



Pontificia Universidad Católica del Ecuador

Sede Ibarra

ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES

INFORME FINAL DEL PROYECTO

TEMA:

“Determinación de la presencia de *Staphylococcus aureus* y su prevalencia en fincas productoras de leche en la provincia de Imbabura”

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

INGENIERA ZOOTECNISTA

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN: Gestión sostenible y aprovechamiento de los recursos naturales.

SUBLINEA: Seguridad y soberanía alimentaria.

AUTOR: MELANIE ARACELI MORA PONCE

ASESOR: LENNYS BEATRIZ BERUTTI SUAREZ

Ibarra, 05 de septiembre de 2023

Ibarra, 05 de septiembre de 2023

Lennys Beatriz Berutti Suarez

ASESOR

CERTIFICA:

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



(f).....

Lennys Beatriz Berutti Suarez

C.C.: 1757289986

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).....

MSc. Lennys Beatriz Berutti Suarez

C.C.: 1757289986



(f).....

MSc. Santiago Xavier Mafla Andrade

C.C.: 1002658399



(f).....

MSc. Luis Humberto Haro Bedon

C.C.: 1002739389

ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS

Yo MELANIE ARACELI MORA PONCE, declaro conocer y aceptar la disposición del 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 derecho de disponer de sus derechos o autorizar 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, 05 de septiembre del 2023

f): 

MELANIE ARACELI MORA PONCE

C.C.: 1004628697

AUTORÍA

Yo, MELANIE ARACELI MORA PONCE, portador de la cédula de ciudadanía N°1004628697, declaró 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):.....

MELANIE ARACELI MORA PONCE

C.C.: 1004628697

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, MELANIE ARACELI MORA PONCE, con C.C.: 1004628697, autor del trabajo de grado intitulado: “DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* Y SU PREVALENCIA EN FINCAS PRODUCTORAS DE LECHE EN LA PROVINCIA DE IMBABURA” previo a la obtención del título profesional de Ingeniería en Zootecnia, 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 del sitio web de la Biblioteca de la PUCE I el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Ibarra, 05 de septiembre del 2023

f): .....

MELANIE ARACELI MORA PONCE

C.C.: 1004628697

**DECLARACIÓN DE COMPORTAMIENTO ÉTICO EN LA ELABORACIÓN,
DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

Por medio de la presente declaro conocer y aplicar en la elaboración, desarrollo y evaluación de Proyecto de Titulación: “DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* Y SU PREVALENCIA EN FINCAS PRODUCTORAS DE LECHE EN LA PROVINCIA DE IMBABURA”, lo propuesto en el Código de Ética de la investigación y el aprendizaje de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, aprobado por el Consejo Superior de la PUCE con fecha 26 de abril de 2023

Para constancia firma:

f):

Melanie Araceli Mora Ponce
Estudiante que ejecuta el trabajo de Titulación
C.C/ Pasaporte: 1004628697
Carrera: Ingeniería en Zootecnia

Ibarra, 05 de septiembre del 2023

DEDICATORIA

El presente trabajo se los dedico a mis padres Verónica Ponce y Renan Mora por su amor incondicional, trabajo y sacrificios en todos estos años. Especialmente a mi madre por ser un gran apoyo durante todo el trayecto de mi carrera y por enseñarme que la constancia y responsabilidad son fundamentales para conseguir todo lo que me proponga.

A la memoria de mi abuelito Jesús Ponce por haber sido un pilar fundamental en mi vida por sus enseñanzas y valores que los mantendré conmigo el resto de mi vida.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por la vida que me ha dado, por colocar en mi camino a personas que han sido buenas y me han servido de soporte en toda mi vida, por todas las bendiciones que he recibido y por permitirme haber llegado hasta donde estoy, un logro muy importante para mi vida profesional.

A mis padres por el amor incondicional que me han dado, por siempre creer en mí y en que soy capaz de muchas cosas, por los sacrificios que han tenido que hacer para que a mí no me falte nada y por su apoyo constante durante toda mi vida.

A mi novio y a mis amigas por su cariño, apoyo, paciencia y por siempre darme ánimos cuando los necesitaba, por brindarme su amistad y amor incondicional, por cada momento que hemos compartido risas y llantos y jamás abandonarme.

A mi asesora Mgs. Lennys Berutti un especial agradecimiento por brindarme su tiempo y apoyo durante la elaboración de mi anteproyecto y proyecto final, por sus aportes y consejos que me ha permitido terminar mi trabajo de titulación de la mejor manera

GRACIAS.

ÍNDICE

RESUMEN	15
ABSTRACT.....	16
CAPÍTULO I	17
INTRODUCCIÓN	17
CAPÍTULO II	19
OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo general.....	19
2.2. Objetivos específicos	19
2.3. Pregunta de investigación	19
CAPÍTULO III.....	20
ESTADO DEL ARTE	20
3.1. Sector lechero a nivel mundial.....	20
3.2. Producción de leche en ecuador.....	20
3.2.1. Producción de leche en Imbabura.....	21
3.3. Mastitis bovina.....	21
3.3.1. Tipos de mastitis	22
3.3.1.1. Mastitis clínica	22
3.3.1.2. Mastitis subclínica	22
3.3.2. Mastitis en Imbabura	22
3.3.3. Factores que favorecen la aparición de mastitis	23
3.3.3.1 Falta de higiene en la sala de ordeño	24
3.3.3.2. Instalaciones inadecuadas	24
3.3.4. Patógenos causantes de mastitis	24
3.3.5. Pruebas y métodos para diagnosticar mastitis	25
3.3.5.1. Observación y palpación de la ubre	25
3.3.5.2. Prueba del paño negro - taza probadora.....	26
3.3.5.3. Prueba de Whiteside	26

3.3.5.4. California Mastitis Test (CMT)	27
3.4. Identificación morfológica bacteriana	28
3.4.1. Morfología del <i>Staphylococcus aureus</i>	28
3.5. Identificación molecular bacteriana.....	28
3.6. <i>Staphylococcus aureus</i>	29
3.7. Requisitos microbiológicos de la leche cruda.....	30
3.7.1. Unidades Formadoras de Colonias (UFC).....	31
3.7.2. Conteo de Células Somáticas (CCS)	31
3.8. Toma de muestras	31
3.8.1. Toma de muestras de leche de cuartos de acuerdo con Agrocalidad.....	32
3.9. Cultivo de bacterias	33
3.9.1. Medios de cultivo.....	33
3.10. Hemólisis en cepas de <i>Staphylococcus spp.</i> que causan mastitis bovina	33
3.11. Pruebas bioquímicas	34
3.12. Prevalencia de mastitis.....	34
CAPÍTULO IV	36
MATERIALES Y MÉTODOS	36
4.1. Ubicación del lugar de estudio.....	36
4.1.1. Ubicación haciendas	36
4.1.2. Ubicación laboratorios.....	36
4.2. Materiales.....	37
4.2.1. Equipos de laboratorio	37
4.2.2. Materiales empleados en campo y laboratorio	37
4.2.3. Reactivos.....	38
4.3. Métodos	38
4.3.1. Trabajo en Campo.....	38
4.3.1.1. Selección de haciendas	38
4.3.1.2. Toma de muestras	40
4.3.2. Trabajo en Laboratorio	40

4.3.2.1. Siembra de bacterias	40
4.3.2.2. Conteo de UFC	42
4.3.2.3. Caracterización morfológica.....	42
4.3.2.4. Pruebas bioquímicas	43
4.3.2.5. Caracterización molecular	43
4.3.2.5.1. Extracción de ADN.....	43
4.3.2.5.2. Secuenciación de ADN.....	45
4.3.2.6. Hemólisis	46
4.3.3. Prevalencia.....	46
CAPÍTULO V	48
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
5.1. Presencia de <i>Staphylococcus aureus</i>	48
5.2. Unidades formadoras de colonias (UFC).....	50
5.3. Caracterización morfológica.....	52
5.4. Pruebas bioquímicas	53
5.4.1. Prueba de catalasa.....	53
5.4.2. Prueba de coagulasa.....	55
5.5. Agar sangre	57
5.6. Caracterización molecular	58
5.6.1. Extracción y secuenciación de ADN de <i>Staphylococcus aureus</i>	58
5.7. Prevalencia.....	59
CAPÍTULO VI	61
CONCLUSIONES	61
CAPÍTULO VII.....	62
RECOMENDACIONES.....	62
CAPÍTULO VIII.....	63
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
ANEXOS	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Interpretación de resultados en la prueba de Whiteside.....	27
Tabla 2 Interpretación de resultados de la prueba California Mastitis Test (CMT).....	27
Tabla 3 Requisitos microbiológicos en leche.....	30
Tabla 4 Historial de conteo de células somáticas y unidades formadoras de colonia en los años 2018 -2022 en la hacienda de código 190.....	39
Tabla 5 Historial de conteo de células somáticas y unidades formadoras de colonia en los años 2018 -2022 en la hacienda de código 173.....	39
Tabla 6 Resultados de la prueba de CMT realizada en campo.....	48
Tabla 7 Datos obtenidos de las UFC de las placas sembradas en el laboratorio.....	50
Tabla 8 Resultados de la prueba de catalasa.....	54
Tabla 9 Resumen de resultados.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Producción y rendimiento de leche a nivel regional.....	21
Figura 2 Prueba Whiteside.....	26
Figura 3 Porcentaje de vacas que dieron positivo a la prueba California Mastitis Test (CMT) hacienda de código 173.....	49
Figura 4 Porcentaje de vacas que dieron positivo a la prueba California Mastitis Test (CMT) hacienda de código 173.....	49
Figura 5 Placa Petri empleada para el conteo de UFC.....	51
Figura 6 Muestra 3 hacienda 173.....	52
Figura 7 <i>Staphylococcus aureus</i> imagen microscópica.....	52
Figura 8 Muestra 7 hacienda 190.....	53
Figura 9 <i>Staphylococcus aureus</i> imagen microscópica.....	53
Figura 10 Prueba de catalasa positiva realizada en laboratorio.....	55
Figura 11 Prueba de catalasa positiva y negativa tomada de Derolence (2023)	55
Figura 12 Prueba de coagulasa positiva y negativa realizada en laboratorio.....	56
Figura 13 Prueba de coagulasa positiva y negativa realizada por Martins (2015)	56
Figura 14 Hacienda 190 muestra 5.....	57
Figura 15 Hacienda 173 muestra 7.....	57

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Oficio enviado a los productores.....	68
Anexo 2 Datos hacienda 190.....	69
Anexo 3 Datos hacienda 173.....	70
Anexo 4 Agar empleado para el cultivo.....	71
Anexo 5 Agar diluido en agua destilada.....	71
Anexo 6 Preparación de placas para autoclavar.....	72
Anexo 7 Reactivo para prueba de CMT.....	72
Anexo 8 Limpieza de pezones	73
Anexo 9 Prueba de CMT.....	73
Anexo 10 Dispensando de agar en placas.....	73
Anexo 11 Sembrado de muestras.....	73
Anexo 12 Estufa a 37°C empleada después del sembrado de muestras.....	74
Anexo 13 Placas dentro de la estufa.....	74
Anexo 14 Crecimiento bacteriano a las 24h.....	75
Anexo 15 Conteo de Unidades Formadoras de colonias.....	75
Anexo 16 Caldo nutritivo.....	76
Anexo 17 Agar sangre.....	76
Anexo 18 Agar sangre y caldo nutritivo en tubos listos para autoclavar	76
Anexo 19 Extracción de sangre	77
Anexo 20 Plasma obtenido de la sangre	77
Anexo 21 Placa de agar sangre	77
Anexo 22 ADN extraído	77
Anexo 23 Secuencia de la muestra en placa obtenida de hacienda 190-2.....	78
Anexo 24 Secuencia de la muestra en placa obtenida de hacienda 173-8.....	78
Anexo 25 Secuencia de la muestra de ADN extraído de la muestra 173-3.....	79
Anexo 26 Secuencia de la muestra de ADN extraído de la muestra 190-7	80

RESUMEN

La producción de ganado lechero presenta un problema frecuente: la aparición de mastitis, enfermedad que causa grandes pérdidas económicas al sector pecuario. Son diversas causas las que provocan su aparición como malas prácticas de ordeño, mala nutrición, entre otras situaciones que generan un ambiente propicio para la aparición de distintos patógenos que generan mastitis a los animales. Existen varios tipos de patógenos, pero el *Staphylococcus aureus* es el agente causal más frecuente de la mastitis en bovinos.

Para elaborar la presente investigación se realizó en primer lugar una fase de selección de haciendas, para esto se tomó información de una base de datos de productores proporcionada por una empresa que recepta la leche de las provincias de Imbabura y Carchi. En donde se obtuvo un total de 291 haciendas para ambas provincias, para el primer proceso de minería de datos se consideraron sólo aquellas que presentaban los registros de conteo de células somáticas (CCS) y unidades formadoras de colonias (UFC) de los últimos 5 años (2018 a 2022) dando como resultado 94 haciendas, con estas se procedió al segundo paso de esta minería en donde se tomó en cuenta solo aquellas que en este periodo de tiempo de manera consecutiva superaban los límites de CCS y UFC establecidos por la norma técnica Ecuatoriana (NTE INEN 9:2012 Leche cruda. Requisitos) como resultado de esto se obtuvieron 10 haciendas, y de este grupo se descartaron 8 haciendas de acuerdo a su ubicación y al permiso concedido por los dueños. De las 2 haciendas restantes ubicadas en la provincia de Imbabura, se confirmó la presencia de la bacteria *Staphylococcus aureus* mediante pruebas de California Mastitis Test (CMT) y se muestrearon las que resultaron positivas dando un total de 10 muestras para la hacienda de código 190 y 15 muestras de la hacienda 173. Las muestras se llevaron a los laboratorios de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra, en donde se sembraron en placas Petri con manitol salino agar, a las que se realizaron pruebas bioquímicas y microbiológicas confirmando así la presencia de *Staphylococcus aureus*, una vez confirmada se realizó la caracterización molecular. Los resultados de las pruebas moleculares arrojaron un 99% de similitud para *Staphylococcus aureus*. Finalmente se calculó la prevalencia y se obtuvo un 83.3% para la hacienda 190 y 37.5% para la hacienda 173.

Palabras clave: UFC, CCS, *Staphylococcus aureus*, Imbabura, mastitis.

ABSTRACT

Dairy cattle production presents a frequent problem: the appearance of mastitis, a disease that causes great economic losses to the livestock sector. There are various causes that cause its appearance such as bad milking practices, poor nutrition, among other situations that create an environment conducive to the appearance of different pathogens that generate mastitis in animals. There are several types of pathogens, but *Staphylococcus aureus* is the most frequent causative agent of bovine mastitis.

To prepare this research, a farm selection phase was first carried out, for this information was taken from a database of producers provided by a company that received milk from the provinces of Imbabura and Carchi. Where a total of 291 farms were obtained for both provinces, for the first data mining process only those that presented somatic cell count (CCS) and colony-forming units (UFC) records for the last 5 years were considered. (2018 to 2022) resulting in 94 farms, with these we proceeded to the second step of this mining where only those that in this period of time consecutively exceeded the CCS and UFC limits established by the technical standard were taken into account. Ecuadorian (NTE INEN 9:2012 Raw milk. Requirements) as a result of this, 10 farms were obtained, and from this group 8 farms were discarded according to their location and the permission granted by the owners. Of the 2 remaining farms located in the province of Imbabura, the presence of the *Staphylococcus aureus* bacterium was confirmed by California Mastitis Test (CMT) and those that were positive were sampled, giving a total of 10 samples for farm code 190 and 15 samples from the farm 173. The samples were taken to the laboratories of the Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Ibarra campus, where they were planted in Petri dishes with saline mannitol agar, to which biochemical and microbiological tests were carried out, thus confirming the presence of *Staphylococcus aureus*, once confirmed, molecular characterization was performed. Molecular test results were 99% similar for *Staphylococcus aureus*. Finally, the prevalence was calculated and 83.3% was obtained for farm 190 and 37.5% for farm

173.**Keywords:** UFC, CCS, *Staphylococcus aureus*, Imbabura, mastitis.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

En las producciones animales la aparición de enfermedades es uno de los principales problemas debido a que causan una disminución notoria en cuanto a cantidad y calidad de su producto afectando directamente a la economía del productor y a la seguridad alimentaria de los consumidores.

El presente trabajo se enfoca en las producciones de ganado bovino lechero, las cuales suelen presentar un problema frecuente a nivel de salud de sus animales, y es la aparición de mastitis debido a la falta de manejo técnico o malas prácticas antes, durante y después del ordeño, golpes en las ubres, mala nutrición animal, entre otras causas que generan un ambiente propicio para la aparición agentes patógenos. La mastitis es provocada por distintos tipos de bacterias entre las cuales se encuentran *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma spp*, *Corynebacterium bovis*. La presente investigación se centra en *Staphylococcus aureus*, el cual es causante de hasta el 75% de las mastitis infecciosas en el ganado bovino (Pasachova, et al., 2019).

La mastitis es una enfermedad que causa un gran impacto a nivel económico en los productores debido a los costos que se necesitan invertir en medicamentos para el tratamiento y servicios veterinarios una vez que esta se presenta y si no es tratada a tiempo puede llegar a generar la pérdida del animal. Además de esto si una vaca adquiere la enfermedad la leche de esta no puede ser consumida por las personas y se tendrá que desechar hasta que se elimine por completo la enfermedad DANE (2014).

Por otro lado, el presente trabajo es desarrollado con el objetivo de identificar que fincas en la provincia de Imbabura han presentado de manera repetitiva durante los últimos 5 años un exceso en los límites de UFC (unidad formadora de colonias) y CCS (conteo de células somáticas) que son permitidos por el INEN en los requisitos de leche cruda.

Por lo tanto, la realización del proyecto planteado se justifica debido a la utilidad de sus resultados finales para conocer el estado actual de la provincia, corroborar la presencia de *Staphylococcus aureus* y poder realizar otras investigaciones afines como plantear posibles soluciones o medidas preventivas, con lo cual se incrementará la bibliografía especializada en el tema que hoy por hoy es un tanto escasa en la provincia.

Para concluir, la presente investigación se encuentra dividida en siete capítulos los mismos que son mencionados en orden que se encuentran presentados: introducción, objetivos, estado del arte, materiales - métodos, resultados-discusión y finalmente conclusiones y recomendaciones.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Determinar la presencia de *Staphylococcus aureus* en fincas productoras de leche en la provincia de Imbabura.

2.2. Objetivos específicos

- Identificar las fincas que superaron los niveles de UFC, y CCS permitidos por las normas INEN durante los últimos 5 años de manera consecutiva.
- Caracterizar morfológica y molecularmente el *Staphylococcus aureus* mediante pruebas microbiológicas e identificación molecular.
- Determinar la prevalencia de mastitis causada por *Staphylococcus aureus* en fincas de la provincia de Imbabura.

2.3. Pregunta de investigación

¿Existe prevalencia de *Staphylococcus aureus* en fincas de la provincia de Imbabura?

CAPÍTULO III

ESTADO DEL ARTE

3.1. SECTOR LECHERO A NIVEL MUNDIAL

En un informe presentado por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación [FAO (2016)] acerca del sector lechero mundial, se menciona que en el año 2013 la leche fue uno de los productos agrícolas más importantes teniendo una producción de 770 000 millones de litros que se encuentran valorados en 328 000 millones de dólares ocupando así el tercer lugar en producción por tonelaje. Además de que este producto constituye el 27% en el valor agregado global del ganado y un 10% en la agricultura.

Dentro del informe también se menciona que el sector lechero crece de manera acelerada y se proyecta que para el año 2025 esta aumentará su producción a 177 millones de toneladas y la tasa de crecimiento promedio es del 1.8% aproximado por año.

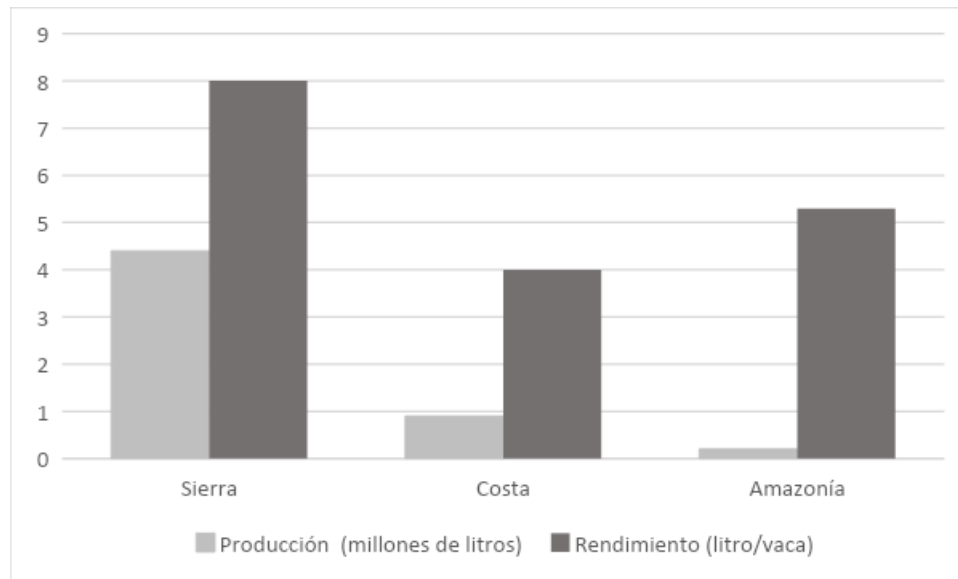
En el año 2022 la Unión Europea fue señalada como la mayor productora de leche de vaca en todo el mundo, los 27 países que la conforman llegaron a producir alrededor de 144 millones de toneladas métricas de leche. En segundo lugar, se encuentra Estados Unidos con 103 millones de toneladas métricas y en tercer lugar la India con una producción de 97 millones de toneladas métricas (Orús, 2023).

3.2. PRODUCCIÓN DE LECHE EN ECUADOR

El Instituto Nacional de Estadística y Censos [INEC (2023)] menciona que en base a la ESPAC (Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua) en el 2022, la producción diaria de leche a nivel nacional fue de 5.5 millones de litros con un promedio en el rendimiento de 6.8 litros/vaca. La provincia con mayor producción es Pichincha con una producción de 18.7% en todo el país. En la figura 1 se muestran la producción y el rendimiento en litros/vaca por región.

Figura 1

Producción y rendimiento de leche a nivel regional



Nota. tomado de ESPAC, 2022.

3.2.1. Producción de leche en Imbabura

Durante el año 2022 la provincia de Imbabura contó con 13 814 vacas ordeñadas y una producción total de 110 375 litros de leche de los cuales 86 637 de litros fueron vendidos en líquido (INEC, 2023).

3.3. MASTITIS BOVINA

La mastitis es un proceso que causa cierto grado de inflamación en la glándula mamaria debido a una infección microbiana que es provocada por patógenos que ingresan a la glándula a través del canal del pezón. Y está caracterizada por cambios químicos y físicos de la glándula mamaria causando un fuerte impacto en la producción y el bienestar de los animales además de afectar tanto la calidad como la cantidad de la leche (Mera, et al., 2017).

El proceso de contagio de la enfermedad se da de la siguiente manera: los agentes etiológicos se mueven desde la parte externa de la ubre hacia el interior de la misma por medio del conducto

glandular y según el grado de patogenicidad que presente la enfermedad puede causar diversas perturbaciones como la fibrosis, abscesos o gangrenas, la atrofia del tejido mamario entre otras alteraciones (Díaz y Martínez,2020).

En términos generales esta enfermedad puede clasificarse de acuerdo al grado de inflamación, lesiones e implicaciones sistémicas que presente la vaca.

3.3.1. Tipos de mastitis

3.3.1.1. Mastitis clínica

Se caracteriza por la presencia de inflamación mamaria, además de dolor y se siente calor en ese órgano. Esto a su vez provoca una leche diferente pues el producto final es una leche amarilla o roja, debido al pus que posee (Ramírez, et al., 2018).

3.3.1.2. Mastitis subclínica

En este tipo de enfermedad los cambios en las mamas o la leche no son muy evidentes, debido a que los cambios solo se pueden comprobar con una prueba de Mastitis, donde se determina la composición de la leche debido a la presencia de factores inflamatorios o una producción pequeña de leche. De acuerdo a Avilés y Medina (2022), en la realidad, “la mastitis subclínica no se puede detectar a tiempo, por lo que es importante utilizar con frecuencia técnicas de laboratorio para contar las células somáticas y realizar cultivo bacteriano” (p.18).

3.3.2. Mastitis en Imbabura

Al ser la mastitis un problema general de la ganadería, la zona norte y la provincia de Imbabura no están exentas de dicha patología.

En la provincia de Imbabura las investigaciones sobre el tema de mastitis y su prevalencia son muy escasos, pero en un trabajo de investigación se determinó que el porcentaje de prevalencia en toda la provincia es del 81.48% (Tates, 2018, como se citó en Echeverría, 2016).

Por otro lado, en su proyecto de investigación Jácome (2022) hace un análisis sobre la presencia de la mastitis, enfocada principalmente en el cantón Antonio Ante. Según la autora entiende a la mastitis como una enfermedad que es provocada por ciertas bacterias que penetran la ubre cuando los productores o encargados del manejo animal realizan métodos inadecuados en el transcurso del ordeño, provocando un proceso inflamatorio leve o grave y generando fuertes pérdidas económicas a la industria lechera.

De acuerdo a la investigadora, “la causa principal para que (la bacteria) esté presente, es el uso indiscriminado de antibióticos” (p.15). Como resultados de la investigación se determinó con ayuda de la prueba (California Mastitis Test) el tipo de mastitis de las unidades de producción ganaderas y además la influencia en la calidad de leche, donde, además:

Se identificaron los agentes etiológicos causales como *Staphylococcus aureus* R., *Staphylococcus epidermis* W., *Staphylococcus chromogenes* G. y *Staphylococcus simulans* K. Las bacterias que presentaron mayor resistencia a los antibióticos (cefalexina, gentamicina, amoxicilina con ácido clavulánico, lincomicina y neomicina), fueron *Staphylococcus aureus* y *S. epidermis* en un 3%: mientras que *S. simulans* presentó 32% y *S. chromogenes* 15% de sensibilidad bacteriana (Jácome, 2022, p. 15).

3.3.3. Factores que favorecen la aparición de mastitis

Las vacas pueden llegar a presentar una predisposición genética a contraer mastitis lo cual se asocia a determinadas características anatómicas del animal, además de su estado nutricional, número de partos, estado de lactación, lactogénesis, involución mamaria (Mora, et al., 2015 como se citó en Oltenacu y Broom, 2010).

Por otro lado, también se puede presentar debido a varios factores externos como:

3.3.3.1 Falta de higiene en la sala de ordeño

Este aspecto es uno de los más importantes pues en el ambiente de cuidado y ordeño del ganado generalmente no se toma muy en cuenta esta situación. De hecho, existen trabajadores que carecen de higiene, debido a que mantienen sus manos o ropa sucias, emplean agua de mala calidad para la limpieza de las ubres, e incluso no limpian ni desinfectan sus materiales y la sala de ordeño antes y después de cada ordeño. Por otro lado, también es importante que exista una adecuada higiene de las instalaciones en cuanto a limpieza del lugar y material de ordeño además de un correcto manejo de residuos (Bonifaz y De Jesús, 2011).

3.3.3.2. Instalaciones inadecuadas

Para evitar el apareamiento y propagación de enfermedades que afectan al ganado, es necesario poseer una infraestructura adecuada, además de los equipos necesarios para el manejo de la producción y que esta sea óptima y eficiente. Según Avilés y Medina (2022) “si las instalaciones tienen pisos con hoyos u obstáculos, así como alambres sueltos en los corrales, o deficiencia en el drenaje de aguas residuales, se corre el riesgo de provocar daños al animal que tendrán consecuencias en la producción a futuro” (pp.19-20). Debido a que estas deficiencias vuelven susceptible al animal de contraer algún tipo de patología o generar heridas que sirven de igual forma como una entrada para los microorganismos infecciosos a su cuerpo.

3.3.4. Patógenos causantes de mastitis

En el artículo “Prevalence of Mastitis Pathogens and Antimicrobial Susceptibility of Isolates From Cattle and Buffaloes in Northwest of Pakistan” se menciona que el 70% de las causas de mastitis son patógenos bacterianos y el otro 30% son agentes no infecciosos como traumas físicos o lesiones mecánicas de la glándula. Por otro lado, dentro de ese 70% existen unas 135 especies bacterianas que se asocian con la mastitis bovina y 20 de ellas son las más comunes en mastitis de animales lecheros. Entre los patógenos bacterianos más comunes en la mastitis son

Staphylococcus aureus, *Escherichia coli*, *Estafilococos coagulasa negativos* (CNS) y varios tipos de *Streptococcus* sp. (Alí, et al., 2021).

Por otro lado, Bedolla (2017) clasifica a los agentes en tres grupos dependiendo del tipo de mastitis que causen:

- Mastitis Contagiosa: *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium* spp. y *Mycoplasma* spp. Los cuales se transmiten de animal a animal y el primer reservorio que contiene a los patógenos es el animal infectado o el cuarto de la ubre.
- Mastitis ambiental: *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* y *Enterococcus* spp. Estos a diferencia de los anteriores se transmiten entre las ordeñas por el ambiente el cual es el reservorio principal de los mismos.
- Patógenos oportunistas: *Serratia marcescens*, levaduras, *Prototheca* spp., *Pseudomona* spp. y *Nocardia* spp. La principal forma en que se transmiten es el ambiente debido a un inadecuado manejo del entorno de la vaca, como la cama húmeda, ubres mojadas de leche, preparación inadecuada de la ubre, entre otras. Estas infecciones casi siempre ocurren de forma esporádica.

3.3.5. Pruebas y métodos para diagnosticar mastitis

Bedolla (2018) menciona que un plan de diagnóstico integral de mastitis en cualquier hato necesita de un monitoreo constante en el cual se pueden emplear diferentes pruebas para una detección temprana de esta enfermedad.

3.3.5.1. Observación y palpación de la ubre

Esta infección puede provocar que se inflamen uno, varios o todos los cuartos de la ubre de la vaca por lo cual se observa un incremento de tamaño en el cuarto o cuartos afectados además de un incremento en la temperatura del área afectada y se puede observar un enrojecimiento de

la zona. Con la palpación de la ubre, especialmente del pezón se notan endurecimientos. En la zona de transición de la cisterna mamaria al canal del pezón pueden observarse estrechamientos debido al aumento del grosor en el epitelio que originan trastornos en la emisión de leche (Bedolla, 2018).

3.3.5.2. Prueba del paño negro - taza probadora

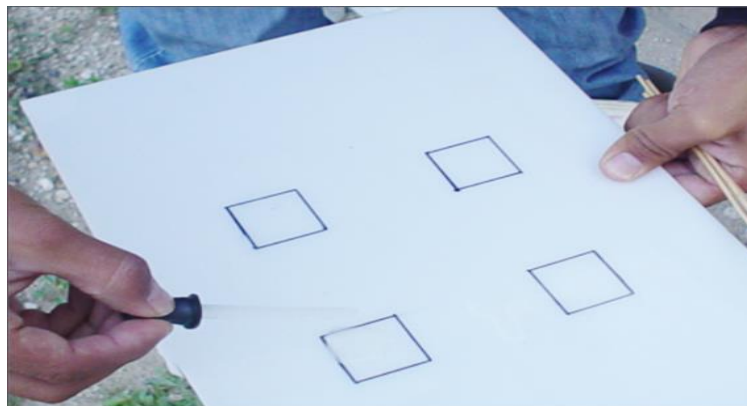
Para esta prueba se utiliza una malla negra o un *strip cup* que es un recipiente diseñado para esto. Esta prueba se realiza durante la preparación de la vaca para el ordeño. Para esto se vierten los primeros chorros de la leche por la malla o el recipiente para observar la presencia de grumos en la misma y de esta manera detectar leche anormal a causa de algún patógeno.

3.3.5.3. Prueba de Whiteside

Para esta prueba se necesita mezclar por 20s unas 5 gotas de leche con 2 gotas de una solución de NaOH al 4% en una placa de acrílico, esto provoca que la leche se gelifique y se formen unos grumos que son visibles, entre mayor número de células somáticas el tamaño del grumo será mayor.

Figura 2

Prueba Whiteside



Nota. Tomado de Bedolla, 2018

Tabla 1*Interpretación de resultados en la prueba de Whiteside*

Nivel de gelificación	Células somáticas/ ml
3+	Más de 2 000 000
2+	1 000 000- 2 000 000
1+	600 000- 1 000 000
TRAZA	300 000- 600 000
NEGATIVO	0-325 000

Nota. La interpretación se basa en la consistencia del gel, a mayor consistencia (+3) de este, el número de células somáticas es mayor. Tomado de Bedolla, 2018.

3.3.5.4. California Mastitis Test (CMT)

La prueba de CMT es una prueba de campo de fácil manejo y buena sensibilidad, aunque esta no proporciona los resultados en valores numéricos se utiliza como un indicador si el recuento de células es elevado o bajo.

Para realizar prueba se necesita tomar uno o dos chorros de leche de cada uno de los cuartos y colocar en cada placa de la paleta, tomando en cuenta que se debe desechar la leche del pre-ordenio, una vez listo esto se añade a la placa la misma cantidad de reactivo de la prueba que de leche, se mezcla y se espera la gelificación, a mayor presencia de células habrá una mayor concentración de ADN y la formación de gelatina será de igual forma mayor interpretándose como el grado más elevado de inflamación (Bedolla, 2018).

Tabla 2*Interpretación de resultados de la prueba California Mastitis Test (CMT)*

Nivel de gelificación	Rango relativo del nivel de células somáticas (células/ml)
+3	>5.000.000
+2	800.000-5.000.000
+1	400.000-1.500.000
Trazas	150.000-500.000
Negativo	<200.000

Nota. A mayor consistencia del gel, el contenido de células somáticas en la leche será mayor, Tomado de Bedolla, 2018.

3.4. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA BACTERIANA

La identificación de bacterias se basa en la taxonomía clásica y la tradicional de los caracteres fenotípicos como lo es la morfología. En la identificación morfológica bacteriana se observan aspectos como tamaño, aspecto, esporas, flagelos, tipos de tinción. Para la tinción las coloraciones más usadas son azul de metileno y la de Gram, siendo la última la que especialmente se usa debido a que permite ver las propiedades de tinción para toda clase de bacterias y las divide en dos grupos grampositivas color violeta y gramnegativas en color rojo (Bou, et al., 2011).

La morfología de las colonias bacterianas es fundamental durante la identificación preliminar por eso es importante que las colonias que serán examinadas sean de cultivos frescos.

3.4.1. Morfología del *Staphylococcus aureus*

El *Staphylococcus aureus* es un microorganismo Gram-positivo que presenta la morfología en cocos y una agrupación en racimos. Las colonias de esta bacteria son lisas, convexas y brillantes, poseen un característico color amarillo dorado debido a la producción de carotenoides durante su crecimiento (Pasachova, et al., 2019).

3.5. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR BACTERIANA

Las técnicas de identificación molecular en bacterias se fundamentan en generar una ampliación genómica y en la secuenciación de los genes o sus fragmentos. Durante estas técnicas los factores críticos son la extracción del ADN y su amplificación por lo cual deben tratarse con especial cuidado durante toda la metodología, mientras que el medio de cultivo o las condiciones de incubación no son factores determinantes (Bou, et al., 2011).

A partir de cultivos puros de la bacteria se extrae su ADN a través de la metodología que se indica en los kits de extracción de ADN utilizados para este fin. Una vez extraído el ADN, este

se envía a un laboratorio comercial en el que se realiza la secuenciación del mismo (Aquino et al., 2017).

3.6. *Staphylococcus aureus*

Es una bacteria del filo firmicutes de clase bacilli y perteneciente al orden bacillales, su familia es *Staphylococcaceae* y específicamente el género *Staphylococcus*. Esta es de gran importancia debido a que su presencia llega a causar distintos tipos de patologías en personas y animales, debido a la intervención de los distintos factores de patogenicidad y virulencia que llega a presentar a lo largo de todo su ciclo de vida (Pasachova et.al., 2019).

Los mismos autores mencionan que este microorganismo es difícil de tratar debido a la capacidad que tiene de colonizar e invadir las células de su huésped esto gracias a sus mecanismos de resistencia los cuales pueden llegar a generar una matriz extracelular la cual impide la interacción de los antibióticos con las bacterias.

Los *Staphylococcus* son conocidos como el agente etiológico más común de la mastitis en el ganado y provocan una pérdida tanto en la cantidad como en la calidad de la leche. Esto se atribuye a la función invasiva, formación de biopelículas y factores de virulencia que son mediados por toxinas y la resistencia a los antimicrobianos. Los factores de virulencia como leucocidinas, hemolisinas, enterotoxinas generan el desarrollo de infecciones intramamarias y contribuyen al patógeno a escapar del sistema inmunitario del huésped (Neelam, et al., 2022).

Ese patógeno habita tanto fuera como dentro de la ubre, y elabora toxinas que rompen las membranas celulares afectando directamente el tejido mamario, favoreciendo de esta manera su multiplicación en lesiones infectadas y aumentando así su colonización en la zona de infección, dando como resultado la contaminación de la ubre y causando la enfermedad que puede llegar a ser crónica de no ser tratada a tiempo (Avilés y Medina, 2022).

Este patógeno tiene la habilidad de evadir la respuesta inmune de su hospedador y así sobrevivir dentro de diferentes células que se encuentran en la glándula mamaria y pasar por un largo período sin causar una inflamación clínica por lo cual las vacas que ya han estado infectadas al menos una vez tienen mayor riesgo de infectarse nuevamente (Pereyra, et al., 2014).

Por otro lado, Muñoz et al., (2012) mencionan que a mayor número de lactancias tenga una vaca la susceptibilidad a contraer infecciones intramamarias incrementa debido a que es mayor el tiempo que están expuestas a los patógenos, estas infecciones son causadas principalmente por la presencia de *Staphylococcus aureus*, y en su investigación demuestran que este patógeno aumenta a medida que avanza la lactancia pudiendo llegar a aumentar hasta un 33.3% cuando las vacas llevan más de 190 días dando de lactar.

3.7. REQUISITOS MICROBIOLÓGICOS DE LA LECHE CRUDA

La Norma Técnica Ecuatoriana en su quinta revisión (2012) establece los siguientes requisitos:

Tabla 3

Requisitos microbiológicos en leche

Requisito	Límite máximo	Método de ensayo
Recuento de microorganismos aerobios mesófilos REP, UFC/cm³	1.5x10 ⁶	NTE INEN 1529: -5
Recuento de células somáticas/cm³	7.0x10 ⁵	AOAC-978.26

Nota. El método de ensayo se basa en el uso de normas nacionales e internacionales. Tomado de INEN-9, 2012.

Por otro lado, es importante mencionar que estos requisitos son exigidos en todos los países, pero cada uno mantiene diferentes límites así pues como ejemplo tenemos la Unión Europea la cual exige entre 100 000 a 500 000 UFC/ml y en el caso de que esto no se cumpla se aplican sanciones económicas; mientras que en Estados Unidos se acepta un valor de 300x10³ UFC/ml (Contero, et al., 2021).

3.7.1. Unidades Formadoras de Colonias (UFC)

Es un término que se utiliza en microbiología y que sirve como indicador de la cantidad presente de microorganismos en un líquido. Este valor está determinado por el número de colonias individuales y describe el número de células de un organismo en el agua.

3.7.2. Conteo de Células Somáticas (CCS)

Es un indicador de la cantidad de células presentes en la leche y que no son células productoras de leche, como ejemplo de esto es la presencia de glóbulos blancos que se encuentran en la leche cuando la ubre está infectada con mastitis (Quevedo, 2018).

3.8. TOMA DE MUESTRAS

Las técnicas de muestreo bacteriano pueden variar dependiendo el tipo de muestra que se tome: tejido adiposo, leche, comunidades microbianas del rumen, conductos radiculares, patógenos periodontales.

En el artículo llamado “Método de tomas de muestras para análisis bacteriológico” se describe el siguiente procedimiento de toma de muestras, tomando en cuenta que es importante primero haber preparado con antelación todo el material que se va a ocupar como desinfectante de pezones, guantes, tubos, gradilla, marcador permanente (Labrie, 2020).

Una vez con todo listo, se deben colocar los guantes y limpiar los pezones con papel o toallas limpias y desinfectar con algodón y alcohol los pezones, hasta que el algodón salga limpio. Ya desinfectado los primeros chorros deben ser descartados para reducir el número de bacterias del canal de pezón; después de eso se toma un tubo de ensayo y se quita el tapón para así poder tomar la muestra, se debe evitar que haya contacto del pezón con el tubo y se debe colocar de manera inclinada para evitar se contamine con otras sustancias, cada tubo debe contener la misma cantidad de leche de los cuatros pezones (se deben llenar $\frac{3}{4}$ partes) colocar el tapón.

En cada tubo se debe colocar la fecha, número de identificación de la vaca y si se tomó de un solo cuarto anotar de cuál fue tomado. Las muestras tomadas deben ser refrigeradas (4°C – max. 24h y -20°C- max. 1 mes). Finalmente, las muestras son transportadas a un laboratorio de microbiología para establecer la identificación microbiológica del microorganismo.

3.8.1. Toma de muestras de leche de cuartos de acuerdo con Agrocalidad

Flores (2020) menciona que se deben seguir varias instrucciones para la toma de muestras, las cuales se detallan a continuación:

- La persona encargada de la toma de muestras debe lavarse bien las manos con agua y jabón para así reducir la carga microbiana, y secarse con papel desechable.
- Debe utilizar guantes, mascarilla, mandil u overol, y cofia para evitar cualquier cuerpo extraño en la muestra.
- Los frascos que se ocuparán deberán ser rotulados antes de tomar la muestra.
- Los pezones deben ser lavados con suficiente agua y ser secados con papel desechable.
- Se debe descartar al menos los 3 primeros chorros de leche. Si observa en la glándula o en la leche algún signo clínico se debe anotar en todo en el registro INT/CL/010-FO01.
- Se deben sumergir los pezones en una solución germicida por 30s y secarlos con papel desechable.
- Para tomar la muestra de manera individual de cada cuarto. Se debe quitar la tapa del frasco y de manera inclinada tomar la muestra evitando que el pezón toque el tubo.
- Para una muestra compuesta o completa de los 4 pezones se debe comenzar por el pezón que está más próximo y continuar por los que están más lejos, se debe tomar aproximadamente 10 ml por cuarto de ubre.
- Al final las muestras deben ser colocadas en un cooler o refrigerador para ser llevados a laboratorio en donde se realizarán los análisis.

3.9. CULTIVO DE BACTERIAS

El tamaño de las bacterias impide que estas puedan ser estudiadas como un individuo aislado, sino como una sola población. Para poder obtenerlas se necesita emplear técnicas y un medio de cultivo que le proporcione los nutrientes necesarios para el crecimiento de las bacterias este medio puede ser un agar o un caldo; todos estos procedimientos se llevan a cabo en un entorno controlado de un laboratorio.

3.9.1. Medios de cultivo

Actualmente la mayoría de medios de cultivo se encuentran de forma liofilizada por cual es necesario rehidratar, para esto se deben seguir las instrucciones del fabricante que suelen venir detalladas en el envase; se tomará la cantidad que desea y se disolverá en agua destilada, por otro lado, si se trata de un caldo esta irá directamente a esterilizarse en las condiciones especificadas en el envase (Sanz, 2011).

Además, se menciona que una vez estén esterilizados se deben dejar enfriar a temperatura ambiente para después ser vertidos en los recipientes que se necesitan, en el caso de medios sólidos si se desean verter en tubos deberán inclinarse para que al solidificar adopten una forma de agar inclinado, si se desea en placas Petri se debe ir vertiendo el medio en las mismas y cerca de una llama para evitar que se contaminen.

3.10. Hemólisis en cepas de *staphylococcus* spp. que causan mastitis bovina

Las hemolisinas son proteínas que producen lisis de eritrocitos además de causar toxicidad en varias líneas celulares. Existen 4 tipos de hemolisinas: alfa, beta y gamma que son las más conocidas, pero también existen las delta, las cuales involucran a la invasión del huésped y penetración de tejidos, identificar el tipo de hemolisina es necesario para poder realizar una posible identificación del patógeno presente en el cultivo. Las hemolisinas sintetizadas por la mayoría de cepas de *Staphylococcus* tienen la capacidad hemolítica y citolítica lo cual indica

que llegan a actuar sobre determinadas células del huésped como plaquetas, fibroblastos, leucocitos y macrófagos (Cervantes, et al., 2014).

3.11. PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Bou, et al., (2011) mencionan que lograr identificar el agente etiológico causante de cualquier proceso infeccioso permite poder aplicar medidas para su eliminación del organismo. Existen diversas pruebas, pero para la presente investigación se mencionan solo acerca de la prueba de catalasa y coagulasa.

- Catalasa: la catalasa es una enzima que se encuentra presente en gran parte de bacterias aerobias. El fundamento de esta prueba menciona que la presencia de esta enzima en una bacteria junto con peróxido de hidrogeno genera el desprendimiento de burbujas debido a que lo descompone en agua y oxígeno, si este fenómeno ocurre la prueba es positiva.
- Coagulasa: Es una prueba más lenta debido a que se necesita más tiempo para poder observar los resultados. Es una proteína que la producen varios microorganismos que causan que el fibrinógeno se convierta en fibrina y se utiliza para distinguir entre los distintos tipos de *Staphylococcus*, si al poner en contacto el plasma con una colonia se forma un coagulo la prueba es positiva.

3.12. PREVALENCIA DE MASTITIS

La prevalencia hace referencia a un número de individuos que presentan síntomas o padecen una enfermedad en un período de tiempo determinado dividido para el total de la población; se usa como un concepto estadístico en epidemiología que se utiliza para poder planificar una política sanitaria (Bonifaz y Conlago, 2016).

Empleando este concepto los mismos autores realizaron una investigación nombrada “Prevalencia e incidencia de mastitis bovina mediante la prueba de California mastitis test con

identificación del agente etiológico, en Paquiestancia, Ecuador”, el objetivo de la investigación fue determinar el porcentaje de prevalencia e incidencia durante dos muestreos e identificar al agente causante y así poder plantear medidas para mejorar la calidad sanitaria.

El muestreo de investigación se realizó en 880 cuartos mamarios pertenecientes a 220 vacas de 42 haciendas, de las 220 en la primera fase 141 vacas dieron positivo a la prueba mientras en la segunda fase hubo un incremento dando como positivo a la prueba un total de 145 vacas, con estos datos se calculó su prevalencia utilizando la siguiente fórmula ((Prevalencia= Casos contagiados/ número de la población)*100), en donde se obtuvo como resultado una prevalencia de 64% en la primera fase y un incremento del 2% en la segunda dando una prevalencia de 66%. En base a esto plantean como recomendación que se empleen medidas preventivas para los animales que aún no son contagiados y medidas curativas para los que ya dieron positivo además de mantener un seguimiento continuo para reducir estos porcentajes. Por otro lado, entre los agentes causantes se encontró varias especies de *Staphylococcus*, *Escherichia. Coli*, *Micrococcus*, *Corynebacterium* sp y Flora mixta contaminante, en donde el mayor porcentaje pertenecía a las especies de *Staphylococcus*.

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se describe la ubicación de las fincas en las cuales se extrajeron las muestras para la parte experimental de la investigación además de materiales y métodos empleados para la obtención de dichas muestras y de la determinación del tipo de microorganismos encontrados en las mismas.

4.1. UBICACIÓN DEL LUGAR DE ESTUDIO

4.1.1. Ubicación haciendas

El presente trabajo se realizó en dos haciendas que fueron seleccionadas previamente mediante un análisis a los registros de CCS y UFC. Estas se encuentran ubicadas en dos cantones de la provincia de Imbabura y son identificadas mediante códigos y no por nombres.

- **Hacienda 190**

Provincia: Imbabura

Latitud: N 0°23'19.8"

Cantón: Antonio Ante

Longitud: W 78°10'17.0"

Parroquia: Imbaya

Altitud: 2015 m.s.n.m

- **Hacienda 173**

Provincia: Imbabura

Latitud: N 0°23'04.5"

Cantón: Urcuquí

Longitud: W 78°11'20.5"

Parroquia: San Miguel de Urcuquí

Altitud: 1974 m.s.n.m

4.1.2. Ubicación laboratorios

La parte experimental fue desarrollada en los laboratorios de microbiología y biotecnología pertenecientes a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador en su Sede Ibarra (PUCE I).

Provincia: Imbabura
Cantón: Ibarra
Parroquia: San Francisco

Latitud: N 0°21'50"
Longitud: W 78°15'40"
Altitud: 2220 m.s.n.m

4.2. MATERIALES

4.2.1. Equipos de laboratorio

- Refrigeradora
- Autoclave
- Balanza analítica (ADAM)
- Estufa (Mettler)
- Cámara de flujo laminar
- Contador de colonias Stuart (BioCote)
- Microscopio (MICROS AUSTRIA)
- Vortex mixer (Labnet)
- Bloque calentador seco (Labnet)
- Microcentrífuga PRISM (Labnet)
- Centrifuga (DIAB)

4.2.2. Materiales empleados en campo y laboratorio

- Frascos para muestras
- Paleta para test California
- Placas Petri
- Frasco de laboratorio autoclavable
- Mecheros de alcohol
- Micropipeta y puntas
- Papel Parafilm

4.2.3. Reactivos

- Agua destilada
- Alcohol
- Manitol salado agar
- Reactivo para C.M.T
- Agar Sangre
- LB Broth Base
- Peróxido de hidrógeno
- Set de tinción gram (cristal violeta, Lugol, safranina)
- Kit de extracción de ADN (PureLink: genomic DNA mini kit)

4.3. MÉTODOS

4.3.1. Trabajo en Campo

4.3.1.1. Selección de haciendas

Para la selección de haciendas se realizó un proceso de minería de datos sobre una base de datos que fue proporcionada por una empresa que receipta leche de las provincias de Imbabura y Carchi, en la base de datos había un total de 291 haciendas y un registro de datos desde el año 2014 al 2022.

La primera parte consistió en filtrar de todas las haciendas sólo aquellas que tenían datos de los últimos 5 años de manera consecutiva, de aquí se obtuvieron 94 haciendas, posteriormente se constataron las haciendas que no superaran los límites que se plantean en la tabla 3 (Requisitos microbiológicos en leche), de manera consecutiva en los últimos 5 años, una vez verificado este dato se obtuvieron 10 haciendas, de las cuales 2 ya no proveen de leche a la empresa, por cual no se proporcionó el contacto de estas, 3 pertenecían a la provincia del Carchi, quedando un

total de 5 haciendas para muestrear en la provincia de Imbabura, de las cuales fue posible contactar 2 de ellas.

Una vez realizado todo este proceso de minería de datos se procedió a tomar muestras de las dos haciendas. En las tablas 4 y 5 se detalla un promedio calculado por año.

Tabla 4

Historial de conteo de células somáticas y unidades formadoras de colonia en los años 2018 - 2022 en la hacienda de código 190

Año	CCS/ml	UFC/ml
2018	738417	749055
2019	454083	5074467
2020	354625	4434400
2021	508000	4108178
2022	671000	13213813

Nota. En la tabla se muestra un promedio por año del conteo de las CCS= conteo de células somáticas y UFC= unidades formadoras de colonias. Tomado de los registros de la empresa que se utilizó para la presente investigación.

Tabla 5

Historial de conteo de células somáticas y unidades formadoras de colonia en los años 2018 - 2022 en la hacienda de código 173

Año	CCS/ml	UFC/ml
2018	649333	94907
2019	779458	151522
2020	914125	167683
2021	744267	3322809
2022	982400	19746560

Nota. En la tabla se muestra un promedio por año del conteo de las CCS= conteo de células somáticas y UFC= unidades formadoras de colonias. Tomado de los registros de la empresa que se utilizó para la presente investigación.

4.3.1.2. Toma de muestras

Para la toma de muestras primero se realizó una prueba de CMT en 208 cuartos mamarios pertenecientes a 52 vacas divididas en 2 haciendas, 12 pertenecientes a la hacienda de código 190 y 40 a la hacienda de código 173. Se tomo una sola muestra de todos los cuartos infectados por cada vaca. En total se tomaron 25 muestras, 10 pertenecientes a la hacienda 190 la cual poseía un total de 12 animales en producción, y 15 de la hacienda 173 la cual tenía 40 animales en producción.

Las muestras de leche fueron recolectadas antes del ordeño y se empleó la metodología detallada por Labrie (2020), primero se realizó una limpieza a los pezones, y en la paleta para el test de mastitis se agregó un poco de leche de cada pezón y también la misma cantidad de reactivo de CMT, luego de esto se agitó suavemente la paleta para observar si había algún cambio en la leche tomando muestras únicamente de él o los cuartos de la ubre de la vaca en donde sí se presentó algún cambio en la consistencia de la leche, una vez con la muestra se etiquetaba y guardaba en un cooler con hielo para conservarlas hasta trasladarlas al laboratorio de microbiología.

4.3.2. Trabajo en Laboratorio

4.3.2.1. Siembra de bacterias

Para la siembra de bacterias se empleó manitol salado agar debido a que este es usado para la diferenciación de estafilococos a partir de distintas muestras. En el instructivo elaborado por los laboratorios Britania S.A. (2021) menciona que “el manitol es un medio altamente selectivo por la alta concentración salina y diferencial debido a la capacidad de fermentación por los microorganismos” (p.1), estos microorganismos producen ácidos que cambian el pH del medio y cambia el indicador de pH convirtiéndolo de color rojo a color amarillo.

Los estafilococos pueden o no fermentar el manitol, si estos llegan a fermentar se podrán observar colonias amarillas rodeadas de un mismo color, y si no fermentan serán de color rojo que estarán rodeadas de una zona de color rojo o púrpura.

Se preparó el agar el cual sirvió para realizar el cultivo de bacterias, se pesó la cantidad en el envase, el cual indicaba que para 1000 ml de agua se debía colocar 111 g de agar, con estos datos proporcionados por el fabricante se realizó una regla de tres, tomando en cuenta que para las 25 muestras se necesitaban 500 ml.

$$\begin{array}{l} 1000\text{ml}-----111\text{g} \\ 500\text{ml}-----x = 55.5\text{g} \end{array}$$

La siembra de muestras se basó en la metodología de Santabrosio, et al., (2009) y se realizó el siguiente trabajo en laboratorio:

Una vez con el agar listo, se procedió a meter en el autoclave junto con 25 placas Petri que fueron envueltas en papel, estuvieron en el autoclave por 1 hora y 30 min para su esterilización, una vez esterilizados se llevaron a la cámara de flujo que fue previamente desinfectada con alcohol, se colocaron 5 mecheros de alcohol para evitar que se puedan contaminar las placas, con todo el material listo se procedió a ir dispensando en cada placa, se colocó aproximadamente 20 ml de agar y se cerraba, luego flameaba y dejaba a un lado, cuando todas las placas estuvieron listas se esperó que el agar se hiciera gel para poder realizar el cultivo.

Las muestras de leche fueron previamente sacadas del cooler para que estén a temperatura ambiente y poder ser utilizadas, cuando el agar estuvo listo se fue tomando 1 ml de leche con la micropipeta y colocando en cada placa que luego se selló con papel Parafilm y se etiquetó, cuando se terminó con todas las placas se llevaron a la estufa por 24 h a 37°C para esperar que crezcan las bacterias, y a las 24 h ya se pudo observar el crecimiento bacteriano.

4.3.2.2. Conteo de UFC

Para el conteo de bacterias se utilizaron las placas Petri sembradas con 1 ml de leche, las cuales se dejaron en la estufa y luego de 24h se observó la aparición de colonias bacterianas.

Para este procedimiento se utilizó la máquina “colony counter” y su manual [Marriot (2017)] en donde explica de manera detallada el uso de la misma, menciona que se debe ir colocando cada una de las placas y para el conteo se debe asegurar que la pantalla esté en cero y con ayuda de un marcador se marca cada colonia y la máquina irá registrando, una vez terminado se retira la placa y se pone el contabilizador en cero y este procedimiento se llevó a cabo con las 25 cajas que se obtuvieron de las muestras.

4.3.2.3. Caracterización morfológica

Para realizar la caracterización morfológica fue necesario realizar tinción Gram. Para esto se utilizó la metodología detallada por Sanz (2011) en su capítulo de tinción de bacterias:

Con un asa bacteriológica que previamente fue esterilizada se tomó una pequeña muestra de colonias de una de las cajas pertenecientes a una hacienda y se colocó en un portaobjetos limpio el cual tenía una gota de agua destilada, con el asa se mezcló hasta obtener una mezcla homogénea, esto se realizó cerca del mechero para lograr que la muestra se fije.

Una vez con la muestra fijada se procedió a colocar cristal violeta y se dejó por 1 min luego se lavó con agua destilada el exceso de colorante y se colocó Lugol dejándolo por otro minuto para después decolorar con alcohol por 30s, luego se cubrió con safranina por 30s y se lavó con agua destilada, finalmente se drenó el frotis y se dejó secar en forma vertical. En donde se observó que las bacterias se tiñeron de azul-violeta indicando que eran Gram positivas (+).

Con la muestra lista se añadió aceite de inmersión sobre él y un cubreobjetos para poder observar bajo el microscopio bajo el lente de 100x. Una vez ajustado el lente se procedió a observar las

características de las bacterias gram positivas (+). Se repitió el mismo procedimiento para una muestra de la otra hacienda.

4.3.2.4. Pruebas bioquímicas

Con el fin de comprobar bioquímicamente que las bacterias sembradas pertenecen a *Staphylococcus aureus* se realizaron dos pruebas: catalasa y coagulasa.

- Catalasa: para esta prueba se tomó una pequeña muestra de colonias de una de las cajas y se colocó en un portaobjetos limpio, a la muestra se le agregó una gota de agua oxigenada y se observó si había presencia de efervescencia (Sanz, 2011).
- Coagulasa: para esta prueba fue necesario primero sacar sangre de una vaca para poder obtener el plasma de esta, la muestra de sangre fue llevada a una centrifuga por 15 min, luego de esto se observó el plasma separado y con una micropipeta se tomó y se colocó en tubos de ensayo para comenzar con la prueba.

Usando un asa estéril se tomó una muestra de colonias de 4 cajas Petri al azar (dos por hacienda) y se colocó en los tubos que contenían 1ml de plasma, se mezcló y se dejó en la estufa por 24h a 37°C, después de este tiempo se observó la presencia de un coágulo en cada tubo (Pro-Lab, 2013).

4.3.2.5. Caracterización molecular

4.3.2.5.1. Extracción de ADN

En el laboratorio de biotecnología se procedió a preparar el caldo nutritivo necesario para la producción de cepas que se utilizaron para extraer ADN de las mismas. Para la preparación del caldo se utilizó LB Broth Base, primero se realizó una regla de tres en base a la cantidad que viene fijada por el fabricante en el envase esta indica que por cada litro de agua se debe emplear

20 g del mismo. Tomando en cuenta que se iban a realizar 80ml para 8 tubos de ensayo el resultado de la regla de tres fue:

$$\begin{array}{l} 1000\text{ml}-----20\text{g} \\ 80\text{ml}-----x = \underline{1.6\text{g}} \end{array}$$

Con el caldo preparado se vertió en los tubos de ensayo y se tapó con algodón para colocar a la autoclave por 1h al finalizar se dejó enfriar un poco y un asa bacteriológica estéril se tomó 2 muestras de 2 cajas por hacienda y se iba colocando en el caldo, para finalmente dejar en la estufa a 35°C por 24h como se menciona en el protocolo de DIBICO (2020).

Una vez listo el caldo con las bacterias se llevó al laboratorio de biotecnología y con ayuda del PureLink: Genomic DNA Mini Kit se extrajo el ADN de este caldo de cultivo siguiendo el protocolo de la empresa Thermo Fisher Scientific (Invitrogen Corporation, 2007).

A. Lisis celular (Rompimiento de la célula)

Se tomó 1ml de cultivo y se colocó en un frasco este se llevó al vortex por 1 min, después se agregó 180µl de la solución de lisis (Lysozyme digestion buffer containing) el cual permite lisar la célula sin causar algún daño al ADN, esta mezcla se incubó a 80°C por 10min en el bloque calentador seco, transcurridos los 10 min se dejó enfriar a temperatura ambiente.

B. Precipitación de proteínas

A la mezcla anterior se le agregó 20µl de la solución Proteinase K, y se volvió a mezclar, una vez listo se agregó 200µl de lisis genómica PureLink y se colocó en el vórtex por 20s.

C. Purificación

Para purificar la mezcla se utilizó etanol debido a que ayuda a purificar y concentrar ADN, ARN y polisacáridos.

Se agregó 200µl de etanol al 96%, y se llevó al vortex por 5s para homogeneizar la mezcla, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, luego se centrifugó a 13 000 rpm por 3 min luego se decantó.

D. Rehidratación

Se hidrató colocando 500µl de tampón buffer 1, esto se utiliza para proteger el ADN, luego se centrifugó a 10 000 rpm por un minuto, se desechó el tubo y la columna centrifugada se colocó en un nuevo tubo se volvió a hidratar con 500µl de tampón buffer 2 y se volvió a centrifugar de nuevo se colocó la columna en un nuevo tubo y se le añadió 200 µl de tampón elución genómico.

Una vez terminado esto se incubó por 1min a temperatura ambiente y se centrifugó a velocidad máxima por 1 min, una vez terminado se obtuvo el ADN genómico purificado el cual se conservó en un refrigerador a -30°C para después ser llevado a secuenciar en otro laboratorio.

4.3.2.5.2. Secuenciación de ADN

Para la secuenciación de ADN, se enviaron 4 muestras (2 cajas sembradas directamente con muestras de leche y 2 tubos con ADN extraído de las colonias formadas de cajas sembradas) a un laboratorio especializado en la ciudad de Quito IDgen-identificación molecular, en donde emplearon como método de determinación: identificación molecular por barcoding 16S para bacterias.

El procedimiento que realizaron con las placas fue:

- Extraer ADN por un método convencional utilizando 100 mg de muestra.
- Mediante espectrofotometría de micro volúmenes y visualización del gen de agarosa evaluaron la calidad e integridad del ADN extraído.

- Diluyeron el ADN hasta una concentración de 20 ng/uL para poder amplificar y mediante la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) para lo cual utilizaron 2 primers (16S: 27F/1492R)
- Se purificaron los productos de PCR antes de la secuenciación mediante el método de SANGER.
- Usando programas bioinformáticos las secuencias se limpiaron y ensamblaron.
- Finalmente se compararon las secuencias ensambladas de las muestras con la base de datos de nucleótidos de GenBank del NBCI para identificar su taxonomía.

4.3.2.6. Hemólisis

Para la prueba de hemólisis se utilizó Agar sangre, y se empleó el protocolo de los laboratorios Britania (2021) en primer lugar se preparó el agar y luego se colocó 5% de sangre como indica el fabricante, una vez listo el agar se colocó 1 ml de leche, se dejó a 37°C por 24h y luego se observó las placas para ver los resultados.

4.3.3. Prevalencia

Hernández (2015) menciona que la prevalencia es la frecuencia de todos los casos de una enfermedad, puede ser prevalencia puntual (en un momento dado del tiempo) o prevalencia de periodo (período definido).

La misma autora indica que la fórmula para calcular la prevalencia es:

$$P \text{ de período} = \frac{\text{casos nuevos} + \text{existentes}}{\text{personas en riesgo}}$$

$$P \text{ de punto} = \frac{\text{casos existentes}}{\text{total de población}} \times 100$$

Con esta fórmula se procedió a calcular la prevalencia de punto de cada hacienda debido a que solo se conocen los casos existentes.

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se detallan las pruebas y análisis realizados para determinar la presencia de *Staphylococcus aureus* en la leche de las dos haciendas que se identificaron para la toma de muestras, de las cuales se realizó la prueba de California Mastitis Test (CMT) al total de vacas en producción en donde se encontró que en la primera hacienda de código (190) 10 de 12 vacas dieron positivo a la prueba de CMT en mayor o menor medida, mientras que en la segunda hacienda de código (173) de 40 vacas solo 15 dieron positivo. Las pruebas realizadas a las muestras de leche confirmaron la presencia de *Staphylococcus aureus*.

5.1. PRESENCIA DE *Staphylococcus aureus*

En la tabla 6 se pueden observar el número de vacas que dieron positivo y negativo a la prueba de CMT que se realizó previo al ordeño en las dos haciendas. De las vacas que dieron positivo se procedió a tomar las muestras para poder identificar el patógeno que se encontraba presente.

Tabla 6

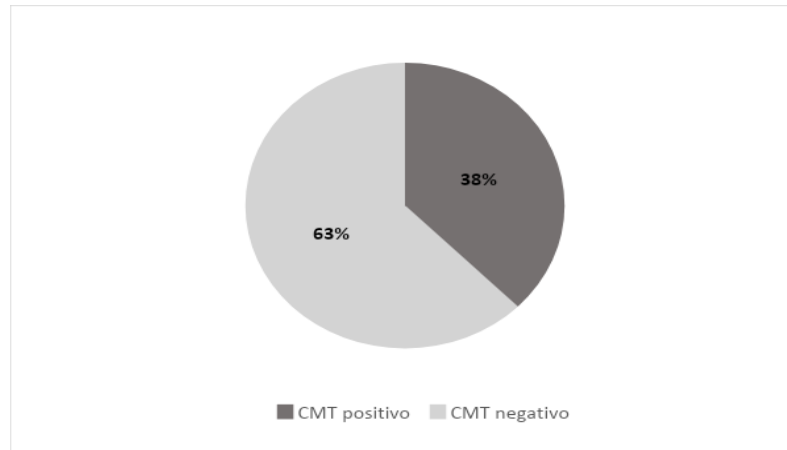
Resultados de la prueba de CMT realizada en campo

Código hacienda	Total población	CMT positivo	CMT negativo
173	40	15	25
190	12	10	2

En base a los resultados obtenidos se puede afirmar que la hacienda 173 en relación a la 190 lleva un mejor manejo en sus animales y sistema de producción debido a que del 100% de sus animales solo un 37.5% dio positivo mientras la otra hacienda el 83.3% dieron positivo a la prueba de mastitis.

Figura 3

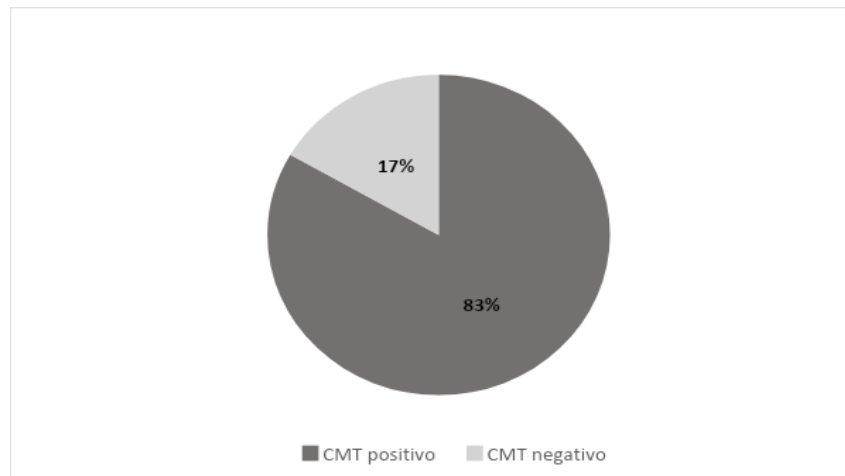
Porcentaje de vacas que dieron positivo a la prueba California Mastitis Test (CMT) hacienda de código 173



Nota. En la figura 3 se muestra el porcentaje de un total de 40 vacas en donde el 37% corresponde a las que resultaron positivo a la muestra de CMT que se realizó y el 63% es el porcentaje que dieron negativo.

Figura 4

Porcentaje de vacas que dieron positivo a la prueba California Mastitis Test (CMT) hacienda de código 190



Nota. En la figura 4 se muestra el porcentaje de un total de 12 vacas en producción donde el 37% corresponde a las que resultaron positivo a la muestra de CMT que se realizó y el 63% es el porcentaje que dieron negativo.

5.2. UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC)

En la tabla 7 se presentan los datos del conteo de colonias que se realizó a las 25 placas Petri previamente sembradas con 1 ml de leche de cada una de las muestras. El conteo se realizó con el equipo “colony counter” con ayuda de un marcador (anexo 15) se colocaban puntos en cada colonia mientras la máquina contabilizaba dando un aproximado del total de unidades formadoras de colonias (UFC).

Tabla 7

Datos obtenidos de las UFC de las placas sembradas en el laboratorio.

Código	Número	UFC	Cuartos tomados de la ubre
190	1	107	2
190	2	89	1
190	3	81	1
190	4	307	3
190	5	54	1
190	6	29	1
190	7	274	2
190	8	372	3
190	9	174	2
190	10	85	1
173	1	466	3
173	2	325	3
173	3	359	3
173	4	390	2
173	5	171	1
173	6	410	3
173	7	403	2
173	8	288	2
173	9	356	3
173	10	215	2
173	11	335	2
173	12	362	2

173	13	450	3
173	14	57	1
173	15	171	1

En la tabla se puede observar que la cantidad de UFC no es alta en comparación de los límites que permiten la NTE (2012) en donde expone que por cm^3 el límite máximo permitido es 1.5×10^6 aunque se debe tomar en cuenta que la siembra se realizó en un tipo de agar en el que no se desarrollan todas las bacterias solo las que han logrado satisfacer sus necesidades nutricionales dentro de ese agar el cual está desarrollado para el crecimiento de bacterias Grampositivas. Por otro lado, al ser un conteo manual pueden existir colonias que no fueron contabilizadas debido a que su tamaño era muy pequeño o se encontraban alrededor de la caja por lo cual se dificulta su conteo.

Figura 5

Placa Petri empleada para el conteo de UFC



Nota. En esta figura se observa una de las placas que fueron empleadas para el conteo de sus UFC, en donde se observa que hay distintos tamaños de colonias y no se llega a apreciar bien por lo cual dificulto su conteo.

Ruiz, et al., (2012) mencionan que el elevado conteo de UFC en la leche está asociado con frecuencia a la mala sanidad, deficiencia en la cadena de frío, mastitis en las vacas, contaminación ambiental, tipo de ordeño (mecánico en sala, manual en sala o potrero) entre otros factores. En base a esto se puede afirmar que las condiciones en las que fueron tomadas las muestras para la presente investigación también influyen en el número de UFC que se llegaron a contabilizar.

5.3. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

En las figuras 6 y 8 gracias a la tinción Gram que se realizó a las muestras se puede confirmar la presencia de bacteria de reacción positiva por el color azul-violeta que se presenta, además de otras características que se observaron bajo el lente 100x en el microscopio en donde se aprecian microorganismos en forma esférica (cocos) que se agrupan en racimos.

Figura 6
Muestra 3 hacienda 173

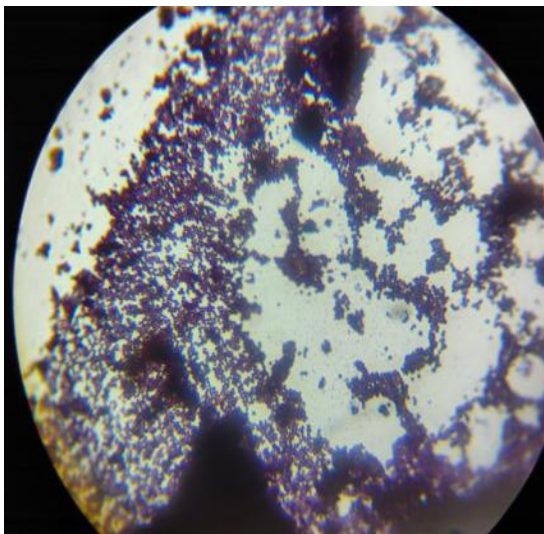


Figura 7
Staphylococcus aureus imagen microscópica

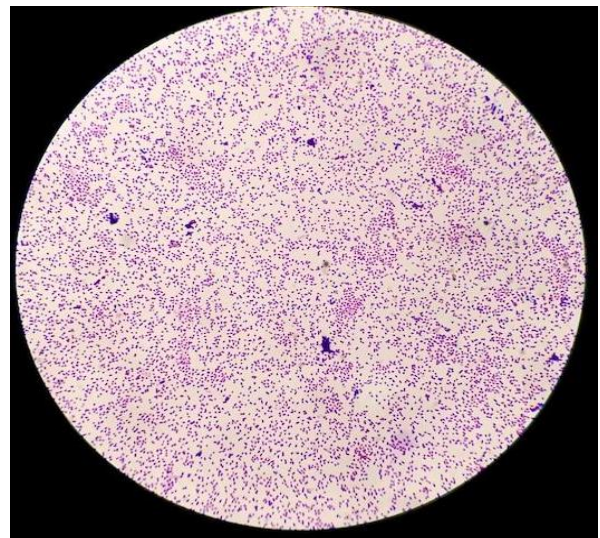


Figura 8
Muestra 7 hacienda 190

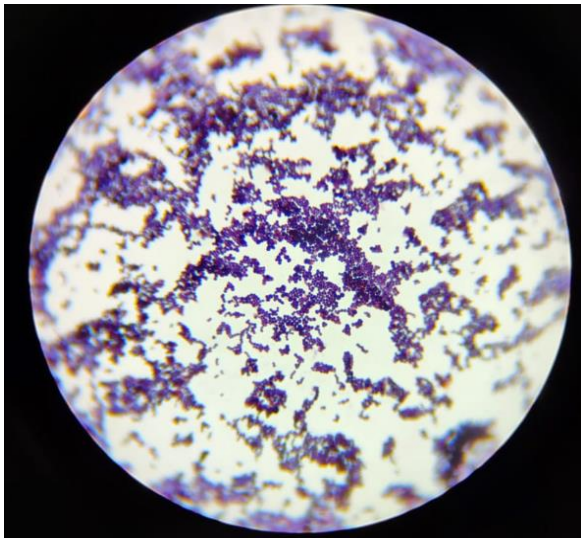
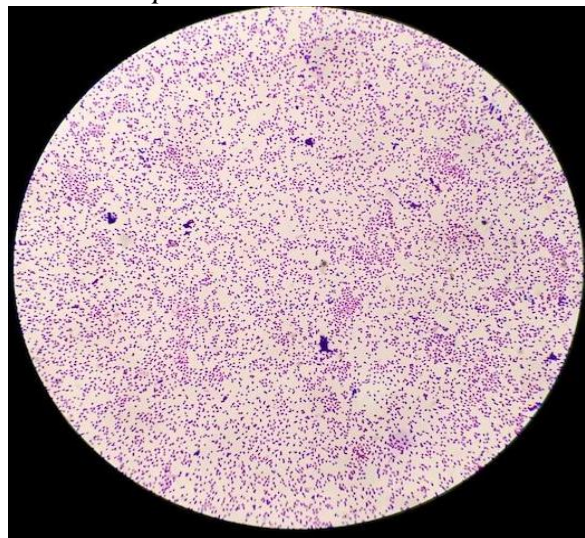


Figura 9
*Staphylococcus aureus imagen
microscópica*



Nota. Las figuras 6 y 8 son fotos tomadas de las muestras de la presente investigación, mientras las figuras 7 y 9 son una foto tomada por Biswas (2022) a colonias bacterianas de *Staphylococcus aureus* con tinción gram bajo el microscopio.

Cervantes et. al, (2014) mencionan que las características morfológicas ya expuestas son propias de la bacteria *Staphylococcus aureus* por lo cual se puede llegar a afirmar debido a la similitud entre las fotos realizadas a las muestras en laboratorio con las fotos de otro autor pertenecen a grupos de esta bacteria. Aunque las fotos a comparadas no son exactamente iguales se debe tomar en cuenta que no se ocupó el mismo equipo que el otro autor, ni las mismas muestras, distinta calidad de la cámara, entre otros factores que hacen que tengan cierta diferencia las imágenes comparadas.

5.4. PRUEBAS BIOQUÍMICAS

5.4.1. Prueba de catalasa

Con una pequeña muestra de colonias de las cajas y una gota de agua oxigenada juntas se produjo una reacción de efervescencia como se puede observar en la figura 10.

La prueba de catalasa se realizó a las 25 muestras de las dos haciendas, obteniendo resultados positivos en todas ellas, como se muestra en la tabla 8.

Tabla 8

Resultados de la prueba de catalasa

MUESTRA	RESULTADO	MUESTRA	RESULTADO
190-1	Positivo (+)	173-1	Positivo (+)
190-2	Positivo (+)	173-2	Positivo (+)
190-3	Positivo (+)	173-3	Positivo (+)
190-4	Positivo (+)	173-4	Positivo (+)
190-5	Positivo (+)	173-5	Positivo (+)
190-6	Positivo (+)	173-6	Positivo (+)
190-7	Positivo (+)	173-7	Positivo (+)
190-8	Positivo (+)	173-8	Positivo (+)
190-9	Positivo (+)	173-9	Positivo (+)
190-10	Positivo (+)	173-10	Positivo (+)
		173-11	Positivo (+)
		173-12	Positivo (+)
		173-13	Positivo (+)
		173-14	Positivo (+)
		173-15	Positivo (+)
		173-16	Positivo (+)
		173-17	Positivo (+)
		173-18	Positivo (+)
		173-19	Positivo (+)
		173-20	Positivo (+)
		173-21	Positivo (+)
		173-22	Positivo (+)
		173-23	Positivo (+)
		173-24	Positivo (+)
		173-25	Positivo (+)

Nota. Para realizar esta prueba se tomó una colonia de caja Petri y con una gota de peróxido de hidrógeno se observó la efervescencia por lo cual se anotó el resultado de las mismas.

Figura 10

Prueba de catalasa muestra positiva realizada en laboratorio



Figura 11

Prueba de catalasa positiva y negativa tomada de Martins (2015)



Nota. Con ayuda de la figura 11 se puede realizar una comparación con otro autor en base a los resultados que él obtuvo y afirmar que el resultado de la figura 10 es positivo para catalasa.

La reacción que se observa en la figura 10 se da gracias a que ciertas bacterias como en este caso el *Staphylococcus aureus* es catalasa-positivo lo cual quiere decir que sintetiza catalasa la cual detoxifica el peróxido de hidrógeno dando como resultado una liberación de burbujas que es lo que se observa, con esta prueba se puede comprobar que la bacteria que se encuentra presente en las muestras de leche recolectadas es *Staphylococcus aureus* (Sanz, 2011).



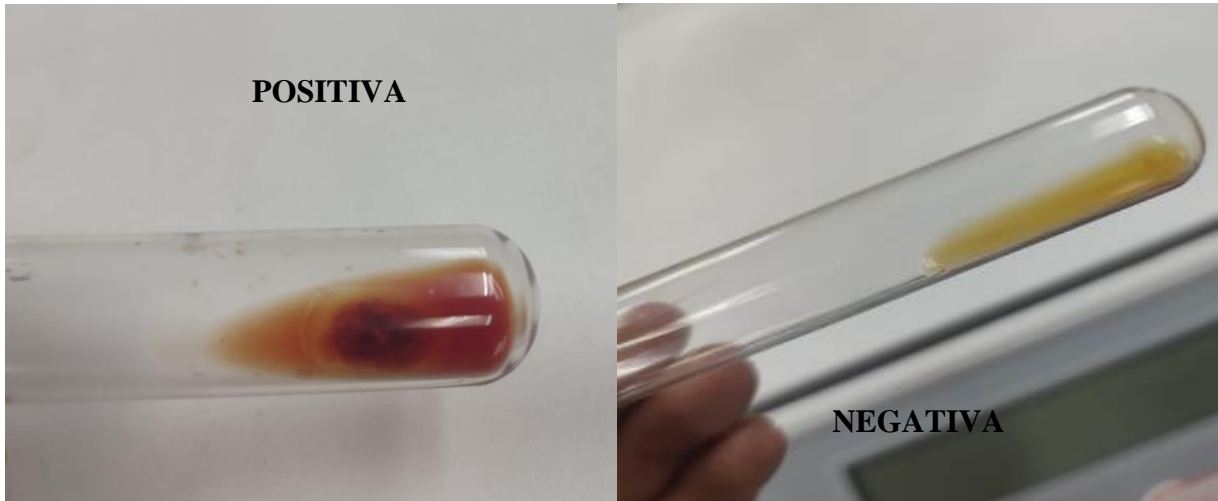
Reacción para la catalasa

5.4.2. Prueba de coagulasa

Se realizó la prueba de coagulasa a 4 muestras al azar dos por cada hacienda, obteniendo resultados positivos en las 4, y para comparar se dejó un tubo con plasma sin muestra, para ver la diferencia. Los resultados se muestran en la figura 12

Figura 12

Prueba de coagulasa positiva y negativa realizada en laboratorio



Nota. En la figura 12 se muestra el resultado de la prueba de coagulasa que fue realizada en el laboratorio de microbiología de la universidad, las cuales fueron realizadas con plasma de sangre de vaca. En la prueba que es positiva se observa la formación de un pequeño coágulo por lo cual se puede afirmar que es positiva, mientras que en la negativa se ve el plasma únicamente y no se observa la formación de un elemento adicional.

Figura 13

Prueba de coagulasa positiva y negativa realizada por Martins (2015)



Nota. La figura 13 tomada de Martins (2015) se utilizó como un ejemplo de la prueba y para poder comparar los resultados, en donde se observa en la prueba positiva que en el plasma se formó un coágulo

que está en el fondo del tubo y tomó un color más oscuro mientras en la negativa el plasma se observa líquido sin ninguna formación adicional y sin color.

El *S. aureus* es conocido por su capacidad de producir la enzima coagulasa, enzima capaz de coagular el plasma. Esta bacteria produce dos tipos de coagulasa: la coagulasa unida o conocida también como factor de aglutinación debido a que esta permanece fijada en la pared celular del organismo; coagulasa libre la cual es una enzima extracelular que se produce cuando se cultiva cierto organismo en un caldo (Pro-Lab, 2013).

5.5. AGAR SANGRE

Se realizaron varias placas con agar sangre, para poder determinar si las bacterias que se sembraron son alfa, beta o gamma. En la investigación se encontraron dos tipos de hemólisis: alfa y beta, pero en su mayoría hemólisis beta.

Figura 14

Hacienda 190 muestra 5

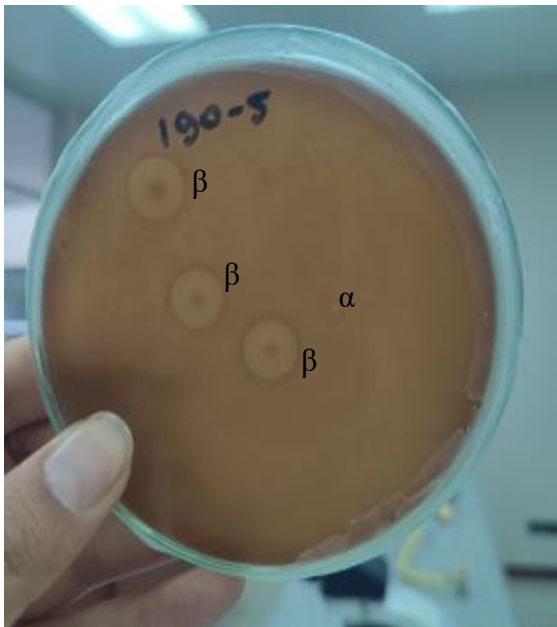
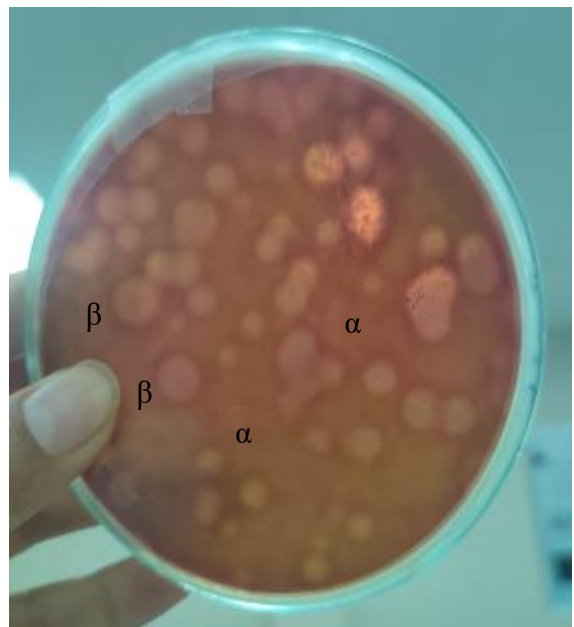


Figura 15

Hacienda 173 muestra 7



Nota. Después de 24h que se sembraron las placas con agar sangre se observó la presencia de bacterias alfa y beta, en la figura 14 se muestra de una manera más clara la presencia de 3 colonias beta y una alfa,

mientras que en la figura 13 debido al elevado crecimiento de colonias es más difícil distinguir el número de colonias alfa y beta.

Sánchez y Angarita (2017) mencionan que en su trabajo de investigación acerca de la determinación de hemólisis de cepas de *Staphylococcus* spp. que causan mastitis, se encontraron ciertas características cualitativas en los distintos tipos de hemólisis que se llegan a presentar de acuerdo a la especie que pertenece, obteniendo en sus resultados hemólisis beta para especies como: *Staphylococcus hyicus*, *S. auricularis*, *S. aureus*, *S. saprophyticus*, *S. chromogenes* y *S. simiae* pues estas presentaron un halo transparente debido a la destrucción total que causan a los glóbulos rojos del agar. Además de también hemólisis alfa la cual produce un halo verde y es propia de especies como *Staphylococcus sciuri*, *S. warneri* y *S. devriesei*.

En base a esto se puede determinar que en las placas que fueron sembradas en el laboratorio y encontrándose dos tipos de hemólisis en las muestras de leche se encontraban varias especies de *Staphylococcus* además de la especie de interés.

5.6. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

La caracterización molecular se empleó para poder verificar que las pruebas realizadas en los laboratorios de microbiología y biotecnología de la universidad además de la caracterización morfológica fueron realizadas de manera correcta y se logró identificar el mismo patógeno.

5.6.1. Extracción y secuenciación de ADN de *Staphylococcus aureus*

Al terminar todo el proceso de extracción de ADN del cultivo de bacterias realizado en un caldo de LB se obtuvo ADN genómico purificado de *Staphylococcus aureus* que es lo que se observa en la figura 7, este ADN fue utilizado para obtener la secuenciación de esta bacteria.

Los resultados obtenidos en el laboratorio para las placas Petri sembrada indican que se obtuvo un ADN de alta calidad, el cual fue utilizado para la amplificación, en donde se visualizaron bandas de aproximadamente 1.5 kb correspondientes al marcador 16S. A partir de las lecturas

resultantes de la secuenciación SANGER se obtuvieron las secuencias ensambladas en donde se determinó la identidad de los aislados y se muestra en la tabla 9.

Tabla 9

Resumen de resultados

Muestra	Longitud	Calidad	Organismo	Fragmento	% de identidad	N° de accesión
173-8	1336	96.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	16S	99.8	CP035101.1
190-2	1362	97	<i>Staphylococcus aureus</i>	16S	99.9	CP035101.1
173-3	1304	96	<i>Staphylococcus aureus</i>	16S	100	CP035101.1
190-7	1314	98.4	<i>Staphylococcus aureus</i>	16S	100	CP035101.1

Nota. Este cuadro de resumen fue Elaborado por Garrido (2023) y menciona que los resultados que poseen un porcentaje de identidad menor a 97% no permiten asegurar que el aislado corresponda a una especie, pudiendo tratarse de una especie que no esté descrita o que no hay referencia en la base de datos.

Con el porcentaje de identidad que se obtuvo se asegura de manera certificada que el organismo que se encuentra en las muestras de leche se trata de *Staphylococcus aureus* y su secuenciación se encuentra en los anexos 23 y 24.

5.7. PREVALENCIA

- **Prevalencia hacienda 173**

$$P \text{ de punto} = \frac{\text{casos existentes}}{\text{total de población}} \times 100$$

$$P \text{ de punto} = \frac{15}{40} \times 100 = 37.5\%$$

Con esto se determina que de 40 animales que se realizaron pruebas de mastitis 15 de ellos dieron positivo y poseen el patógeno de *Staphylococcus aureus* representando un 37.5% del total de su población.

- **Prevalencia hacienda de código 190**

$$P \text{ de punto} = \frac{\text{casos existentes}}{\text{total de población}} \times 100$$

$$P \text{ de punto} = \frac{10}{12} \times 100 = 83.3\%$$

En la hacienda de código 190 la cual poseía un total de 12 animales en producción 10 dieron positivo a la prueba de mastitis realizada presentando una prevalencia del 83.3%

Estas 2 haciendas representan el producto de 291 haciendas entre Imbabura y Carchi que se sometieron a una minería de datos en base a varios parámetros que se marcaron para muestrear la provincia de Imbabura, y con los resultados obtenidos por hacienda se obtiene como promedio un 60.4% de prevalencia en las dos haciendas pertenecientes a la provincia de Imbabura.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

- De acuerdo con los registros proporcionados por la empresa productora de derivados lácteos se encontraron 10 haciendas de un total de 291 que superaron los límites permitidos por las normas INEN-9 en el período de tiempo 2018-2022, de las cuales 5 pertenecen a la provincia del Carchi, 2 a Imbabura y de 3 no se tiene información de contacto actualizada.
- Las 2 haciendas pertenecientes a Imbabura poseían en promedio de CS y UFC: hacienda de código 190 un promedio de 545225 CCS/ml y 5515983 UFC/ml en los últimos 5 años, mientras que la hacienda de código 173 tenía un promedio de 813917 CCS/ml y 4996696 UFC/ml en los últimos 5 años.
- La caracterización morfológica y pruebas bioquímicas confirmaron la presencia de *Staphylococcus aureus* en las muestras, pues presentó forma de coco, agrupación en racimos, formación de coágulos y liberación de oxígeno, características que coincidieron con los autores citados.
- Se lograron identificar de manera molecular en las muestras de leche aislados bacterianos, pertenecientes a *Staphylococcus aureus* con ayuda del marcador molecular 16S.
- La prevalencia de las 2 haciendas muestreadas de Imbabura es de 60.4% tomando en cuenta los parámetros que se establecieron para la toma de muestras para esta investigación.

CAPÍTULO VII

RECOMENDACIONES

- Ampliar la muestra en la Provincia, disminuir el tiempo considerado para la minería de datos de 5 a 3 años para así observar si el número de haciendas con presencia de mastitis incrementa y poder tener un mayor número de lugares para muestrear en toda la provincia.
- Emplear placas específicas para una detección más rápida y certera de la bacteria que se desea encontrar en las muestras de leche. Estas placas confirman de manera efectiva la presencia de la bacteria, reduciendo el tiempo en laboratorio y con un mayor nivel de seguridad.
- Identificada la prevalencia en los lugares en los que hay la presencia de la bacteria *Staphylococcus aureus*, realizar investigaciones específicas que encuentren las causas y planteen soluciones con la finalidad de probar distintas alternativas que disminuyan o eliminen la presencia de esta en los animales, así como también el uso de antibióticos.

CAPÍTULO VIII

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alí T., Kamran., Raziq A., Wazir I., Ullah R., Shah P., Ijaz M., Bo-had. y Liu P. (2021) *Prevalence of Mastitis Pathogens and Antimicrobial Susceptibility of Isolates from Cattle and Buffaloes in Northwest of Pakistan*. Front. Vet. Sci. Vol. 8. Disponible en <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.746755>.
- Aquino R., Gonzales E., Samaniego S., Rivera J., Cedeño V., Urbina Y. y Diringer B. (2017) *Caracterización molecular de bacterias patógenas de las vías respiratorias de pacientes peruanos con fibrosis quística*. Rev Peru Med Exp Salud Publica. Vol. 34(3):423-35
- Avilés, N., y Medina, A. (2022). *Comparación de la prueba california mastitis test y tarro de fondo oscuro en el diagnóstico de mastitis subclínica en bovinos lecheros del cantón cuenca de la provincia del azuay*. Universidad de Guyayaquol, Facultad de medicina veterinaria y zootecnia. Guayaquil: Facultad de medicina veterinaria y zootecnia.
- Bedolla C. (2017) *Etiología de la mastitis bovina*. Sitio Argentino de Producción Animal. Disponible en https://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_leche/128-Etiologia.pdf
- Bedolla C. (2018) *Pruebas y métodos para el diagnóstico de mastitis*. BMEDITORES. Disponible en <https://bmeditores.mx/ganaderia/pruebas-y-metodos-para-el-diagnostico-de-mastitis-1706/#:~:text=DE%20LA%20MASTITIS-,Observaci%C3%B3n%20y%20palpaci%C3%B3n%20de%20la%20ubre,la%20leche%20que%20C3%A9sta%20produce>.
- Bedolla C. (2018) *Pruebas y métodos para el diagnóstico de mastitis II*. BMEDITORES. Disponible en <https://bmeditores.mx/ganaderia/pruebas-y-metodos-para-el-diagnostico-de-mastitis-ii-1705/>
- Biswas A. (2022) *Staphylococcus aureus bacterias colonia tinción de gram imagen microscópica 100x*. Disponible en https://www.freepik.es/fotos-premium/staphylococcus-aureus-bacterias-colonia-tincion-gram-imagen-microscopica-100x_31217736.htm

- Bonifaz N. y De Jesús N. (2011) *Buenas prácticas de ordeño y calidad higiénica de la leche en el Ecuador. La Granja. Revista de ciencias de vida.* Vol. 14. (2). Disponible en <https://revistas.ups.edu.ec/index.php/granja/article/view/14.2011.04>
- Bou G., Fernández A., García C., Sáenz J. y Valdezate S. (2011) *Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología.* Enferm. Infecc. Microbiol. Vol. 29 (8). Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>.
- Britania S.A. (2021) *Manitol Salado Agar.* Rev. 2. Disponible en https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_607073c954fa9.pdf
- Britania S.A. (2021) *Sangre Agar Base.* Rev. 02. Disponible en https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6070906bed89d.pdf
- Bonifaz N. y Congalo 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. Vol. 24(2):43-52. ISSN: 1390-3799.
- Contero R., Requelme N., Cachipundo C. y Acurio D. (2021) *Calidad de la leche cruda y sistema de pago por calidad en Ecuador.* La Granja: Revista de ciencias de la vida. Vol. 33 (1).
- 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. Disponible en <https://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2014/pt141e.pdf>
- DANE (2014) *La mastitis bovina enfermedad infecciosa de gran impacto en la producción lechera.* Boletín mensual: Insumos y factores asociados a la producción agropecuaria. Disponible en https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/sipsa/insumos_factores_de_produccion_ago_2014.pdf
- Díaz, D., y Martínez, F. (2020). *Determinación de la incidencia de mastitis bovina en dos fincas de la comarca Piedra Sembrada, Comoapa, departamento de Boaco, en el periodo de febrero-abril 2020.* Universidad Nacional Agraria, Sede regional Comoapa. Comoapa-Nicaragua: Universidad Nacional Agraria.
- DIBICO (2020) *Descripción del caldo LB.* Disponible en <https://www.probiotek.com/productos/reactivos/medios-de-cultivo-reactivos/caldo-luria-luria-bertani-lb/>

- FAO (2016) *El sector lechero mundial: Datos*. Disponible en <http://www.dairydeclaration.org/Portals/153/FAO-Global-Facts-SPANISH-F.PDF?v=1>
- Flores (2020) *Instructivo para “toma de muestras de leche cruda y suero de leche”*. AGROCALIDAD. REV. 7. Disponible en <https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2020/05/calech3.pdf>
- Garrido S. (2023) *Informe de resultados: Identificación molecular de bacterias*. IDgen.
- Hernández G. (2015) *Incidencia y prevalencia*. Universidad nacional autónoma de México. Disponible en <https://es.slideshare.net/gloriahg02/incidencia-y-prevalencia>
- INEC (2023) *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (ESPAC) 2022*. Disponible en https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac_2022/PPT_%20ESPAC_%202022_04.pdf
- INEN (2012) *Leche cruda. Requisitos*. Primera Edición. Quito, Ecuador.
- Invitrogen Corporation (2007) *PureLink Genomic DNA mini kit*. Disponible https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/purelink_genomic_mini_man.pdf
- Labrie J. (2020) *Método de tomas de muestras para análisis bacteriológico*. Disponible en: reseaumammite.org/tactic/es/metodo-para-la-toma-de-muestras-de-leche-para-analisis-bacteriologico/
- Marriot S. (2017) *Instruction manual: Colony counter*. Disponible en <https://www.keison.co.uk/products/stuart/SC6PlusManual.pdf>
- Martins P. (2015) *Identificación de Staphylococcus coagulasa negativo*. Disponible en https://redemc.net/campus/wp-content/uploads/2016/05/M1_Bispo_ES.pdf
- Mera R., Muñoz E., Artieda J., Ortiz P., Gonzales R. y Vega V. (2017) *Mastitis bovina y su repercusión en la calidad de la leche*. Revista Electrónica veterinaria. ISSN 1695-7504.
- Mora J. (2022). *Prevalencia de agentes bacterianos resistentes a antibióticos en mastitis bovina de ganaderías lecheras del cantón Antonio Ante*. Universidad Técnica del Norte, Facultad de ingeniería en ciencias agropecuarias y ambientales. Ibarra: UTN.
- Mora M., Vargas B., Romero J. y Camacho J. (2015) *Factores de riesgo para la incidencia de mastitis clínica en ganado lechero de Costa Rica*. Agron. Costarricense. Vol. 39 (2).

Disponible en https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0377-94242015000200077

- Muñoz S., Hernández L., Arrieta E., Camacho L., Hernández D. (2012) *Aislamiento bacteriano en bovinos de doble propósito con mastitis subclínica, en la costa de Guerrero*. México REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria. VOL. 13 (7). Disponible en <https://www.redalyc.org/pdf/636/63624404007.pdf>
- Neelam, Jain V., Singh M., Joshi V., Chhabra R., Singh K. y Rana S. (2022) *Virulence and antimicrobial resistance gene profiles of Staphylococcus aureus associated with clinical mastitis in cattle*. PCM9064094. Disponible en <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264762>
- Orús A. (2023) *Ranking de los principales países productores de leche de vaca en el mundo en el 2022*. Disponible en <https://es.statista.com/estadisticas/600241/principales-productores-de-leche-de-vaca-en-el-mundo-en/#:~:text=La%20Uni%C3%B3n%20Europea%20fue%20la,segunda%20y%20tercera%20posici%C3%B3n%20respectivamente>.
- Pasachova, J., Ramírez, S., y Muñoz, L. (2019). *Staphylococcus aureus: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular*. (Nova, Ed.) Nova, 17(32), 25-38.
- Pereyra E., Dallard B. y Calvino L. (2014) *Aspectos de la respuesta inmune innata en las infecciones intramamarias causadas por Staphylococcus aureus en bovinos*. Rev. Argent. Microbiol. Vol. 4 (4). Disponible en http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412014000500014
- Pro-Lab (2013) *Rabbit coagulasa plasma*. Disponible en [https:// PL850products_Rabbit-Coagulase-Plasma_Spanish%20\(1\).pdf](https://PL850products_Rabbit-Coagulase-Plasma_Spanish%20(1).pdf)
- Quevedo W. (2018) *Recuento de células somáticas como indicador en la resitencia de la mastitis bovina*. Rev. Cien. Tec. In. Vol. 16 (17). Disponible en http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2225-87872018000100005
- Ramírez N., Fernández J. y Palacio L. (2018) *Tasa de incidencia de mastitis clínica y susceptibilidad antibiótica de patógenos productores de mastitis en ganado lechero del norte de Antioquia, Colombia*. Rev. Med. Vet. (36). ISSN 0122-9354. Disponible en <http://www.scielo.org.co/pdf/rmv/n36/0122-9354-rmv-36-00075.pdf>

- Ruiz T., Orozco S., Rodríguez L., Idárraga J. y Olivera M. (2015) *Factores que afectan el recuento de UFC en tanque en hatos lecheros del norte de Antioquia- Colombia*. Rev. Udcaactual.divulg.cient. Vol. 15 (1). Disponible en http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262012000100016
- Sánchez Y. y Angrita M. (2018) *Determinación de hemólisis en cepas de Staphylococcus spp. causantes de mastitis bovina*. Revista Investig. Salud Univ. Boyacá. Vol. 5 (1):15-30. ISSN 2389-732. doi: <https://doi.org/10.24267/23897325.266>
- Santabrosio E., Ortega M. y Garibaldi P. (2009) *Siembra y recuento de microorganismos*. Disponible en https://www.fro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5_anio/biotecnologia/practicoIII.pdf
- Sanz S. (2011) *Prácticas de microbiología*. 2da Edición. ISBN:978-84-694-0870-4.
- Tates V. (2018) Evaluación del efecto antibiótico del extracto de la planta medicinal más usada en mastitis bovina en la provincia de Imbabura. [Tesis de grado, Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra]. Repositorio de la PUCESI <https://dspace.pucesi.edu.ec/handle/11010/222>

ANEXOS

Anexo 1

Oficio enviado a los productores



IBARRA DIRECCIÓN ECAA

Ibarra, 19 de junio de 2023

Oficio N° ECAA-208

Elija un elemento.

Estimados Productores

Presente. -

A nombre de la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales queremos expresarle un atento y cordial saludo y nuestro deseo de éxitos en las funciones que a diario realizan a favor de la Seguridad Alimentaria de nuestra Provincia.

Por medio del presente, me permito comunicarles que como parte del proyecto de investigación dirigido por la Mgs Lennys Berutti, Directora de la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales, denominado **"Determinación de la actividad antibacteriana de extractos de plantas nativas de la Provincia de Imbabura sobre *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina"**, solicitamos a usted nos permita el ingreso al Hato que acertadamente dirige, con la finalidad de tomar algunas muestras que serán analizadas dentro del proyecto como parte de la tesis de la estudiante Melanie Mora.

Los resultados de esta tesis si desean le serán socializados,

Auguro éxitos en las funciones que cumplen y agradezco su predisposición, para alcanzar los objetivos que nos conlleven a un excelente desarrollo Institucional, desde los más altos valores.

Por la atención que se digne dar a la presente, anticipo mi agradecimiento.

Atentamente,



MSc. Lennys Berutti
DIRECTORA DE LA ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES

Dirección: Av. Jorge Guzmán Rueda y Av. Aurelio Espinosa Pólit. Ciudadela "La Victoria".
Teléf: (593-6) 2615 500 / 2615 453 **Ext.** 1000 **Cel.** 099 236 27 13 / 098 138 3498
Ibarra - Ecuador / www.pucesi.edu.ec



Anexo 2

Datos hacienda 190

Date	CCS	UFC / ML
15/01/2018	799000	220267
31/01/2018	799000	115733
15/02/2018	691000	20000
28/02/2018	691000	761867
15/03/2018	661000	517867
31/03/2018	661000	766667
15/04/2018	766000	553600
30/04/2018	766000	140800
15/05/2018	579000	10247733
31/05/2018	579000	169050
15/06/2018	600000	68000
30/06/2018	600000	98667
15/07/2018	786000	41600
31/07/2018	786000	21333
15/08/2018	710000	28800
31/08/2018	710000	524267
15/09/2018	635000	115467
30/09/2018	635000	714133
15/10/2018	783000	73867
31/10/2018	783000	44800
15/11/2018	1468000	218933
30/11/2018	1468000	514133
15/12/2018	383000	1628000
31/12/2018	383000	371733
15/01/2019	328000	3419733
31/01/2019	328000	3135200
15/02/2019	359000	742933
28/02/2019	359000	1079200
15/03/2019	2001000	10538400
31/03/2019	2001000	54724800
15/04/2019	135000	9072800
30/04/2019	135000	4565867
15/05/2019	158000	2727200
31/05/2019	158000	3625067
15/06/2019	481000	1150133
30/06/2019	481000	2162667

15/07/2019	287000	418400
31/07/2019	287000	232800
15/08/2019	243000	2580267
31/08/2019	243000	2580267
15/09/2019	373000	3127733
30/09/2019	373000	3099733
15/10/2019	373000	3099733
31/10/2019	857000	14667
15/11/2019	255000	257600
30/11/2019	255000	407733
15/12/2019	214000	8191200
31/12/2019	214000	833067
01/01/2020	600000	291200
31/01/2020	600000	220533
15/02/2020	227000	783200
29/02/2020	227000	13333
15/03/2020	260000	1410400
31/03/2020	260000	1410400
15/04/2020	400000	30203733
30/04/2020	400000	30203733
15/05/2020	173000	1013333
15/06/2020	349000	140267
15/07/2020	451000	40800
31/08/2020	214000	932800
15/09/2020	364000	104267
15/10/2020	423000	1329067
30/11/2020	351000	11733
15/12/2020	375000	2841600
15/01/2021	1455000	9266133
31/01/2021	1455000	9266133
15/02/2021	567000	66933
15/03/2021	318000	1984000
31/03/2021	318000	1984000
15/04/2021	374000	4341333
15/05/2021	199000	3866133
15/06/2021	283000	10340000
30/06/2021	283000	10340000
15/07/2021	267000	460533
15/08/2021	310000	2433600
15/09/2021	508000	6911467

15/10/2021	222000	196533
15/11/2021	720000	116800
15/12/2021	341000	49067
15/01/2022	875000	28689600
31/01/2022	875000	28689600
15/02/2022	243000	8355200
15/03/2022	1074000	302133
15/04/2022	288000	32533

15/02/2019	1177000	95000	25333
28/02/2019	1177000	80000	21333
15/03/2019	979000	65000	17333
31/03/2019	979000	120000	32000
15/04/2019	737000	337000	89867
30/04/2019	737000	118000	31467
15/05/2019	717000	140000	37333
31/05/2019	717000	136000	36267
15/06/2019	861000	1996000	532267
30/06/2019	861000	285000	76000
15/07/2019	1032000	293000	78133
31/07/2019	1032000	347000	92533
15/08/2019	644000	137000	36533
31/08/2019	644000	137000	36533
15/09/2019	526000	190000	50667
30/09/2019	526000	169000	45067
15/10/2019	526000	169000	45067
31/10/2019	743000	40000	10667
15/11/2019	385000	142000	37867
30/11/2019	385000	7839000	2090400
15/12/2019	652000	431000	114933
31/12/2019	652000	149000	39733
01/01/2020	920000	242000	64533
31/01/2020	920000	337000	89867
15/02/2020	1338000	596000	158933
29/02/2020	1338000	96000	25600
15/03/2020	1012000	93000	24800
31/03/2020	1012000	93000	24800
15/04/2020	914000	828000	220800
30/04/2020	914000	828000	220800
15/05/2020	1011000	2351000	626933
15/06/2020	1137000	326000	86933
15/07/2020	883000	541000	144267
31/08/2020	545000	343000	91467
15/09/2020	727000	388000	103467
15/10/2020	680000	687000	183200
30/11/2020	506000	658000	175467
15/12/2020	769000	1654000	441067
15/01/2021	547000	31907000	8508533
31/01/2021	547000	31907000	8508533

Anexo 3

Datos hacienda 173

Date	CCS	CBT/ ML	UFC / ML
15/01/2018	312000	29000	7733
31/01/2018	312000	2108000	562133
15/02/2018	413000	1557000	415200
28/02/2018	413000	1557000	415200
15/03/2018	352000	40000	10667
31/03/2018	352000	28000	7467
15/04/2018	419000	29000	7733
30/04/2018	419000	32000	8533
15/05/2018	475000	1674000	446400
31/05/2018	475000	72596	19359
15/06/2018	430000	56000	14933
30/06/2018	430000	42000	11200
15/07/2018	196000	34000	9067
31/07/2018	196000	28000	7467
15/08/2018	376000	23000	6133
31/08/2018	376000	23000	6133
15/09/2018	299000	64000	17067
30/09/2018	299000	96000	25600
15/10/2018	992000	226000	60267
31/10/2018	992000	226000	60267
15/11/2018	2463000	252000	67200
30/11/2018	2463000	171000	45600
15/12/2018	1065000	75000	20000
31/12/2018	1065000	99000	26400
15/01/2019	1009000	63000	16800
31/01/2019	1009000	159000	42400

15/02/2021	771000	1075000	286667	15/09/2021	882000	2210000	589333
15/03/2021	717000	31036000	8276267	15/10/2021	1114000	12323000	3286133
31/03/2021	717000	31036000	8276267	15/11/2021	1117000	683000	182133
15/04/2021	626000	723000	192800	15/12/2021	967000	2039000	543733
15/05/2021	575000	4488000	1196800	15/01/2022	681000	181752000	48467200
15/06/2021	691000	17251000	4600267	31/01/2022	681000	181752000	48467200
30/06/2021	691000	17251000	4600267	15/02/2022	1205000	782000	208533
15/07/2021	643000	278000	74133	15/03/2022	1489000	4963000	1323467
15/08/2021	559000	2701000	720267	15/04/2022	856000	999000	266400

Anexo 4

Agar empleado para el cultivo



Anexo 5

Agar diluido en agua destilada



Anexo 6

Preparación de placas para autoclavar



Anexo 7

Reactivo para prueba de CMT



Anexo 8
Limpieza de pezones



Anexo 9
Prueba de CMT



Anexo 10
Dispensando de agar en placas



Anexo 11
Sembrado de muestras



Anexo 12

Estufa a 37°C empleada después del sembrado de muestras



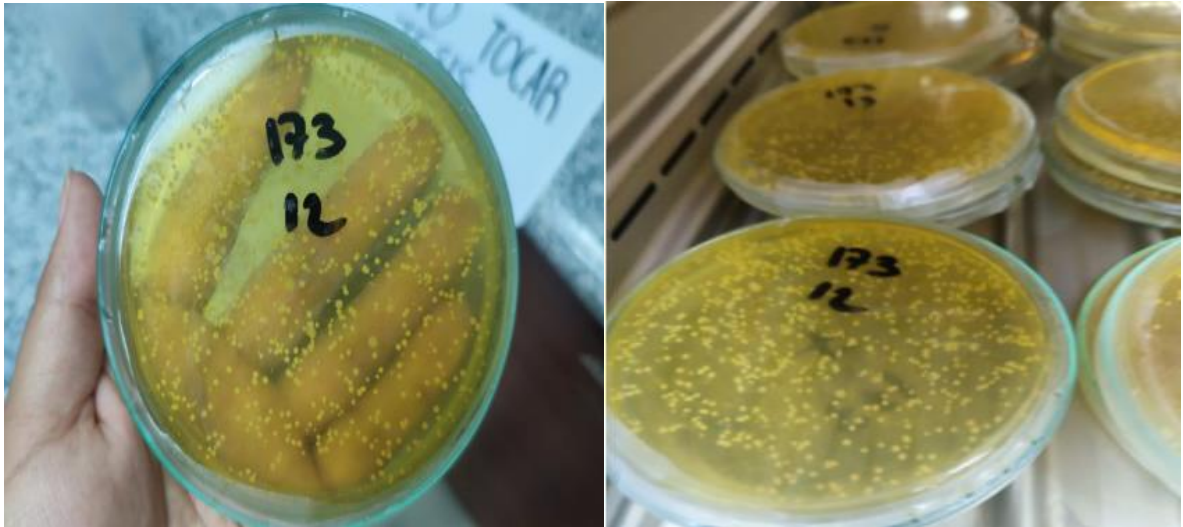
Anexo 13

Placas dentro de la estufa



Anexo 14

Crecimiento bacteriano a las 24h



Anexo

15

Conteo de Unidades Formadoras de colonias



Anexo 16

Caldo Nutritivo



Anexo 17

Agar Sangre



Anexo 18

Agar sangre y caldo nutritivo en tubos listos para autoclavar



Anexo 19

Extracción de sangre



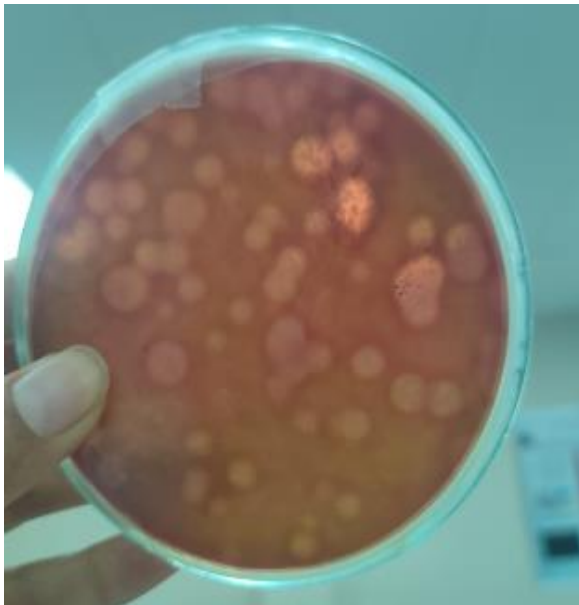
Anexo 20

Plasma obtenido de la sangre



Anexo 21

Placa de agar sangre



Anexo 22

ADN extraído



Anexo 23

Secuencia de la muestra en placa obtenida de en hacienda 190-2

CAAACCTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCG
TAGCATGCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATGTAGTCGAGTTGCAGA
CTACAATCCGAACTGAGAACAACCTTATGGGATTTGCTTGACCTCGCGGTTTCGCT
GCCCTTTGTATTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAAATCATAAGGGGCATGAT
GATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCAACTTAGAGTG
CCCAACTTAATGATGGCAACTAAGCTTAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAAC
CCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACCTTTGTCC
CCCGAAGGGGAAAGCTCTATCTCTAGAGTTGTCAAAGGATGTCAAGATTTGGTAA
GGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGTCCCC
GTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAAT
GCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTT
TACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTATCCCCACGCTTTCGCACAT
CAGCGTCAGTTACAGACCAGAAAGTCGCCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATCTC
TGCGCATTTACCGCTACACATGGAATTCCACTTTCCTCTTCTGCACTCAAGTTTTC
CAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAAAA
ACCGCCTACGCGCGCTTACGCCCAATAATTCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTA
TTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGATTAGGTACCGTCAAG
ATGTGCACAGTTACTTACACATATGTTCTTCCCTAATAACAGAGTTTTACGATCCG
AAGACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGGCTTTCGCCATTGCGGAAG
ATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGGC
CGATCACCTCTCAGGTCGGCTATGCATCGTTGCCTTGGTAAGCCGTTACCTTACC
AACTAGCTAATGCAGCGCGGATCCATCTATAAGTGACAGCAAGACCGTCTTTCAC
TTTTGAACCATGCGGTTCAAATATTATCCGGTATTAGCTCCGGTTTCCCGAAGTT
ATCCCAGTCTTATAGGTAGGTTATCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACAT
CAGAGTAAGCACAGCTTCTCGTA

Anexo 24

Secuencia de la muestra en placa obtenida de en hacienda 173-8

CTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGTAGC
ATGCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATGTAGTCGAGTTGCAGACTAC
AATCCGAACTGAGAACAACCTTATGGGATTTGCTTGACCTCGCGGTTTCGCTGCC
TTTGTATTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAAATCATAAGGGGCATGATGATT
TGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCAACTTAGAGTGCCCA
ACTTAATGATGGCAACTAAGCTTAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAA

CATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGTCCCCCG
AAGGGGAAAGCTCTATCTCTAGAGTTGTCAAAGGATGTCAAGATTTGGTAAGGTT
CTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCA
ATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCGTA TCTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGT
TAGCTGCAGACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACG
GCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGATCCCCACGCTTTCGCACATCAGC
GTCAGTTACAGACCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATCTCTGCG
CATTTACCGCTACACATGGAATTCCACTTTCCTCTTCTGCACTCAAGTTTTCCAGT
TTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACC
GCCTACGCGCGCTTTACGCCAATAATTCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTA
CCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGATTAGGTACCGTCAAGATG
TGCACAGTTACTTACACATATGTTCTTCCCTAATAACAGAGTTTTACGATCCGAAG
ACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGGCTTTCGCCATTGCGGAAGATT
CCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGGCCGA
TCACCCTCTCAGGTCGGCTATGCATCGTTGCCTTGGTAAGCCGTTACCTTACCAAC
TAGCTAATGCAGCGCGGATCCATCTATAAGTGACAGCAAGACCGTCTTTCACTTTT
GAACCATGCGGTTCAAATATTATCCGGTATTAGCTCCGGTTTCCCGAAGTTATCC
CAGTCTTATAGGTAGGTTATCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCGGCTAACATC

Anexo 25

Secuencia de la muestra de ADN extraído de la muestra 173-3

TGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGATAACCTACCTATAAGACTGGGAT
AACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATATTTTGAACCGCATGGTTCAA
AGTGAAAGACGGTCTTGCTGTCCTTATAGATGGATCCGCGCTGCATTAGCTAGTT
GGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGAT
CGGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGG
GAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAA
GGTCTTCCGATCGTAAAACCTCTGTTATTAGGGAAGAACATATGTGTAAGTAACTG
TGCACATCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGC
CGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGC
GTAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCA
TTGGAAACTGGAAAACCTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATTCATGTGTAGC
GGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGT
CTGTAACCTGACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATAACCT
GGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTCCGCCCTTA
GTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGA
AACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTC

GAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTTGACATCCTTTGACAACTCTAGAGAT
AGAGCTTTCCCCTTCGGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCT
CGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAAGCTTAGT
TGCCATCATTAAGTTGGGCACTCTAAGTTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAG
GTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTAC
AATGGACAATACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTCAAGCAAATCCCATAAAGT
TGTTCTCAGTTCGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGCTGGAATCGCTAG
TAATCGTAGATCAGCATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGTC

Anexo 26

Secuencia de la muestra de ADN extraído de la muestra 190-7

GATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGATAACCTACCTATAAGACTGGG
ATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATATTTTGAACCGCATGGTTCA
AAAGTGAAAGACGGTCTTGCTGTCACTTATAGATGGATCCGCGCTGCATTAGCTA
GTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTG
ATCGGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA
GGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATG
AAGGTCTTCGGATCGTAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACATATGTGTAAGTAAC
TGTGCACATCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCA
GCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGC
GCGTAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGT
CATTGGAACTGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCATGTGTA
GCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTG
GTCTGTAAGTACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACC
CTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTT
AGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTG
AAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT
CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTTGACATCCTTTGACAACTCTAGAGA
TAGAGCTTTCCCCTTCGGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGC
TCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAAGCTTAG
TTGCCATCATTAAGTTGGGCACTCTAAGTTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGA
GGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCT
ACAATGGACAATACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTCAAGCAAATCCCATAAA
GTTGTTCTCAGTTCGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGCTGGAATCGCT
AGTAATCGTAGATCAGCATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACAC