Cuantificación de ADN. Las metodologías que emplean ADN o ARN, necesitan de cumplimiento de pureza y cantidad suficiente del material genético para que tenga lugar la reacción. El método de medición del radio de absorbancia espectrofotométrico es el que permite generar una relación entre la cantidad de luz absorbida por la muestra y su atenuación luego de haber atravesado la muestra, en caso de ADN o ARN, se miden valores en 260 nm y 280 nm (Wilfinger et al., 1997).

La relación de $A_{260/280}$ con un valor de 1.8 es aceptado como muestra pura de ADN, si existen valores menores indica la presencia de proteínas o contaminantes con absorbancias cercanas a 280 nm como el fenol. La relación de $A_{260/230}$ es una medida secundaria para medir pureza, tiene un rango aceptable como puro de 2.0 - 2.2, si el radio es menor indica presencia de contaminantes orgánicos no deseados con absorbancias cercanas a 230 nm como trizol, guanidina, HCl y tiocianato de guanidina (Wilfinger et al., 1997).

Los errores más comunes en la medición de radio se dan por la contaminación de compuestos del proceso de aislamiento o extracción, muestras muy diluidas del material genético con valores menores a $10 \text{ ng}/\mu\text{L}$ y el uso de solución inapropiada para blanco, como el agua en caso de muestras diluidas con TE.

Reacción en Cadena de la Polimerasa. La PCR es una técnica de biología molecular desarrollada en 1987, utilizada para multiplicar fragmentos de ADN mediante una reacción enzimática *in vitro*, cada nueva molécula conteniendo una cadena molde original y una cadena nueva de ADN. La reacción requiere una mínima cantidad de ADN y se da por la acción de cebadores, la enzima ADN polimerasa, y la utilización de un termociclador que brindas las

condiciones necesarias para realizar las múltiples copias del material genético objetivo (Passarge, 2007). La PCR tiene tres etapas: desnaturalización, hibridación y extensión y requiere información previa de las secuencias a utilizarse como cebadores para llegar a nuestro ADN objetivo (**Figura 1**).

Componentes de una PCR. Para la reacción in vitro se utiliza un máster mix, cada tubo contiene 25 μ L o 50 μ L. El mix contiene un buffer para mantener el pH durante la reacción, una enzima catalizadora termorresistente como es el caso de la *Taq* polimerasa, los desoxinucleósidos trifosfatos (dNTPs) para ser añadidos por la *Taq* y sintetizar el ADN, los cebadores o primers (forward & reverse) diseñados para limitar el fragmento objetivo, los cationes divalentes mayoritariamente magnesio 2+, que reacciona con los dNTP para formar complejos que son los sustratos de la *Taq* y estabilizar la unión cebador-molde y el ADN molde o template que contiene el fragmento de interés (Green & Sambrook, 2019).

Ciclos de la PCR. La desnaturalización es el proceso donde se separa la doble hebra del ADN molde a dos cadenas sencillas (una en sentido 5' - 3' y otra 3' - 5') con altas temperaturas hasta de 98°C. En su mayoría la temperatura esta dado por la cantidad de G y C del fragmento, mientras mayor sean las G y C, mayor será la temperatura. En reacciones donde se utiliza la enzima aislada de la bacteria *Thermus aquaticus* (*Taq* polimerasa) el proceso se da a temperaturas de 94° - 95 ° y en periodos cortos de tiempo (30 - 60 segundos) para evitar daños de la secuencia molde y que la enzima catalice de manera eficiente la siguiente reacción (Passarge, 2007).

En la hibridación o alineamiento, el cálculo de la Temperatura de "annealing" (T_a) es crítica, debido a que se debe ajustar por debajo de 5°C con la temperatura más baja del cebador o primer a utilizar (T_m) y en periodos cortos de 30 - 60 segundos. La temperatura en esta etapa

se encuentra en rangos de 50 - 72° C. Aquí los “primers” se hibridan con las hebras simples de ADN en posiciones de sus secuencias blanco y se forman puentes de hidrógeno entre bases complementarias (A - T, G - C) (Green & Sambrook, 2019).

La extensión tiene un rango de temperatura de 70° - 75°C como óptima para la síntesis de ADN y está catalizada por la enzima polimerasa termorresistente. El tiempo de extensión es proporcional al tamaño del fragmento, generalmente 1 minuto por cada 1 000 pares de bases. El proceso inicia cuando la enzima se une al extremo 3' terminal del cebador y va añadiendo nucleótidos complementarios de la cadena molde extendiéndose en sentido 3' o 5' leído desde el ADN hasta encontrarse con región límite donde ya no puede añadir. Como resultado obtenemos la síntesis de dos moléculas de ADN con cadenas dobles, una cadena nueva y una obtenida del molde. El ciclo puede repetirse de 30 a 40 veces y obtener 10^6 copias del segmento original de ADN (Green & Sambrook, 2019). El fragmento puede ser verificado con una electroforesis en gel de agarosa (Gonzalo, 2013).

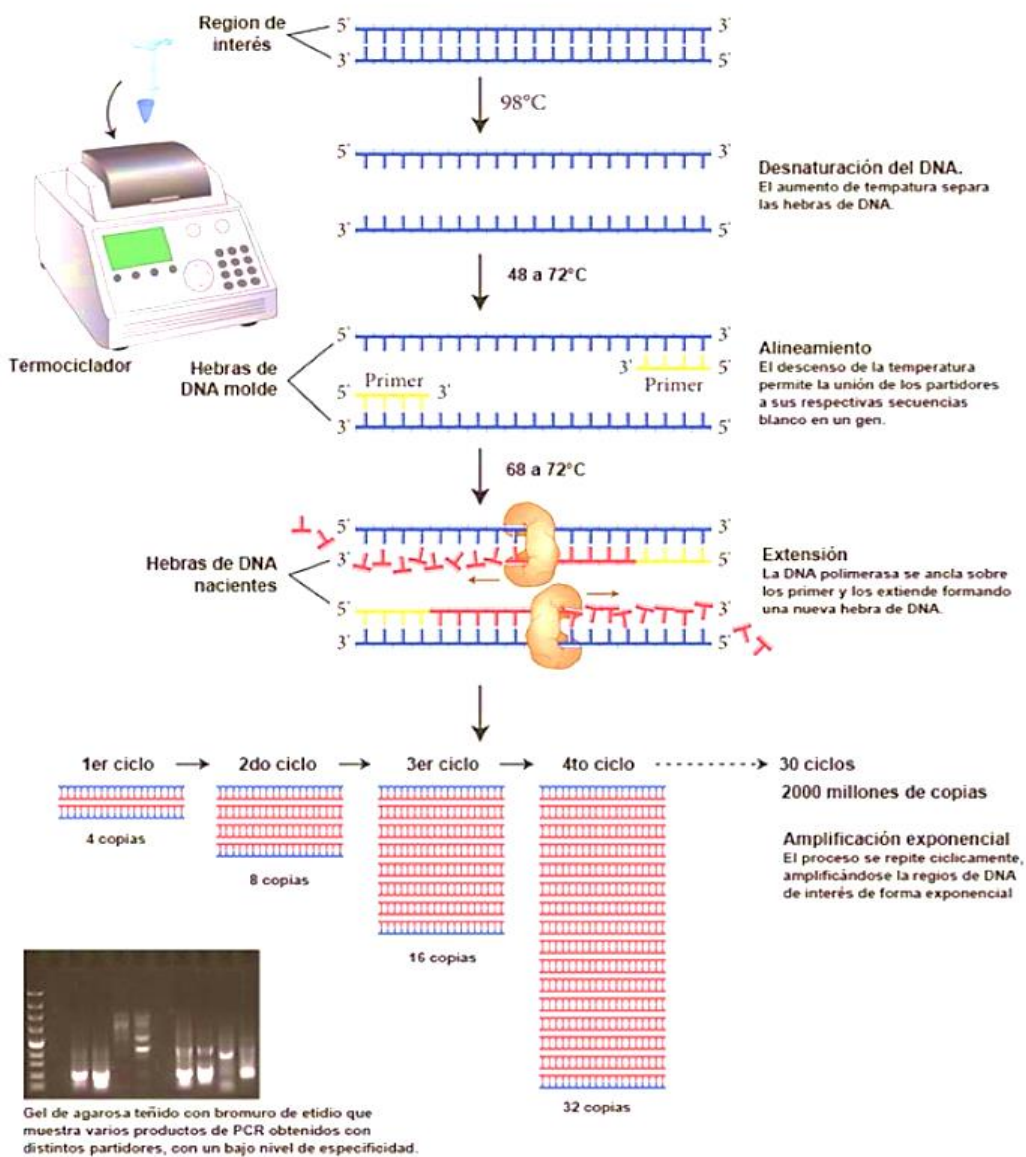
Esta técnica es considerada simple de replicar, barata y sensible, con varias aplicaciones en la biociencia: buscar alteraciones genéticas, mutaciones y en microbiología la detección de virus y bacterias que causan enfermedades (Zhu et al., 2020). La PCR es una alternativa rápida al cultivo bacteriano en caso de diagnóstico de mastitis bovina, obteniendo mayor sensibilidad en detectar bacterias inhibidas o no viables y mayor especificidad disminuyendo los resultados falsos negativos (Aguilar & Álvarez, 2019).

Existen nuevas modificaciones como la PCR cuantitativa (qPCR) o PCR en tiempo real (RT-PCR), que corrigen errores, optimizan tiempos y logran incorporar más características útiles para aumentar la sensibilidad de la prueba, logrando resultados mejores en identificación de microorganismos, aunque se destaca que el costo por muestra de una RT-PCR o qPCR también

aumentan, lo que hace que una PCR convencional siga siendo la más utilizada si el estudio es enfocado a una identificación.

Figura 1

Ciclos de Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR)



Nota. Ciclo de desnaturalización, alineamiento y extensión de un fragmento de ADN por la reacción en cadena de la polimerasa. Tomado de *Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR*.

Encina S., 2013, Revista Médica Clínica.

Electroforesis. La electroforesis en gel de agarosa es la herramienta más usada en laboratorio para separar y analizar los fragmentos de ADN según su tamaño desde 100 pares de bases hasta 25 kb. La agarosa es un polisacárido extraído de algas marinas *Gelidium* conformada por alfa y beta galactosas. El gel de agarosa más utilizado es 0.8 %, pero dependiendo del experimento se utiliza hasta el 2 % para los fragmentos más pequeños. La movilidad del ADN depende de la concentración de agarosa, mientras mayor concentración menor el tamaño el poro (Lee et al., 2012).

El principio de la electroforesis consiste en la migración por carga eléctrica, la cámara que contiene el gel se conecta a dos electrodos ánodo (positivo) y cátodo (negativo). El grupo fosfato del ADN le brinda una carga negativa, por lo que, al aplicar corriente los fragmentos de ADN migran al lado cargado positivamente y se separan por pesos.

Las muestras con productos de PCR se cargan con buffer de carga para dar mayor densidad y color, permitiendo que se hunda en el gel y se más visible para el operador durante el proceso. El gel se prepara con buffer TBE (45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA), que mantiene el pH y conduce la corriente. El colorante que se usa para teñir el gel para su posterior visualización es SYBER, en remplazo del colorante tóxico bromuro de etidio (Lee et al., 2012).

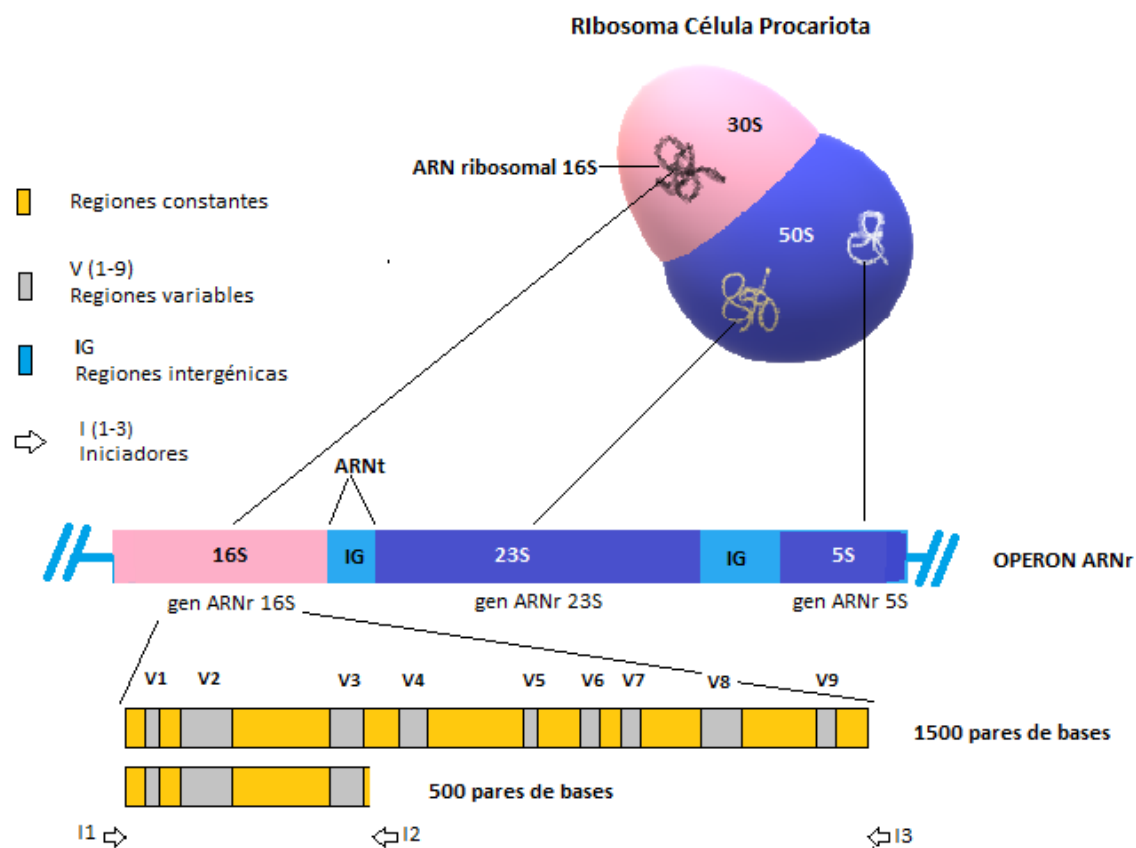
Gen ARNr 16s bacteriano

El ribosoma de las células procariota es un orgánulo complejo encargado de la síntesis de proteínas. Tiene un coeficiente de sedimentación de 70S y contiene dos subunidades ribonucleoprotéicas, la mayor de 50S (en color azul) y la menor de 30S (en color rosado) como se muestra en la **Figura 2**. En la subunidad mayor se encuentra dos ARNr de 23S y 5S con 34 proteínas y en la subunidad menor se encuentra el ARNr 16S y 21 proteínas. Los genes

codificantes de los ARN ribosomales se organizan en operones, cada operón contiene genes para los ARNr 16S, 23S y 5S (Fukuda et al., 2016).

Figura 2

Gen de ARNr 16S del Ribosoma Procariota



Nota. La imagen describe la estructura del ribosoma de células procariotas, sus 2 subunidades 30S y 50S, en la subunidad menor encontramos el ARN ribosomal 16S. Se observa el operón ribosómico con los genes de ARNr (16S, 23S y 5S) acompañados de dos regiones intergénicas. También se indica el tamaño del gen de ARNr 16S: cuando se utilizan los Iniciadores 1 y 2 el fragmento es de 500 pb (pares de bases) y para iniciadores 1 y 3 un fragmento de 1 500 pb. Adaptado de *Molecular Approaches to Studying Microbial Communities: Targeting the 16S Ribosomal RNA Gene*, Fukuda et al., 2016, Journal of UOEH.

El gen de ARNr 16S de aproximadamente 1 500 pb, es altamente conservado y sin mayor variación durante el tiempo, siendo esencial para los procesos de traducción, por lo que, la mayoría de los genomas bacterianos están compuestos por este gen. Al tener regiones variables y conservadas, se utilizan primers “universales” complementarios a la región conservada para amplificar las regiones variables y obtener la información taxonómica del gen mediante PCR (Addis et al., 2016).

En un estudio por Lane (1991) se determinan pares de primers universales acorde las posiciones del gen de ARNr 16S en *E. coli*. Los primers 341F, 530F, 685R, 907R, 1100R y 1392R se utiliza para amplificar fragmentos del gen menor a 1 500 pb y los primers 27F y 1492R para el gen completo de 1 500 pb del ARNr 16S en la clasificación de especies bacterianas (Fukuda et al., 2016).

Se ha demostrado que la amplificación del gen de ARNr 16S en muestras de leche que han dado un cultivo negativo, arroja resultados de especies bacterianas que pueden estar presentes por debajo de los umbrales de detección de este método. De ahí que se utilicen herramientas moleculares para monitoreo de mastitis u otras enfermedades de ganado bovino (Kuehn et al., 2013).

Tipos de PCR para diagnóstico De mastitis

Para la identificación de microorganismos causantes de mastitis, se puede emplear el ADN de las bacterias aisladas, directamente de la leche del cuarto infectado y del silo. Todo dependerá del Tipo de PCR a utilizar.

PCR Convencional. Es usada para detectar microorganismos causantes de mastitis, usando el material genético de bacterias aisladas, de la leche del cuarto afectado o del silo. La sensibilidad de detección disminuye de los resultados depende de la dilución de la leche libre de

infección y la infectada. Para la identificación se utiliza un par de primers diseñados para un segmento específico logrando diferenciar miembros de una misma especie o subespecie (El-Sayed et al., 2019). La unidad 16S de ADN ribosomal es uno de los fragmentos conservados más utilizados en la identificación bacteriana y se utiliza para describir patógenos en las muestras de leche tanto para mastitis clínica y subclínica.

PCR multiplex. Al ser una enfermedad causada por varios microorganismos, se usa otras estrategias para la identificación en caso de mastitis. La PCR multiplex utiliza más pares de cebadores en una misma reacción para dirigirse a genes de diferentes patógenos en caso de diagnósticos o diferentes genes del mismo patógeno para genotipificación. Este tipo de PCR reduce el costo por muestra y el tiempo de diagnóstico, aunque puede presentar menor sensibilidad que una PCR convencional, debido a la competitividad de los cebadores y posible competencia entre ellos (El-Sayed et al., 2019).

Ensayos para la identificación de cinco o más organismos en caso de mastitis, han dado buenos resultados utilizando el gen 16S sumando la detección de genes de resistencia para antibióticos en un mismo organismo, la PCR multiplex , PCR en Tiempo real y qPCR (cuantitativa) muestran alta sensibilidad y especificidad (Ashraf & Imran, 2020).

Secuenciación

La secuenciación es técnica para ordenar los nucleótidos del ADN, que brindan la información para determinar diferencias y similitudes entre organismos. Cada nucleótido, está compuesto por un azúcar, bases nitrogenadas adenina (A), timina (T), guanina (G) y citocina (C) y un grupo fosfato. En 1977 se desarrollan dos técnicas para secuenciar: una química y otra enzimática (Márquez et al., 2011).

Secuenciación química de Maxam y Gilbert. Este método utiliza el fragmento de ADN de interés desnaturalizado y cuatro químicos en cuatro diferentes reacciones correspondientes a los cuatro nucleótidos. Lo primero es el marcaje del extremo 5' de ADN con fósforo 32, segundo se hace la modificación química de la base nitrogenada, tercero la separación de la base nitrogenada del esqueleto del azúcar y cuarto la escisión de la cadena de la región abásica.

Para la modificación química se utilizan cuatro mezclas, en la **Tabla 2** se detallan los agentes modificantes y de escisión para cada base. Cuando se utiliza el dimetil sulfato (DMS) para G y A, este añade un grupo metilo al anillo, luego la piperidina elimina el anillo modificado para que el ADN se parta en el enlace fosfodiéster en dirección 5' al sitio sin base. Para T y C, se utiliza la hidracina como agente modificante y la piperidina para que se rompa el grupo fosfato del azúcar (Maxam & Gilbert, 1977).

Tabla 2

Compuestos utilizados en el proceso de Secuenciación Química

Base	Agente Modificante	Agente de escisión
Guanina	Dimetil sulfato	Piperidina
Adenina y guanina	Dimetil sulfato + ácido fórmico	Piperidina
Timina y citocina	Hidracina	Piperidina
Citocina	Hidracina + NaCl	Piperidina

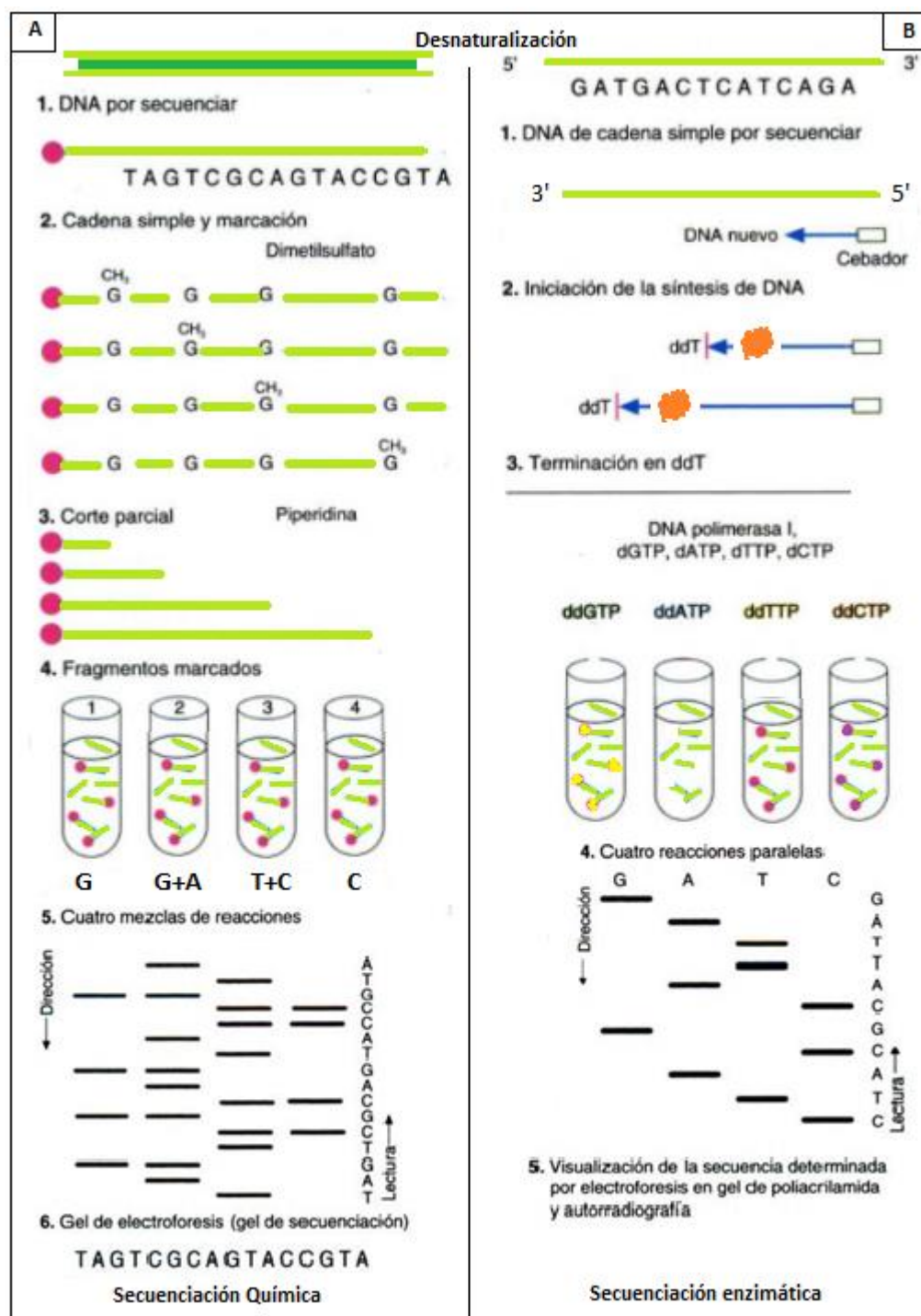
Nota. Compuestos químicos utilizados en las cuatro mezclas de la secuenciación de Maxam y Gilbert para separar las bases del azúcar y las cadenas de las regiones abásicas. Adaptado de *A new method for sequencing DNA*, Maxam & Gilbert, 1977, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.

Las cuatro muestras de cada base se corren en carriles separados de un gel de poliacrilamida. Y la lectura se hace de en sentido opuesto a la migración para tener la secuencia

en sentido 5' – 3' como se muestra en la **Figura 3A** (Passarge, 2007). La lectura del gel de secuenciación, ya es la lectura de la secuencia descifrada.

Figura 3

Procesos de secuenciación química y enzimática



Nota. La secuenciación química se da en cuatro reacciones separadas y utiliza los compuestos DMS y piperidina para realizar los cortes en el fragmento que se desea secuenciar (A). La secuenciación Sanger utiliza a los ddNTPs como terminadores y obtener los fragmentos que serán leídos en gel y autorradiografías (B). Adaptado de *Genética Texto y Atlas*, Passarge E., 2007, Editorial Panamericana.

Secuenciación enzimática de Sanger. El principio consiste en la síntesis del fragmento de ADN utilizando cuatro didesoxinucleótidos (ddATP, ddTTP, ddGTP y ddCTP) que difieren de un desoxinucleótido normal (dNTP) por no tener el grupo hidroxilo en la posición del carbono 3' y que estarán marcados por fluoróforos o radioactividad. Para iniciar el proceso se necesita desnaturalizar el ADN de interés para obtener una secuencia de cadena simple.

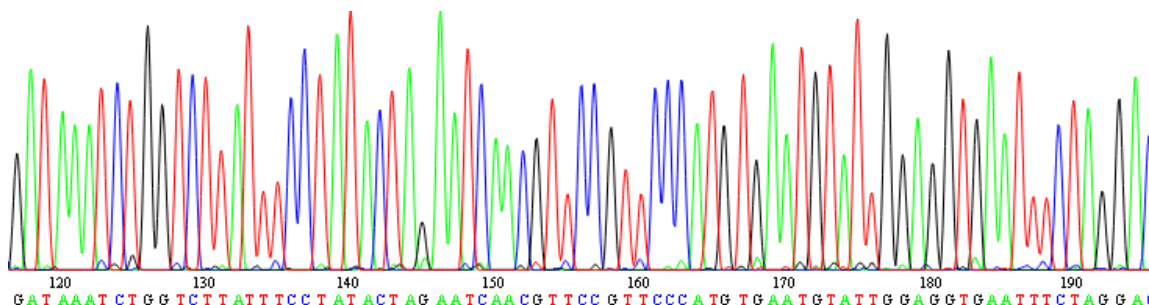
Se utiliza pasos similares a los de una PCR: un primer específico y una ADN polimerasa que va uniendo los nucleótidos hasta encontrarse con un ddNTP, al no unirse con el nucleótido siguiente, termina la síntesis de la cadena en ese sitio. Es un proceso de interrupción controlada de síntesis con cuatro reacciones. Al final del proceso se obtienen fragmentos de diferentes longitudes terminados en ddNTPs (Estrada, 2017). Para visualizar los fragmentos se utiliza un gel de electroforesis leído de abajo hacia arriba para obtener la secuencia de ADN como se muestra en la **Figura 3B**.

Una secuenciación automatizada adapta nuevos métodos para el marcaje por fluorescencia, los fluoróforos son moléculas que emiten un color fluorescente cuando se exponen a diferentes longitudes de onda de luz UV. Los ddNTPs marcados con estas moléculas se reconocen en electroforesis por capilaridad, una fuente excita los fluorocromos y un detector laser los lee mientras pasan, esta lectura se refleja por picos (**Figura 4**), y revela la base que le corresponde a la secuencia (Estrada, 2017). Actualmente existen métodos de segunda y tercera

generación como Illumina para secuenciación, así como tecnologías basadas en nanoporos (Lu et al., 2016).

Figura 4

Sistema Automático de marcaje fluorescente para secuenciación



Nota. Lectura de secuencias por picos con fluorescencia. Tomado de *Herramientas moleculares aplicadas a la ecología*, Marquéz et al., 2011.

Ensamblaje y alineamiento de secuencias

El ensamblaje consiste en leer los sentidos forward y reverse y obtener una secuencia consenso. La secuencia consenso busca editar los posibles errores de fidelidad de la polimerasa y al emparejar los dos sentidos se logra disminuir los sitios de conflicto (Márquez et al., 2011).

La secuencia obtenida se debe comparar con una de una base de datos conocida, aquí se utiliza la herramienta de búsqueda de alineamientos locales básica (BLAST por su acrónimo en inglés) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), y se verifica si tiene una similitud con el microorganismo o con el gen deseado.

El alineamiento es la manera de mostrar la similitud entre diferentes secuencias homólogas, estas regiones conservadas pueden ser funcionales o establecer relaciones evolutivas entre ellas. Existen tres tipos de alineamientos: global, local y múltiple. En general los alineamientos locales se realizan en la plataforma de BLAST y para alineamientos múltiples los

programas basados en el modelo de Markov, MEGA (<https://www.megasoftware.net/>) y CLUSTAL (<http://www.clustal.org/clustal2/>). En estos programas se ingresan las secuencias obtenidas de BLAST para realizar el alineamiento múltiple y también se genera un árbol (González, 2014).

Árboles evolutivos

La disciplina que se encarga de clasificar a los seres vivos es la filogenética. El análisis filogenético trata de reconstruir la historia evolutiva de los organismos, estas relaciones son ilustradas mediante un árbol, en la cual se infiere una hipótesis sobre el pasado común de un grupo de entidades taxonómicas a través de los cambios detectados en caracteres estudiados en el presente (Caujapé et al., 2003).

Los árboles evolutivos describen objetos, a manera de nodos interno y externos. Los nodos externos son taxones y pueden representar un fragmento de gen, organismo o una especie, mientras que los nodos internos representan ancestros comunes inferidos de los taxones muestreados (Bouckaert et al., 2014).

Existen métodos para el estudio filogenético, los que más robustez demuestran son: máxima verosimilitud (ML) e Inferencia Bayesiana (IB). ML captura completamente lo que los datos nos dicen sobre la filogenia, bajo un modelo de evolución y un árbol dado, mientras que, el IB se basa en “priors” (conocimiento previo) no específicos, produciendo millones de árboles de acuerdo a algoritmos Markov Chain Monte Carlo (MCMC) escogiendo el árbol según los datos de posibilidad de distribución más aproximada (Holder & Lewis, 2003). Los dos tienen como objetivo final representar un árbol filogenético que sea reflejo del proceso de evolución de organismos o genes como resultado de modificaciones o similitudes entre especies ancestrales y descendientes (Peña, 2011).

Hipótesis

Las bacterias identificadas causantes mayoritarias de mastitis en el ganado bovino de las islas Santa Cruz e Isabela son *Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp. y *Streptococcus* sp.

Capítulo 2: Materiales y métodos

Obtención de cepas aisladas

Las cepas que se utilizó procedieron de un estudio paralelo realizado en los laboratorios de Microbiología de la Universidad de las Fuerza Armadas ESPE, por Guazha, (2020). Se recolectó la información de 9 fincas, se procesaron 37 muestras en 10 animales con sospecha para la enfermedad, 6 animales de 5 fincas en Santa Cruz, 3 animales de 3 fincas de Isabela y 1 animal de una finca en Floreana.

En los 10 animales de estudio, al menos uno de sus cuartos fue positivo para mastitis subclínica. El 62.17% de las 37 muestras de leche fueron negativas para mastitis subclínica y el 37.83% fueron positivas para SCM con un conteo de células somáticas mayor a las 200 000 células/cm³.

De Santa Cruz, 41.66% (10/24) de los cuartos muestreados, fueron positivos para SCM. En Isabela 25% (3/12) de los cuartos resultaron positivos y de Floreana una muestra dio positivo.

Se realizó la siembra de las 37 muestras de leche positivas y negativas para mastitis subclínica en medios diferenciales y selectivos. En total se obtuvieron 65 cepas aisladas, 44 de Santa Cruz la isla más poblada, 19 de isabela y 3 de Floreana. Como se muestra en el **ANEXO 2**.

Crecimiento masivo de cepas bacterianas

Se prepararon tubos con caldo Luria (LB) a pH 7.5 para proliferar los 65 microorganismos (**Tabla 3**), se tomó una muestra de las colonias sembradas en agar nutriente con el asa de

siembra y se sembraron en tubos con 3 mL de medio líquido, se incubaron a 37°C por 24 horas y en agitación a 200 rpm en incubadora Labnet Incubator Shaker 311-DS. Las condiciones para evaluar el crecimiento fueron la apariencia turbia del medio.

Tabla 3

Composición de Medio de cultivo LB para inóculos de bacterias

Medio	Peso en gramos por litro de caldo
Caldo Luria (LB)	10 g de cloruro de sodio
	5 g extracto de levadura
	10 g triptona

Nota: g: gramos.

Extracción de ADN

Se utilizó el kit de extracción de Promega Wizard® Genomic DNA Purification Kit para bacterias, con ciertas modificaciones (Promega, 2018). En la **Tabla 4**, se detallan los reactivos.

Tabla 4

Reactivos para extracción con kit Wizard® Genomic DNA Purification Promega

Reactivo	Unidad
EDTA 50 mM (pH 8.0)	480 µL
Solución lisosima (20 mg / mL)	60 µL
Solución de lisis	600 µL
Solución ARNasa	3 µL
Solución de precipitación de proteínas	200 µL
Isopropanol	600 µL
Etanol 70 %	600 µL
Solución Rehidratante	50 µL

Nota. La tabla detalla los microlitros (µL) de reactivos utilizados para la extracción de ADN por muestra. Tomado de Promega, 2018.

Se añadió 1 mL de caldo de cultivo LB con muestras de 24 horas en un tubo Eppendorf Tubes® de 1.5 mL, se centrifugó en la centrifuga Heltich Zentrifugen MIKRO 200 a 8 000 rpm por 5 minutos, y se desechó el sobrenadante, esto se repitió por tres veces para usar todo el medio. En la **Tabla 8** de Anexos se detalló el tipo de tinción Gram obtenido para las 65 muestras de microorganismos para la extracción, siguiendo el protocolo específico para cada tipo.

Al pellet de las células Gram positivas se les re suspendió en 480 µL de Buffer EDTA 50 mM utilizando un vórtex VELP CLASSIC, se añadió 60 µL de lisosima de concentración 20 mg / mL y se pipeteó gentilmente hasta homogenizar. Los tubos se incubaron a 37° C por 40 minutos y se centrifugaron a 13000 rpm por 3 minutos. Se desechó el sobrenadante y se continuó con el proceso de Lisis en conjunto con las células Gram negativas.

Lisis celular

Se añadió 600 µL de solución de lisis nucleica, se homogenizó pipeteando, se incubó a 80°C por 5 minutos y se dejó reposar hasta obtener una temperatura ambiente. Luego, se adicionó 3 µL de solución RNAsa, se homogenizó por inversión del tubo, se incubó a 37°C durante 30 minutos y se dejó reposar a temperatura ambiente.

Precipitación de proteínas

A las células lisadas, se les colocó 200 µL de solución de precipitación de proteínas, se homogenizó en vórtex durante 20 segundos, se incubó en hielo por 5 minutos y se centrifugó a 13 000 rpm durante 4 minutos.

Precipitación y Rehidratación de ADN

El sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf estéril con 600 µL de isopropanol, se mezcló por inversión hasta observar la formación de un hilo color blanco. Se centrifugó el tubo a

13000 rpm durante 3 minutos, se descartó el sobrenadante y el isopropanol del tubo se drenó con papel absorbente. Se lavó el pellet con 600 μL de etanol al 70 %, se centrifugó a 13000 rpm durante 3 minutos y descartó el sobrenadante. Se retiró el excedente de etanol con tiras de papel y adicionalmente se dejó secar sobre papel por 15 minutos hasta eliminar rastros de etanol. Finalmente se añadió 50 μL de solución de rehidratación de ADN, el tubo se dejó a 4°C durante 24 horas y se almacenó a -20°C para su posterior uso.

Cuantificación e integridad de ADN

La pureza del ADN obtenido fue medida con base en las lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm de las muestras de ADN en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 Thermo Scientific™. Se utilizó la solución de hidratación como blanco, cada muestra fue colocada en el lector y se esperó el resultado de la lectura para la concentración con valores en $\mu\text{g} / \mu\text{L}$ y los ratios de la relación $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$ para verificar la pureza de las muestras (Wilfinger et al., 1997).

Para analizar la integridad de ADN, se hizo una electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % para esto, se utilizó 60 mL de buffer tris-borato-EDTA (TBE) 1X y se añadió 6 μL de visualizador SYBR® Safe Invitrogen. Se cargó 1 μL de ADN con buffer de carga 10X Blue Juice Invitrogen en cada pocillo y se dejó correr el gel en la cámara de electroforesis a 120 Voltios durante 45 minutos. Finalmente, se observó la integridad de las bandas en el sistema de imagen Chemidoc TMBioRad.

Amplificación del gen ARNr 16s por PCR

Una vez extraído el ADN de las 65 muestras de bacterias, se hizo una PCR para amplificar la secuencia del gen ARNr 16S (**Tabla 5**) utilizando los cebadores universales 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3'). En la **Tabla 6** se detalla los componentes del Master Mix de la PCR utilizando *Taq* Hot Start (ABM) para cada reacción de 25 μL .

Tabla 5*Primers generales para gen ARNr 16S de bacterias*

Nombre	Secuencia 5' - 3'	Gen	Tamaño	Referencia
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	16S ARNr	1500 pb	(Koskinen et al., 2009)
1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT			

Tabla 6*Máster Mix de PCR para el gen ARNr 16s bacteriano*

Reactivos	Unidad	Stock	Volumen por reacción (µL)
H2O	µL	N/A	19,15
Buffer	X	10,00	2,50
16S GENE 27F	µM	10,00	0,88
16S GENE 1492R	µM	10,00	0,88
MgSO4	mM	25,00	0,00
dNTP	mM	40,00	0,50
Taq Hot Start	U / µL	5,00	0,10

Nota. µL: microlitros; µM: micromolar; mM: milimolar, son unidades para concentración que se muestran en la tabla.

Las condiciones del termociclador ProFlex™ 3 x 32-well PCR System modificada y optimizada, constaron de una etapa de desnaturalización inicial de 95°C durante cinco minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, hibridación a una temperatura de 54°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 1.75 minutos con una extensión final de 10 minutos (Frank et al., 2008).

Análisis por electroforesis

Para el análisis de los productos de PCR se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % con buffer TBE 1X y 1 μ L de visualizador SYBR® Safe por cada 10 mL de buffer. Los pocillos se cargaron con 1 μ L de producto de PCR con 1 μ L de buffer de carga Blue Juice 1X, el primer pocillo se cargó con 1 μ L de marcador de peso molecular 1 kb. Se dejó correr el gel en la cámara de electroforesis a 120 Voltios durante 60 minutos y se observó el resultado de las bandas en el sistema de imagen Chemidoc™ BioRad (Yu et al., 2013).

Como control negativo se utilizó una muestra con Máster Mix sin ADN y como control positivo se utilizó la cepa verificada C160 de *Staphylococcus aureus* (RNA 16S staph+, nuc+, mecA-, blaZ+) autorizada para su uso por el departamento de Bacteriología de la Universidad de Liège, Bélgica.

Secuenciación y análisis bioinformático

Los productos de PCR de organismos aislados fueron secuenciados directamente por la empresa Macrogen, Inc.

Las secuencias recibidas como resultado de la secuenciación, se ensamblaron una con otra (forward & reverse) para obtener la secuencia consenso con el software Sequencher (versión 5.4.6.) ([Sequencher DNA Sequence Analysis Software from Gene Codes Corporation](#)).

El alineamiento de las secuencias consenso y secuencias referencia de la base de datos de BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) se hizo usando CLUSTAL W de MEGAX (https://www.megasoftware.net/show_eua).

El árbol para determinar la diversidad bacteriana fue construido usando el método de máxima verisimilitud, implementado en MEGAX (<http://www.megasoftware.net>) (Kabir et al., 2017).

Capítulo 3: Resultados

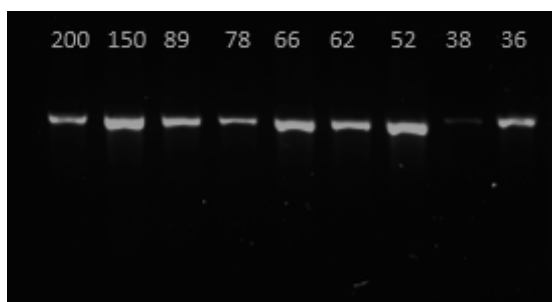
Extracción de ADN bacteriano

El promedio de los valores para densidad óptica (OD) del radio de $A_{260/280}$ de las 65 muestras tuvo un valor de 1.99, valor aceptado dentro del rango para considerar a las muestras de ADN puras y el promedio de radio de $A_{260/230}$ fue de 1.66 indicando un valor por debajo del aceptado, ya que valores por debajo del 1.8 indican contaminación con químicos (Wilfinger et al., 1997). Los valores de concentración y radios se muestran en el **ANEXO 2**.

El material genético obtenido de las 65 muestras del grupo de estudio fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % para determinar su integridad, se siguió el protocolo descrito en la sección de Materiales y métodos. La integridad del ADN se visualizó por la presencia de bandas intensas y definidas, permitiendo validar el protocolo de extracción de ADN, siendo la migración de las bandas uniforme y sin perturbaciones que muestren degradación ver la **Figura 5**.

Figura 5

Electroforesis de Integridad de ADN con kit Wizard de Promega



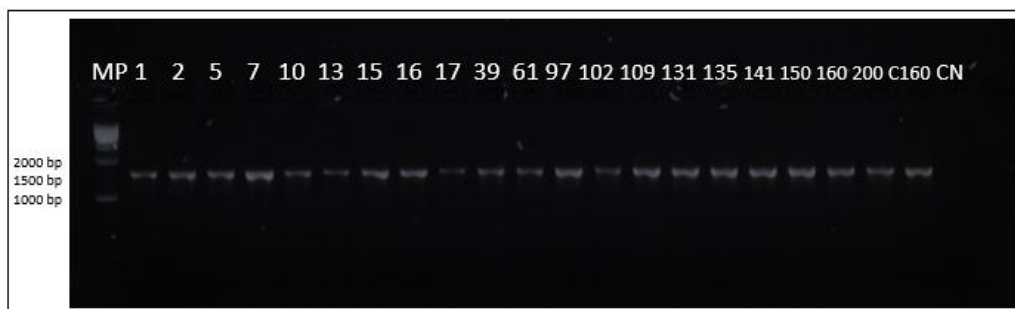
Nota. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %. Análisis de Integridad de ADN de muestras de agentes causales de mastitis en las islas Galápagos utilizando kit comercial de Promega. Se observa que todas las muestras reflejan una banda clara, las bandas que reflejaron mayores concentraciones fueron igualadas a 20 µg / µL para su posterior uso en la PCR.

Amplificación del gen ARNr 16S bacteriano por PCR utilizando *Taq* Hot Start

La amplificación del gen 16S, fue observado en el gel de electroforesis al 1.5 %. Se realizó triplicados de cada muestra. Cada repetición reflejó una banda clara concordando con la distancia del marcador de 1 Kb para 1500 pares de bases como se observa en la **Figura 6**.

Figura 6

Amplificación por PCR del gen ARNr 16S del ADN obtenido de aislados de muestras de leche de ganado bovino de las islas Galápagos.



Nota. MP marcador de peso molecular 1 Kb. Carril (1 - 200): productos de PCR gen ARNr 16S muestras Galápagos. Carril C160: Control positivo *S. aureus* (RNA 16S staph+, nuc+, mecA-, blaZ+), autorizada para su uso por el departamento de Bacteriología de la Universidad de Liège, Bélgica. Carril CN control negativo.

Alineamiento de secuencias

El análisis bioinformático del gen ARNr 16S se realizó utilizando al programa Sequencher como ensamblador. Se obtuvieron 56 secuencias limpias de 65. MEGAX fue la herramienta para alineación múltiple de secuencia utilizando ClustalW y herramientas NCBI-BLAST para obtener

las secuencias se referencia, su obtuvo una identidad del 98 % al 100 % de promedio para las 56 secuencias analizadas como se muestra en el **ANEXO 2**.

Árbol utilizando el método de máxima verosimilitud

El alineamiento se realizó con la opción ClustalW y se ejecutó con 1 000 bootstraps. Se escogió el método de máxima verosimilitud, con delección parcial de gaps. En **La Figura 7** se aprecia el árbol consenso, con probabilidad mas alta, bajo el modelo K2+G de -15 421.324. Se determinó la relación filogenética de los agentes causales de mastitis presentes en leche de ganado bovino de las islas Galápagos, basados en la secuencia del gen ARNr 16S amplificado con PCR.

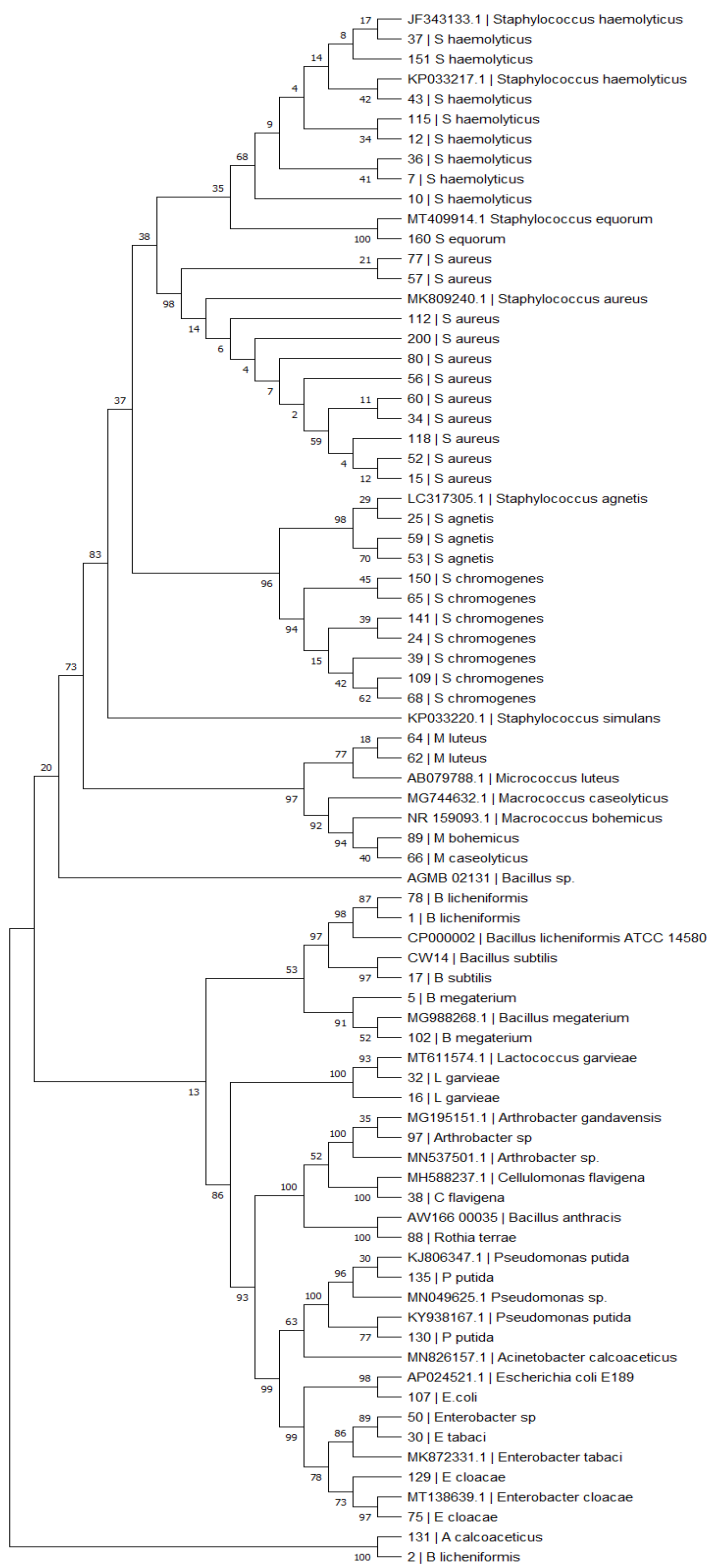
Se identificó que en el primer clado se encuentran emparentados los *S. haemolyticus* de las islas Santa Cruz e Isabela. Lo mismo se identificó en el resto de clados donde los aislados son comunes entre las dos islas.

Todos los *S. agnetis*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *E. tabaci*, *L. garvieae*, *C. flavigena*, *E. coli*, *M. luteus*, *M. caseolyticus*, *M. bohemicus* y *R. terrae* encontrados en las muestras de Santa Cruz comparten el mismo ancestro común.

En el clado *S. aureus* se reconoció a la muestras de las tres islas identificadas, como el mismo agente causal compartido.

Figura 7

Árbol consenso obtenido por análisis de máxima verosimilitud

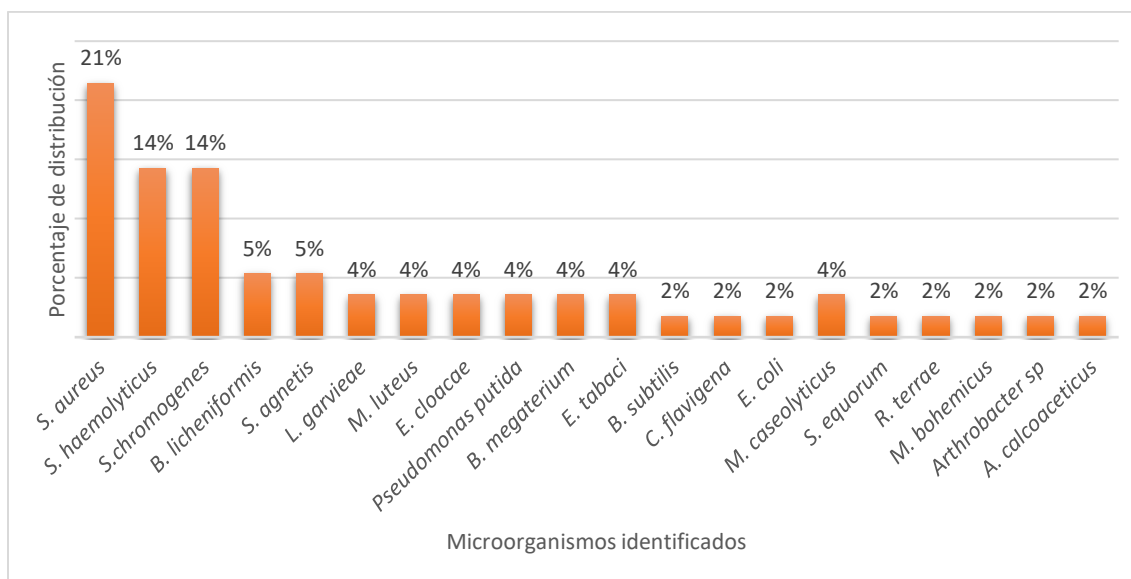


Agentes causales de mastitis en las islas Galápagos

El análisis de la amplificación el gen ARNr 16S por PCR de los 56 microorganismos aislados en leche de ganado bovino con SCM, identificó: estafilococo coagulasa positivo *Staphylococcus aureus* como el mayor agente causal (21 %, 12/56), seguido de SCN *Staphylococcus haemolyticus* y *Staphylococcus chromogenes* (14 %, 8/56, respectivamente), los aislados de *Bacillus licheniformis* y *Staphylococcus agnetis* (5 %, 3/56, respectivamente), *Lactococcus garvieae*, *Micrococcus luteus*, *Enterobacter cloacae*, *M. caseolyticus*, *Enterobacter tabaco*, *B. megaterium* y *Pseudomonas putida* (4%, 2/56, respectivamente) cada uno. El resto de aislados se encuentran *B. subtilis*, *M. bohemicus*, *Escherichia coli*, y los aislados de *Arthrobacter sp*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Cellulomonas flavigena*, *Rothia terrae* y el SCN *Staphylococcus equorum* representados en menor número (2 %, 1/56) cada uno, mostrado en la **Figura 8**.

Figura 8

Representación de los microorganismos identificados como agentes causales de mastitis en las islas Galápagos



Nota: Porcentaje de representación general de cada microorganismo identificado por PCR del gen ARNr 16S bacteriano de las muestras de leche de ganado bovino.

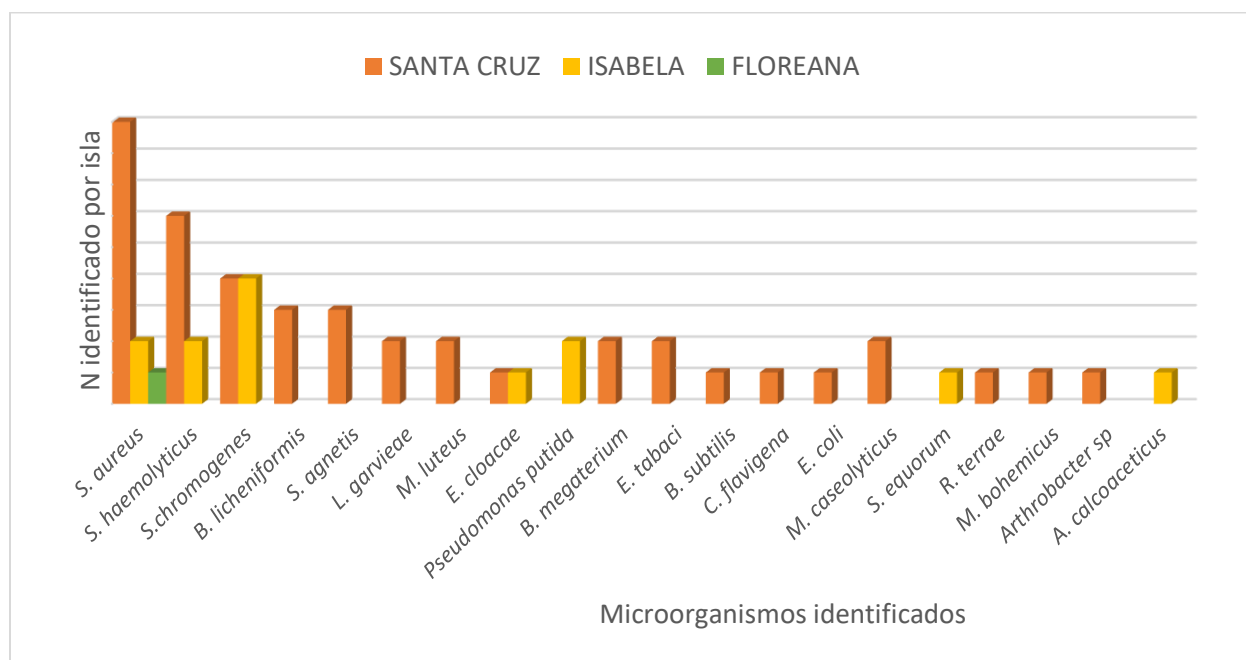
Los principales agentes causales de mastitis en la isla de Santa Cruz son: el *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *S. chromogenes*, *B. licheniformis*, *S. agnetis*, *L. garvieae*, *B. megaterium*, *E. tabaci*, *M. luteus* y *M. caseolyticus*; siendo el grupo en menor proporción: *E. cloacae*, *B. subtilis*, *E. coli*, *C. flavigena*, *M. bohemicus*, *R. terrae* y *Arthrobacter* sp.

En la isla Isabela los principales agentes causales de mastitis son: *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *S. chromogenes* y *Pseudomonas putida* y en menor proporción *E. cloacae*, *S. equorum* y *A. calcoaceticus*.

En la isla Floreana, el único agente causal de mastitis presente en leche identificado fue el *Staphylococcus aureus* (Figura 9).

Figura 9

Distribución de agentes causales de mastitis distribuidos en las islas Santa Cruz, Isabela y Floreana.



Nota: Comparación de microorganismos identificados en las tres islas. *S. aureus* fue agente causal de mastitis para las tres islas Santa Cruz y Floreana. En la isla Isabela el agente causal mayoritario

fue el *S. chromogenes*. En la Isla Santa Cruz, el organismo predominante como agente causal fue *S. aureus*.

El estudio permitió relacionar a la producción diaria de leche como un factor a considerar en casos de mastitis subclínica, ya que, animales con mayor producción tuvieron mayor cantidad de cepas aisladas que de los animales con menor producción.

Capítulo 4: Discusión

En el presente estudio se encontró al estafilococo coagulasa positivo *Staphylococcus aureus* como el mayor agente causal de mastitis al presentarse en un 21 % lo que concuerda con lo reportado en el estudio de Guazha, (2020) en donde identificó este organismo con un 44.7 % frente al resto de agentes. Estudios realizados en Ecuador continental también detallan al *S. aureus* como el principal agente causal de mastitis, en la Sierra Andrade & Sánchez, (2018) reporta al *S. aureus* con un 55.2 % para casos de mastitis en Bolívar y el estudio de Acuña & Rivadeneira, (2008) en Pichincha con un 55.5 %. La investigación en provincia del Napo de Espinoza & Mier, (2013) reporta a *S. aureus* como segundo patógeno identificado con 12.8 %, concluyente para establecerlo como causante predominante de mastitis en ganado bovino para Ecuador.

Se confirma que los aislados 30, 50 pertenecen a *Enterobacter tabaci*, agrupados dentro del mismo clado y se diferencian de *Enterobacter cloacae*, con un soporte de 981. Seguido de *E. coli* con 1 000, los de estas, se diferencian *Cellulomonas flavigena* y *Pseudomonas putida* los aislados 130 y 135. En *Bacillus* sp, se diferencia *Bacillus megaterium* (5, 102), *Bacillus licheniformis* (78, 1) y *Bacillus subtilis* con soporte de datos que van acorde a lo reportado por (Amer et al., 2018).

Se establece la separación de *Macrocooccus luteus* en el clado, sin embargo, entre *Macrocooccus caseoliticus* y *M. bohemicus*, se mantienen dentro del mismo, esto es corroborado por Lange et al., (2015) que señala el bajo soporte en los clados como una diferenciación pobre, debido a la existencia de identidad alta para la región del gen 16S, al ser altamente conservada puede mantener hasta un 93% de probabilidad al empatar y compartir la misma secuencia a pesar de ser de diferentes especies.

La agrupación en un solo clado del árbol confirmó que las tres islas comparten al agente causal de mastitis *S. aureus* con el mismo origen y estos a su vez, están emparentadas con cepas de *S. aureus* encontradas en casos de mastitis en Ecuador y Brasil. En cuanto a los *Staphylococcus*, se diferencian entre *S. agnetis*, *S. chromogenes*, *S. aureus* y *S. haemolyticus* en conjunto con los aislados obtenidos.

La predominancia en mastitis bovina del *S. aureus* se debe a que dispone de mecanismos que lo hacen un patógeno adaptable y resistente a la respuesta del sistema inmune como tal. Formar biopelículas y producir colonias de lento crecimiento conocidas como variantes de colonias pequeñas (SVC), le permite reducir la susceptibilidad a los antibióticos y su estrategia de internalizarse en macrófagos o células epiteliales o formar cápsulas, le ayuda a burla al sistema inmune (Zaatout et al., 2020). Además, es un agente infeccioso peligroso, ya que puede estar presente en lesiones de la piel, equipos en casos de hatos lecheros que dispongan un sistema automatizado e incluso las manos del operador.

El 14% de los aislados SCN identificados son *S. haemolyticus* y *S. chromogenes*. En comparación con otras provincias, los resultados son menores a lo reportado en el Oro y en Pichincha, ya que, estos representan un 55% de los agentes causales de mastitis en ganado bovino. Esto puede sugerir que, al ser bacterias consideradas oportunistas no son agentes con

alta patogenicidad en las islas, sin embargo, son identificados en casos de mastitis y también se incluyen en estudios para determinar su rol o complementariedad en procesos de inflamación mixta con *S. aureus* (Yasser et al., 2018). En Argentina, uno de los países con alta demanda en la industria láctea en América Latina, se identifica a *S. chromogenes* con 46.2 % y a *S. haemolyticus* con 9.7 % como causantes de mastitis y con posibles riesgos a futuro, por su resistencia antibiótica a la penicilina (Srednik et al., 2015).

S. agnetis identificado con un 5 % en las muestras de galápagos, es una bacteria coagulasa variable identificada en Finlandia que guarda similitudes con *S. hyicus*, que, a pesar de no ser identificado en Ecuador, en Estados Unidos ha sido reportado en casos de mastitis bovina y su secuenciación ha determinado genes de virulencia para estudios a futuro (Calcutt et al., 2014).

Otro SCN identificado fue el *S. equorum*, organismo no reportado en Ecuador en casos de mastitis. En Egipto, este SCN se encontró en la piel del pezón de la ubre, y se estudia por su relación con infecciones mixta junto a *S. aureus* (Yasser et al., 2018). Otro estudio indica que este organismo fue aislado de la leche de una vaca Holstein en la Universidad de Missouri en 2006 y se lo estudia por su parecido en cuando a resistencia antibiótica a otras bacterias SCN en casos de mastitis bovina (Calcutt et al., 2013).

Una identificación por microbiología de mastitis en Galápagos, determinó la presencia de bacilos Gram positivos en un 15.79 % para el total de aislados (Guazha, 2020). Con la secuenciación del gen ARNr 16S del presente estudio y la construcción del árbol, se identifica a los microorganismos como: *B. licheniformis* (5 %), *B. subtilis* (2 %) y *B. megaterium* (4 %). Lo que coincide con Navarrete (2019) y Amer et al. (2018) que reportaron a *B. licheniformis* y *B. subtilis*

con un 21 % de los aislados en casos de mastitis clínica y subclínica, estableciendo que estos organismos están presentes tanto en las islas como Ecuador continental.

El *B. megaterium* reportado en la isla Santa Cruz no tiene coincidencia con estudios en Ecuador, ni territorio cercano, sin embargo, coincide con estudios realizados en Sudán y la India, en donde identificaron a este microorganismo en un 2 % para casos de mastitis bovina clínica y subclínica (Mukesh et al., 2019).

En los estudios de mastitis bovina realizados en Ecuador se han identificado a: *Pseudomonas putida.*, *M. luteus* y *Escherichia coli*, los mismos que representan el 4 % y el 2 % del presente estudio, siendo considerados patógenos ambientales causantes de mastitis y habitantes normales del tracto digestivo de los animales o microorganismos del suelo (Almeida, 2016).

Las bacterias *Macrococcus caseolyticus* y *Macrococcus bohemicus* identificadas con un 2%, son consideradas inofensivas y relacionadas generalmente, en casos de alergias como rinitis o dermatitis de caninos, aunque también, se han aislado en piel de ubres de vacas lecheras en Suiza y sus estudios han determinado que poseen el gen *mecD*, que brinda resistencia a la meticilina y betalactámicos (Schwendener et al., 2017).

Arthrobacter sp. y *A. gandavensis* reportada en este estudio con un 2%, coincide con el registro de esta bacteria hecho en Bélgica, se aisló de ganado bovino que presentaba infecciones mamarias y uterinas, pero se desconoce su papel en estos procesos (Storms et al., 2003).

L. gaviae y *R. terrae* reportados, son microorganismos identificados en enfermedades zoonóticas, la endocarditis una de ellas, a pesar de ser patógenos oportunistas, el caso mayormente relacionado se encuentra en un estudio de mastitis en rumiantes (Rodrigues et al.,

2016). El resto de microorganismos identificados y agrupados en el árbol, no han sido reportados como agentes presentes en infecciones de ganado bovino, o mastitis. Siendo objetos de interés para futuros estudios.

Los aislados 131 y 2, no se agruparon en los clados obtenidos. Acorde a la búsqueda en BLAST estos presentan 99 % de identidad con *Rothia terrae* y *Bacillus anthracis*. Sin embargo, el alineamiento no presenta relación, existen secuencias de organismos muy comunes en muestras ambientales, si se realiza la amplificación de la región 16S, es posible que no se logre separar de la mejor manera por ser una región muy conservada (Lange et al., 2015). Para esto una secuenciación del genoma completo puede presentar las zonas variables para cada organismo y mejorar la identificación (Ghebremedhin et al., 2008).

Al disponer la producción de leche diaria aproximada de los animales, se identifica a los animales con mayor capacidad productora con mayor número de agentes causales presentes. Dicha información es corroborada por el estudio de análisis de regresión por Ramírez et al., (2011) en Colombia, un tiempo de lactancia mayor a seis meses y mayor tasa de producción de leche genera un factor de riesgo en caso de presentar mastitis (Ramírez et al., 2011).

Capítulo 5: Conclusiones

- Se logró amplificar por PCR del gen 16S de 1 500 bp, identificando los agentes causales de mastitis en las islas Galápagos.
- Los resultados del estudio determinan que los agentes causales de mastitis presentes en leche de ganado bovino en la provincia de Galápagos, identificados mediante la PCR del gen ARNr 16S son: *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *S. chromogenes*, *B. licheniformis*, *S. agnetis*, *L. garvieae*, *M. luteus*, *E. cloacae*, *Pseudomonas putida*, *B. megaterium*, *E. tabaci*, *B. subtilis*, *C. flavigena*, *E. coli*, *M. caseolyticus*, *S. equorum*, *R. terrae*, *M. bohemicus*, *Arthrobacter* sp y *A. calcoaceticus*.
- Se confirma la hipótesis, estableciendo a *Staphylococcus* spp. y *Bacillus* spp. como principales agentes causales de mastitis aislados de muestras de leche de ganado bovino de las islas Galápagos. Sin encontrar *Streptococcus* sp. en el estudio.
- El árbol filogenético confirma que el *S. aureus* presente en las tres islas guardan parentesco y comparten el mismo origen, agrupados en el mismo clado.
- El principal agente causal de mastitis bovina presente en las tres islas: Santa Cruz, Isabela y Floreana es *S. aureus*.
- En la isla Santa Cruz, los agentes causales de mastitis son: *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *S. chromogenes*, *B. licheniformis*, *S. agnetis*, *L. garvieae* y *M. luteus*; siendo el grupo en menor proporción: *E. cloacae*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *E. tabaci*, *C. flavigena*, *E. coli*, *M. caseolyticus*, *R. terrae*, *M. bohemicus* y *Enterobacter* sp.
- En Isabela se determina como agentes predominantes causantes de mastitis a: *Pseudomonas putida*, *S. chromogenes*, *S. aureus* y *S. haemolyticus*, en menor proporción a *E. cloacae*, *S. equorum* y *A. calcoaceticus*.
- Las bacterias ambientales relacionadas con la mastitis fueron: *M. luteus* y *Escherichia coli*.
- En los seis animales de estudio positivos para mastitis subclínica, se reporta la presencia de *S. aureus* en al menos uno de los cuartos.
- Los agentes causales comunes entre las islas Santa Cruz e Isabela se encuentran emparentados, ya que, comparten el mismo clado y poseen valores altos de soporte para los nodos.

Capítulo 6: Recomendaciones

- Se recomienda realizar un estudio de genoma completo para validar la información de organismos encontrados que no guardan relación con los agentes causales de mastitis bovina reportados.
- Se recomienda realizar estudios de genes de resistencia a antibióticos en los *Staphylococcus sp.* encontrados en el estudio.
- Para mayor validación en los resultados se recomienda utilizar una secuenciación completa, o amplificar genes no tan conservados con el gen ARNr 16S, que permita diferenciar entre los que no se lograron separar.
- Se recomienda realizar estudios de transferencia horizontal de genes resistente a antibióticos en caso de infecciones mixtas con el *S. aureus*.
- Se recomienda realizar estudios para comparar los patógenos presentes en las especies nativas de las islas y las presentadas en este estudio, con el fin de analizar como la mastitis bovina se relaciona con otras patologías.
- Se recomienda la búsqueda y relaciones con patógenos presentes entre las especies nativas, humanos y ganado enfermos, para determinar si este ha sido transmitido por contacto con el ser humano o tiene origen silvestre.

Capítulo 7: Bibliografía

- Acuña, V., & Rivadeneira, A. (2008). Aislamiento, identificación y antibiograma de patógenos presentes en leche con mastitis en ganaderías bovinas de la provincia de Pichincha. In *Departamento de Ciencias de la Vida Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias*. Escuela Politécnica del Ejercito.
- Addis, M. F., Tanca, A., Uzzau, S., Oikonomou, G., Bicalho, R. C., & Moroni, P. (2016). The bovine milk microbiota: Insights and perspectives from -omics studies. *Molecular BioSystems*, 12(8), 2359–2372. <https://doi.org/10.1039/c6mb00217j>
- Agrocalidad. (2012). Guía de Buenas Prácticas Pecuarias de Producción de Leche. In *Resolución Técnica N° 0217*. <https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2020/05/man3.pdf>
- Aguilar, F., & Álvarez, C. (2019). *Mastitis Bovina*. UTMACH. <http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/15205/1/MASTITIS-BOVINA.pdf>
- Almeida, R. (2016). Mastitis ambientales. *Albéitar: Publicación Veterinaria Independiente*, 195, 14–15.
- Amer, S., Gálvez, F. L. A., Fukuda, Y., Tada, C., Jimenez, I. L., Valle, W. F. M., & Nakai, Y. (2018). Prevalence and etiology of mastitis in dairy cattle in El Oro Province, Ecuador. *Journal of Veterinary Medical Science*, 80(6), 861–868. <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0504>
- Andrade, C., & Sánchez, A. (2018). *Estudio clínico, microbiológico y estimación económica de mastitis bovina, en la Cooperativa de Producción Agropecuaria “El Salinerito”, provincia Bolívar - Ecuador* [Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE]. <https://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/14267>
- Ashraf, A., & Imran, M. (2020). Causes, types, etiological agents, prevalence, diagnosis,

treatment, prevention, effects on human health and future aspects of bovine mastitis.

Animal Health Research Reviews, 21(1), 36–49.

<https://doi.org/10.1017/S1466252319000094>

Bazzicalupo, M., & Fancelli, S. (1997). DNA Extraction from Bacterial Cultures. In *Fingerprinting Methods Based on Arbitrarily Primed PCR* (pp. 41–45). Springer Berlin Heidelberg.

https://doi.org/10.1007/978-3-642-60441-6_7

Bedolla, C., Castañeda, V., & Wolter, W. (2007). Métodos de detección de la mastitis bovina (Methods of detection of the bovine mastitis). *REDVET*, 9, 265–270.

http://findresultsonline.com/?dn=veterinaria.org&rg=7934785&_slen=1

Bi, Y., Wang, Y. J., Qin, Y., Guix Vallverdú, R., Maldonado García, J., Sun, W., Li, S., & Cao, Z.

(2016). Prevalence of Bovine Mastitis Pathogens in Bulk Tank Milk in China. *PLoS ONE*, 11,

1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155621>

Bonifaz, N., & Conlago, F. (2016). PREVALENCIA E INCIDENCIA DE MASTITIS BOVINA MEDIANTE LA PRUEBA DE CALIFORNIA MASTITIS TEST CON IDENTIFICACIÓN DEL AGENTE ETIOLÓGICO, EN PAQUIESTANCIA, ECUADOR. *La Granja*, 24(2), 43–52.

<https://doi.org/10.17163/lgr.n24.2016.04>

Bouckaert, R., Heled, J., Kühnert, D., Vaughan, T., Wu, C. H., Xie, D., Suchard, M. A., Rambaut, A., & Drummond, A. J. (2014). BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary

Analysis. *PLoS Computational Biology*, 10(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003537>

Brisuela Raygosa, J., Palacios Torres, J., López Valencia, G., Hori-Oshima, S., Herrera Ramírez, J.

C., Pujol Manríquez, L. C., Angulo Valadez, C. E., Rentería Evangelista, T. B., & Medina

Basulto, G. E. (2018). Identificación molecular y frecuencia de patógenos aislados de

- mastitis bovina en establos de la Península de Baja California, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 9(4), 755–768. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v9i4.4365>
- Calcutt, M., Foecking, M., Fry, P., Hsieh, H.-Y., Perry, J., Stewart, G., Scholl, D., Messier, S., & Middleton, J. (2014). Draft Genome Sequence of Bovine Mastitis Isolete *Staphylococcus agnetis* CBMRN 20813338. *Genome Announc*, 2(5), 883–897. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00883-14>
- Calcutt, M., Foecking, M., Hsieh, H.-Y., Perry, J., Stewart, G., & Middleton, J. (2013). Genome Sequence Analysis of *Staphylococcus equorum* Bovine Mastitis Isolate UMC-CNS-924. *Genome Announcements*, 1(5). <https://doi.org/10.1128/GENOMEA.00840-13>
- Calderón, A., & Rodríguez, V. C. (2008). Prevalência de mastitis bovina y su etiología infecciosa en sistemas especializados en producción de leche en el altiplano cundiboyacense (Colombia). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 21(4), 582–589.
- Caujapé, J., Pedrola, J., & Membrives i, N. (2003). Aspectos filosóficos del análisis de datos en sistemática molecular. *Botánica Macaronésica*, 24, 127–141.
- CGREG; INEC; MAGAP. (2014). *Censo de Unidades de Producción Agropecuaria de Galápagos*. <https://siicg.gobiernogalapagos.gob.ec/php/publico/publicaciones/206/2>
- CIL. (2015). *LA LECHE DEL ECUADOR - Historia de la lechería ecuatoriana* (Effecto Studios & R. Lasso (eds.); agosto 2015). http://sitp.pichincha.gob.ec/repositorio/disenio_paginas/archivos/La Leche del Ecuador.pdf
- Cruz, M., Ramos, M., Duque, V., Cedeño, M., Espinosa, M., Vélez, A., Azuero, R., Mejía, M., Arana, D., & Iturbide, R. (2016). La bioseguridad en Galápagos es importante pra proteger

la salud humana, la economía local y la biodiversidad. *Informe Galapagos 2015-2016*, 27–32.

Dalanezi, F. M., Joaquim, S. F., Guimarães, F. F., Guerra, S. T., Lopes, B. C., Schmidt, E. M. S., Cerri, R. L. A., & Langoni, H. (2020). Influence of pathogens causing clinical mastitis on reproductive variables of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, *103*(4), 3648–3655. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16841>

Deb, R., Kumar, A., Chakraborty, S., Verma, A. K., Tiwari, R., Dhama, K., Singh, U., & Kumar, S. (2013). Trends in diagnosis and control of bovine mastitis: A review. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, *16*(23), 1653–1661. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2013.1653.1661>

El-Sayed, A., Awad, W., Abdou, N.-E., & Castañeda Vázquez, H. (2019). *Molecular biological tools applied for identification of mastitis causing pathogens*. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2017.08.002>

Elhaig, M. M., & Selim, A. (2014). Molecular and bacteriological investigation of subclinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* in domestic bovids from Ismailia, Egypt. *Tropical Animal Health and Production*, *47*(2), 271–276. <https://doi.org/10.1007/s11250-014-0715-1>

Espinoza, M. G., & Mier, J. P. (2013). *Determinación de la prevalencia de mastitis mediante la prueba California mastitis test e identificación y antibiograma del agente causal en ganaderías lecheras del Cantón el Chaco, provincia del Napo* [Quito: UCE]. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/1281>

Estrada, D. (2017). Sanger sequencing. In *FEBS Journal* (Vol. 284, Issue 24, p. 4174). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/febs.14319>

- Fernández, O. F. (2012). Mastitis bovina: Generalidades y métodos de diagnóstico. *Revista Veterinaria REVET*, 13(11), 1–11. http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infeciosas/bovinos_leche/78-mastitis.pdf
- Frank, J. A., Reich, C. I., Sharma, S., Weisbaum, J. S., Wilson, B. A., & Olsen, G. J. (2008). Critical Evaluation of Two Primers Commonly Used for Amplification of Bacterial 16S rRNA Genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(8), 2461–2470. <https://doi.org/10.1128/AEM.02272-07>
- Fukuda, K., Ogawa, M., Taniguchi, H., & Saito, M. (2016). Molecular approaches to studying microbial communities: Targeting the 16S ribosomal RNA gene. *Journal of UOEH*, 38(3), 223–232. <https://doi.org/10.7888/juoeh.38.223>
- Gallegos, R. (2018). *Datos de leche cruda producida en el Ecuador y su distribución por provincia*. https://e152f73b-81b4-4206-a6ee-8b984b6a13b0.filesusr.com/ugd/6cc8de_513a9bb8db76451a9a74586d7902bb3b.pdf
- Ghebremedhin, B., Layer, F., König, W., & König, B. (2008). Genetic Classification and Distinguishing of Staphylococcus Species Based on Different Partial gap, 16S rRNA, hsp60, rpoB, sodA, and tuf Gene Sequences. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 46(3), 1019–1025. <https://doi.org/10.1128/JCM.02058-07>
- González, F. (2014). Guía Rápida Del Proceso De Identificación Y Análisis Filogenético De Recursos Genéticos, Basado En La Comparación De Secuencias De Adn. *Recursos Genéticos Curso Intensivo de Postgrado.*, 21–29. afsadfaf
- Gonzalo, E. S. (2013). Biología molecular en oncología: lo que un clínico debiera saber. *Revista*

Médica Clínica Las Condes, 24(4), 563–570. [https://doi.org/10.1016/s0716-8640\(13\)70196-](https://doi.org/10.1016/s0716-8640(13)70196-2)

2

Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harb Protocols*.

<https://doi.org/10.1101/pdb.top095109>

Guazha, C. (2020). *Aislamiento e identificación de bacterias patógenas presentes en leche de vacas con mastitis de las islas Santa Cruz e Isabela, de la provincia de Galápagos - Ecuador*.

<http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/23029/1/T-ESPE-044038.pdf>

Halasa, T., Huijps, K., Østerås, O., & Hogeveen, H. (2007). Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. *Veterinary Quarterly*, 29(1), 18–31.

<https://doi.org/10.1080/01652176.2007.9695224>

Holder, M., & Lewis, P. O. (2003). Phylogeny estimation: Traditional and Bayesian approaches.

Nature Reviews Genetics, 4(4), 275–284. <https://doi.org/10.1038/nrg1044>

INEC. (2021). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua 2020 Contenido*. n:

<https://www.ecuadorencifras.gob.ec//estadisticas-agropecuarias-2/>

Kabir, M. H., Ershaduzzaman, M., Giasuddin, M., Nazir, K. H. M. N. H., Mahmud, M. M., Islam, M.

R., Islam, M. S., Karim, M. R., Yousuf, M. A., Rahman, S. M., & Ali, M. Y. (2017). Prevalence

and molecular detection of the causal agents of sub-clinical mastitis in dairy cows in

Sirajganj and Pabna districts, Bangladesh. *Journal of Advanced Veterinary and Animal*

Research, 4(4), 378–384. <https://doi.org/10.5455/javar.2017.d238>

Koskinen, M. T., Holopainen, J., Pyörälä, S., Bredbacka, P., Pitkälä, A., Barkema, H. W., Bexiga, R.,

Roberson, J., Sølverød, L., Piccinini, R., Kelton, D., Lehmusto, H., Niskala, S., & Salmikivi, L.

(2009). Analytical specificity and sensitivity of a real-time polymerase chain reaction assay

- for identification of bovine mastitis pathogens. *Journal of Dairy Science*, 92(3), 952–959.
<https://doi.org/10.3168/jds.2008-1549>
- Kuehn, J. S., Gorden, P. J., Munro, D., Rong, R., & Dong, Q. (2013). Bacterial Community Profiling of Milk Samples as a Means to Understand Culture-Negative Bovine Clinical Mastitis. *PLoS ONE*, 8(4), 61959. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061959>
- Kumari, T., Bhakat, C., Singh, A. K., Sahu, J., Mandal, D. K., & Choudhary, R. K. (2019). Low Cost Management Practices to Detect and Control Sub-Clinical Mastitis in Dairy Cattle. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8(05), 1958–1964.
<https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.805.227>
- Lange, C., Brito, M., Reis, D., Machado, M., Guimarães, A., Azevedo, A., Salles, É., Alvim, M., Silva, F., & Meurer, I. (2015). Species-level identification of staphylococci isolated from bovine mastitis in Brazil using partial 16S rRNA sequencing. *Veterinary Microbiology*, 176(3–4), 382–388. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2015.01.024>
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., & Kim, Y. H. (2012). Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *J. Vis. Exp*, 62, 3923. <https://doi.org/10.3791/3923>
- Lu, H., Giordano, F., & Ning, Z. (2016). Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly. In *Genomics, Proteomics and Bioinformatics* (Vol. 14, Issue 5, pp. 265–279). Beijing Genomics Institute. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2016.05.004>
- Márquez, M., Serrato Díaz, A., & Flores, R. C. (2011). Secuenciación de fragmentos de ADN. In *Herramientas moleculares aplicadas en ecología* (pp. 231–249).
<http://www.nd.edu/~aseriann/maxam.html>,
- Maxam, A. M., & Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the United States of America, 74(2), 560–564.

<https://doi.org/10.1073/pnas.74.2.560>

Mukesh, K., Navin, S., & Vaibhav, B. (2019). In Vitro Antibacterial Evaluation of Terminalia chebula as an Alternative of Antibiotics against Bovine Subclinical Mastitis. *Animal Biotechnology*, 30(2), 151–158. <https://doi.org/10.1080/10495398.2018.1451752>

Navarrete, K. (2019). *Identificación molecular de bacilos Gram positivos aislados de muestras de leche de vacas con mastitis, en la cooperativa de producción agropecuaria “El Salinerito”, provincia Bolívar-Ecuador* [Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Carrera de Ingeniería en Biotecnología]. <http://repositorio.espe.edu.ec/jspui/handle/21000/21251>

Oikonomou, G., Machado, V. S., Santisteban, C., Schukken, Y. H., & Bicalho, R. C. (2012).

Microbial Diversity of Bovine Mastitic Milk as Described by Pyrosequencing of

Metagenomic 16s rDNA. *PLoS ONE*, 7(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047671>

Passarge, E. (2007). *Genética Texto y Atlas* (3ra edition, pp. 60–64). Editorial médica

Panamericana.

https://books.google.com.ec/books?id=bgQ_xyJYkigC&pg=PA60&dq=reaccion+en+cadena+de+la+polimerasa&hl=es-

[419&sa=X&ved=2ahUKEwitsp_p37rxAhWInWoFHX4rATYQ6AEwB3oECAYQAg#v=onepage](https://books.google.com.ec/books?id=bgQ_xyJYkigC&pg=PA60&dq=reaccion+en+cadena+de+la+polimerasa&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwitsp_p37rxAhWInWoFHX4rATYQ6AEwB3oECAYQAg#v=onepage)

[&q=reaccion+en+cadena+de+la+polimerasa&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=bgQ_xyJYkigC&pg=PA60&dq=reaccion+en+cadena+de+la+polimerasa&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwitsp_p37rxAhWInWoFHX4rATYQ6AEwB3oECAYQAg#v=onepage&q=reaccion+en+cadena+de+la+polimerasa&f=false)

Peña, C. (2011). Métodos de inferencia filogenética. In *Revista Peruana de Biología* (Vol. 18,

Issue 2, pp. 265–267). Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San

Marcos. <https://doi.org/10.15381/rpb.v18i2.243>

PESA, & FAO. (2010). *Manejo Sanitario Eficiente del Ganado Bovino: Principales Enfermedades*.

<http://www.pesacentroamerica.org>

Preethirani, P. L., Isloor, S., Sundareshan, S., Nuthanalakshmi, V., Deepthikiran, K., Sinha, A. Y., Rathnamma, D., Prabhu, K. N., Sharada, R., Mukkur, T. K., & Hegde, N. R. (2015). Isolation, biochemical and molecular identification, and in-vitro antimicrobial resistance patterns of bacteria isolated from bubaline subclinical mastitis in South India. *PLoS ONE*, *10*(11).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142717>

Promega, C. (2018). Wizard Genomic DNA Purification Kit Quick Protocol, FB022. *Wizard*, 1123–1126.

Ramírez, N., Arroyave, O., Cerón-Muñoz, M., Jaramillo, M., Cerón, J., & Palacio, L. (2011).

Factores asociados a mastitis en vacas de la microcuenca lechera del altiplano norte de Antioquia, Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria*, *22*.

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-93542011000200004

Rodríguez, M. X., Lima, S. F., Higgins, C. H., Canniatti-Brazaca, S. G., & Bicalho, R. C. (2016). The *Lactococcus* genus as a potential emerging mastitis pathogen group: A report on an outbreak investigation. *Journal of Dairy Science*, *99*(12), 9864–9874.

<https://doi.org/10.3168/JDS.2016-11143>

Ruiz, A., Ponce, P., Gomes, G., Mota, R., Elizabeth, S., Lucena, E., & Benone, S. (2011).

Prevalencia de mastitis bovina subclínica y microorganismos asociados: comparación entre ordeño manual y mecánico. *Revista de Salud Animal*.

Schwendener, S., Cotting, K., & Perreten, V. (2017). Novel methicillin resistance gene *mecD* in clinical *Micrococcus caseolyticus* strains from bovine and canine sources. *Scientific Reports*, *7*.

<https://doi.org/10.1038/SREP43797>

- Srednik, M. E., Grieben, M. A., Bentancor, A., & Gentilini, E. R. (2015). Molecular identification of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis and detection of β -lactam resistance. *The Journal of Infection in Developing Countries*, *9*(09), 1022–1027.
<https://doi.org/10.3855/jidc.5871>
- Storms, V., Devriese, L., Coopman, R., Schumann, P., Vyncke, F., & Gillis, M. (2003). *Arthrobacter gandavensis* sp. nov., for strains of veterinary origin. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *53*(Pt 6), 1881–1884. <https://doi.org/10.1099/IJS.0.02353-0>
- Taponen, S., Salmikivi, L., Simojoki, H., Koskinen, M. T., & Pyörälä, S. (2009). Real-time polymerase chain reaction-based identification of bacteria in milk samples from bovine clinical mastitis with no growth in conventional culturing. *Journal of Dairy Science*, *92*(6), 2610–2617. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1729>
- Wang, T., Wang, L., Zhang, J., & Dong, W. (2011). A simplified universal genomic DNA extraction protocol suitable for PCR. *Genetics and Molecular Research*, *10*(1), 519–525.
<https://doi.org/10.4238/vol10-1gmr1055>
- Whyte, D., Walmsley, M., Liew, A., Claycomb, R., & Mein, G. (2005). Chemical and rheological aspects of gel formation in the California Mastitis Test. *Journal of Dairy Research*, *72*, 115–121. <https://doi.org/10.1017/S0022029904000561>
- Wilfinger, W. W., Mackey, K., & Chomczynski, P. (1997). Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques*, *22*(3), 474–481.
<https://doi.org/10.2144/97223st01>
- Yasser, M., Ilka, K., Line, S., Karl, P., & Hanne, I. (2018). Communications of *Staphylococcus aureus* and non-*aureus* *Staphylococcus* species from bovine intramammary infections and

teat apex colonization. *Journal of Dairy Science*, *101*(8), 7322–7333.

<https://doi.org/10.3168/JDS.2017-14311>

Yu, J., Zhou, X.-F., Yang, S.-J., Liu, W.-H., & Hu, X.-F. (2013). Design and application of specific 16S rDNA-targeted primers for assessing endophytic diversity in *Dendrobium officinale* using nested PCR-DGGE. *Appl Microbiol Biotechnol*, *97*, 9825–9836.

<https://doi.org/10.1007/s00253-013-5294-y>

Zaatout, N., Ayachi, A., & Kecha, M. (2020). Staphylococcus aureus persistence properties associated with bovine mastitis and alternative therapeutic modalities. *Journal of Applied Microbiology*, *129*(5), 1102–1119. <https://doi.org/10.1111/JAM.14706>

Zhu, H., Zhang, H., Xu, Y., Laššáková, S., Korabečná, M., & Neužil, P. (2020). Review PCR past, present and future. *Biotechniques*, *69*. <https://doi.org/10.2144/btn-2020-0057>

Capítulo 8: Anexos