



Pontificia Universidad Católica del Ecuador

Sede Ibarra

ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES

INFORME FINAL DEL PROYECTO

TEMA:

Identificación Microbiológica y Molecular de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, en la leche del ganado vacuno de la hacienda “La Verbena” y su incidencia en vacas de diferentes número de parto.

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

Ingeniero Agropecuario

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN:

Línea 2. Ambiente y Biodiversidad

Sublínea 2.1 Recursos Genéticos

AUTOR: Francisco Xavier Alarcón Recalde

ASESORA: M.V.Z Mónica Patricia Velástegui Moreno, M.Sc.

IBARRA, MAYO 2018



Ibarra, 7 de Mayo de 2018

M.V.Z. Mónica Patricia Velástegui Moreno, M.Sc.
ASESOR

CERTIFICA:

Haber revisado el presente informe final de investigación, el mismo que se ajusta a las normas vigentes en la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales (ECCA), de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCESI); en consecuencia, autorizo su presentación para los fines legales pertinentes.

(f) 

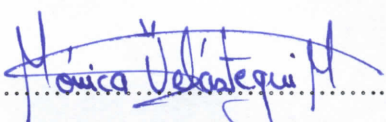
M.V.Z. Mónica Patricia Velástegui Moreno, M.Sc.

C.C.: 0503323024



PÁGINA DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

El jurado examinador, aprueba el presente informe de investigación en nombre de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCESI):

(f): 

M. Sc. Mónica Patricia Velástegui Moreno

C.C.: 0503323024

(f): 

M. Sc. Santiago Xavier Mafla Andrade

C.C.: 1002658399

(f): 

M. Sc. Diego Javier Jauregui Sierra

C.C.: 1720282076



ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS

Yo Francisco Xavier Alarcón Recalde, declaro conocer y aceptar la disposición del Art. Art.165 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, que manifiesta textualmente: “Se reconoce facultad de los autores y demás titulares de derechos de disponer de sus derechos o autorizar las utilidades de sus obras o prestaciones, a título gratuito u oneroso, según las condiciones que determinen. Esta facultad podrá ejercerse mediante licencias libres, abiertas y otros modelos alternativos de licenciamiento o la renuncia”.

Ibarra, 7 de Mayo de 2018

f): 

Francisco Xavier Alarcón Recalde

C.C.:100400706-6



AUTORÍA

Yo, Francisco Xavier Alarcón Recalde, portador de la cédula de ciudadanía N°100400706-6, declaro que la presente investigación es de total responsabilidad del autor, y eximo expresamente a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra de posibles reclamos o acciones legales

f): 

Francisco Xavier Alarcón Recalde

C.C.:100400706-6

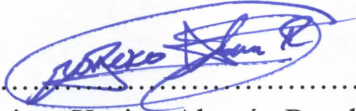
DECLARACIÓN y AUTORIZACIÓN

Yo: Francisco Xavier Alarcón Recalde, con CC: 100400706-6, autor del trabajo de grado intitulado: **Identificación Microbiológica y Molecular de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, en la leche del ganado vacuno de la hacienda “La Verbena” y su incidencia en vacas de diferentes número de parto**, previo a la obtención del título profesional de “Ingeniero Agropecuario” en la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales.

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede- Ibarra, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCESI el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de Universidad.

Ibarra, 7 de Mayo de 2018

(f.): 
Francisco Xavier Alarcón Recalde

C.C. 100400706-6

DEDICATORIA

Dedico este trabajo principalmente a Dios, que fue el que me permitió culminar con éxito esta hermosa etapa de mi vida, en la cual pude entender y valorar cada experiencia presentada.

A mi hijo Juan Francisco que se ha convertido en la razón principal por la cual busco e intento mejorar día a día, a él y a mi esposa que son quienes me han dado fuerza para superarme, gracias a ellos por su apoyo y por su sacrificio de los momentos en familia para ser invertidos en la culminación de este proyecto.

A mis queridos padres por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, a ellos que me dedicaron su vida y su esfuerzo para ver como llego a concluir esta meta, a mis hermanos quienes me empujaron y alentaron en todo el transcurso de mi carrera, a ellos les quedo eternamente agradecido por ayudarme a ser mejor cada instante de mi vida.

Todo este trabajo ha sido posible gracias a ellos.

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia agradezco a Dios por darme la oportunidad de despertar cada día y por estar conmigo en cada paso que doy; por haber encontrado en mi camino a aquellas personas que han sido para mí un eje fundamental en mi formación personal, moral, y profesional durante este periodo en el cual he cursado mis estudios.

A mis padres por ser perseverantes conmigo y no desfallecer ante las circunstancias, gracias por ser mi ejemplo y darme un futuro.

A mi asesora M.V.Z. Mónica Velástegui que creyó en mí y en mis capacidades, gracias por darme la oportunidad de demostrar que una meta se puede conseguir si uno de verdad lucha y cree en sí mismo.

A mis profesores, amigos y colaboradores quienes aportaron en mi formación intelectual y me ayudaron a ser una mejor persona, les agradezco infinitamente por sus consejos, regaños o una simple charla para hacer que pueda ver la vida de diferente manera.

En fin, agradecer a todas las personas que de alguna u otra manera contribuyeron a construirme como un profesional, pero aún más agradezco a quienes me han hecho crecer como hijo, esposo y amigo, a todos muchas gracias por compartir conmigo esta etapa de mi vida.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	vi
INTRODUCCIÓN	vii
CAPITULO I	vi
ESTADO DEL ARTE	1
1. Mastitis.....	2
1.1 Mastitis Clínica.....	2
1.2 Mastitis Subclínica	3
1.3 Etiología de la Mastitis	3
1.4 Incidencia de la Mastitis	5
2. Agentes microbianos en esta investigación	5
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i> :	5
2.2 <i>Escherichia coli</i>	7
3. Identificación Microbiológica	9
CAPITULO II	10
MATERIALES Y MÉTODOS	10
2.1. UBICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR DEL ESTUDIO:.....	10
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	11
2.2.1. Establecimiento de hipótesis	11
2.2.2 Técnicas estadísticas.....	12
2.2.3 Trabajo en Campo	13
2.2.3.1 Toma de muestras.....	13
2.2.4 Trabajo en Laboratorio	14
2.2.4.1 Ensayos microbiológicos	14
a) Siembra y Aislamiento de microorganismos	14
b) Tinción de Gram	15
2.2.4.2 Caracterización molecular	16
a) Extracción de ADN	17
b) Preparación del lisado de bacterias Gram positivas.....	18
c) Preparación del lisado de bacterias Gram negativas.....	18

d) Unión de ADN	19
e) Lavado de ADN	19
f) Elución de ADN	19
g) Amplificación del ADN	19
h) Electroforesis en gel de agarosa	22
i) Observación de OTU's	23
CAPITULO III	25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
3.1 PRESENTACION DE LOS RESULTADOS Y DISCUSION	25
3.1.1 Presencia de <i>Staphylococcus aureus</i>	26
3.1.1.1. Descripción de la incidencia de <i>Staphylococcus aureus</i>	27
a) Primera repetición	27
b) Segunda repetición	29
3.1.1.2 Análisis estadístico para <i>Staphylococcus aureus</i>	32
a) Primera repetición	32
b) Segunda repetición	33
3.1.1.3 Caracterización molecular de <i>Staphylococcus aureus</i>	33
3.1.2 Presencia de <i>Escherichia coli</i>	37
3.1.2.1 Descripción de la incidencia de <i>Escherichia coli</i>	38
a) Primera repetición	38
b) Segunda repetición	40
3.1.2.2 Análisis estadístico para <i>Escherichia coli</i>	42
a) Primera repetición	43
b) Segunda repetición	44
3.1.2.3 Caracterización molecular de <i>Escherichia coli</i>	44
3.2 RESULTADOS DE LA SOCIALIZACIÓN	46
CAPITULO IV	57
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	57
4.1 CONCLUSIONES	57
4.2 RECOMENDACIONES	58
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

ANEXOS	65
Registro Fotográfico.....	65
Resultados Obtenidos para <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i>	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Coordenadas de la hacienda “La Verbena”	10
Tabla 2. Tabla de contingencia para la aplicación del estadístico χ^2 (chi cuadrado)	12
Tabla 3. Modelo utilizado para tabulación de datos	14
Tabla 4. Primers para el ensayo de PCR (<i>Staphylococcus aureus</i>)	17
Tabla 5. Primers para el ensayo de PCR (<i>Escherichia coli</i>)	17
Tabla 6. Reactivos utilizados para la PCR de antígeno somático de las células de <i>Escherichia coli</i>	20
Tabla 7. Reactivos utilizados para la PCR de antígeno flagelar de las células de <i>Escherichia. coli</i>	20
Tabla 8. Reactivos utilizados para la PCR de las células <i>Staphylococcus aureus</i>	21
Tabla 9. Vacas con positivo a <i>Staphylococcus aureus</i> (Primera Repetición).....	26
Tabla 10. Vacas con positivo a <i>Staphylococcus aureus</i> (Segunda Repetición).....	26
Tabla 11. Resultados correspondientes a presencia-ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> (Primera Repetición).....	28
Tabla 12. Resultados correspondientes a presencia-ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> (Segunda repetición)	30
Tabla 13. Cálculo de χ^2 en la primera repetición para <i>Staphylococcus aureus</i>	32
Tabla 14. Cálculo de χ^2 en la segunda repetición para <i>Staphylococcus aureus</i>	33
Tabla 15. Vacas con positivo a <i>Escherichia coli</i> (Primera Repetición)	37
Tabla 16. Vacas con positivo a <i>Escherichia coli</i> (Segunda Repetición)	37
Tabla 17. Resultados correspondientes a presencia-ausencia de <i>Escherichia coli</i> (Primera Repetición).....	38
Tabla 18. Resultados correspondientes a presencia-ausencia de <i>Escherichia coli</i> (Segunda Repetición).....	41
Tabla 19. Cálculo de χ^2 en la primera repetición para <i>Escherichia coli</i>	43
Tabla 20. Cálculo de χ^2 en la segunda repetición para <i>Escherichia coli</i>	44
Tabla 21. Tabulación de resultados de organización del evento.	47
Tabla 22. Tabulación de datos de material audiovisual utilizado.....	48
Tabla 23. Tabulación de resultados acerca del dominio del tema del expositor	49
Tabla 24. Tabulación de resultados de manejo de auditorio.....	50
Tabla 25. Tabulación de resultados correspondiente a facilidad de expresión.....	51

Tabla 26. Resultados tabulados acerca de la importancia del estudio.....	52
Tabla 27. Tabulación de resultados de perspectiva de futuras investigaciones en el ramo .	53
Tabla 28. Resultados tabulados de beneficios de la investigación	54
Tabla 29. Tabulación del porcentaje de objetivos cumplidos.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vista y delimitación del predio	11
Figura 2. Termocicladores para PCR.....	22
Figura 3. Electroforesis en gel de Agarosa.	23
Figura 4. Transiluminador UV.....	24
Figura 5. Muestra número 32, resultado positivo en tinción Gram (+) para <i>Staphylococcus aureus</i>	27
Figura 6. Número y porcentaje de vacas del grupo I con presencia de <i>Staphylococcus aureus</i>	28
Figura 7. Número y porcentaje de vacas del grupo II con presencia de <i>Staphylococcus aureus</i>	29
Figura 8. Número y porcentaje de vacas del grupo III con presencia de <i>Staphylococcus aureus</i>	29
Figura 9. Número y porcentaje de vacas del grupo I con presencia de <i>Staphylococcus aureus</i>	30
Figura 10. Número y porcentaje de vacas del grupo II con presencia de <i>Staphylococcus aureus</i>	31
Figura 11. Número y porcentaje de vacas del grupo III con presencia de <i>Staphylococcus aureus</i>	31
Figura 12. Primera corrida de electroforesis de <i>Staphylococcus aureus</i> en gel de agarosa	34
Figura 13. Segunda corrida de electroforesis de <i>Staphylococcus aureus</i> en gel de agarosa	35
Figura 14. Patrón de comparación. Amplificación de los genes COAG2 y COAG3 en aislado de <i>Staphylococcus aureus</i>	37
Figura 15. Muestra número 142, resultado positivo de tinción Gram (-) para <i>Escherichia coli</i>	38
Figura 16. Número y porcentaje de vacas del grupo I con presencia de <i>Escherichia coli</i> ..	39
Figura 17. Número y porcentaje de vacas del grupo II con presencia de <i>Escherichia coli</i> .	40
Figura 18. Número y porcentaje de vacas del grupo III con presencia de <i>Escherichia coli</i>	40
Figura 19. Número y porcentaje de vacas del grupo I con presencia de <i>Escherichia coli</i> ..	41
Figura 20. Número y porcentaje de vacas del grupo II con presencia de <i>Escherichia coli</i> .	42
Figura 21. Número y porcentaje de vacas del grupo III con presencia de <i>Escherichia coli</i>	42
Figura 22. Tercera corrida de electroforesis para <i>Escherichia coli</i> en gel de agarosa	45

Figura 23. Patrón de comparación. Amplificación de los genes stx1 (180pb) y stx2 (255pb) aislado de <i>Escherichia coli</i> O157:H7	46
Figura 24. Resultados de organización del evento en porcentaje	48
Figura 25. Resultados obtenidos en porcentaje del material audiovisual utilizado	49
Figura 26. Resultados de dominio del tema en porcentaje	50
Figura 27. Resultados de manejo del auditorio por el expositor en porcentaje	51
Figura 28. Resultados en porcentaje sobre facilidad de expresión del expositor	52
Figura 29. Resultados en porcentaje acerca de la relevancia del estudio	53
Figura 30. Resultados en porcentaje de perspectivas para estudios complementarios posteriores.....	54
Figura 31. Resultados de beneficios a largo o corto plazo de la investigación	55
Figura 32. Resultados en porcentaje del cumplimiento de objetivos del estudio	56

INTRODUCCIÓN

En el Ecuador, según la Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua ESPAC realizada por el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC, 2016) y publicada en el mismo año, se reporta que a nivel nacional existen 4'127.311 de cabezas de ganado vacuno, en la región Sierra hay 2'042.144; en la provincia de Imbabura se estiman 97.299 de estas 36.957 es decir el 37.98% son hembras que tienen 2 o más años de edad, por lo tanto se encuentran en edad reproductiva y consecuentemente pueden ser productoras de leche. El Centro de la Industria Láctea del Ecuador (2015) informa que el aporte de la producción de leche de la provincia es el menor de la Sierra Ecuatoriana, representando un 2% de la producción nacional de leche cruda, lo que alcanza un volumen de 140.000 litros por día.

La mayoría de los predios productores de leche que se encuentran en las zonas aledañas a Ibarra entregan su producto a las empresas locales donde se transforma en quesos, yogurt, leche en funda, etc., quedándose con un porcentaje de leche cruda para su autoconsumo y para los terneros que se encuentran aún lactando. La leche que reciben las industrias lácteas deben cumplir con los parámetros especificados el Instituto Ecuatoriano de Normalización (2015) en la norma NTE: INEN 9:2015, en donde se toma en cuenta entre los requisitos microbiológicos el conteo de unidades formadoras de colonia (UFC/g) de *Enterobacteriaceae* y *Staphylococcus aureus*, la presencia de estos microorganismos solo se puede determinar mediante análisis microbiológicos en un laboratorio, razón por la cual las fincas no lo realizan debido a que el procedimiento es oneroso, además de que la entrega de resultados es demorada y aumenta el costo de producción, con este antecedente se utiliza solamente el test CMT como una prueba primaria para la determinación de mastitis que podría ser producida por estas bacterias.

El presente trabajo se lo realizó en “La Verbena” que es una hacienda lechera que se encuentra ubicada en el sector de Angochagua, posee 139 bovinos, de los cuales 70 se encontraban en producción durante la fase experimental de este trabajo, de cada animal se obtiene un promedio de 15 litros, generando 1100 litros diarios.

El ordeño se lo hace de forma mecánica y dos veces al día, culminando con un resaque manual de la leche que queda en las ubres para evitar enfermedades.

Las vacas productoras una vez por semana reciben la visita veterinaria y son monitoreadas una vez al mes con el test CMT para prevenir la presencia de mastitis.

Por lo expuesto anteriormente se decidió hacer una identificación bioquímica y molecular en la leche de la hacienda para determinar si existe presencia de mastitis subclínica producida por dos bacterias: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, que son las principales bacterias causantes de importantes pérdidas económicas al reducir la calidad de la leche, generando el descarte temprano de animales y además de producir enfermedades transmisibles a los humanos.

El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de *Staphylococcus aureus*, y *Escherichia coli* mediante identificación microbiológica y molecular en la leche del ganado bovino de la hacienda “La Verbena” y su incidencia en vacas de diferentes grupos divididos por número de parto.

Para el cumplimiento del objetivo principal de este estudio se debieron cumplir con los objetivos específicos propuestos:

1. Muestrear la leche de las vacas en producción de la propiedad donde se realizó el estudio, para determinar la existencia de las bacterias mediante cultivo en medios selectivos, y reconocer mediante la técnica molecular de PCR, a *Staphylococcus aureus*, y *Escherichia coli* como agentes microbiológicos presentes en la mastitis subclínica.
2. Identificar los animales que presentan la leche infectada por las bacterias en estudio, y a través de inferencia estadística, a los grupos de vacas que muestran mayor afectación por presencia de las bacterias mencionadas.

3. Socializar a la comunidad los hallazgos obtenidos

En este trabajo se encuentran detalladas la metodología y las técnicas empleadas para la determinación microbiológica y molecular de los dos microorganismos objetos del estudio, además los resultados obtenidos, y el análisis estadístico para determinar el grado de significancia a las hipótesis planteadas:

Hipótesis nula H_0 : Todos los grupos de vacas divididos por número de parto presentan infección por las bacterias en estudio.

Hipótesis alterna H_1 : Por lo menos un grupo de vacas presenta predisposición a contaminación por las bacterias en estudio.

RESUMEN

La investigación determina si el número de partos en las vacas es un factor que predispone a la presencia de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, patógenos productores de mastitis en el hato lechero de la hacienda “La Verbena”. Se realizaron dos muestreos de la leche a las vacas en producción, con una diferencia de ocho días. Con éstas se realizaron pruebas microbiológicas para establecer si la leche estaba contaminada con las bacterias mencionadas. Además se realizó análisis moleculares, por el método de reacción en cadena de polimerasa (PCR) para corroborar las pruebas microbiológicas. En estos, se utilizaron los *primers* COAG2 y COAG3, específicos para el gen COA de *Staphylococcus aureus* y gen rfbE0 para los genes stx1, y stx2 ambos productores de toxina shiga presentes en *Escherichia coli*. En ambos casos, el proceso permitió asegurar que los microorganismos eran las cepas patógenas. Se identificó una mayor incidencia de *Staphylococcus aureus* (siete vacas equivalente al 10%) que de *Escherichia coli* (tres vacas, 4,3%), y principalmente en las vacas más jóvenes (aquellas del grupo I con 6 y 2 respectivamente), aunque estadísticamente esta diferencia no fue significativa.

Palabras clave: Mastitis, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, PCR, número de partos.

ABSTRACT

The research establishes if number of births of cows from the dairy herd as a factor that predisposes to the presence of pathogens *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, both part of the etiology of mastitis on Hacienda La Verbena. Sampling of the milk was carried out on two times with a difference of eight days between. Microbiological tests were carried out with these samples in order to establish whether the milk was contaminated with any of the pathogens. Molecular analysis was also performed, by the method named Polymerase Chain Reaction (PCR) in order to corroborate the findings of the microbiological tests. The primers COAG2 and COAG3 were used, both of them are specific for the COA gene present in *Staphylococcus aureus* and rfbEO for the stx1, and stx2 genes, both producers of the shiga toxin, in *Escherichia coli*. In both cases, the process allowed to assure that the microorganisms were the pathogenic strains. A higher incidence of *Staphylococcus aureus* (seven cows, 10%) than of *Escherichia coli* (three cows, 4.3%) was identified, especially in younger cows (group I with 6 and 2 cows respectively), although statistically this difference was not significant.

Key Words: Mastitis, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, PCR, number of births.

CAPITULO I

ESTADO DEL ARTE

En el país, aún existe la costumbre de consumir directamente la leche sin hervirla, además de elaborar quesos y yogurt de leche cruda sin ningún control, siendo ésta vector de varias enfermedades de transmisión alimentarias. En los últimos años, las bacterias de cuatro géneros: *Campylobacter spp.*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, y *Listeria monocytogenes*, presentes en la leche cruda son los organismos que se han asociado con mayor frecuencia a brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos (Oliver, Boor, Murphy, & Murinda, 2009).

Cuando la leche se obtiene a partir de animales sanos, su conteo microbiano al momento del ordeño generalmente es bajo y los sistemas de inhibidores naturales evitan la proliferación de microorganismos durante las primeras tres o cuatro horas después del ordeño a temperatura ambiente. La contaminación microbiana de la leche cruda puede ocurrir a partir de tres fuentes principales: de la ubre (microorganismos asociados a la mastitis), de organismos ambientales que se transfieren por la suciedad de la ubre y la superficie de los pezones, así como de la inadecuada limpieza e higiene del equipo de ordeño y los utensilios (Martínez, Ribot, Villoch, et. al.,2017).

Para determinar la presencia de microorganismos perjudiciales en la leche es necesario realizar periódicamente pruebas en laboratorio, identificando correctamente a que vaca pertenece cada muestra. Los resultados del examen microbiológico pueden ser usados para la adopción de medidas específicas de control, identificación de patógenos emergentes, segregación y descarte de animales con infección crónica, evaluación de la eficacia de tratamientos y establecimiento de patrones de susceptibilidad a antimicrobianos, Ruiz, et. al, (2011) citando a Vasconcelos M.A. (2008).

1. Mastitis

Calderón & Rodríguez (2008) citan a Miller & Bartlet (2004) que definen a la mastitis bovina, como una reacción inflamatoria de la glándula mamaria, y produce alteraciones físicas y químicas en la leche, aumento del número de células somáticas por la presencia de microorganismos patógenos y finalmente cambios como es la pérdida de la funcionalidad de la glándula mamaria.

La inflamación en las mamas es causada en menor frecuencia por alergias y neoplasmas y es habitual que sea producida por lesiones (heridas y golpes) y por contaminación microbiana Bedolla & Ponce de León (2008) citando a (Menzies y Ramanoon, 2001), también puede ser causada por sustancias irritantes o la presencia de agentes infecciosos y sus toxinas que han logrado colonizar el tejido secretor (Calderón & Rodríguez, 2008).

Dependiendo la seriedad de la enfermedad se va a dar lugar a la formación de un sin número de trastornos secundarios como la fibrosis, edema inflamatorio, atrofia del tejido mamario y abscesos o gangrena en casos graves, como consecuencia final puede ocurrir la pérdida total o parcial de la ubre (Mera, Muñoz, Artieda, et. al., 2017) citando a Gazque (2008).

1.1 Mastitis Clínica

La mastitis en el ganado vacuno habitualmente se produce por microorganismos presentes en el entorno, de acuerdo al tipo de bacteria la afección puede estar acompañada de síntomas (clínica) o totalmente asintomática (subclínica) (Leigh, 1999; dos Santos et al., 2002) citado por Pastor & Bedolla (2008) que por lo general no son más que fases del proceso inflamatorio (Scaranelli & Gonzáles, 2003).

Según Ramírez, Arroyave, Cerón, et. al., (2011) la forma clínica se caracteriza por inflamación con calor, dolor, rubor y aumento de tamaño de la ubre o cambios en la apariencia de la leche, o todos los signos.

Osteras (2006) afirma que en los casos clínicos la etiología puede ser por bacterias que están presentes solamente por un corto periodo de tiempo, naturalmente desencadenando claros signos clínicos, ej. *E. coli*.

1.2 Mastitis Subclínica

En el caso de mastitis subclínicas, las células somáticas (CS) migran de la sangre hacia la leche como respuesta a la infección, aumentando con la severidad del proceso (Gómez, Santibañez, Arauc, et. al., 2015), la mastitis subclínica no conlleva cambios visibles en la leche o en la ubre, y se caracteriza por reducción en la producción láctea, alteración en la composición de la leche y presencia de componentes inflamatorios en la misma (Ramírez, Arroyave, Cerón, et. al., 2011).

Por el contrario Osteras (2006) afirma que las mastitis subclínicas pueden ser causadas por patógenos que pueden estar presentes por largos periodos de tiempo y solamente produciendo leves signos en la ubre, ej. *S. aureus*.

Kaşıkçı, Çetin , Bingöl , & Gündüz, (2012) han sugerido diferentes métodos para detección de mastitis subclínica, como California Mastitis Test (CMT), Conteo de Células Somáticas (SCC), algunos métodos bioquímicos, la presencia de patógenos en la leche, y la conductividad eléctrica (EC).

1.3 Etiología de la Mastitis

La etiología de la mastitis puede ser infecciosa, traumática o tóxica.

Mastitis Infecciosa.

Se han identificado más de 130 especies, subespecies y serovares de bacterias causantes de la enfermedad; sin embargo, más del 75% de los casos se deben a microorganismos GRAM Positivos, particularmente especies de los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus* (Scaranelli & Gonzáles, 2003).

(Ramírez, Arroyave, Cerón, et. al., 2011); Trujillo, Gallego, Ramirez, & Palacio, (2011), coinciden en que las bacterias causantes de la mastitis pueden ser clasificadas como patógenos mayores y menores de la glándula mamaria.

a) Patógenos mayores: estos se subdividen en patógenos contagiosos y ambientales.

Patógenos contagiosos: Son aquellos que viven y se multiplican en la glándula mamaria y la piel del pezón, se transmiten de animal a animal mediante el proceso del ordeño (mecánico o manual) e incluyen a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Actinomyces pyogenes* (Ramírez, Arroyave, Cerón, et. al., 2011; Trujillo, Gallego, Ramirez, & Palacio, 2011), *Corynebacterium bovis* y a especies de *Mycoplasma* (Bolaños, Trujillo, Peña, et. al., 2012) citando a Rodostist et al. (2002), también están consideradas dentro de este grupo a las enterobacterias como *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* y *Enterobacter spp.*

Patógenos ambientales: Son aquellos cuyo reservorio primario es el lugar donde viven las vacas. Estos organismos constituyen un grupo heterogéneo de géneros y especies bacterianas, siendo los más frecuentemente aislados los estreptococos y las bacterias coliformes.

Los estreptococos ambientales (EA) causantes de mastitis bovina incluyen *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus equinus* (anteriormente caracterizado como *Streptococcus bovis*), *Streptococcus equi*, *Streptococcus parauberis* y *Streptococcus canis*. Dentro de estos, *S. uberis* y *S. dysgalactiae* son los más prevalentes, causando infección intramarias (IIM) cuando se dan condiciones favorables. *Streptococcus dysgalactiae* puede comportarse tanto como un patógeno ambiental como contagioso (Rodríguez M. , 2000).

b) Patógenos menores:

Los patógenos menores incluyen *Mycoplasma spp*, *Pasteurella spp*, *Nocardia spp*, *Listeria spp*, y algunos hongos y levaduras (Ramírez, Arroyave, Cerón, et. al., 2011; Trujillo, Gallego, Ramirez, & Palacio, 2011).

1.4 Incidencia de la Mastitis

Bonifaz & Conlago (2016) citan a (Ron, 2011) y definen la incidencia como el número de nuevos casos que aparecen en una población conocida durante un periodo de tiempo. Siempre y cuando el animal no muera de una enfermedad o causa distinta durante el periodo de observación. Se interpreta como el riesgo que tiene un individuo de contraer una enfermedad dentro del periodo a riesgo.

Por lo tanto la incidencia de la mastitis sería una forma de medir la frecuencia de la enfermedad en un hato lechero.

En países tropicales se ha descrito un incremento en la incidencia de la enfermedad, lo cual lleva al productor a hacer uso de diferentes antibióticos, práctica que en los últimos tiempos se ha tratado de disminuir o evitar, dadas las consecuencias que puede tener en el animal y en el consumidor (Fernández, Ramírez, Chaves , & Arias, 2008).

Según Bonifaz & Conlago (2016) la tasa de incidencia de mastitis en Paquiestancia (Cayambe – Ecuador) es del 70% es decir el grado de la enfermedad es muy alta y tiende a subir el porcentaje, mientras que en Santa Ana (Sonora-México) es del 5.35% (Gerlach, Ayala, Denogean, et. al., 2009), en Tarimbaro (Michoacán-México) (Pastor & Bedolla, 2008) reportan una incidencia de mastitis del 43.14%, en Maria Pinto (Santiago de Chile) el porcentaje de incidencia es de 48.70% según Azocar (2001), para Antioquia (Colombia) es de 13.8% (Ramírez, Fernández, & Palacio, 2018).

2. Agentes microbianos en esta investigación

2.1 *Staphylococcus aureus*:

Una gran variedad de microorganismos han sido involucrados como causales de mastitis bovina, siendo *Staphylococcus aureus* el principal agente infeccioso por su prevalencia y patogenicidad, ocasionando más del 80% de las infecciones intramamarias (Gonzales y col., 1980; McDonald, 1984; Rampone y col., 1993; Wilson y col., 1997; Watts, 1998) citados por Pellegrino, Odierno, & Bogni (2011). Según Pereyra, Dallard, & Calvino (2014)

citando a (Calvinho & Tirante, 2005) la mastitis provocada por *S. aureus* puede mantenerse durante toda la vida del animal, iniciándose como un cuadro subclínico (asintomático) o clínico agudo que puede pasar inadvertido, finalmente se transforma en un cuadro crónico (Pereyra, Dallard, & Calvinho, 2014) citando a (Sears PM & McCarthy K.K, 2003).

Su importancia radica en que no es un patógeno obligado de la ubre, ya que se puede encontrar también en lesiones de la piel de los pezones, en las manos de los ordeñadores, en las camas, en los equipos de ordeño y en muchas ocasiones, las prácticas de manejo pueden hacer que este agente etiológico alcance el conducto del pezón y de ahí desencadene una reacción inflamatoria (Calderón & Rodríguez, 2008).

La leche procedente de ubres de vacas con infección estafilocócica puede dar origen a la contaminación de numerosos productos lácteos. Muchos brotes de intoxicación estafilocócica se han originado por el consumo de leche cruda o de quesos inadecuadamente refrigerados. Si las condiciones ambientales son favorables, *S. aureus* se multiplica en el alimento y produce enterotoxinas. Una vez elaborada la toxina no se destruye aunque el alimento se someta a ebullición durante el tiempo usual de cocimiento. Por lo tanto, puede suceder que no se encuentre estafilococos en el alimento pero que sí se encuentre su toxina (Acha & Szyfres, 2001).

Rodríguez & Jiménez (2015) afirman que en el humano, *S. aureus* es responsable de un espectro amplio de manifestaciones clínicas, que van desde infecciones cutáneas superficiales como forunculosis y foliculitis, hasta infecciones graves como neumonía necrosante, osteomielitis, bacteriemias y endocarditis.

Características:

S. aureus es una bacteria Gram (+) (Wimm et al., 2008), posee forma esférica, por lo que se le denomina coco, presenta un diámetro de 0.5 a 1.5 μm (Cervantes, García, & Salazar, 2014). La mayoría de los estafilococos son catalasa positivo (Kuroda, Ohta, Uchiyama, & Baba, 2001). Se distingue de otras especies de estafilococos por la coloración dorada de sus

colonias y el resultado positivo en las pruebas de coagulasa, fermentación del manitol y desoxirribonucleasa (Rodríguez & Vesga , 2005).

Algunas cepas de *S. aureus* son capaces de sintetizar exotoxinas que se distinguen por su acción letal, hemolítica y necrolítica. Las exotoxinas de tipo enterotóxicas y la toxina del choque tóxico -1 (TSST-1), al ponerse en contacto con el tracto gastrointestinal produce intoxicaciones alimentarias, envenenamiento, síndrome del choque tóxico (Cervantes, García, & Salazar, 2014). Una de las principales características de *S. aureus* es la resistencia relativamente elevada que presenta ante las temperaturas bajas (congelación), a la desecación, a la radiación solar y a las sustancias químicas.

2.2 *Escherichia coli*

Magariños (2000), cita que la presencia en la ubre de bacterias entéricas, entre ellas *Escherichia coli*, puede provocar pérdidas económicas cuantiosas ocasionadas por la mastitis, esto ha sido demostrado por numerosos estudios. Estas pérdidas pueden ser provocadas por: la disminución de la producción de la leche que podría llegar a un 70%, la eliminación prematura de vacas lecheras llegando a alcanzar un 6% de los animales infectados; la modificación en la composición físico-química de la leche y el pago de tratamientos médicos y asistencia veterinaria.

E. coli productor de toxina Shiga (STEC) denominada así por su similitud a las generadas por *Shigella dysenteriae*) OMS (2016), es el patógeno emergente en alimentos de mayor impacto (Pistone, Venzano, Vilte, et. al., 2005).

El bovino es considerado el principal reservorio de *E. coli*, generalmente excreta el germen en sus heces; la contaminación de la carne puede efectuarse durante la faena en el matadero al ponerla en contacto con excrementos que pudieran estar en el piso o en las manos del operario, durante el almacenamiento de las canales en el frigorífico también pueden contaminarse, además en el ordeño es probable la contaminación de la leche (Castillo, Silveira, Maya, & Cepero, 2011).

El contagio al hombre frecuentemente se debe al consumo de alimentos cárnicos y lácteos contaminados, deficientemente cocidos o sin pasteurizar, o al contacto directo con los animales o con sus heces, al consumo de agua, frutas o verduras contaminadas. También puede producirse contagio mediante el contacto con personas que se encuentren eliminando el germen (Rivero, Padola, Etcheverría, & Parma, 2004).

El término *E. coli* enterohemorrágica (ECEH), del cual está ampliamente estudiado el serotipo O157:H7, fue asignado a las cepas que ocasionan diarrea con o sin sangre, colitis hemorrágica (CH), y síndrome urémico hemolítico (SUH) en humanos (Leotta et al., 2005), y que a su vez sintetizan Stx (Toxina Shiga). El serotipo de ECEH O157:H7 se caracteriza porque no fermenta el sorbitol, ni la ramnosa y no produce β -glucuronidasa, siendo su principal reservorio el intestino del ganado bovino (Hannaoui, Villalobos, & Martínez, 2009).

Características:

E. coli es una bacteria Gram (-), en forma de bacilos cortos variando de formas cocoides a alargadas (García, 2013), mide 0.5μ de ancho por 3μ de largo, es catalasa positivo, oxidasa negativo, reduce nitrato a nitritos (Rodríguez G. , 2002), también fermenta glucosa con producción de gas (Schlegel, 2012).

E. coli sembrado en agar EMB (eosina y azul de metileno) puede presentar colonias que pueden presentar un diámetro de 2 a 4 mm, estas tienen un centro grande de color oscuro tendiendo al negro, a contraluz se puede observar un brillo verde metálico, en agar MacConkey estas son rojas con halo turbio.

Las personas contaminadas por *E. coli* (STEC) (productora de toxina Shiga) pueden desarrollar síndrome hemolítico urémico, con una tasa de letalidad de 3% - 5% (OMS, 2016). En los bovinos los más susceptibles son los lactantes produciendo en los terneros la diarrea blanca o colibacilosis. En animales adultos ocasiona, metritis, cervicitis, mastitis; también artritis, pielonefritis y onfaloflebitis (García, 2013).

3. Identificación Microbiológica

La identificación microbiológica se la puede realizar mediante métodos fenotípicos (cultivos de microorganismos en agares y caldos) y genotípicos (métodos moleculares por ejemplo: PCR). Los más utilizados hoy en día son los fenotípicos debido a que son confiables y no representan un alto costo como las técnicas de caracterización molecular.

Los esquemas tradicionales de identificación fenotípica bacteriana se basan en las características «observables» de las bacterias, como su morfología, desarrollo, y propiedades bioquímicas y metabólicas. El cultivo, cuando es factible, continúa siendo el método diagnóstico de elección; permite el aislamiento del microorganismo implicado, su identificación, el estudio de sensibilidad a los antimicrobianos y facilita la aplicación de marcadores epidemiológicos. En el cultivo es esencial la correcta elección del medio de crecimiento y las condiciones de incubación (Fernández, García, Saéz, & Valdezate, 2010).

En un ambiente natural no es frecuente encontrar un solo tipo de microorganismos, existen comunidades microbianas. Por lo que se requiere el desarrollo de métodos y procedimientos que permitan el aislamiento y cultivo del o los microorganismos de interés (Madigan, Martinko, & Parker, 2003).

CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente capítulo se describe brevemente el lugar de donde se extrajeron las muestras para la realización del estudio, los materiales y métodos utilizados para la obtención de muestras y para la determinación de los microorganismos presentes en las mismas.

Además se detalla la técnica estadística empleada para la comprobación de la hipótesis del trabajo.

2.1. UBICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR DEL ESTUDIO:

El presente trabajo se realizó utilizando la leche del ganado que se encuentra en producción de la Hacienda “La Verbena”, el predio se localiza políticamente de la siguiente manera:

- Provincia: Imbabura
- Cantón: Ibarra
- Parroquia: Angochagua

La propiedad se encuentra a una altitud de 2620 msnm, teniendo una precipitación promedio anual de 1000 a 1250 mm, una temperatura entre 8 y 10°C y los suelos son franco-arcillosos. La **Tabla 1** muestra las coordenadas donde está la finca:

Tabla 1. Coordenadas de la hacienda “La Verbena”

Punto	Longitud	Latitud
	X	y
1	823018	10029697
2	822291	10029351
3	822860	10028733

Elaborado por: el Autor

A continuación la **Figura 1** muestra un plano del predio tomado de una vista aérea.

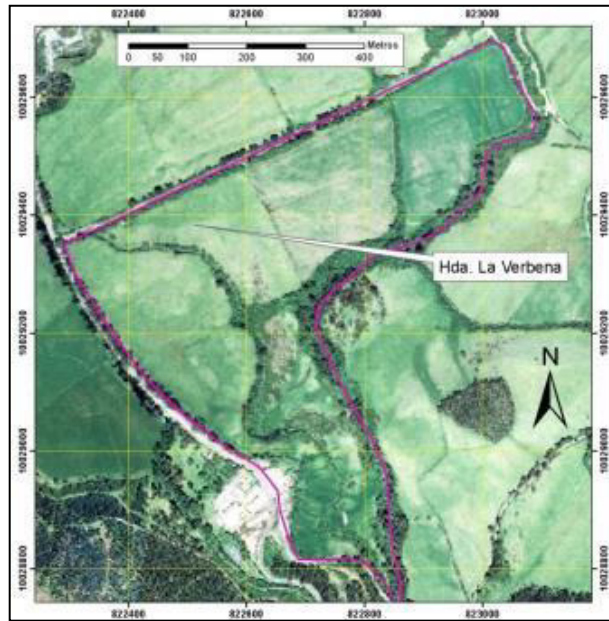


Figura 1. Vista y delimitación del predio
Fuente: SIG tierras

La planimetría del predio realizada sobre la fotografía aérea muestra un área aproximada de 29,15 ha.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Para la elaboración del presente se realizó trabajo de campo en donde se recolectó por dos ocasiones la leche de cada una de las vacas en producción, posteriormente estas fueron llevadas a laboratorio, en donde se dividió las actividades en dos: en primer lugar ensayos microbiológicos de las muestras para determinar presencia/ausencia de las bacterias estudiadas y en segundo lugar la caracterización molecular de las muestras que presentaron *E. coli* y/o *S. aureus* donde se comprobará mediante ADN que los dos microorganismos estudiados están presentes, lo antes expuesto se describe a continuación.

2.2.1. Establecimiento de hipótesis

Las hipótesis que se establecieron para el desarrollo del presente trabajo de investigación son las siguientes:

Hipótesis nula H_0 : Todos los grupos de vacas divididos por número de parto presentan infección por las bacterias en estudio.

Hipótesis alterna H_1 : Por lo menos un grupo de vacas presenta predisposición a contaminación por las bacterias en estudio.

2.2.2 Técnicas estadísticas

De acuerdo a lo aprobado en el ante proyecto de tesis, en la presente investigación, por ser de carácter prospectivo, en el que los factores (variables independientes) no se pueden manejar a gusto del investigador, no se ha creído conveniente la construcción de un diseño experimental con análisis de varianza.

Como el objetivo fundamental fue determinar si el número del parto y por tanto de lactancia es o no un factor que predispone al ganado lechero a la infección bacteriana, se ha optado por realizar la inferencia estadística a través de una tabla de contingencia en la que, a través de la aplicación de la prueba de χ^2 (chi cuadrado) se identifique las frecuencias absolutas de incidencia bacteriana en cada grupo por número de parto.

Para el efecto, se elaboró una tabla de contingencia (**Tabla 2**) para cada uno de los microorganismos que son objeto de estudio.

Tabla 2. Tabla de contingencia para la aplicación del estadístico χ^2 (chi cuadrado)

Grupo	Presencia <i>E. coli</i>	Ausencia <i>E. coli</i>	Total grupo
Grupo I	o1	o4	Tg1
Grupo II	o2	o5	Tg2
Grupo III	o3	o6	Tg3
Totales	Tc1	Tc2	GT

Elaborado por: el Autor

o1, o2, o3 representan el total de individuos infectados con la bacteria, mientras que o4, o5 y o6, son el total de vacas sin infección. Todos estos valores corresponden a las frecuencias observadas.

Para poder aplicar el estadístico χ^2 (chi cuadrado) se calculó primero las frecuencias esperadas para cada una de las celdas de la siguiente manera:

$$E1 \text{ (Para } O1): \frac{Tc1 \times Tg1}{GT}$$

Y así para cada una de las frecuencias observadas.

A continuación se aplicó el estadístico χ^2 (chi cuadrado) a la tabla de contingencia, como una medida de desviación de la distribución resultado de los datos levantados en el campo de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\chi^2 = \sum \frac{(O-E)^2}{E}$$

En donde:

O es la frecuencia observada

E es la frecuencia esperada para cada clase de observación.

La comparación del valor calculado con el valor tabular permitió decidir si existe o no diferencia en la infección entre cada grupo por número de parto.

2.2.3 Trabajo en Campo

2.2.3.1 Toma de muestras

La toma de muestras se realizó en dos oportunidades en días diferentes en la primera se trabajó con 64 muestras ya que se encontraban en ese momento vacas produciendo y en la segunda visita ocho días después se recogieron un total de 70 por que había aumentado el número de productoras.

Se dividió la población en tres grupos de acuerdo al número de partos que ha tenido, en la **Tabla 3** se puede observar el modelo de tabla utilizada para la tabulación de datos.

Tabla 3. Modelo utilizado para tabulación de datos

Grupo	# de Partos
GI	1 a 2
GII	3 a 4
GIII	5 y más
Total	

Elaborado por: el Autor

Para el muestreo se tomó una alícuota de la leche de todas las vacas que se encontraban en producción en la hacienda “La verbena”, la recolección de las muestras se realizó al inicio del ordeño luego de la limpieza de la ubre, en la primera colecta se tomó la leche de cada cuarto de la ubre luego de realizado el despunte; en la segunda ocasión se cogió la leche sin realizar el despunte, en ambos casos las muestras fueron colocadas en frascos estériles de plástico correctamente rotuladas con el número del arete de la vaca y fueron transportados en un *cooler* con hielo lo que proveía una temperatura de 4 grados centígrados al laboratorio de microbiología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador sede Ibarra, donde se realizó los ensayos microbiológicos y la caracterización molecular de los microorganismos objeto de este estudio.

2.2.4 Trabajo en Laboratorio

2.2.4.1 Ensayos microbiológicos

Estos ensayos permitieron identificar y aislar a los microorganismos objeto de estudio, en las muestras de leche colectadas.

a) *Siembra y Aislamiento de microorganismos*

Para el cultivo de las muestras recolectadas, se preparó los agares específicos escogidos para el crecimiento de las cepas de *E. coli* se utilizó Eosin Methylene Blue Agar (EMB) y para *S. aureus* el Blood Agar Base (AS); se pesó la cantidad fijada por el fabricante en el frasco para cada uno de los agares específicos: 37.5 gr por litro para EMB y 39.5 gr por litro para AS, para hidratar cada uno de los medios de cultivo se utilizó 3000 ml de agua destilada, se mezcló hasta su completa disolución y se los llevó al autoclave por 45 minutos a una

temperatura de 121°C a 1.45 atm. Se dejó enfriar un poco y en el Blood Agar Base (AS) se colocó el 6% de sangre animal para enriquecer el medio.

En cada caja Petri esterilizada previamente se dispensó 20 ml de medio de cultivo, se dejó enfriar y se colocó un 1 ml de muestra (leche), se colocó la caja tapada en la mesa y se mezcló con movimientos envolventes en forma de ocho se rotuló. Las cajas con agar y muestra se mantuvieron a 37°C en una incubadora por un lapso de 24 horas; para que el goteo de la condensación no caiga sobre la superficie del agar se colocaron con la tapa hacia abajo.

Al término de este tiempo se revisaron las cajas Petri y se identificaron las cepas correspondientes a los microorganismos de interés: para la identificación de *S. aureus* sobre el Agar sangre enriquecido se tomó como resultado positivo la hemólisis alrededor de las colonias tipo beta hemolítica (completa). Para la identificación de *E. coli* se observó el brillo verde metálico sobre las cepas.

Las colonias identificadas como *S. aureus* y *E. coli* fueron aisladas en caldo LB (Luria Bertani), este caldo de cultivo antes de ser utilizado fue esterilizado a 121°C y 1.5 atm por un lapso de 45 minutos, posteriormente fue colocado en tubos de ensayo se esperó a que llegue a una temperatura de 40°C y se sembró las colonias anteriormente referidas, se cubrieron con tapones de algodón y se mantuvieron a 35°C por un periodo de 12 horas, posteriormente fueron sometidas a tinción de Gram.

b) Tinción de Gram

Toma de muestra: con el asa bacteriológica estéril se tomó una muestra de las colonias que se desarrollaron en el caldo LB.

Fijado de muestra: antes de depositar la muestra sobre el portaobjetos este debía estar perfectamente limpio y seco, se extendió con el asa microbiológica la muestra a observar, se

pasó el portabojetos por la llama del mechero con movimientos horizontales cuidando que no se queme.

Tinción: A la muestra fijada se le cubrió con cristal violeta se dejó descansar por 45 segundos y se lavó con agua destilada el exceso del colorante. Se le colocó lugol dejando reposar sobre la muestra 45 segundos, se eliminó el excedente de colorante con agua destilada.

Se decoloró con alcohol por 15 segundos y se lavó inmediatamente con agua destilada. Finalmente en el frotis se colocó safranina como colorante de contraste por 45 segundos y se lavó, se secó el exceso de líquido con papel absorbente cuidando de no dañar la muestra.

Observación al microscopio: A la muestra tincionada se le puso aceite de inmersión y se colocó bajo el lente objetivo de 100x (lente de inmersión). Las bacterias Gram positivas (+) se tiñeron de azul-violeta y las Gram negativas (-) de color rojo.

El objetivo de realizar la tinción de Gram a las muestras aisladas en el caldo LB fue determinar cuál es el protocolo a seguir para la preparación del lisado de bacterias de acuerdo a su clasificación en Gram (+) o Gram (-).

2.2.4.2 Caracterización molecular

La caracterización molecular permitió verificar que en los análisis microbiológicos se hayan identificado correctamente las cepas de los patógenos estudiados.

Para ello es necesario multiplicar exponencialmente un gen exclusivo (diana) de la bacteria a detectar. Éste debe ser específico para cada bacteria y de secuencia altamente conservada, para evitar falsos resultados negativos. Para ello, es necesario que el juego de oligonucleótidos que vayamos a utilizar sea suficientemente específico (Newsletter Microbial # 2, 2008).

En la **Tabla 4** se observan los *Primers* obtenidos para *S. aureus*, según los autores Padilha da Silva, Silva, Pegoraro, et. al., (2003) y Vieira da Mota, Manhães Folly, & Camargo Hagen Sakiyama, (2001) y Vieira da Mota, Manhães, & Camargo, (2001).

Tabla 4. Primers para el ensayo de PCR (*Staphylococcus aureus*)

Primers	Secuencia (5' - 3')	Tamaño del producto (pb) / fuente
COAG2	ACC ACA AGG TAC TGA ATC AAC G	Variable Padilha da Silva <i>et al.</i> (2003) y
COAG3	TGC TTT CGA TTG TTC GAT GC	612 a 964 Vieira-da-Motta <i>et al.</i> (2001)

Fuente: Padilha da Silva et al., (2003) y Vieira da Mota, Manhães & Camargo, (2001).

En la **Tabla 5** se puede observar los *Primers* obtenidos para *E. coli* según lo publicado por Dong, & otros, (2015) e Inat & Siriken (2010).

Tabla 5. Primers para el ensayo de PCR (*Escherichia coli*)

Primers	Dirección	Secuencia (5' - 3')	Tamaño del producto (pb)/Fuente
rfbE0157	Adelante	GGATGACAAATATCTGCGCTGC	213
	Reverso	GGTGATTCCTTAATTCCTCTCTTTCC	Gordillo et al. (2011) en Dong et al. (2015)
flicH7	Adelante	GCGCTGTCGAGTTCTATCGAGC	625
	Reverso	CAACGGTGACTTTATCGCCATTCC	Gordillo et al. (2011) en Dong et al. (2015)
stx1	Adelante	TGTAAGTGGAAAGGTGGAGTATACA	210
	Reverso	GCTATTCTGAGTCAACGAAAATAAC	Fratamico et al. (2011) en Dong et al. (2015)
stx2	Adelante	GTTTTTCTTCGGTATCCTATTCC	484
	Reverso	GATGCATCTCTGGTCATTGTATTAC	Fratamico et al. (2011) en Dong et al. (2015)
stx1	Adelante	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC	180
	Reverso	AGAACGCCCACTGAGATCATC	Paton & Paton (1998) en Inat & Siriken (2010)
stx2	Adelante	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC	255
	Reverso	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	Paton & Paton (1998) en Inat & Siriken (2010)

Fuente: Dong, & otros, (2015) e Inat & Siriken (2010).

Para la caracterización molecular es necesario cumplir las siguientes etapas:

a) Extracción de ADN

Al término de las 12 horas de incubación del caldo LB se sustrajeron las cepas que habían crecido en el mismo con el fin de extraer el ADN de las mismas, para lo cual se utilizó el

Mini Kit (Invitrogen®) provisto por PureLink® Genomic DNA, este kit contiene 7 reactivos enumerados en el apartado de materiales y equipos.

Para la extracción de ADN (Ácido Desoxirribonucleico) se siguieron las instrucciones provistas por el fabricante, en los ítems siguientes se describe las acciones que se realizaron.

b) Preparación del lisado de bacterias Gram positivas.

Preparación del lisado: en un tubo Eppendorf de 2 ml se colocaron 1.5 ml de cultivo y se centrifugó por un minuto a 10.000 revoluciones, al finalizar se formó un pellet.

Obtención de solución homogénea: al pellet obtenido se le colocó 180µl de Lysozyme Digestion Buffer (concentración final de Lisozima: 20 mg.ml⁻¹), se mezcló en el agitador (vórtex) por 5 segundos. Esta mezcla se llevó a la incubadora por 30 minutos a una temperatura de 37°C.

Al completarse el tiempo de incubación se añadió al tubo del preparado 20 µl de Proteinase K, se agitó durante un tiempo corto la mezcla y se agregó 200 µl Genomic Lysis / Binding Buffer, se realizó la mezcla en el vórtex (agitador) por 5 segundos y se incubó a 55°C por 30 minutos. Al resultado se le agregó 200 µl de etanol (96-100%) y se mezcló hasta la obtención de una solución homogénea.

c) Preparación del lisado de bacterias Gram negativas.

Preparación del lisado: en un tubo Eppendorf de 2 ml se colocaron 1.5 ml de cultivo bacteriano y se centrifugó por un minuto a 10.000 revoluciones, al finalizar se formó un pellet.

Obtención de solución homogénea: al pellet obtenido se le colocó 180µl de Lysozyme Digestion Buffer (concentración final de Lisozima: 20 mg.ml⁻¹), a esta solución se le agregaron 20 µl de Proteinase K, inmediatamente se mezcló en el agitador (vórtex) por 5 segundos. Esta mezcla se llevó a la incubadora por 30 minutos a una temperatura de 55°C.

Luego de la incubación se le agregó a la muestra: 20 µl de RNase A, 200 µl de Genomic Lysis / Binding Buffer y 200 µl de etanol (96-100%), y se mezcló hasta la obtención de una solución homogénea.

d) Unión de ADN

Para realizar esta acción se transfirió 640 µl del lisado (solución homogénea) a una de las Columna PureLink™ (en adelante la columna giratoria) con tubo de recolección y se centrifugó a 10.000 rpm, se desechó el tubo de recolección y se colocó la columna en otro tubo de 2 ml que estuviera limpio.

e) Lavado de ADN

Al tubo de recolección limpio con la columna giratoria utilizada en el paso anterior se le colocó 500 µl de Wash Buffer 1 y se le puso a centrifugar (10.000 rpm) durante un minuto a temperatura ambiente. Se descartó el tubo de recolección con el líquido en su interior y puso la columna giratoria dentro de un nuevo tubo de recolección limpio y seco. A esto se le agregó 500 µl de Wash Buffer 2 y finalmente se centrifugó por 3 minutos a máxima velocidad.

f) Elución de ADN

Al finalizar la centrifugación se eliminó el tubo de recolección con su contenido y la columna giratoria se colocó dentro de un tubo Eppendorf de 1.5 ml estéril, se puso en el centro de la columna giratoria 100 µl de Genomic Elution Buffer y se dejó reposar a temperatura ambiente por un minuto, inmediatamente se centrifugó por el lapso de un minuto a máxima velocidad, finalmente la columna giratoria fue descartada y el tubo Eppendorf con el ADN puro fue colocado a -30°C.

g) Amplificación del ADN

Para la amplificación del ADN (Ácido Desoxirribonucleico) se utilizó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Para los dos microorganismos objetivos del presente estudio se utilizaron los *primers* rfbEO157_f y rfbEO157_R para antígeno somático y

primers flicH7_F y flicH7_R para antígeno flagelar de para las células de *E. coli*. Mientras que para las células de *S. aureus* se utilizaron *primers* específicos COAG2_F y COAG3_R.

Para cada reacción de PCR el volumen total utilizado fue de 25 µl, para obtener así una concentración ideal de ADN de 10n molar/µl, los 25 µl se repartieron de la siguiente manera, observar la **Tabla 6**:

Tabla 6. Reactivos utilizados para la PCR de antígeno somático de las células de *Escherichia coli*.

Reactivos	Volumen
Agua libre de nucleasas (DNase, RNase)	5,5 µl
Taq Polimerasa	12,5 µl
rfbEO157_Forward	1 µl
rfbEO157_Reverse	1 µl
ADN	5 µl
Volumen total	25 µl

Elaborado por: el Autor

Amplificación de ADN para *E. coli*:

Para realizar la amplificación de ADN se utilizó el termociclador (**Figura 2**) y se siguió las siguientes etapas:

1. Desnaturalización inicial: a 94°C por 5 minutos. Seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos.
2. Se realizó un alineamiento a 63.5°C por 45 segundos.
3. Elongación a 72° C por 90 segundos.
4. Desnaturalización final: a 94°C por 30 segundos.
5. Alineamiento final a 63.5°C por 45 segundos.
6. Finalmente se realizó una extensión a 4°C.

La **Tabla 7** muestra los reactivos utilizados para la PCR de *E. coli*:

Tabla 7. Reactivos utilizados para la PCR de antígeno flagelar de las células de *Escherichia coli*.

Reactivos	Volumen
Agua libre de nucleasas (DNase, RNase)	5,5 µl

Taq Polimerasa	12,5 µl
flicH7 Forward	1 µl
flicH7 Reverse	1 µl
ADN	5 µl
Volumen total	25 µl

Elaborado por: el Autor

Amplificación de ADN para *S. aureus*:

Para realizar la amplificación del Ácido Desoxirribonucleico de *S. aureus* se realizó el siguiente proceso:

1. Desnaturalización inicial: a 94°C por 5 minutos.
2. Seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos.
3. Se realizó un alineamiento a 67°C por 45 segundos.
4. Elongación a 72° C por 90 segundos.
5. Se repitieron los pasos 2 y 3.
6. Finalmente se realizó una extensión a 4°C.

Para este procedimiento se utilizó el termociclador que se muestra en la **Figura 2**.

La **Tabla 8** muestra los reactivos y el volumen en que fueron utilizados para la PCR de *S. aureus*:

Tabla 8. Reactivos utilizados para la PCR de las células *Staphylococcus aureus*

Reactivos	Volumen
Agua libre de nucleasas (DNase, RNase)	5,5 µl
Taq Polimerasa	12,5 µl

COAG2_Forward	1 μ l
COAG3_Reverse	1 μ l
ADN	5 μ l
Volumen total	25 μl

Elaborado por: el autor.



Figura 2. Termocicladores para PCR.

Fuente: Laboratorio de Biotecnología Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra.

h) Electroforesis en gel de agarosa

Se preparó el gel de agarosa al 2% agregando 5 μ l de Diamond™ Nucleic Acid Dye en varios pocillos y se dejó reposar (polimerizar) por 15 minutos, cuando ya estaba listo se colocó en el equipo de electroforesis; a cada pocillo que contenía el gel polimerizado se le agregó con una micropipeta 5 μ l del indicador de peso molecular PCR markers (50) lanes PROMEGA, a estos se les adicionó el producto resultante de la amplificación de ADN de *E. coli* y *S. aureus*.

Cuando todos los pocillos estuvieron listos fueron colocados en la cámara de electroforesis que se encontraba previamente cargada con una solución buffer: TAE 1X (40 mm Tris-acetato y 1mm EDTA) que tiene un pH 8.3 y a una temperatura de 25°C, se tapó el equipo

y se colocaron los electrodos en la fuente de energía. Se realizó la electroforesis a 90 voltios (V) y a 500 miliAmperios (mA) por un periodo de 45 minutos.

En la **Figura 3** se puede ver como se armaron las cámaras de electroforesis y su funcionamiento:



Figura 3. Electroforesis en gel de Agarosa.

Fuente: Laboratorio de Biotecnología Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra.

i) Observación de OTU's

Al terminar el proceso de electroforesis se colocó el gel en un equipo transiluminador de luz ultra violeta, con el uso de este aparato se pudieron visualizar las bandas formadas, se foto documentó el resultado con una cámara digital Nikon. Finalmente las fotografías con los patrones de bandas revelados en el gel fueron identificados.

La **Figura 4** muestra la revelación del gel para poder observar los resultados finales.

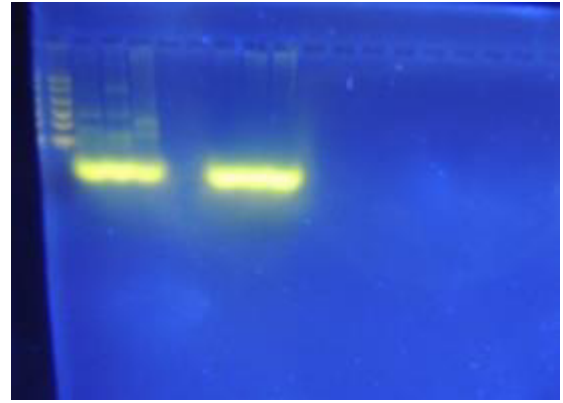


Figura 4. Transiluminador UV

Fuente: Laboratorio de Biotecnología Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra.

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 PRESENTACION DE LOS RESULTADOS Y DISCUSION.

De la revisión de la literatura específica del tema, es necesario manifestar que aunque se han identificado estudios particulares que son tópicos de esta investigación, no se encontró una investigación única que se refiera a los dos patógenos: *S. aureus* y *E. coli* y que, utilicen tanto análisis microbiológicos y moleculares.

Corroborando lo expuesto por Martínez, Ribot, Villoch, et. al., (2017), la leche recién ordeñada de la mayoría de las vacas de la hacienda La Verbena, se encuentra en condiciones adecuadas para su consumo: densidad entre 1,028 a 1,034 g/L y negatividad a la prueba del CMT.

Sin embargo 10 vacas reportaron la presencia de patógenos en sus muestras, 7 animales (10%) del total presentaron *S. aureus*, mientras que 3 (4,3%) contenían *E.coli*. Esta información, contrastada con la de otros estudios realizados en el medio como el de Bonifaz & Conlago (2016), quienes demuestran una incidencia de 60% para *S. aureus* y 20% para coliformes fecales, expone un manejo sanitario moderadamente bueno para evitar la mastitis en la hacienda “La Verbena”.

Como se mencionó anteriormente, la identificación de las bacterias se realizó utilizando tanto técnicas microbiológicas como de biología molecular. El análisis microbiológico para cada uno de los patógenos se realizó en dos ocasiones, que se han denominado repeticiones para efectos del presente trabajo.

En el anexo de Resultados se puede observar el listado general de vacas muestreadas y sus resultados. A continuación se presentan los resultados una vez tabulados esos datos, los mismos que se han organizado de la siguiente manera: Presencia, Descripción de la

incidencia, Análisis estadístico, Caracterización molecular; en primer lugar para *S. aureus* y luego para *E.coli*.

3.1.1 Presencia de *Staphylococcus aureus*.

En la primera repetición se identificaron seis vacas con leche contaminada por *S. aureus*, de un total de 64, como se muestra en la **Tabla 9**:

Tabla 9. Vacas con positivo a *Staphylococcus aureus* (Primera Repetición)

Número de arete	Número de partos	Presencia de <i>S. aureus</i>
84	2	positivo
102	1	positivo
142	1	positivo
144	1	positivo
148	1	positivo
32	6	positivo

Elaborado por: el Autor

En la **Tabla 10** correspondiente a la segunda repetición, en cambio, solamente dos vacas de 70 mostraron contaminación por *S. aureus*:

Tabla 10. Vacas con positivo a *Staphylococcus aureus* (Segunda Repetición)

Número de arete	Número de partos	Presencia de <i>S. aureus</i>
132	1	positivo
144	1	positivo

Elaborado por: el Autor

Después de realizar las tinciones y cultivos correspondientes, descritos en el acápite de Metodología, se comprobó la existencia de una bacteria de reacción positiva a la tinción de Gram, de color violeta, forma esférica y acomodados en grandes racimos como lo exponen Cervantes, García, & Salazar, (2014), llegándose a determinar que es *S. aureus*.

Bajo el microscopio, *S. aureus* se muestra como un coco Gram (+), y se visualizan como corpúsculos de forma esférica de color violeta, como se puede apreciar en la **Figura 5**:

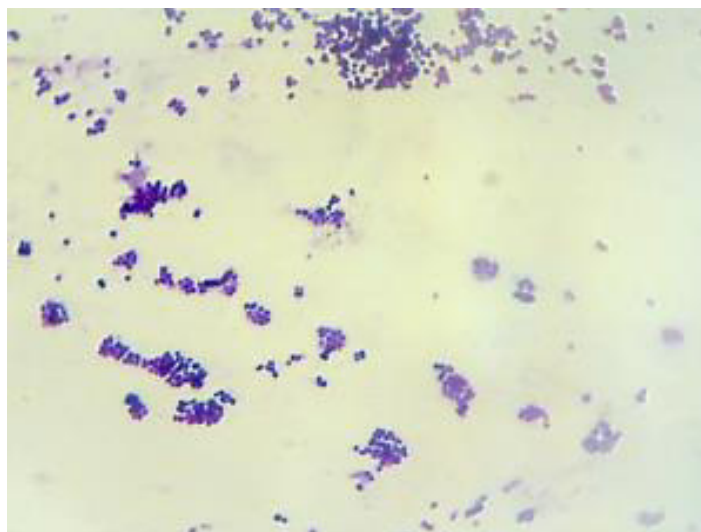


Figura 5. Muestra número 32, resultado positivo en tinción Gram (+) para *Staphylococcus aureus*

Fuente: el Autor

3.1.1.1. Descripción de la incidencia de *Staphylococcus aureus*.

a) Primera repetición

Los resultados para la primera repetición en el análisis microbiológico de *S. aureus*, se muestra en la **Tabla 11**, en donde se puede observar que de las 64 vacas muestreadas, 46 pertenecen al grupo I, (de 1 a 2 partos), nueve al grupo II (de 3 a 4 partos), y nueve al grupo III (más de 5 partos).

Del Grupo I cuyo total es 46 vacas, cinco presentan presencia de *S. aureus* en su leche, siendo el que tiene mayor incidencia de este microorganismo, el Grupo II no presenta casos positivos, y el Grupo III de un total de 9 vacas solamente una es positiva a *S. aureus*.

Tabla 11. Resultados correspondientes a presencia-ausencia de *Staphylococcus aureus* (Primera Repetición)

Grupo	Presencia <i>S. aureus</i>	Ausencia <i>S. aureus</i>	Total Grupo
Grupo I: de 1 a 2 partos	5	41	46
Grupo II: de 3 a 4 partos	0	9	9
Grupo III: de 5 + partos	1	8	9
Total	6	58	64

Elaborado por: el Autor

Las siguientes Figuras permiten visualizar con más claridad la información mencionada anteriormente.

La **Figura 6**, permite visualizar que, de las 46 vacas del grupo I, cinco vacas correspondiente al 11% muestran presencia de *S. aureus*, mientras que en las 41 restantes (89%) no se ha identificado el patógeno.

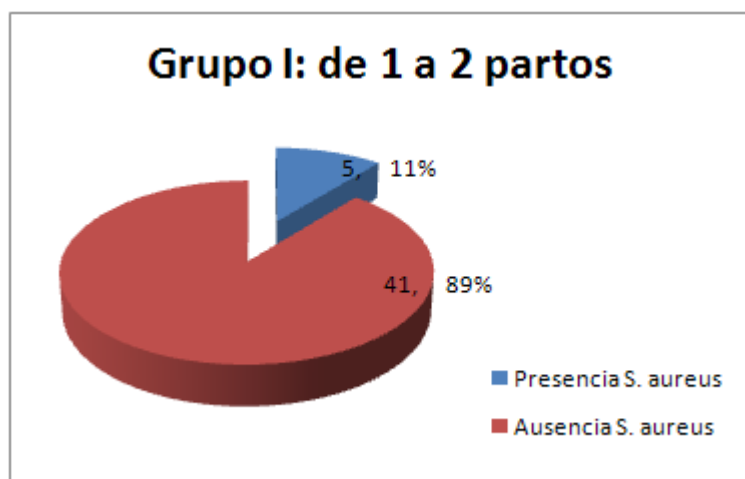


Figura 6. Número y porcentaje de vacas del grupo I con presencia de *Staphylococcus aureus*

Elaborado por: el Autor

En la **Figura 7**, se muestra que ninguna de las nueve vacas del grupo II es decir el 0%, muestran presencia de *S. aureus*, lo que indicaría que 100% están sanas.

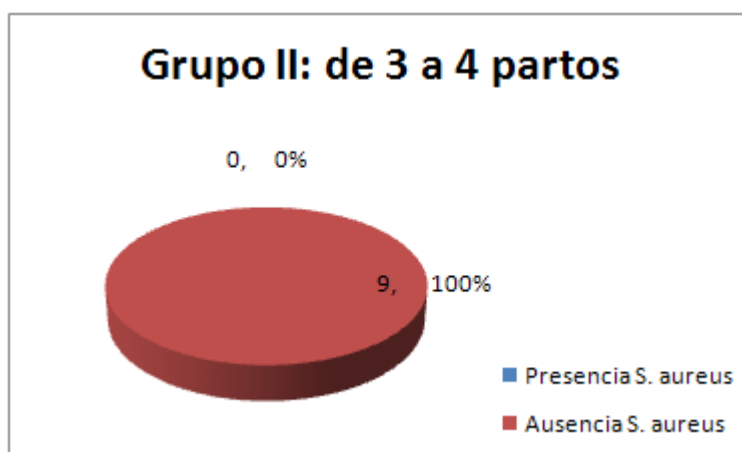


Figura 7. Número y porcentaje de vacas del grupo II con presencia de *Staphylococcus aureus*
 Elaborado por: el Autor

La **Figura 8** por su parte, muestra que de la totalidad de las nueve vacas del grupo III, solamente 1 que corresponde al 11% se encuentra infectada con *S. aureus*, mientras que el resto se encuentran sanas.

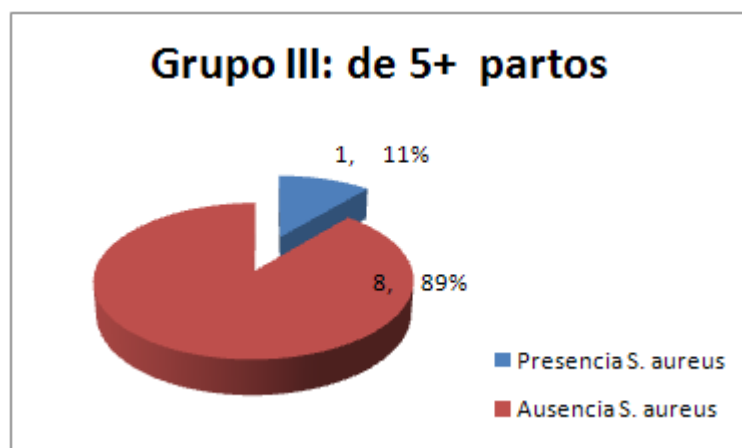


Figura 8. Número y porcentaje de vacas del grupo III con presencia de *Staphylococcus aureus*
 Elaborado por: el Autor

b) Segunda repetición

Los resultados para la segunda repetición en el análisis microbiológico de *S. aureus*, se reportan en la **Tabla 12**, en donde se puede observar que de las 70 vacas muestreadas, 50 pertenecen al grupo I, (de 1 a 2 partos), 10 al grupo II (de 3 a 4 partos), y 10 al grupo III (más de 5 partos).

Tabla 12. Resultados correspondientes a presencia-ausencia de *Staphylococcus aureus* (Segunda repetición)

Grupo	Presencia <i>S. aureus</i>	Ausencia <i>S. aureus</i>	Total Grupo
Grupo I: de 1 a 2 partos	2	48	50
Grupo II: de 3 a 4 partos	0	10	10
Grupo III: de 5 + partos	0	10	10
Total	2	68	70

Elaborado por: el Autor

De estos totales, la presencia de *S. aureus* se identifica en dos vacas del grupo I, ninguna del grupo II y, también ninguna del grupo III. Las siguientes Figuras permiten visualizar con más claridad la información mencionada anteriormente.

La **Figura 9**, permite visualizar que, de las 50 vacas del grupo I, dos vacas correspondiente al 4% muestran presencia de *S. aureus*, mientras que en las 48 restantes (96%) no se ha identificado el patógeno.

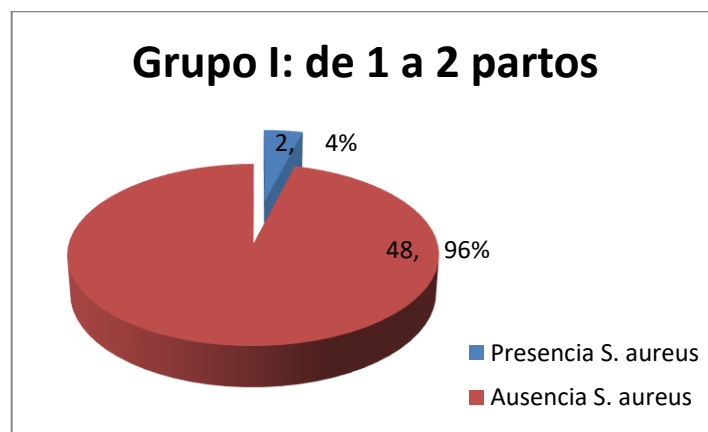


Figura 9. Número y porcentaje de vacas del grupo I con presencia de *Staphylococcus aureus*

Elaborado por: el Autor

Así mismo en la **Figura 10**, se muestra que ninguna (0%) de las 10 vacas del grupo II, muestran presencia de *S. aureus*.

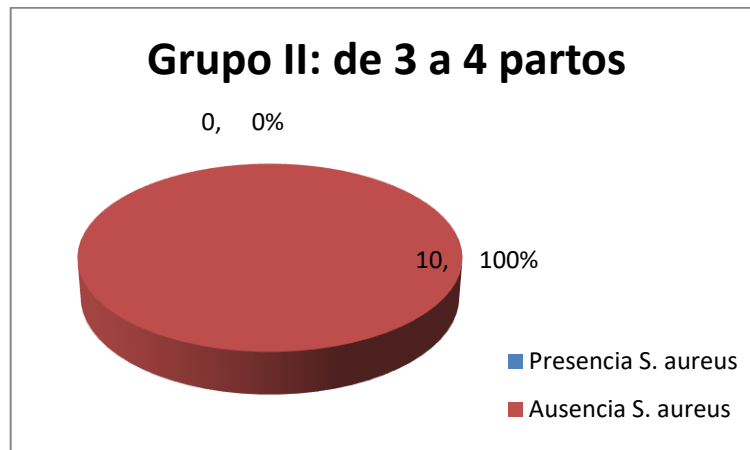


Figura 10. Número y porcentaje de vacas del grupo II con presencia de *Staphylococcus aureus*
 Elaborado por: el Autor

La **Figura 11**, muestra que ninguna de las 10 vacas del grupo III se encuentra infectada con *S. aureus*.

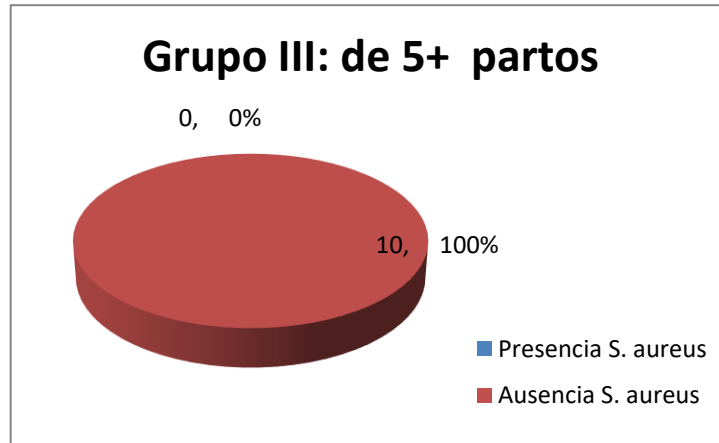


Figura 11. Número y porcentaje de vacas del grupo III con presencia de *Staphylococcus aureus*
 Elaborado por: el Autor

Es necesario mencionar que una sola vaca en los dos muestreos repite positivo al análisis de *S.aureus*, lo que deja demostrada su persistencia, acorde a lo manifestado por Pereyra, Dallard, & Calvino, (2014).

3.1.1.2 Análisis estadístico para *Staphylococcus aureus*.

En cada una de las repeticiones se construyó para mejor visualización una tabla constituida por las observaciones o los valores observados, los valores esperados calculados, su diferencia y el cuadrado de la misma, y los valores parciales de χ^2 . Su sumatoria constituye el valor calculado de χ^2 .

En todos los casos de la presente investigación, el número de grados de libertad es (grupos-1)x(estados-1) o sea (3-1)x(2-1)

Es decir GL=2

a) *Primera repetición*

La **Tabla 13**, muestra los cálculos realizados de acuerdo a lo expuesto en el numeral anterior referente a la técnica estadística usada.

Tabla 13. Cálculo de χ^2 en la primera repetición para *Staphylococcus aureus*

Observados (O)	Esperados (E)	O-E	(O-E) ²	(O-E) ² /E
5	4,3125	0,6875	0,4727	0,1096
0	0,8438	-0,8438	0,7119	0,8438
1	0,8438	0,1563	0,0244	0,0289
41	41,6875	-0,6875	0,4727	0,0113
9	8,1563	0,8438	0,7119	0,0873
8	8,1563	-0,1563	0,0244	0,0030
64	64,0000	0,0000	2,4180	1,0839

Elaborado por: el Autor

El valor calculado de χ^2 es 1,0839

Para dos grados de libertad los valores críticos tabulares de χ^2 :

$$\chi^2_{\alpha=0.05} = 5.991$$

$$\chi^2_{\alpha=0.01} = 9.210$$

Por lo tanto al enfrentar el valor calculado al valor tabular, se determina que se rechaza H_0 , es decir que el grupo de edad no predispone la presencia de *S. aureus* en la leche de las vacas.

b) Segunda repetición

A manera de confirmación se realizó una segunda repetición. El cálculo estadístico se encuentra en la **Tabla 14**.

Tabla 14. Cálculo de χ^2 en la segunda repetición para *Staphylococcus aureus*

Observados (O)	Esperados (E)	O-E	(O-E) ²	(O-E) ² /E
2	1,4286	0,5714	0,3265	0,2286
0	0,2857	-0,2857	0,0816	0,2857
0	0,2857	-0,2857	0,0816	0,2857
48	48,5714	-0,5714	0,3265	0,0067
10	9,7143	0,2857	0,0816	0,0084
10	9,7143	0,2857	0,0816	0,0084
70	70,0000	0,0000	0,9796	0,8235

Elaborado por: el Autor

El valor calculado de χ^2 es 0,8235

Para dos grados de libertad los valores críticos tabulares de χ^2 :

$$\chi^2_{\alpha=0.05} = 5.991$$

$$\chi^2_{\alpha=0.01} = 9.210$$

Por lo tanto al enfrentar el valor calculado al valor tabular, se determina que se rechaza H_0 , es decir que el grupo de edad no predispone la presencia de *S. aureus* en la leche de las vacas.

3.1.1.3 Caracterización molecular de *Staphylococcus aureus*.

La identificación del Acido Desoxirribonucleico de las bacterias por medio del método de Reacción en Cadena de la Polimerasa también conocido por sus siglas en inglés PCR, permitió, a través de la amplificación de un fragmento del ADN obtener los siguientes resultados:

Para la identificación de *S. aureus* se realizó una primera corrida en la cámara de electroforesis sobre un sustrato de gel de agarosa al 2%, con ADN de muestras positivas al ensayo microbiológico y con los *primers* COAG2 y COAG3, específicos para el gen COA de *S. aureus*.

La amplificación de los carriles (columnas) indica la posición de los genes y los pares de bases calculados a partir de la secuencia del marcador molecular. Su fotografía se puede observar en la **Figura 12**.

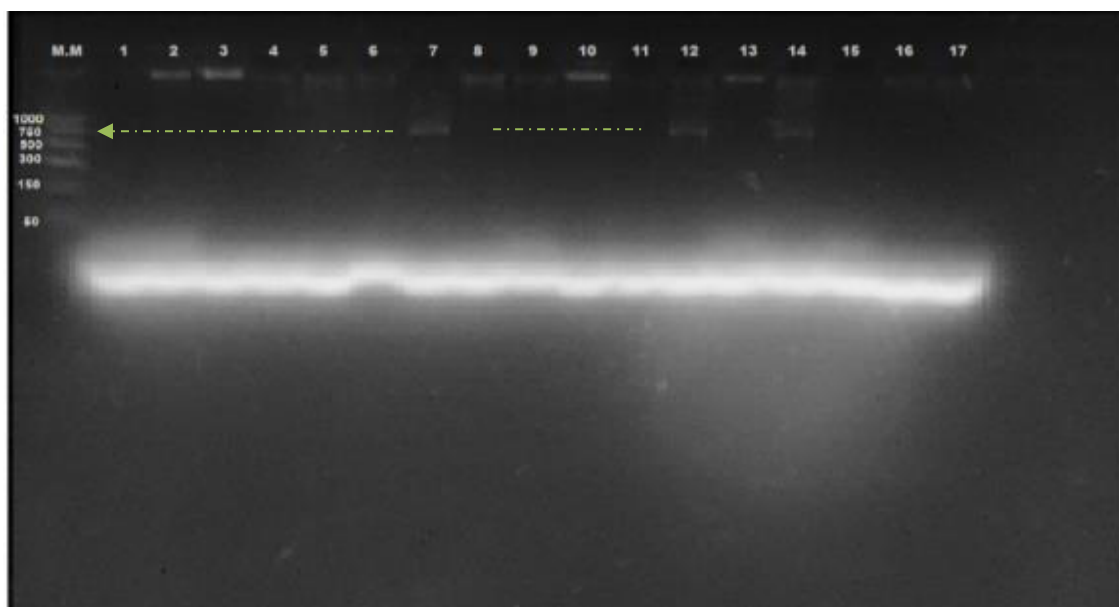


Figura 12. Primera corrida de electroforesis de *Staphylococcus aureus* en gel de agarosa
Fuente: el Autor

En el carril M.M. se colocó el marcador molecular (PCR Markers (50) lanes PROMEGA), que permite marcar 50, 150, 300, 500, 750 and 1000 bp en 6 bandas.

En el carril 7: ADN perteneciente a la muestra número 144 (segunda repetición), con el *primer* gen COAG2 y COAG3, presenta 750 bp, indicativo de positivo para la cepa *S. aureus*.

En el carril 12: ADN perteneciente a la muestra número 132 (segunda repetición), con el *primer* gen COAG2 y COAG3, presenta 750 bp, indicativo de positivo para la cepa *S. aureus*.

En el carril 14: ADN perteneciente a la muestra número 144 (primera repetición), con el *primer* gen COAG2 y COAG3 presenta 750 bp, indicativo de positivo para la cepa *S. aureus*,

La segunda corrida también se realizó para la identificación de *S. aureus*. Al igual que la anterior, en la cámara de electroforesis sobre un sustrato de gel de agarosa al 2%, con ADN de muestras positivas al ensayo microbiológico y con los *primers* COAG2 y COAG3, específicos para el gene COA de *S. aureus*.

Su fotografía se puede observar en la **Figura 13**:

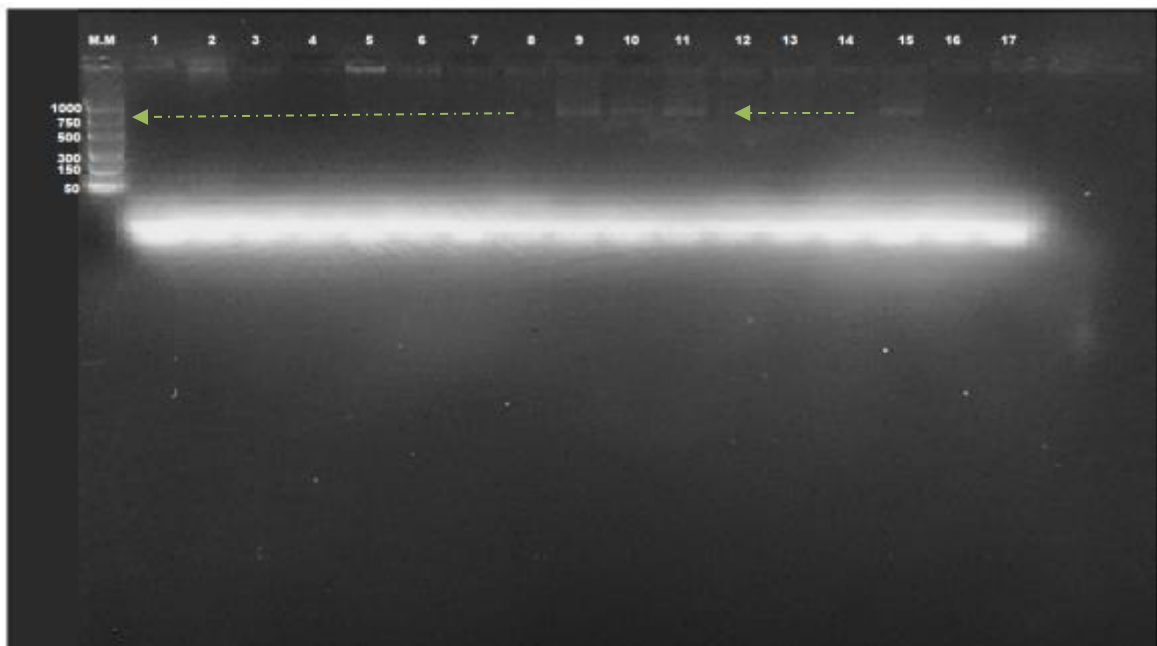


Figura 13. Segunda corrida de electroforesis de *Staphylococcus aureus* en gel de agarosa

Fuente: el Autor

En el carril M.M. se colocó el marcador molecular (PCR Markers (50) lanes PROMEGA), que permite marcar 50, 150, 300, 500, 750 y 1000 bp en 6 bandas.

En el carril 9: ADN perteneciente a la muestra número 148 (primera repetición), con el primer gen COAG2 y COAG3, presenta 750 bp, indicativo de positivo para la cepa *S. aureus*.

En el carril 10: ADN perteneciente a la muestra número 102 (primera repetición) con el primer gen COAG2 y COAG3, presenta 750 bp, indicativo de positivo para la cepa *S. aureus*.

En el carril 11: ADN perteneciente a la muestra número 142 (primera repetición) con el primer gen COAG2 y COAG3, presenta 750 bp, indicativo de positivo para la cepa *S. aureus*.

En el carril 15: ADN perteneciente a la muestra número 32 (primera repetición) con el primer gen COAG2 y COAG3, presenta 750 bp, indicativo de positivo para la cepa *S. aureus*.

En el carril 17: ADN perteneciente a la muestra número 84 (primera repetición) con el primer gen COAG2 y COAG3, presenta 750 bp, indicativo de positivo para la cepa *S. aureus*.

En general se puede mencionar, que el análisis molecular de los aislados de *S. aureus* dió como resultado la amplificación de las bandas en el área de 750 pb, que se encuentra dentro del rango de 612 a 964 pb, manifestados por Vieira da Mota, Manhães, & Camargo, (2001). Esto significa que la cepa de *S. aureus*, contiene los genes COAG2 – COAG3.

En la **Figura 14** se puede observar, a manera de patrón de comparación, la amplificación de los genes COAG2 y COAG3, en donde las columnas 12, 22, 27, 29, 31, 43, 49, 52, 55 y 64 corresponden a productos de *S. aureus*, según Padilha da Silva et al., (2003) que se ubican dentro del rango de 612 a 964 pb, concordante con los resultados obtenidos (750pb).

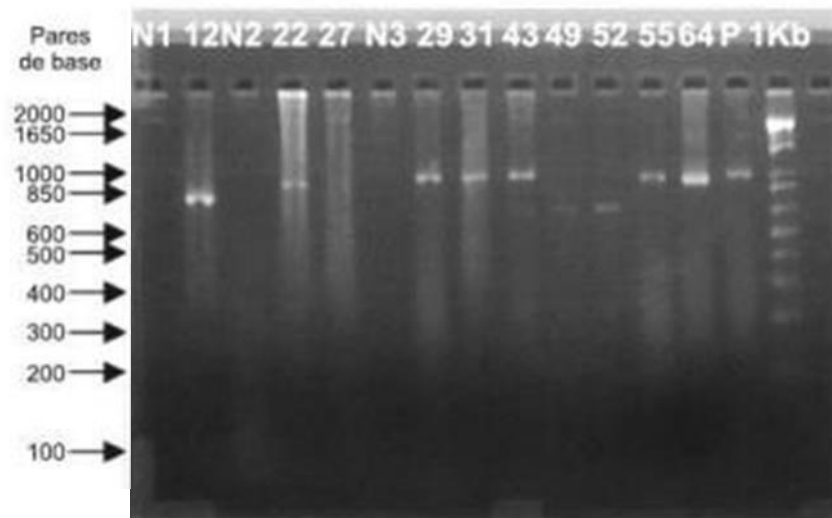


Figura 14. Patrón de comparación. Amplificación de los genes COAG2 y COAG3 en aislado de *Staphylococcus aureus*

Fuente: Padilha da Silva et al., (2003).

3.1.2 Presencia de *Escherichia coli*.

En la primera repetición se identificó solamente una vaca con leche contaminada por *E. coli*, de un total de 64, como se muestra en la **Tabla 15**:

Tabla 15. Vacas con positivo a *Escherichia coli* (Primera Repetición)

Número de arete	Número de partos	Presencia de <i>E.coli</i>
142	1	positivo

Elaborado por: el Autor

En la segunda repetición, en cambio, dos vacas de un total de 70 mostraron contaminación por *E. coli*, como se muestra en la **Tabla 16**:

Tabla 16. Vacas con positivo a *Escherichia coli* (Segunda Repetición)

Número de arete	Número de partos	Presencia de <i>E.coli</i>
-----------------	------------------	----------------------------

82	1	positivo
74	3	positivo

Elaborado por: el Autor

Al igual que para la bacteria anterior, después de realizar las tinciones y cultivos correspondientes, descritos en el acápite de Metodología, se comprobó la existencia de una bacteria que encaja exactamente en las características expuestas por García (2013), reacción negativa a la tinción de Gram, de color rosado tenue, en forma de bastones aislados o en cadenas cortas. Al microscopio, como se observó en la **Figura 15**, se trata inequívocamente de *E. coli*, la otra bacteria aislada e identificada.

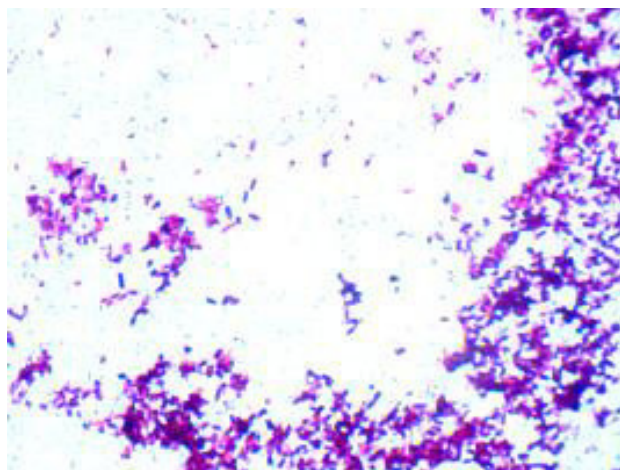


Figura 15. Muestra número 142, resultado positivo de tinción Gram (-) para *Escherichia coli*.

Fuente: el Autor

3.1.2.1 Descripción de la incidencia de *Escherichia coli*.

a) Primera repetición

Los resultados para la primera repetición en el análisis microbiológico de *E. coli*, se muestran en la **Tabla 17**, en donde se puede observar que de las 64 vacas muestreadas, 46 pertenecen al grupo I, (de 1 a 2 partos), nueve al grupo II (de 3 a 4 partos), y nueve al grupo III (más de 5 partos).

Tabla 17. Resultados correspondientes a presencia-ausencia de *Escherichia coli* (Primera Repetición)

Grupo	Presencia <i>E. coli</i>	Ausencia <i>E. coli</i>	Total Grupo
Grupo I: de 1 a 2 partos	1	45	46

Grupo II: de 3 a 4 partos	0	9	9
Grupo III: de 5 + partos	0	9	9
Total	1	63	64

Elaborado por: el Autor

De estos totales, la presencia de *E. coli* se identifica en una vaca del grupo I, ninguna del grupo II y, ninguna del grupo III. Las siguientes Figuras permiten visualizar con más claridad la información mencionada anteriormente.

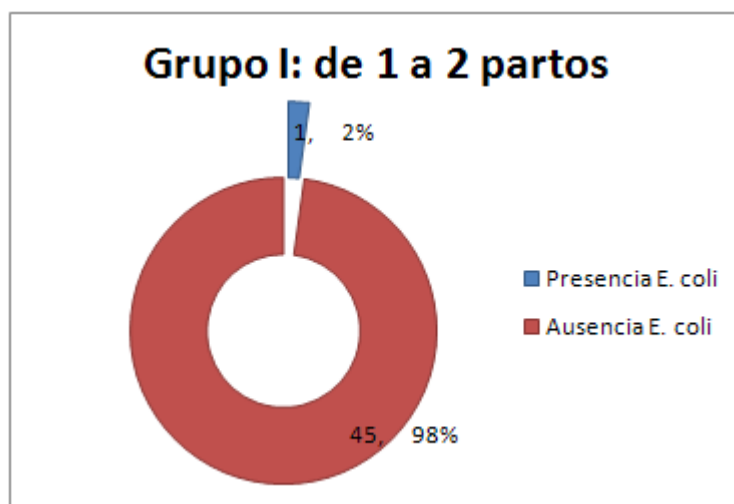


Figura 16. Número y porcentaje de vacas del grupo I con presencia de *Escherichia coli*

Elaborado por: el Autor

La **Figura 16**, permite visualizar que, de las 46 vacas del grupo I, una vaca correspondiente al 2%, muestra presencia de *E. coli*, mientras que las 45 restantes (98%) no muestran presencia del patógeno.

Así mismo en la **Figura 17**, se muestra que ninguna (0%) de las nueve vacas del grupo II, muestran presencia de *E. coli*.

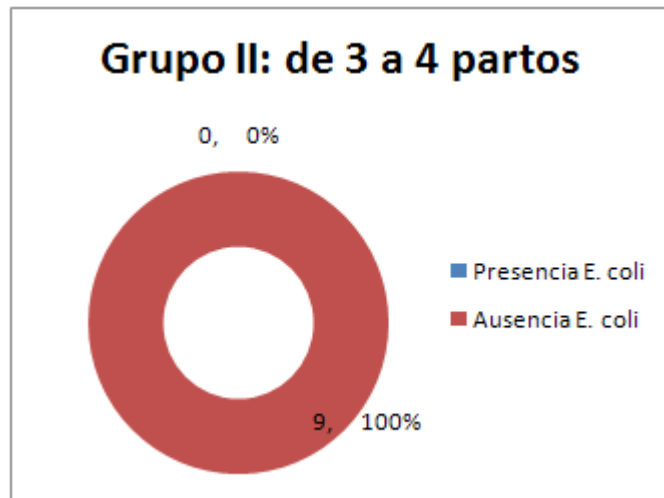


Figura 17. Número y porcentaje de vacas del grupo II con presencia de *Escherichia coli*
 Elaborado por: el Autor

La **Figura 18** por su parte, muestra que el 100% de la totalidad de las nueve vacas del grupo III, se encuentran libres de infección por *E. coli*.

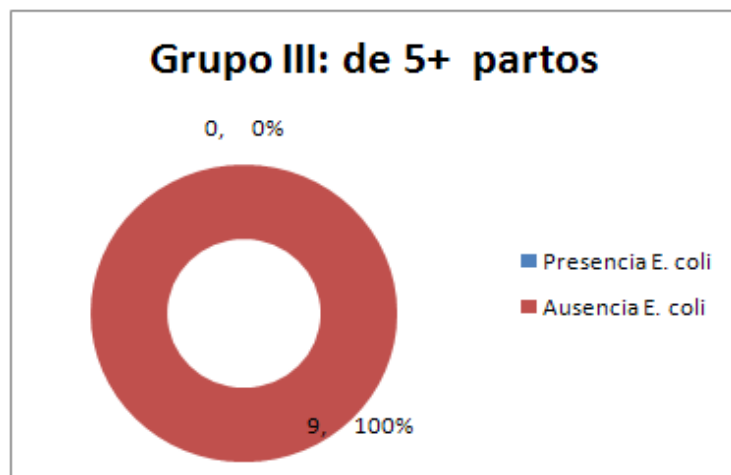


Figura 18. Número y porcentaje de vacas del grupo III con presencia de *Escherichia coli*
 Elaborado por: el Autor

b) Segunda repetición

Los resultados para la segunda repetición en el análisis microbiológico de *E. coli*, se muestran en la **Tabla 18**, en donde se puede observar que de las 70 vacas muestreadas, 50

pertenecen al grupo I, (de 1 a 2 partos), 10 al grupo II (de 3 a 4 partos), y 10 al grupo III (más de 5 partos).

Tabla 18. Resultados correspondientes a presencia-ausencia de *Escherichia coli* (Segunda Repetición)

Grupo	Presencia <i>E. coli</i>	Ausencia <i>E. coli</i>	Total Grupo
Grupo I: de 1 a 2 partos	1	49	50
Grupo II: de 3 a 4 partos	1	9	10
Grupo III: de 5 + partos	0	10	10
Total	2	68	70

Elaborado por: el Autor

De estos totales, la presencia de *E. coli* se identifica en una vaca del grupo I, una del grupo II y, ninguna del grupo III. Las siguientes Figuras permiten visualizar con más claridad la información mencionada anteriormente.

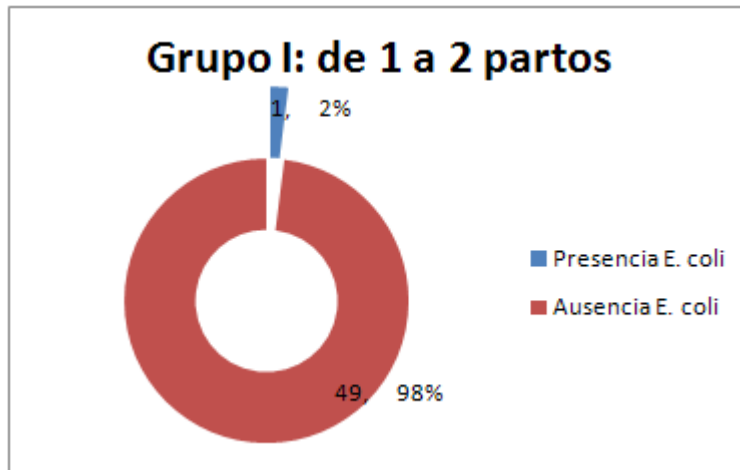


Figura 19. Número y porcentaje de vacas del grupo I con presencia de *Escherichia coli*

Elaborado por: el Autor

La **Figura 19**, permite visualizar que, de las 50 vacas del grupo I, una vaca correspondiente al 2% muestra presencia de *E. coli* mientras que las 49 restantes es decir el 98% no muestran presencia del patógeno.

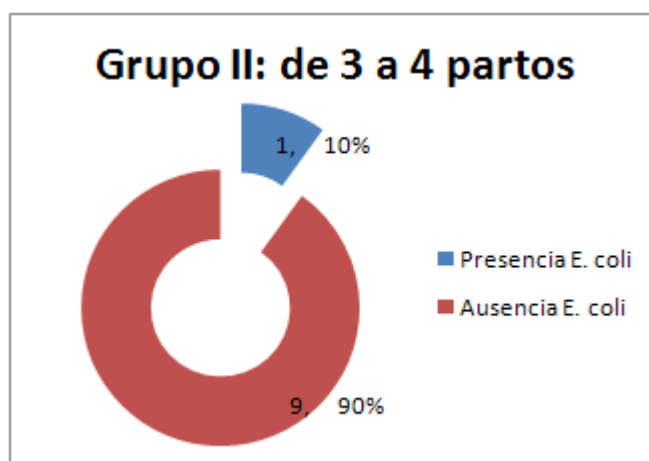


Figura 20. Número y porcentaje de vacas del grupo II con presencia de *Escherichia coli*
 Elaborado por: el Autor

La **Figura 20** por su parte, muestra que una (10%) de las diez vacas del grupo II, muestran presencia de *E. coli*, mientras que las 9 restantes (90%) no lo muestran.

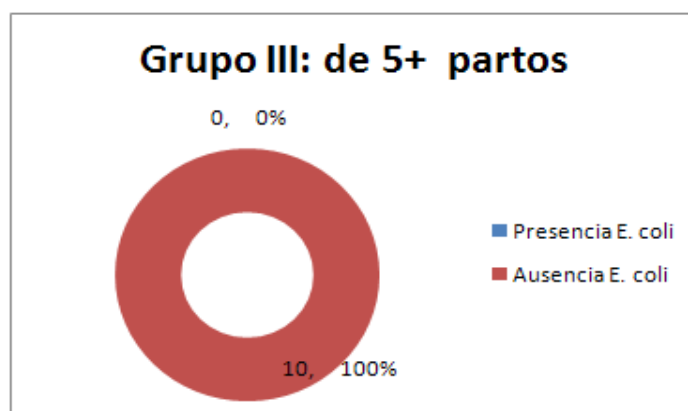


Figura 21. Número y porcentaje de vacas del grupo III con presencia de *Escherichia coli*
 Elaborado por: el Autor

La **Figura 21** en cambio, muestra que el 100% de la totalidad de las 10 vacas del grupo III, se encuentran libres de infección por *E. coli*.

3.1.2.2 Análisis estadístico para *Escherichia coli*.

Al igual que en el caso anterior, en cada una de las repeticiones se tiene una tabla constituida por las observaciones o los valores observados, los valores esperados calculados, su

diferencia y el cuadrado de la misma, y los valores parciales de χ^2 . Su sumatoria constituye el valor calculado de χ^2 .

Igualmente, el número de grados de libertad es (grupos-1)x(estados-1) o sea (3-1)x(2-1)

Es decir GL=2

a) Primera repetición

La **Tabla 19**, muestra los cálculos realizados de acuerdo a lo expuesto en el numeral referente a la técnica estadística usada.

Tabla 19. Cálculo de χ^2 en la primera repetición para *Escherichia coli*

Observados (O)	Esperados (E)	O-E	(O-E) ²	(O-E) ² /E
1	0,7188	0,2813	0,0791	0,1101
0	0,1406	-0,1406	0,0198	0,1406
0	0,1406	-0,1406	0,0198	0,1406
45	45,2813	-0,2813	0,0791	0,0017
9	8,8594	0,1406	0,0198	0,0022
9	8,8594	0,1406	0,0198	0,0022
64	64,0000	0,0000	0,2373	0,3975

Elaborado por: el autor

El valor calculado de χ^2 es 0,3975

Para dos grados de libertad los valores críticos tabulares de χ^2 :

$$\chi^2_{\alpha=0.05} = 5.991$$

$$\chi^2_{\alpha=0.01} = 9.210$$

Por lo tanto al enfrentar el valor calculado al valor tabular, se determina que se rechaza H_0 , es decir que el grupo de edad no predispone la presencia de *E. coli* en la leche de las vacas.

b) Segunda repetición

A manera de confirmación se realizó una segunda repetición. El cálculo estadístico se encuentra en la **Tabla 20**.

Tabla 20. Cálculo de χ^2 en la segunda repetición para *Escherichia coli*

Observados (O)	Esperados (E)	O-E	(O-E) ²	(O-E) ² /E
1	1,4286	-0,4286	0,1837	0,1286
1	0,2857	0,7143	0,5102	1,7857
0	0,2857	-0,2857	0,0816	0,2857
49	48,5714	0,4286	0,1837	0,0038
9	9,7143	-0,7143	0,5102	0,0525
10	9,7143	0,2857	0,0816	0,0084
70	70,0000	0,0000	1,5510	2,2647

Elaborado por: el autor

El valor calculado de χ^2 es 2,2647

Para dos grados de libertad los valores críticos tabulares de χ^2 :

$$\chi^2_{\alpha=0.05} = 5.991$$

$$\chi^2_{\alpha=0.01} = 9.210$$

Por lo tanto al enfrentar el valor calculado al valor tabular, se determina que se rechaza H_0 , es decir que el grupo de edad no predispone la presencia de *E. coli* en la leche de las vacas.

3.1.2.3 Caracterización molecular de *Escherichia coli*.

En cuanto se refiere a la caracterización molecular de *E. coli*, se presentan los resultados de su correspondiente corrida en gel de agarosa al 2%. En esta se ha conservado el mismo marcador molecular y se ha sustituido el *primer*, con el genrfbEO, que amplifica 225 bp cuando encuentra el gen stx2 y 180 bp cuando encuentra el gen stx1, ambos productores de la toxina shiga.

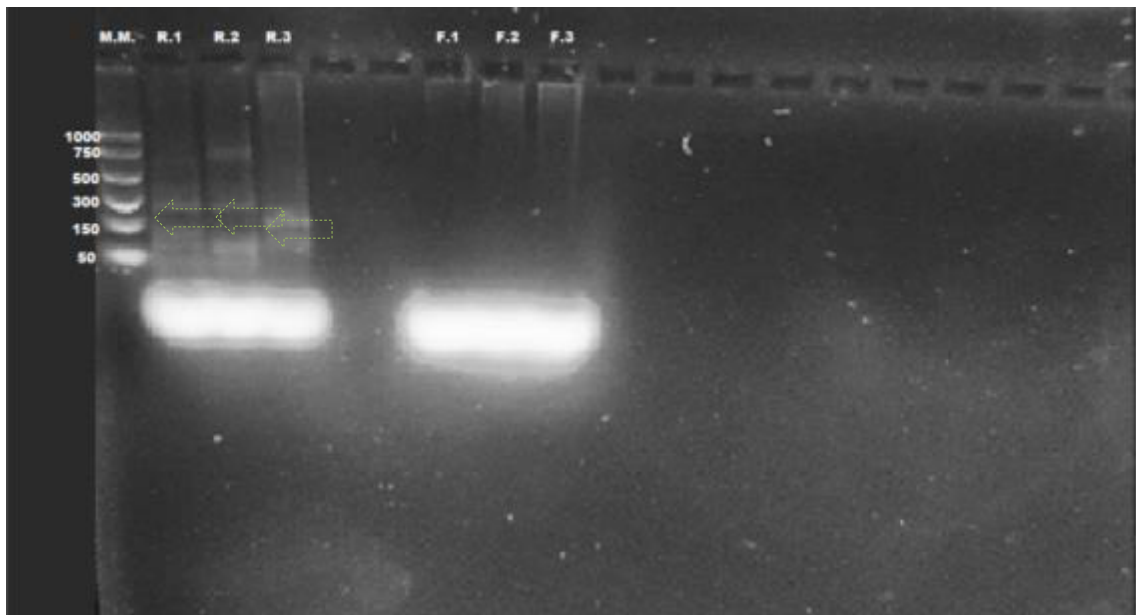


Figura 22. Tercera corrida de electroforesis para *Escherichia coli* en gel de agarosa

Fuente: el Autor

En la **Figura 22** se puede observar la Tercera corrida de Electroforesis para confirmar la presencia de *E. coli* en gel de agarosa al 2%.

En el carril M.M se colocó el marcador molecular (PCR Markers (50) lanes PROMEGA), que permite marcar 50, 150, 300, 500, 750 y 1000 bp en 6 bandas.

En el carril R1: ADN perteneciente a la muestra 74 (segunda repetición) con el primer genrfbEO, presenta 255pb perteneciente a stx2.

En el carril R2: ADN perteneciente a la muestra 82 (segunda repetición) con el primer genrfbEO, presenta 255pb perteneciente a stx2.

En el carril R3. ADN perteneciente a la muestra 142 (segunda repetición) con el primer genrfbEO, presenta 180pb perteneciente a stx1.

Por su parte, se puede mencionar que mediante el análisis molecular de los aislados y la amplificación de la placa de agarosa correspondiente a *E. coli*, se revelaron bandas con un

peso de 255 pb que, acorde a lo mostrado por Inat & Siriken (2010), correspondería al gen stx2, existente en las cepas productoras de toxina shiga.

En la **Figura 23** se puede observar, a manera de patrón de comparación la amplificación por PCR multiplex de los genes stx1 (180 pb) y stx2 (255 pb) en 7 de 8 aislamientos de *E. coli* O157: H7. La letra "M" representa la molécula marcador de peso (Inat & Siriken, 2010).

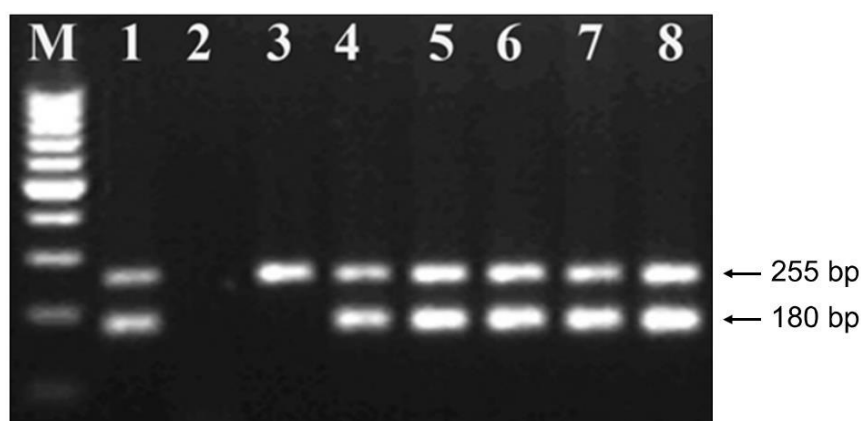


Figura 23. Patrón de comparación. Amplificación de los genes stx1 (180pb) y stx2 (255pb) aislado de *Escherichia coli* O157:H7

Fuente: Inat & Siriken (2010).

3.2 RESULTADOS DE LA SOCIALIZACIÓN

Al obtener finalmente los resultados de la identificación microbiológica y molecular de *E. coli* y de *S. aureus* de las muestras de leche, se redactó el presente documento y se presentó el mismo para su revisión antes de realizar la socialización de los hallazgos, para cumplir con el tercero de los objetivos planteados.

Se realizó una reunión informativa en los predios de la hacienda “La Verbena” a donde se enviaron con anterioridad las invitaciones para la misma.

Se tuvo la presencia de 12 personas entre los que se contaban trabajadores y administradores de la propiedad, además de vecinos de la comunidad.

Se hizo la presentación con ayuda visual (infocus) donde se destacó los objetivos, resultados, conclusiones y recomendaciones resultantes del estudio, finalmente se pasó a una ronda de preguntas, para concluir se entregó una encuesta a cada uno de los asistentes y se agradeció la atención y la presencia en el acto. Los resultados obtenidos de la tabulación de la encuesta presentada son: los siguientes:

Para la valoración para cada una de las preguntas de la encuesta utilizó la siguiente escala:

5. Muy Alto
4. Alto
3. Medio
2. Bajo
1. Nulo

DETALLE DE LA VALORACIÓN

A continuación se muestran las tablas y gráficos que contienen la información tabulada para cada una de las preguntas.

1) Organización del Evento

¿Considera Usted que la sala donde se desarrolló este evento brindó las comodidades necesarias?

En la **Tabla 21** se puede observar que la mayoría de los asistentes (67%) considera que el lugar donde se realizó la socialización estuvo cómodo y adecuado.

Tabla 21. Tabulación de resultados de organización del evento.

Valoración	# de casos
Nulo	0
Bajo	0
Medio	0
Alto	4
Muy Alto	8

Fuente: El Autor.

En la **Figura 24**, se puede mirar de una forma más clara la representación de los datos tabulados en la tabla anterior.

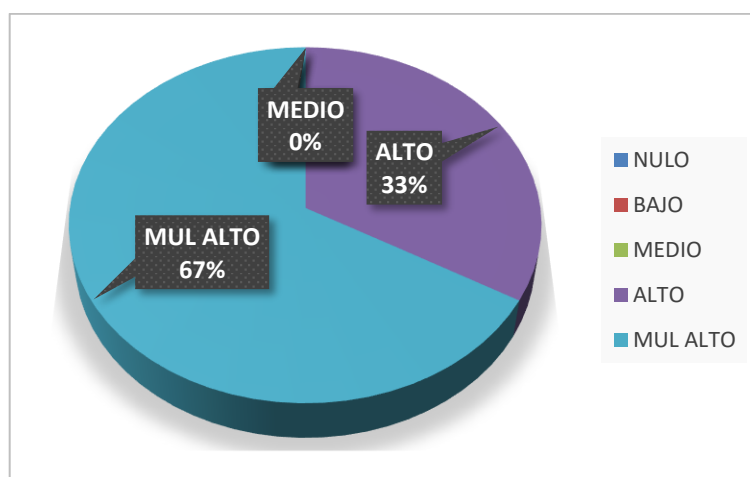


Figura 24. Resultados de organización del evento en porcentaje

Fuente: El Autor.

¿Considera Usted que el material audiovisual utilizado en la presentación fue adecuado?

La **Tabla 22** muestra que la mayoría de los asistentes (92%) considera que la presentación elaborada en power point estuvo apropiada y que contaba con la información suficiente para un correcto entendimiento.

Tabla 22. Tabulación de datos de material audiovisual utilizado

Valoración	# de casos
Nulo	0
Bajo	0
Medio	0
Alto	1
Muy Alto	11

Fuente: El Autor.

En la **Figura 25**, se puede apreciar de forma más clara los resultados que fueron tabulados y presentados en la **Tabla 22**.

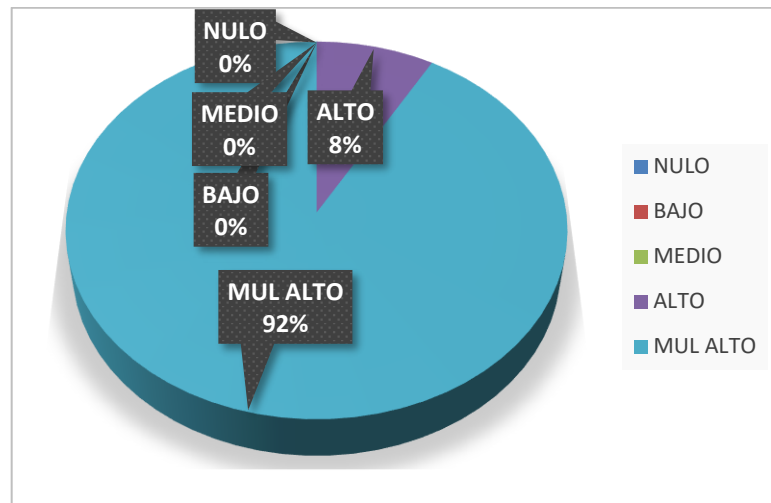


Figura 25. Resultados obtenidos en porcentaje del material audiovisual utilizado

Fuente: El Autor

EJECUCIÓN DEL EVENTO POR PARTE DEL EXPOSITOR

Para determinar si la persona que realizó la socialización se encontraba apta para ello se realizan las siguientes preguntas:

¿Considera Usted que el expositor mostro dominio del tema?

En la **Tabla 23** se aprecia que 7 personas es decir el 58% de los asistentes considera que el expositor tenía un alto dominio del tema y solo 5 (42%) que muy alto, esto pudo deberse al nerviosismo que provoca hablar en público.

Tabla 23. Tabulación de resultados acerca del dominio del tema del expositor

Valoración	# de casos
Nulo	0
Bajo	0
Medio	0
Alto	7
Muy Alto	5

Fuente: El Autor

En la **Figura 26** se visualiza de mejor manera la tendencia de los asistentes en la valoración acerca de la preparación o dominio del tema por parte del expositor.

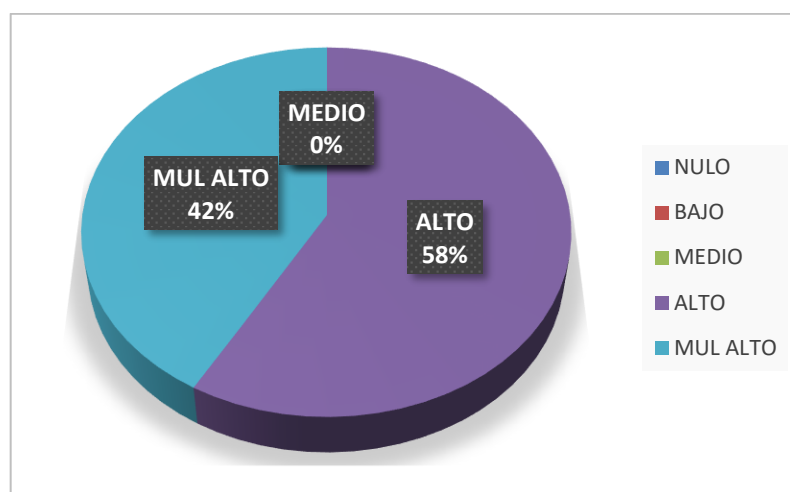


Figura 26. Resultados de dominio del tema en porcentaje

Fuente: El Autor

¿Estima Usted que el manejo del auditorio por parte del expositor fue adecuado?

En la **Tabla 24** se encuentran tabuladas las respuestas a esta pregunta, la mayoría de los asistentes (67%) considera que el expositor supo manejarse correctamente frente al público.

Tabla 24. Tabulación de resultados de manejo de auditorio

Valoración	# de casos
Nulo	0
Bajo	0
Medio	0
Alto	4
Muy Alto	8

Fuente: El Autor

En la **Figura 27** se aprecia que la valoración de los asistentes hacia el expositor y su manejo escénico es bueno, ya que el 33% considera alto su accionar y el 67% muy alto.

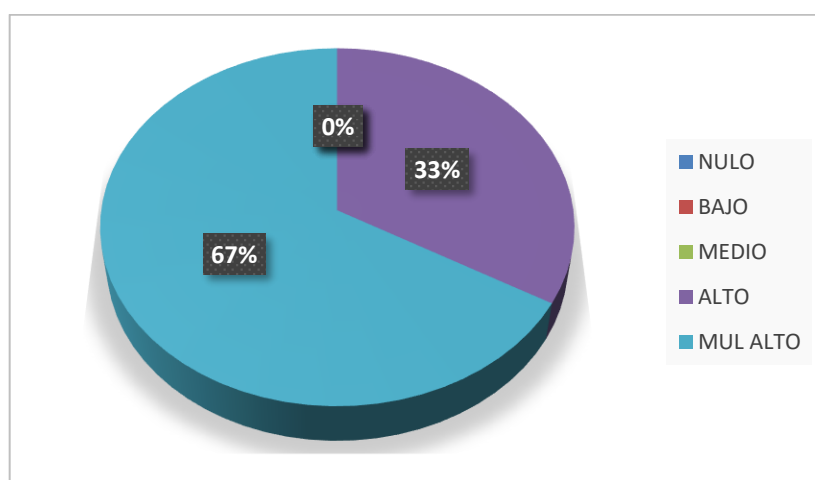


Figura 27. Resultados de manejo del auditorio por el expositor en porcentaje

Fuente: El Autor.

¿Considera Usted que el expositor demostró facilidad de expresión?

Con esta interrogante se evaluó al expositor en sus habilidades de transmisión de los conocimientos a los asistentes, obteniéndose que el 58% cree que si tiene una alta facilidad de expresión, esto se lo puede observar en la **Tabla 25**.

Tabla 25. Tabulación de resultados correspondiente a facilidad de expresión

Valoración	# de casos
Nulo	0
Bajo	0
Medio	0
Alto	7
Muy Alto	5

Fuente: El Autor.

En la **Figura 28** se puede apreciar claramente que el auditorio cree que el expositor tiene facilidad para expresarse en público y transmitir sus ideas claramente.

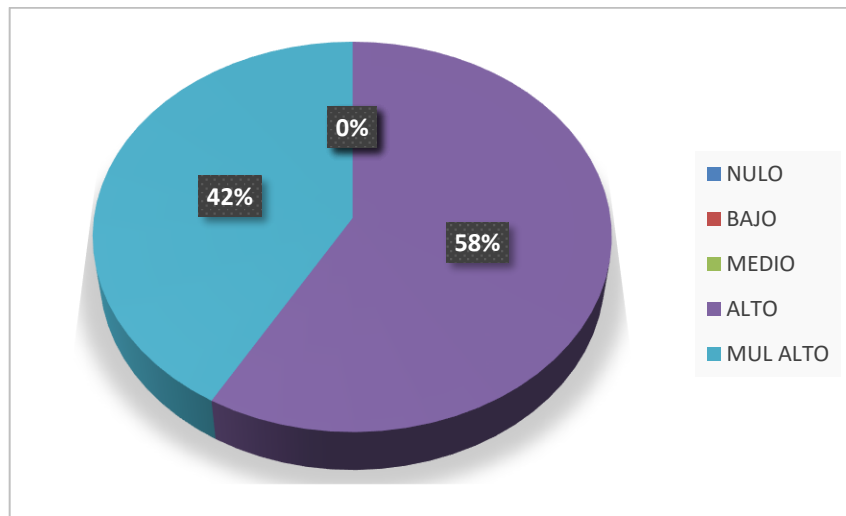


Figura 28. Resultados en porcentaje sobre facilidad de expresión del expositor

Fuente: El Autor.

MEDICIÓN DE IMPACTO DE LA INVESTIGACIÓN

Para determinar la importancia, relevancia y posibles estudios complementarios o afines al tema se aplicaron las siguientes interrogantes:

¿Considera Usted que el tema de investigación posee relevancia para algún actor y/o sector de la sociedad?

En la **Tabla 26** se observa que la tabulación de resultados muestra que el 92% de los asistentes consideran que la investigación realizada en la hacienda “La Verbena” y los resultados obtenidos va a servir para mejorar aún más las prácticas ordeño.

Tabla 26. Resultados tabulados acerca de la importancia del estudio.

Valoración	# de casos
Nulo	0
Bajo	0
Medio	0
Alto	1
Muy Alto	11

Fuente: El Autor.

En la **Figura 29** se aprecia que la mayoría de los asistentes considera que la investigación tiene relevancia para el mejoramiento del manejo del ganado lechero que se encuentra produciendo en las fincas.

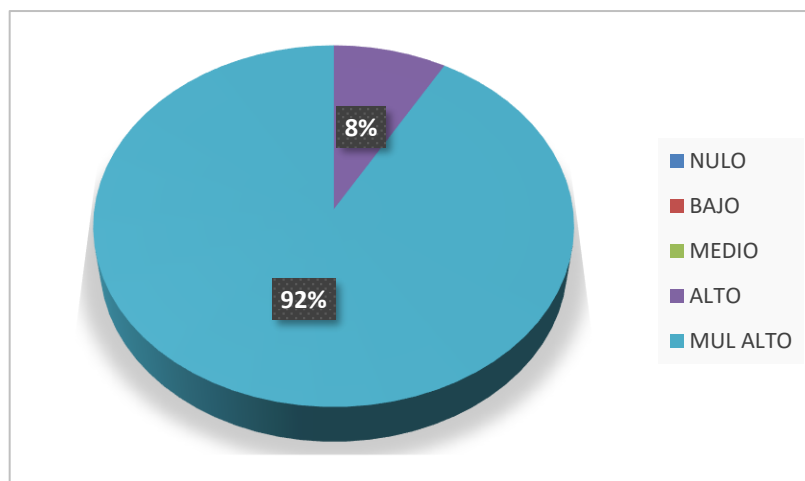


Figura 29. Resultados en porcentaje acerca de la relevancia del estudio

Fuente: El Autor.

¿Considera Usted que esta investigación posee perspectivas para estudios complementarios posteriores?

La **Tabla 27** muestra que la mayoría de los asistentes considera que la investigación realizada puede conducir a futuro a nuevos trabajos de esta índole.

Tabla 27. Tabulación de resultados de perspectiva de futuras investigaciones en el ramo

Valoración	# de casos
Nulo	0
Bajo	0
Medio	0
Alto	4
Muy Alto	8

Fuente: El Autor.

La **Figura 30** muestra que el 67% de los asistentes considera que la investigación realizada tiene muy altas posibilidades de que a futuro se realicen estudios complementarios o en su defecto se siga con esta línea de investigación.

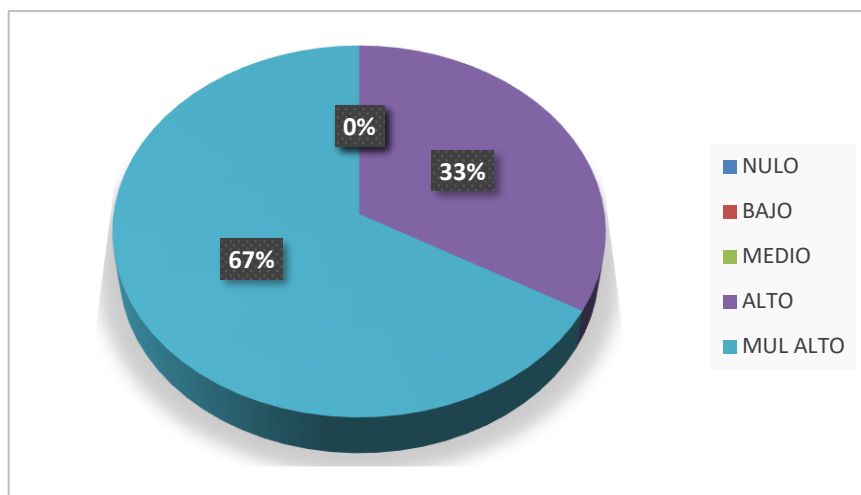


Figura 30. Resultados en porcentaje de perspectivas para estudios complementarios posteriores

Fuente: El Autor.

¿Considera Usted que el tema investigado genera actualmente o a futuro un beneficio concreto para alguna organización, empresa pública o privada, comunidad o institución?

La **Tabla 28** muestra los resultados de la encuesta para esta pregunta y el 83% de los asistentes considera que el tema del presente estudio genera beneficios tanto dentro de la propiedad como a los vecinos de la comunidad.

Tabla 28. Resultados tabulados de beneficios de la investigación

Valoración	# de casos
Nulo	0
Bajo	0
Medio	0
Alto	2
Muy Alto	10

Fuente: El Autor.

La **Figura 31** presenta en forma más clara los resultados obtenidos en la **Tabla 28** en donde el 17% de los asistentes considera que el estudio tiene un alto beneficio y el 83% cree que es muy alto.

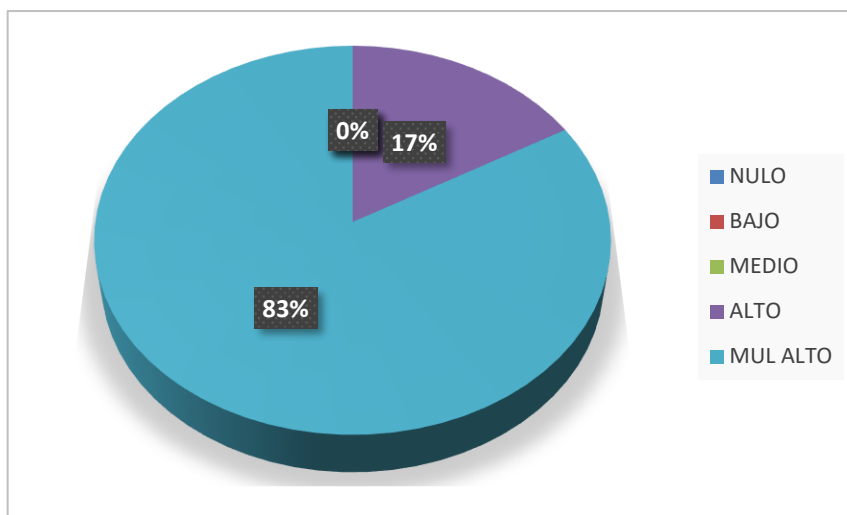


Figura 31. Resultados de beneficios a largo o corto plazo de la investigación

Fuente: El Autor.

¿En función de los objetivos planteados expuestos en la investigación, considera Usted que estos se cumplieron?

En la **Tabla 29** se encuentran tabulados los datos correspondientes a la pregunta de si los asistentes consideran que los objetivos planteados para la investigación se cumplieron y el 83% creen que si fueron concluidos.

Tabla 29. Tabulación del porcentaje de objetivos cumplidos

Valoración	# de casos
Nulo	0
Bajo	0
Medio	0
Alto	2
Muy Alto	10

Fuente: El Autor.

En la **Figura 32** se muestran los resultados obtenidos para esta pregunta planteada en la encuesta y prácticamente todos consideran que los objetivos planteados en el trabajo fueron cumplidos.

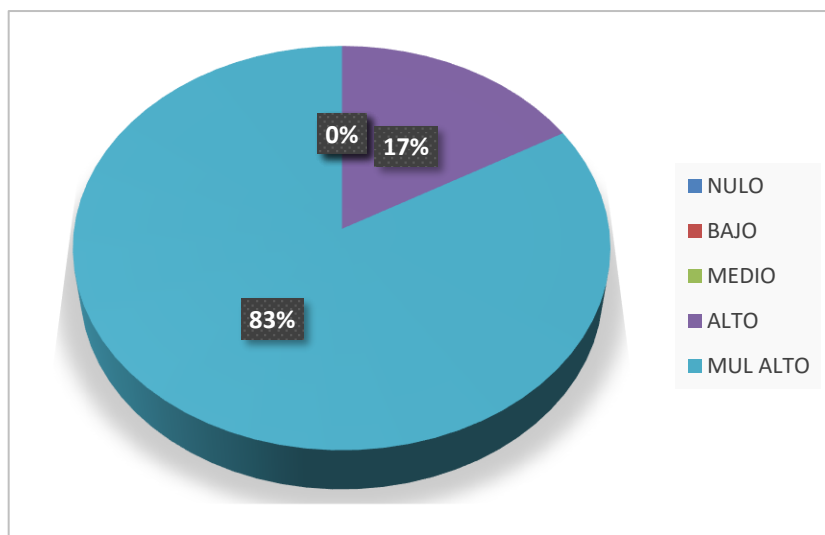


Figura 32. Resultados en porcentaje del cumplimiento de objetivos del estudio

Fuente: El Autor.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES

- Una vez realizado el muestro total de las unidades bovinas en producción se analizó las muestras de leche. Siete vacas equivalente al 10%, dieron positivo al análisis para *S. aureus* manifestando hemólisis beta en la placa correspondiente, mientras que tres vacas (4,3%) dieron positivo al análisis para *E. coli*, identificada por la presencia de la coloración verde en las cepas, propia de la fermentación láctica producida por esta bacteria.
- Se comprobó que la incidencia de *S. aureus* y *E. coli* en los animales que estaban en producción en la hacienda “La Verbena” durante la realización de este estudio es baja, ya que 10 vacas (14,3%) reportaron la presencia de patógenos en sus muestras.
- Para la identificación molecular por el método PCR se usó *primers* específicos para cada bacteria, y por medio de la electroforesis, y la cuantificación de los pares de bases, dieron como positivo para *S. aureus* las vacas (84, 102, 142, 144, 148 y 32; 132 y 144) y para *E. coli* las vacas (142, 82 y 74) lo cual demuestra que existe la presencia de tales bacterias en el hato lechero de la hacienda.
- Numéricamente, la mayor cantidad de infecciones de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* se produjo en vacas del Grupo I (7 vacas) y (2 vacas) respectivamente. Sin embargo al aplicar la prueba estadística de χ^2 (chi cuadrado), no se obtuvo diferencia significativa entre los grupos I, II y III. La inferencia estadística, por tanto, no muestra que el número de partos sea un factor que predispone a la infección de los patógenos. En tales condiciones, se acepta la hipótesis nula *H₀*.

4.2 RECOMENDACIONES

- Si bien estadísticamente, no se mostró diferencias entre los grupos I, II, III, en cuanto a su vulnerabilidad al desarrollo de patógenos, el conteo numérico de afectados fue mayor en el grupo I. Por esta razón se recomienda a quienes manejan la ganadería de leche de la hacienda “La Verbena” y al ganadero en general, tener un mayor cuidado en el manejo sanitario de las vacas lecheras en los dos primeros partos y sus correspondientes lactancias.
- Se recomienda a los productores de leche realizar continuamente pruebas rápidas como el California Mastitis Test (CMT) para la detección de mastitis subclínica, pues esto minimizará la afección y las pérdidas tanto en producción como económicas derivadas de esta.
- Si bien la incidencia de *E. coli*, no es alta, se recomienda la aplicación de un programa de pruebas abreviadas para la detección de este patógeno en cada hato lechero, debido a que esta bacteria es productora de toxinas, que deterioran la salud del consumidor.
- Con respecto a la incidencia de *E. coli* y *S. aureus* en las vacas de primer y segundo parto puede deberse a la presencia de pezones de menor tamaño que el promedio y este “defecto” puede ser corregido o eliminado en las nuevas generaciones seleccionando pajuelas de un toro que entre las características que presenta su catálogo esté la corrección de este inconveniente.
- Se recomienda la realización de más investigaciones en el mismo ámbito en donde se busque la presencia de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* utilizando otros genes diana, y otros *primers* o cebadores que pudieren producir mejores resultados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acha, P., & Szyfres, B. (2001). *Zoonosis y Enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales* (Vol. I). Washington D.C, Estados Unidos: Organización Panamericana de la Salud.
- Azocar, J. E. (2001). Prevalencia, incidencia y etiología de mastitis en un centro de acopio lechero, comuna de Maria Pinto, Región Metropolitana, Santiago de Chile. *Corfo - Sercotec*, 49-50.
- Bedolla, C. C., & Ponce de León, M. (2008). *Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina en la Industria Lechera*. Recuperado el 18 de Enero de 2018, de Revista Electrónica de Veterinaria:
<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040408/040805.pdf>
- Bolaños, O. F., Trujillo, J. E., Peña, J. J., Cerquera, J., & Granja, Y. T. (2012). Mastitis Bovina: Generalidades y Métodos de Diagnóstico. *Revista veterinaria REDVET*, 13(11).
- 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: Revista de Ciencias de la Vida*, 24(2), 43-52.
- Calderón, A., & Rodríguez, V. (2008). Prevalencia de Mastitis Bovina y su etiología infecciosa en sistemas especializados en producción de leche en el altiplano cundinoboyacense (Colombia). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 21, 582-589.
- Castillo, J., Silveira, E., Maya, M., & Cepero, O. (2011). Prevalencia de Escherichia coli enterohemorrágica en terneros lactantes de ganado lechero. (V. Organización, Ed.) *REDVET: Revista Electrónica de Veterinaria*, 12(2), 1-7.
- Centro de la Industria Láctea del Ecuador. (2015). La Leche del Ecuador - Historia de la Lechería Ecuatoriana. En *La Leche del Ecuador - Historia de la Lechería Ecuatoriana* (pág. 69). Quito, Pichincha, Ecuador: Efecto Studio.

- Cervantes, E., García, R., & Salazar, P. M. (2014). Características generales de *Staphylococcus aureus*. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 61(1), 28 - 40.
- Dong, P., Zhu, L., Mao, Y., Liang, R., Lebao, N., Zhang, Y., y otros. (2015). Prevalence and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 from samples along the production line in Chinese beef-processing plants. *FOOD CONTROL*, 54, 39-46.
- Fernández, A., García, C., Saéz, J. A., & Valdezate, S. (2010). *Procedimientos en Microbiología Clínica: Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología*. España: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
- Fernández, M. L., Ramírez, J. P., Chaves, C., & Arias, M. L. (2008). Disminución en la incidencia de mastitis en ganado vacuno con la aplicación de un sellador de barrera experimental. *Agronomía Costaricense*, 32(1), 107-112.
- García, R. (2013). *Manual de Teoría Veterinaria II*. Managua, Nicaragua: Universidad Nacional Agraria.
- Gerlach, F. A., Ayala, F., Denogean, F., Moreno, S., & Gerlach, L. E. (2009). Incidencia y Costo de la mastitis en un estado del municipio de Santa Ana, Sonora. *Revista Mexicana de Agronegocios*, 24.
- Gómez, O. E., Santibañez, C. E., Arauc, F., Espezua, O. H., & Manrique, J. (2015). Criterios de Interpretación para California Mastitis Test en el Diagnóstico de Mastitis Subclínica en Bovinos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 86-95.
- Hannaoui, E. J., Villalobos, L. B., & Martínez, R. (2009). *Escherichia coli* shigatoxigénica: Patogénesis, diagnóstico y tratamiento. (S. V. Microbiología, Ed.) *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29(1), 13-20.
- Inat, G., & Siriken, B. (2010). Detection of *Escherichia coli* O157 and *Escherichia coli* O157:H7 by the immunomagnetic separation technique and *stx1* and *stx2* genes by multiplex PCR in slaughtered cattle in Samsun Province, Turkey. *Journal of Veterinary Science*, 321 - 326.

- Instituto Ecuatoriano de Normalización . (2015). NTE: INEN 9:2015. En INEN, *Leche Cruda Requisitos*. Quito.
- Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. (2016). *Ecuador en Cifras*. Recuperado el 18 de Septiembre de 2017, de Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua ESPAC.
- Kaşıklı, G., Çetin , Ö., Bingöl , E., & Gündüz , M. C. (2012). Relations between electrical conductivity, somatic cell count, California mastitis test and some quality parameters in the diagnosis of subclinical mastitis in dairy cows. *Turkish Journal of Veterinary Sciences-Academic Journals*, 36(1), 49-55.
- Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., & Baba, T. (2001). Whole genome sequencing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *The Lancet*, 357, 1225-1240.
- Leotta, G. A., Chinen, I., Epszteyn, S., Miliwebsky, E., Melamed, I. C., Motter, M., y otros. (2005). Validación de una Técnica de PCR Múltiple para la Detección de *Escherichia coli* Productor de Toxina Shiga. *Revista Argentina de Microbiología*, 37(1), 1-10.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2003). *Brock Biología de los Microorganismos* (10 ed.). Barcelona, España: Pearson Prentice Hall.
- Magariños, H. (2000). *Producción Higiénica de la leche cruda, una guía para la pequeña industria*. Guatemala: 2001 Producción y Servicio Incorporados S.A.
- Martínez, A., Ribot, A., Villoch, A., Montes de Oca, N., Remón, D., & Ponce, P. (2017). Calidad e Inocuidad de la leche cruda en las condiciones actuales de Cuba. *Salud Animal*, 39(1), 51-61.
- Mera, R., Muñoz, M., Artieda, J., Ortíz, P., González, R., & Vega, V. (2017). *Mastitis Bovina y su Repercusión en la Calidad de la Leche*. (V. O. España, Ed.) Recuperado el 15 de Enero de 2018, de REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63653574004>
- Newsletter Microbial # 2. (2008). Tres etapas de los métodos de investigación de patógenos en alimentos basados en PCR. (U. d. Girona, Ed.) *Microbial*.

- Oliver, S. P., Boor, K. J., Murphy, S. C., & Murinda, S. E. (2009). Food Safety Hazards Associated with Consumption of Raw Milk. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(7), 793-806.
- OMS. (2016). *Escherichia coli*. Recuperado el 4 de Agosto de 2017, de Organización Mundial de la Salud: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/es/>
- Osteras, O. (2006). Mastitis epidemiology practical approaches and applications. *World Buiatrics Congress*. Nice, Francia.
- Padilha da Silva, W., Silva, J. A., Pegoraro, M. R., Ribeiro de Araújo, M., Magalhães Mata, M., & Avila Gandra, E. (2003). Identification of *Staphylococcus aureus*, *S.intermedius* and *S.hycus* by PCR amplification of COA and NUC genes. *Brazilian Jorunal of Microbiology*, 125-127.
- Pastor, J., & Bedolla, J. L. (2008). *Determinación de la prevalencia de mastitis bovina en el municipio de Tarimbaro, Michoacán, mediante la prueba de California*. Recuperado el 20 de Agosto de 2017, de Revista Electrónica Veterinaria: <http://www.veterinaria.org/re>
- Pellegrino, M. S., Odierno, L. M., & Bogni, C. I. (2011). *Mastitis Bovina*. (V. Organización, Ed.) Recuperado el 20 de Agosto de 2017, de Revista electrónica de veterinaria: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n070711.html>
- Pereyra, E., Dallard, B. E., & Calvinho, L. F. (2014). Aspectos de la Respuesta Inmune Innata en las Infecciones Intramamarias causadas por *Stahylococcus aureus* en Bovinos. *Revista Argentina de Microbiología*, 46(4), 363-375.
- Pistone, V., Venzano, A., Vilte, D. A., Mercado, E. C., & Ibarra, C. (2005). Efecto Citotóxico en colon humano de *Escherichia coli* enterohemorrágico aislado en terneros con diarrea sanguinolenta. (A. A. Microbiología, Ed.) *Revista Argentina de Microbiología*, 37(3), 117-121.
- Ramírez, N., Arroyave, O., Cerón, M., Jaramillo, M., Cerón, J., & Palacio, L. G. (2011). Factores asociados a mastitis en vacas de la microcuenca lechera del altiplano norte de Antioquia, Colombia. *Revista Média Veterinaria*, 31-42.

- Ramírez, N., Fernández, J. A., & Palacio, L. G. (2018). Tasa de incidencia de mastitis clínica y susceptibilidad antibiotica de patógenos productores de mastitis en ganado lechero del norte de Antioquia, Colombia. *Revista Médica Veterinaria*, 36, 75-87.
- Rivero, M. A., Padola, N. L., Etcheverría, A., & Parma, A. (2004). Escherichia coli enterohemorrágica y síndrome urémico hemolítico en Argentina. *Medicina (Buenos Aires)*, 64(4).
- Rodríguez, C. A., & Vesga, O. (2005). Staphylococcus aureus resistente a vancomicina. (I. N. Salud, Ed.) *Revista del Instituto Nacional de Salud*, 575-587.
- Rodríguez, E. A., & Jiménez, J. N. (2015). Factores relacionados con la colonización por Staphylococcus aureus. (U. d. Antioquía, Ed.) *Revista Médica Universidad de Antioquía*, 28(1), 66-77.
- Rodríguez, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli. *Salud Pública de México*, 44(5).
- Rodríguez, M. (2000). Determinación de mastitis bovina en Catacamas y Santa María del Real Olancho Honduras. *Escuela Nacional de Agricultura*. Honduras : Escuela Nacional de Agricultura .
- Ruiz, A. K., Ponce, P., Gomes, G., Mota, R. A., Sampaio, E., Lucena, E. R., y otros. (2011). Prevalencia de mastitis bovina subclínica y microorganismos asociados: comparación entre ordeño manual y mecánico, en Pernambuco, Brasil. *Revista Salud Animal*, 33(1), 57-64.
- Scaranelli, A., & Gonzáles, Z. (2003). Epizootiología y Diagnostico de mastitis bovina. Maracay, Venezuela: Universidad Central de Venezuela.
- Schlegel, H. (2012). *Microbiología General Nueva Edición*. Barcelona, España: Ediciones Omega S.A.
- Trujillo, C. M., Gallego, A. F., Ramirez, N., & Palacio, L. G. (2011). Prevalencia de Mastitis en siete hatos lecheros del Oriente Antioqueño. (U. d. Antioquía, Ed.) *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 24(1), 11-18.

- Vieira da Mota, O., Manhães, M., & Camargo, C. (2001). Detection of different *Staphylococcus aureus* strains in bovine milk from subclinical mastitis using PCR and Routine Techniques. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32, 27-31.
- Wimm, W., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Shereckenberger, P., y otros. (2008). *Koneman Diagnóstico Microbiológico Texto y Atlas en Color*. Buenos Aires-Argentina: Editorial Médica Panamericana.

ANEXOS

Registro Fotográfico

En este apartado se ha recopilado las fotos más importantes de las actividades realizadas durante la realización del presente trabajo.



Recolección de las muestras en “La Verbena”.



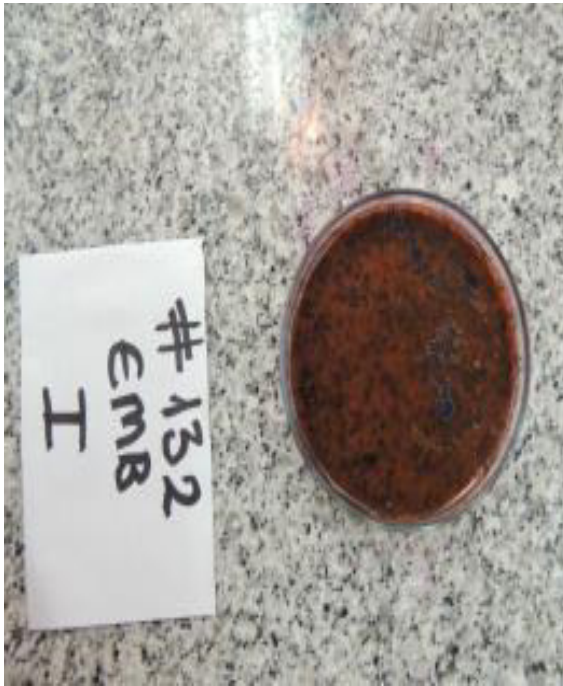
Materiales utilizados para la siembra de las muestras



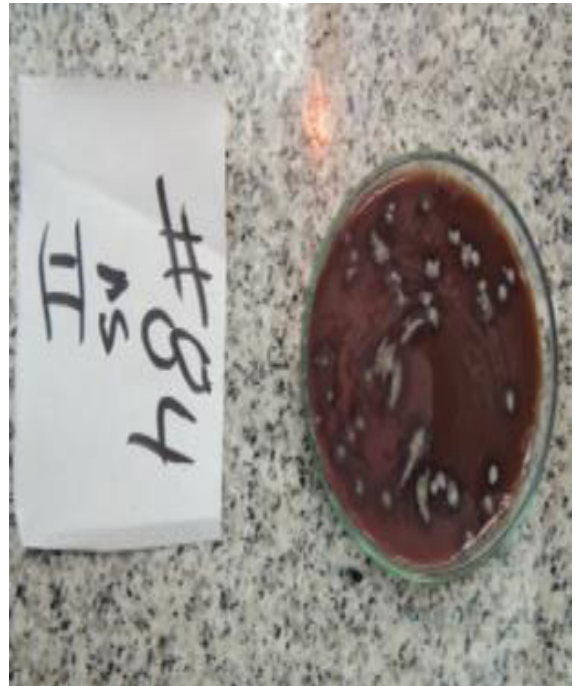
Muestras de leche listas para ser sembradas en placas Petri con medio de cultivo selectivo.



Placas inoculadas con las muestras de leche



Colonias resultantes de *Escherichia coli* en Eosin Methylene Blue Agar (EMB).



Colonias de *Staphylococcus aureus* resultantes en Blood Agar Base (AS)



Siembra de las colonias resultantes en el caldo Lurea Bertani (LB).



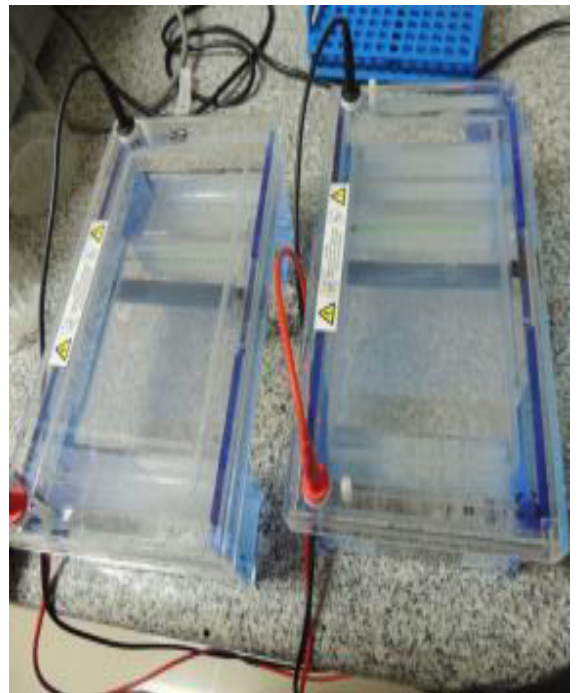
Preparativos para extracción de ADN



Extrayendo ADN

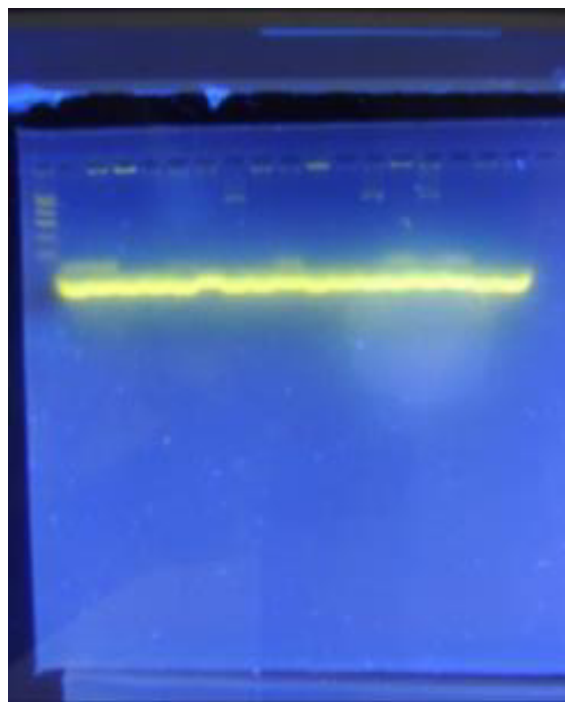
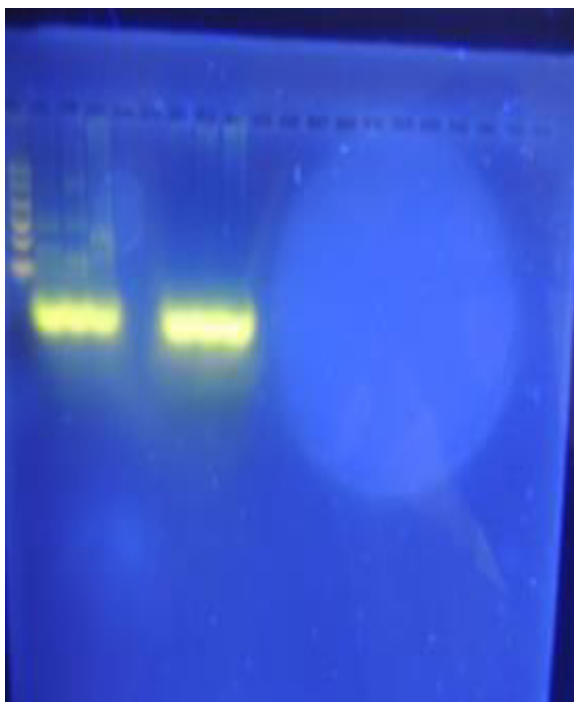


Llenando los pocillos en las cámaras de electroforesis



Electroforesis en Gel de Agarosa

RESULTADOS OBTENIDOS



SOCIALIZACIÓN





Llenando las encuestas



Con los asistentes que trabajan en “La Verbena”



Con la Asesora de tesis y la administradora de la hacienda



Un refrigerio con los asistentes luego de la exposición



Pontificia Universidad
Católica del Ecuador

ESCUELA CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES
ÁREA DE VINCULACIÓN CON LA COMUNIDAD

PROCESO DE SOCIALIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN

El siguiente cuestionario nos permitirá implementar mejoras constantes en los procesos de socialización de trabajos de investigación por favor háganos llegar sus comentarios y sugerencias:

VIERNES 16 DE FEBRERO 2018			
SR. FRANCISCO ALARCÓN			
DENTRO PUCESI		FUERA PUCESI	

NOTA IMPORTANTE: Por favor conteste las preguntas según la siguiente escala:

5. MUY ALTO / 4. ALTO / 3. MEDIO / 2. BAJO / 1. NULO

DETALLE DE VALORACIÓN	1	2	3	4	5
1. ¿Considera Usted que la sala donde se desarrolló este evento brindó las comodidades necesarias?					X
2. ¿Considera Usted que el material audiovisual utilizado en la presentación fue adecuada?					X
3. ¿Considera Usted que el expositor mostró dominio del lema?				X	
4. ¿Estima Usted que el manejo del auditorio por parte del expositor fue adecuada?					X
5. ¿Considera Usted que el Expositor demostró facilidad de expresión?					X
6. ¿Considera Usted que el lema investigado posee relevancia para algún actor y/o sector de la sociedad?					X
7. ¿Considera Usted que esta investigación posee perspectivas para estudios complementarios posteriores?				X	
8. ¿Considera Usted que el lema investigado genera actualmente o a futuro un beneficio concreto para alguna organización, empresa pública o privada, comunidad o institución?					X
9. ¿En función de los objetivos planteados expuestos en la investigación, considera Usted que éstos se cumplieron?					X

Los organizadores deben ver un día adecuado para poder obtener ayudas de las personas cercanas al sitio del evento.

El agua en los tiempos de verano

Mejorar las pateras para una buena producción

INSTITUCIÓN U ORGANIZACIÓN A LA QUE PERTENECE EL ENCUESTADO

La Verbena

ENCUESTA LLENA



Pontificia Universidad
Católica del Ecuador

ESCUELA CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES
ÁREA DE VINCULACIÓN CON LA COMUNITARIO

LISTA DE ASISTENCIA A SOCIALIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN

NOMBRE DEL EXPOSITOR: SR. FRANCISCO ALARCÓN R.

CARRERA: ING. AGROPECUARIA

FECHA: VIERNES 16 DE FEBRERO DEL 2018

NOMBRE ASISTENTE	NÚMERO DE CÉDULA	INSTITUCIÓN A LA QUE PERTENECE	SIGNA
Adriana Castiblanco	1003117214-2	La Verbena	
EISAPAY		La Verbena	
Arturo Tancara	040084290-2	La Verbena	
Franziska Longoria	100387549-5	La Verbena	
Silvia Machiguera	100419339-7	La Verbena	
Miguel Tancara	100507000-2	La Verbena	
Juan Armas	817055022-5		
Eric Vera Tancara	100167108-8		
Fabianio Guatapu	100166170-1		
Humberto Velasco	170301906-5		
Emilio Morillo	0502314719		
Francisco Velástegui	050332302-4	PUCESI	

LISTA DE ASISTENTES

Resultados Obtenidos para *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*

RESULTADOS OBTENIDOS PARA *Staphylococcus aureus*

Incidencia de *S. aureus* (Primera repetición)

PRIMERA REPETICION GRUPO I: DE 1 A 2 PARTOS		
NÚMERO DE ARETE	NÚMERO DE PARTOS	PRESENCIA DE <i>S. aureus</i>
55	2	
60	2	
61	2	
66	2	
70	2	
73	2	
81	2	
82	1	
84	2	positivo
88	1	
90	2	
95	2	
97	2	
100	2	
101	2	
102	1	positivo
103	1	
105	1	
106	2	
107	2	
108	1	
109	1	
110	1	
112	2	
113	1	
114	1	
115	1	
116	1	
117	1	
118	1	
122	1	
124	1	
125	1	
128	1	
131	1	
132	1	
134	1	
135	1	
136	1	
139	1	
140	1	
142	1	positivo
144	1	positivo
145	1	
146	1	
148	1	positivo

**PRIMERA REPETICION GRUPO II :
DE 3 A 4 PARTOS**

NÚMERO DE ARETE	NÚMERO DE PARTOS	PRESENCIA DE <i>S.aureus</i>
33	4	
37	4	
38	4	
46	3	
67	3	
74	3	
77	3	
86	3	
92	3	

**PRIMERA REPETICION GRUPO 3:
5 Y MAS PARTOS**

NÚMERO DE ARETE	NÚMERO DE PARTOS	PRESENCIA DE <i>S. aureus</i>
14	10	
17	10	
18	6	
27	6	
32	6	positivo
36	5	
39	5	
40	5	
62	5	

Segunda repetición

SEGUNDA REPETICION GRUPO I: DE 1 A 2 PARTOS		
NÚMERO DE ARETE	NÚMERO DE PARTOS	PRESENCIA DE <i>S. aureus</i>
47	2	
48	2	
55	2	
60	2	
61	2	
66	2	
70	2	
73	2	
81	2	
82	1	
84	2	
88	1	
90	2	
95	2	
97	2	
100	2	
101	2	
102	1	
103	1	
104	2	
105	1	
106	2	
107	2	
108	1	
109	1	
110	1	
112	2	
113	1	
114	1	
115	1	
116	1	
117	1	
118	1	
122	1	
124	1	
125	1	
128	1	
131	1	
132	1	positivo
134	1	
135	1	
136	1	
139	1	
140	1	
142	1	
144	1	positivo
145	1	
146	1	
148	1	
152	1	

SEGUNDA REPETICION GRUPO II: DE 3 A 4 PARTOS		
NÚMERO DE ARETE	NÚMERO DE PARTOS	PRESENCIA DE <i>S. aureus</i>
33	4	
35	4	
37	4	
38	4	
46	3	
67	3	
74	3	
77	3	
86	3	
92	3	

SEGUNDA REPETICION GRUPO III: 5 Y MAS PARTOS		
NÚMERO DE ARETE	NÚMERO DE PARTOS	PRESENCIA DE <i>S. aureus</i>
6	8	
14	10	
17	10	
18	6	
27	6	
32	6	
36	5	
39	5	
40	5	
62	5	

Incidencia de *Escherichia coli* (Primera Repetición)

PRIMERA REPETICION GRUPO I: DE 1 A 2 PARTOS		
NÚMERO DE ARETE	NÚMERO DE PARTOS	PRESENCIA DE <i>E. coli</i>
55	2	
60	2	
61	2	
66	2	
70	2	
73	2	
81	2	
82	1	
84	2	
88	1	
90	2	
95	2	
97	2	
100	2	
101	2	
102	1	
103	1	
105	1	
106	2	
107	2	
108	1	
109	1	
110	1	
112	2	
113	1	
114	1	
115	1	
116	1	
117	1	
118	1	
122	1	
124	1	
125	1	
128	1	
131	1	
132	1	
134	1	
135	1	
136	1	
139	1	
140	1	
142	1	positivo
144	1	
145	1	
146	1	
148	1	

**PRIMERA REPETICION GRUPO 2:
DE 3 A 4 PARTOS**

NÚMERO DE ARETE	NÚMERO DE PARTOS	PRESENCIA DE <i>E. coli</i>
33	4	
37	4	
38	4	
46	3	
67	3	
74	3	
77	3	
86	3	
92	3	

**PRIMERA REPETICION GRUPO 3:
5 Y MAS PARTOS**

NÚMERO DE ARETE	NÚMERO DE PARTOS	PRESENCIA DE <i>E. coli</i>
14	10	
17	10	
18	6	
27	6	
32	6	
36	5	
39	5	
40	5	
62	5	

Segunda repetición

SEGUNDA REPETICION GRUPO I: DE 1 A 2 PARTOS		
NÚMERO DE ARETE	NÚMERO DE PARTOS	PRESENCIA DE <i>E. coli</i>
47	2	
48	2	
55	2	
60	2	
61	2	
66	2	
70	2	
73	2	
81	2	
82	1	positivo
84	2	
88	1	
90	2	
95	2	
97	2	
100	2	
101	2	
102	1	
103	1	
104	2	
105	1	
106	2	
107	2	
108	1	
109	1	
110	1	
112	2	
113	1	
114	1	
115	1	
116	1	
117	1	
118	1	
122	1	
124	1	
125	1	
128	1	
131	1	
132	1	
134	1	
135	1	
136	1	
139	1	
140	1	
142	1	
144	1	
145	1	
146	1	
148	1	
152	1	

**SEGUNDA REPETICION GRUPO II:
DE 3 A 4 PARTOS**

NÚMERO DE ARETE	NÚMERO DE PARTOS	PRESENCIA DE <i>E. coli</i>
33	4	
35	4	
37	4	
38	4	
46	3	
67	3	
74	3	positivo
77	3	
86	3	
92	3	

**SEGUNDA REPETICION GRUPO III:
5 Y MAS PARTOS**

NÚMERO DE ARETE	NÚMERO DE PARTOS	PRESENCIA DE <i>E. coli</i>
6	8	
14	10	
17	10	
18	6	
27	6	
32	6	
36	5	
39	5	
40	5	
62	5	
