



Pontificia Universidad Católica del Ecuador
Sede Ibarra

ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES
INFORME FINAL DEL PROYECTO

TEMA:

“Potencial bactericida o bacteriostático del veneno de abejas (*Apis mellifera*) para microorganismos causantes de mastitis clínica en vacas lecheras”.

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERO AGROPECUARIO

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN:

Línea 04: Gestión sostenible y aprovechamiento de los recursos naturales
Sub línea 08: Agricultura, Silvicultura, pesca y Veterinaria

AUTOR: Bryan Stalin Aldás Chamorro

ASESOR: Dr. Vicente Arteaga Cadena. Mgs

IBARRA, MARZO 2019

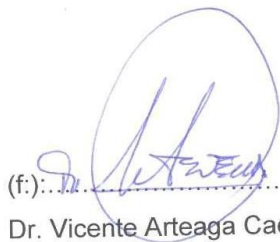


Ibarra, 12 de marzo del 2019

Dr. Vicente Arteaga Cadena. Mgs
ASESOR

CERTIFICA:

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

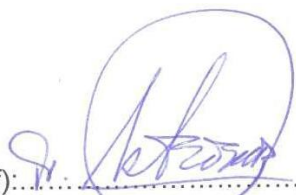
(f.): 

Dr. Vicente Arteaga Cadena. Mgs
C.C.: 040034764-7



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): 

Dr. Vicente Arteaga Cadena. Mgs

C.C.: 040034764-7

(f): 

Ing. Santiago Xavier Mafla Andrade. MSc

C.C.: 100265839-9

(f): 

M.V.Z. Tito Jorge Mendoza Cadena. MSc

C.C.: 100280229-4



ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS

Yo Bryan Stalin Aldás Chamorro, 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 derechos de disponer de sus derechos o autorizar las utilizaciones 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, 12 de marzo de 2019

(f) 

Bryan Stalin Aldás Chamorro
C.C.: 100379397-1



AUTORÍA

Yo, Bryan Stalin Aldás Chamorro, portador de la cédula de ciudadanía N°1003793971, declaro que la presente investigación es de total responsabilidad del (los) autor (es), y eximo expresamente a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra de posibles reclamos o acciones legales.

f): 

Bryan Stalin Aldás Chamorro

C.C.: 1003793971



DECLARACIÓN y AUTORIZACIÓN

Yo: Bryan Stalin Aldás Chamorro, con CC: 1003793971, autor del trabajo de grado intitulado: Potencial bactericida o bacteriostático del veneno de abejas (*Apis mellifera*) para microorganismos causantes de mastitis clínica en vacas lecheras, previo a la obtención del título profesional de Ing Agropecuario, en la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales.

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

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

Ibarra, 12 de marzo del 2019

(f): 

Bryan Stalin Aldás Chamorro

C.C.: 100379397-1



DECLARACIÓN DEL COMPORTAMIENTO ÉTICO DE LA ELABORACIÓN, DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE TRABAJOS DE TITULACIÓN

Por medio de la presente declaro conocer y aplicar en la elaboración, desarrollo y evaluación del Proyecto de Titulación: “Potencial bactericida o bacteriostático del veneno de abejas (*Apis mellifera*) para microorganismos causantes de mastitis clínica en vacas lecheras”, 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 de 15 de enero del 2018.

Para constancia firma:

(f):

BRYAN STALIN ALDAS CHAMORRO

C.C.:100379397-1

Carrera: Ingeniería Agropecuaria



DEDICATORIA

Este proyecto de tesis el cual es una parte importante dentro de mi vida estudiantil, va dedicada a Dios porque él me supo guiar en cada paso que realice en las aulas de aprendizaje.

A mis padres Gonzalo Aldás Iles y Miriam Chamorro Venalcazar por haber depositado sus esfuerzos para que salga adelante y ser una persona útil en la sociedad

A mis Hermanas Karina Aldás, Vanessa Aldás, quien supieron ayudarme a seguir adelante con su comprensión y ternura.

A mis amigos Lennin Morillo, Xavier Carrera quienes han depositado confianza y compañerismo en mi persona haciéndome sentir en familia.

Bryan Stalin Aldás Chamorro



AGRADECIMIENTO

Esta esta etapa es la más importante de mi vida, expreso mis profundos agradecimientos a quienes me brindaron su apoyo incondicional, a lo largo de mi etapa universitaria, en primer lugar a Dios que me ha guiado para conseguir este logro, con sus bendiciones y superando los diferentes obstáculos que se presentaron en mi vida.

Mis padres, Gonzalo Aldás Iles y Miriam Chamorro Venalcazar quienes me dieron la oportunidad de haber estudiado, crecer personalmente y profesionalmente que son un verdadero privilegio de tenerlos a mi lado con sus enseñanzas y amistad incondicional.

A mis hermanas Karina, Vanessa, por su apoyo, valores compartidos para salir adelante en la etapa Universitaria.

A Mgs. Vicente Artega Cadena, asesor del trabajo de tesis, mi agradecimiento por haber confiado en mí, con sus consejos para ser mejor en la parte profesional siendo de vital importancia para culminar este trabajo de investigación.

A mis compañeros y amigos Xavier Carrera, Hugo Cordova gracias por compartir sus conocimientos, anécdotas, consejos que hemos compartido en los cinco años de Universidad.

A todas las personas que me ayudaron a ser posible este sueño se haga realidad.

Bryan Stalin Aldás Chamorro

ÍNDICE

PÁGINA DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL.....	iii
ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS.....	iv
AUTORÍA.....	v
DECLARACIÓN y AUTORIZACIÓN.....	vi
DECLARACIÓN DEL COMPORTAMIENTO ÉTICO DE LA ELABORACIÓN, DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE TRABAJOS DE TITULACIÓN	vii
DEDICATORIA.....	viii
AGRADECIMIENTO.....	ix
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	xiv
ÍNDICE DE TABLAS.....	xiv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xv
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xvii
1. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
Objetivo general:.....	5
Objetivo específico:.....	5
4. ESTADO DEL ARTE.....	6
4.1. La mastitis.....	6
4.1.1. Tipos de mastitis.....	7
4.1.1.1. Mastitis subclínica.....	8
4.1.1.2. Mastitis clínica.....	8
4.1.1.3. Sobre-aguda.....	9
4.1.1.4. Aguda.....	10
4.1.1.5. Sub-aguda.....	10
4.1.1.6 Mastitis gangrenosa.....	11
4.1.1.7 Mastitis crónica.....	11
4.1.1.8. Mastitis ambiental.....	12

4.1.2. Diagnóstico.....	12
4.1.3. Una prueba de uso extensiva es el Test de mastitis de California.....	13
4.2. Las células somática.....	14
4.2.1. Conteo de Células Somáticas (CCS).....	15
4.2.2. Recuento de Organismos Mesófilos.....	17
4.3. Bacterias patógenas que generan mastitis en bovinos.....	18
4.3.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	19
4.3.2. <i>Streptococcus agalactiae</i>	21
4.3.3. <i>Escherichia coli</i>	22
4.4. Secuenciación de bacterias patógenas productora de la mastitis.....	23
4.4.1. Caracterización molecular.....	23
4.5. Mecanismos de defensa de la glándula mamaria.....	24
4.5.1. Células de defensa y mediadores que intervienen en la inflamación de la glándula mamaria.....	25
4.5.1.1. Citocinas.....	26
4.5.1.2. Factores celulares y humorales defensivos presentes en la leche de vaca.....	26
4.5.1.3. Los polimorfonucleares o leucocitos neutrófilos.....	27
4.5.1.4. Linfocitos.....	28
4.6. Los cultivos de bacterias a partir de muestras de leche	29
4.6.1. Crecimiento de Bacterias Gram-Positivas frente a Bacterias Gram-Negativas.....	29
4.6.1.1. Cultivo de <i>Staphylococcus aureus</i>	29
4.6.1.2. Cultivo de <i>Streptococcus agalactiae</i>	31
4.6.1.3. Cultivo de <i>Escherichia coli</i>	32
4.7. Apitoxina.....	33
4.7.1. Composición.....	34
4.7.2. Conservación de la apitoxina.....	34
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
5.1 Área de estudio.....	35

5.1.1. Fase de laboratorio.....	35
5.1.2. Fase de Campo.....	35
5.2. Materiales de laboratorio.....	35
5.3. Materiales de campo.....	36
5.4. MÉTODOS.....	37
5.4.1. Diseño Experimental.....	37
5.4.2. Características del experimento.....	38
5.5. Colecta de apitoxina.....	39
5.6. Recolección de muestras de leche.....	40
5.7. Cultivos microbiológicos.....	40
5.7.1. Aislamiento de cepas.....	40
5.7.2. Identificación de las cepas.....	41
5.7.2.1. Tinción Gram.....	41
5.8. Secuenciación bacteriana.....	42
5.8.1. Reactivación y reisolamiento de las bacterias.....	43
5.8.2. Extracción de ADN.....	43
5.8.3. Células de pellet.....	43
5.8.4. Para las bacterias Gram positivas.....	43
5.8.5. Para las bacterias Gram negativas.....	44
5.8.6. Precipitación de proteínas.....	44
5.8.7. Precipitación y Rehidratación de ADN.....	44
5.8.8. Verificación de concentración de ADN.....	45
5.8.9. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés).....	45
5.8.10. Electroforesis.....	46
5.8.11. Secuenciación.....	46
5.9. Determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI).....	47
5.9.1. Antibiograma.....	47
5.10. Pruebas de campo.....	49
5.10.1. Prueba de California Mastitis Test (CMT).....	49
5.10.2. Lectura de la prueba del California Mastitis Test (CMT).....	50

5.10.3. Determinación de Unidades Formadoras de Colonia (UFC).....	50
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	51
6.1. Fase de laboratorio.....	51
6.1.1. Identificación molecular.....	51
6.1.1.1. Verificación de concentración de ADN.....	51
6.1.1.2. Electroforesis.....	53
6.1.1.3. Secuenciación.....	53
6.1.1.3.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	54
6.1.1.3.2. <i>Streptococcus agalactiae</i>	54
6.1.1.3.3. <i>Escherichia coli</i>	54
6.1.2. Lectura de halos de inhibición de las tres bacterias de estudio.....	54
6.1.2.1. Lecturas de resultados obtenidos a las 24 horas de realizados los cultivos bacteriano.....	54
6.1.2.2. Lecturas de resultados obtenidos a las 48 horas de realizados los cultivos bacterianos.....	58
6.1.2.3. Discusión referente a la variable halos de inhibición.....	61
6.1.3. Unidades Formadoras de Colonias.....	63
6.1.3.1. Discusión para Unidades Formadoras de Colonias (UFC).....	66
6.1.4. Conteo de Células Somáticas (CCS).....	67
6.1.4.1. Discusión de Conteo de Células Somáticas (CCS).....	69
6.2. Socialización.....	70
6.2.1. Discusión.....	75
7. CONCLUSIONES.....	76
8. RECOMENDACIONES.....	78
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
10. ANEXOS.....	92

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Relación entre Conteo de Células Somáticas.....	16
Tabla 2. Dosis de apitoxina (factor A).....	37
Tabla 3. Bacterias (factor B).....	38
Tabla 4. Tratamientos.....	38
Tabla 5. Reactivos utilizados para una master mix de una sola reacción de 25 µl en volumen total.....	45
Tabla 6. Condiciones en las que se programó la PCR en el termociclador.....	46
Tabla 7. Verificación de las respectivas concentraciones de ADN.....	52
Tabla 8. Análisis de varianza para la variable diámetro de halos de inhibición a las 24 horas de realizado el cultivo bacteriano.....	55
Tabla 9. Análisis de varianza para la variable diámetro de halos de inhibición a las 48 horas de realizado el cultivo bacteriano.....	58
Tabla 10. Análisis de varianza para la variable de Unidades Formadoras de Colonias a las 24 horas de iniciado el cultivo bacteriano.....	63
Tabla 11. Análisis de varianza para la variable Unidades Formadoras de Colonias a las 48 horas de iniciado el cultivo bacteriano.....	65
Tabla 12. Análisis de varianza para la variable Conteo de Células Somáticas a las 24 horas de iniciado el cultivo bacteriano.....	67
Tabla 13. Análisis de varianza para la variable número de Células Somáticas a las 48 horas de iniciado el cultivo bacteriano.....	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Resultados de la electroforesis de los ADNs bacterianos mediante el uso de agarosa al 1% y revelado del gel.....	53
Figura 2. Prueba de significancia Tukey 5% entre el diámetro del halo de inhibición y el factor A (dosis apitoxina) a las 24 horas de realizado el cultivo bacteriano.....	56
Figura 3. Prueba de significancia Tukey 5% entre el diámetro del halo de inhibición y el factor B (bacterias) a las 24 horas de realizado el cultivo bacteriano.....	56
Figura 4. Prueba de significancia Tukey 5% entre el diámetro del halo de inhibición y la interacción de T1 VS T2 a las 24 horas de realizado el cultivo bacteriano.....	57
Figura 5. Prueba de significancia Tukey 5% entre el diámetro del halo de inhibición y la interacción de T1, T2 vs RESTO a las 24 horas de realizado el cultivo bacteriano.....	57
Figura 6. . Prueba de significancia Tukey 5% entre el diámetro del halo de inhibición y el factor A (dosis apitoxina) a las 48 horas de realizado el cultivo bacteriano de realizado el cultivo bacteriano.....	59
Figura 7. Prueba de significancia Tukey 5% entre el diámetro del halo de inhibición y el factor B (bacterias) a las 48 hora de realizado el cultivo bacteriano.....	60
Figura 8. Prueba de significancia Tukey 5% entre el diámetro del halo de inhibición y la interacción de T1 vs T2 a las 48 horas de realizado el cultivo bacteriano.....	60
Figura 9. Prueba de significancia Tukey 5% entre el diámetro del halo de inhibición y la interacción de T1, T2 vs RESTO a las 48 horas de realizado el cultivo bacteriano.....	61
Figura 10. Prueba de significancia Tukey 5% entre el promedio Unidades Formadoras de Colonias y los tratamientos a las 24 horas de realizado el cultivo bacteriano	63
Figura 11. Prueba de significancia Tukey 5% entre el promedio Unidades Formadoras de Colonias y los tratamientos a las 48 horas de realizado el cultivo bacteriano	65

Figura 12. Prueba de significancia Tukey 5% entre el promedio Conteo de Células Somáticas y los tratamientos a las 24 horas de realizado el cultivo bacteriano	68
Figura 13. Prueba de Tukey 5% para la variable Conteo de Células Somáticas las 48 horas de realizado el cultivo bacteriano.....	69
Figura 14. ¿Considera usted que la sala se desarrolló este evento brindó las comodidades necesarias?.....	70
Figura 15. ¿Considera Usted que el material audiovisual utilizado en la presentación fue adecuado?.....	71
Figura 16. ¿Considera Usted que el expositor mostro dominio del tema.....	71
Figura 17. ¿Estima Usted que el manejo del auditorio por parte del expositor fue adecuado?.....	72
Figura 18. ¿Considera Usted que el Expositor demostró facilidad de expresión?....	72
Figura 19. ¿Considera Usted que el tema investigado posee relevancia para algún actor y/o sector de la sociedad?.....	73
Figura 20. ¿Considera Usted que esta investigación posee perspectivas para estudios completamente posteriores?.....	74
Figura 21. ¿Considera Usted que el tema investigado genera actualmente o a futuro un beneficio concreto para alguna organización, empresa pública o privada, comunidad o institución?.....	74
Figura 22. ¿En función de los objetivos planteados expuestos en la investigación, considera Usted que éstos se cumplieron?.....	75

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Aislamiento de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i>	92
Anexo 2. Aislamiento de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i>	92
Anexo 3. Identificación de <i>Staphylococcus aureus</i>	93
Anexo 4. Identificación de <i>Staphylococcus aureus</i>	93
Anexo 5. Siembra Tryptic Soy Agar (TSA).....	94
Anexo 6. Conservación de muestras en caldo nutritivo.....	94
Anexo 7. Colecta de apitoxina.....	95
Anexo 8. Secuencia de <i>Escherichia coli</i>	95
Anexo 9. Herramienta informática MEGA.....	96
Anexo 10. Halos de inhibición.....	96
Anexo 11. Halos de inhibición en Agar específico.....	97
Anexo 12. Incubación de las tres bacterias.....	97
Anexo 13. Diámetro del halo de <i>Streptococcus agalactiae</i> a las 24 horas.....	98
Anexo 14. Diámetro de tratamiento <i>Escherichia coli</i> a las 24 horas.....	98
Anexo 15. Diámetro de tratamiento con la bacteria <i>Staphylococcus aureus</i> a las 48 horas.....	99
Anexo 16. Colonias de <i>Staphylococcus aureus</i> 24 horas.....	99
Anexo 17. Anexo 17. Aplicación parenteral.....	100
Anexo 18. Materiales para realizar la prueba California Mastitis Test (CMT).....	100
Anexo 19. Muestra de mastitis clínica en vacas.....	101
Anexo 20. Socialización de la investigación socialización.....	102
Anexo 21. Encuesta entregada a los participantes dentro del proceso de socialización.....	103

1. RESUMEN

Esta investigación se relaciona con el control de mastitis clínica de vacas lecheras, producida por microorganismos como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*, para cuyo propósito se encontró en las propiedades del veneno de abejas (*Apis mellifera*) una alternativa al problema de productores lecheros en general. Se partió del muestreo de vacas clínicamente mastíticas, cultivos microbiológicos de los patógenos, se purificaron para su aislamiento y secuenciación molecular, con el auxilio de personal del laboratorio de Microbiología de la PUCE. Se buscaron concentraciones mínimas inhibitorias (CMI), con el uso de soluciones acuosas de apitoxina de 0,5 hasta 1,0 mg de apitoxina por litro de agua grado uno. La CMI fue administrada parenteralmente a vacas clínicamente confirmadas con mastitis, mediante exploración visual y determinación de unidades formadoras de colonias (UFC) y conteo de células somáticas (CCS). Las mejores CMIs fueron 0,9 mg.l⁻¹ para *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*, mientras que para *Escherichia coli* fue de 1,0 mg.l⁻¹. Concluyéndose que la apitoxina como producto natural es un antibacteriano total para las bacterias objeto de este estudio, encontrándose en este recurso apícola una solución al problema número uno de los productores de leche de vacas.

PALABRAS CLAVE: antibiogramas, apitoxina, mastitis, UFC, CCS, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*.

2. ABSTRACT

This investigation is related to the control of clinical mastitis of dairy cows, produced by microorganisms such as *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* and *Escherichia coli*, for whose purpose was found in the properties of bee venom (*Apis mellifera*) an alternative to the problem of dairy producers in general. We started with the sampling of clinically mastitic cows, microbiological cultures of the pathogens, they were purified for their isolation and molecular sequencing, with the help of personnel from the Microbiology laboratory of the PUCE. Minimum inhibitory concentrations (MIC) were sought, with the use of aqueous solutions of apitoxin from 0.5 to 1.0 mg of apitoxin per liter of water grade one. The IMC was administered parenterally to clinically confirmed cows with mastitis, by visual examination and determination of colony forming units (CFU) and somatic cell count (SCC). The best MICs were 0.9 mg.l⁻¹ for *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*, while for *Escherichia coli* it was 1.0 mg.l⁻¹. Concluding that apitoxin as a natural product is a total antibacterial for the bacteria that is the object of this study, being in this apicultural resource a solution to the number one problem of cow milk producers.

KEY WORDS: antibiotics apitoxin, mastitis, UFC, CCS, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* and *Escherichia coli*.

3. INTRODUCCIÓN

La calidad sanitaria de la leche en el Ecuador es puesta en tela de duda, ya que varios indicadores como sabor, color, olor, pH, número de células somáticas, entre otros, son cuestionados diariamente entre los productores y la industria láctea. Además, si se toman en cuenta los estándares internacionales, se tienen más desventajas que ventajas de este producto lácteo, de tal manera que es necesario ahorrar esfuerzos constantes que mejoran la calidad de la leche para que los ganaderos tengan mayor ingreso económico y así los consumidores cuenten con un alimento que contribuya a mejorar el nivel de vida (Jara, y Maldonado, 2011). El Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN, 2015) señala que la leche debe estar libre de microorganismos como, *Streptococcus aureus*, *S. agalactiae*, *Corinebacterium bovis*, coliformes y otros microorganismos ambientales y oportunistas, que pueden estar presentes en animales con mastitis clínica. Es posible incluso, encontrar residuos de productos fármaco-veterinarios, por lo que se recomienda la aplicación de buenas prácticas pecuarias en la producción de leche, para garantizar su calidad e inocuidad.

El problema central de esta investigación radica en la consideración general de que la fortaleza de la producción lechera se sustenta en la “cosecha” diaria del producto lácteo, constituyendo una condición indispensable la sanidad de la ubre que sintetiza y secreta la leche, así como en el manejo de todo el proceso del ordeño diario al que se someten las vacas lecheras.

Este estudio pretende encontrar una alternativa natural que solucione, al menos en parte, las infecciones mamarias, más conocidas como mastitis de las vacas lecheras, razón por la que se ha pensado en las cualidades curativas de la apitoxina o veneno de abejas (*Apis mellifera*), para lo cual se prepararon diferentes dosis en soluciones acuosas con el fin de comprobar la acción bactericida o bacteriostática, tanto a nivel de laboratorio mediante antibiogramas bacterianos, así como en campo

y con vacas clínicamente mastíticas. De tal manera que se realizaron tratamientos parenterales (intramamarios) en las ubres de vacas diagnosticadas clínicamente con mastitis infecto contagiosa, forma en la cual se determinaron las cualidades curativas que posee este producto natural alternativo para casos de mastitis.

En forma concluyente se presenta el problema central que motivó esta investigación en la siguiente interrogante: ¿Qué alternativa natural ofertar a los pequeños y medianos ganaderos que sufren las consecuencias de brotes agudos y crónicos de mastitis de naturaleza infectocontagiosa en sus vacas lecheras?

Objetivo General

- Determinar la acción bactericida o bacteriostática de la apitoxina mediante antibiogramas y dosis parenterales para el tratamiento de mastitis clínica en vacas lecheras.

Objetivos Específicos

- Caracterizar molecularmente a las bacterias patógenas de ubres en vacas en producción lechera y que sean clínicamente mastíticas.
- Realizar antibiogramas con las bacterias y concentraciones de apitoxina para la determinación de CMI.
- Administrar parenteralmente dosis de apitoxina en solución acuosa, sustentadas en la CMI in vitro, para la identificación de acciones bactericidas o bacteriostáticas in situ.
- Difundir los resultados logrados en esta investigación a ganaderos interesados en esta temática.

Hipótesis

H0 = Ninguna concentración de apitoxina tiene acción mínima inhibitoria frente *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*

H1= Al menos una concentración de apitoxina tiene acción mínima inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*.

4. ESTADO DEL ARTE

4.1 La mastitis

Se trata de una de las patologías más difíciles de combatir, con consecuencias fatales como eliminación de vacas en producción, pérdidas económicas y afectaciones directas e indirectas para la industria láctea. Por cierto que hay múltiples agentes etiológicos de esta enfermedad, sin embargo los más temidos y agresivos son las bacterias, tal es el caso de *Escherichia coli* entre las Gram negativas, mientras que *Streptococcus agalactiae*, entre las Gram negativas, agentes infectocontagiosos que se diseminan por el suelo, camas de los animales, al momento de la manipulación de pastos y forrajes, de las manipulaciones durante el ordeño, razón por la cual las mastitis microbianas son las más preocupantes para productores y consumidores de leche de vaca (Nielsen, *et al.* 2004).

La mastitis es considerada como una reacción inflamatoria de la glándula mamaria, muy común en países en vías de desarrollo, caracterizada por alteraciones físicas y químicas de la leche, por el incremento del número de células somáticas, así como por la presencia de microorganismos y por alteraciones patológicas de la ubre. Es catalogada como una respuesta de los tejidos secretores a lesiones traumáticas, a sustancias irritantes o bien, a la presencia de toxinas producidas por microorganismos que han invadido a la ubre; incluso se conoce que factores estresantes o sobrecargas del organismo animal, tal es el caso de caminatas largas y penosas, presencia de canes en el arreo de las vacas, contribuyen al desarrollo de esta patología (Carillo, *et al.*, 2018).

La mastitis clínica es la forma más común de presentación y de etiología bacteriana, siendo *Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus aureus* entre las especies más comunes, consideradas como microorganismos ambientales, mismos que esperan oportunidades de contagio para atacar a las glándulas mamarias; razón por la cual debería constituir una preocupación permanente de productores de leche bovina, en

especial los que mantienen granjas bajo la modalidad de explotaciones intensivas, ya que las posibilidades de contagio son numerosas y se presentan ya sea por el agua, suelo, aire, manipulaciones de materiales de ordeño, de herramientas y hasta de alimentos sean balanceados o forrajes de corte y suministrados en comederos en etapas previas al ordeño (Nielsen, *et al.*, 2004)

De conformidad con Ramírez, *et al.* (2001), la mastitis es catalogada como un complejo de enfermedades, es la más costosa en la industria lechera, ya que sus consecuencias están dadas por la disminución de la producción de leche, la misma que de conformidad con McDonald, (2007) va desde el 4 al 30% según la severidad de los casos, de igual manera el incremento en los costos de producción debido a gastos medicinales, de manera especial afecta la calidad de la leche. Si bien es cierto que en las últimas tres décadas se han logrado interesantes avances en el control de la mastitis, también es verdad que la lucha no ha sido ganada, los agentes etiológicos de tipo bacteriano son tan agresivos y audaces que se adaptan a las condiciones imperantes para resistir y contraatacar a las glándulas mamarias para causar daños severos, de manera especial en pérdidas económicas, tal es el caso citado por Hogeveer, *et al.* (2011) quienes afirman que en los Estados Unidos de Norte América se estiman entre dos billones de dólares /año como consecuencia de la presencia de esta enfermedad.

4.1.1 Tipos de mastitis

En consideración a los síntomas que presenta las bacterias patógenos productores de mastitis bovina, (Wolter, *et al.*, 2002) las clasifica de la siguiente manera:

4.1.1.1 Mastitis subclínica

Es aquel proceso inflamatorio que no produce los signos típicos de inflamación, calor, dolor, tumor, rubor, ni cambios macroscópicos de la secreción láctea. Este tipo de inflamación es la más frecuente y la que produce mayor daño económico, como se verá más adelante Halasa, (2009) para detectar este tipo de mastitis se emplea métodos especiales de diagnóstico, puede lograrse por medio de cultivos bacteriológicos, la California Mastitis Test (CMT), Prueba Wisconsin para Mastitis (WMT) y el Conteo de Células Somáticas (CCS) (Vieira, *et al.*, 2001).

La mastitis subclínica es definida como la presencia de un microorganismo en combinación con un elevado CCS de la Leche Wolter, *et al.* (2002) tanto es así que Magandi, (2008), considera que un elevado número de células somáticas es indicador de mastitis subclínica.

De otra parte, Ruiz, (2015) afirma que para estos casos de mastitis no son visibles signos de enfermedad, la leche es aparentemente normal, sin embargo hay una merma en su volumen y un incremento en el conteo de células somáticas. Esta clase de mastitis tiene mayor impacto en animales con un mayor tiempo o ciclo de lactancia que en animales jóvenes. Existe una relación directamente proporcional negativa en cuanto al CCS y el rendimiento de la Leche, de manera que la leche normal proveniente de cuartos sanos, los que generalmente contiene menos de 200,000 células somáticas/ml, ya es necesario recordar que valores que superan las 300,000 CS/ml constituye un indicador de un proceso inflamatorio de la ubre.

4.1.1.2 Mastitis clínica

Este tipo de mastitis, según Rudolf (2014) se caracteriza por la presencia de cambios visibles en la ubre, tal es el caso de signos cardinales como son calor,

dolor, rubor, tumor y funciones alteradas del órgano afectado, así como grumos, cambio de físico-químico-biológicos en la leche; en muchos casos puede comprometer seriamente la salud de la vaca, incluso como señala Steeneveld *et al.* (2008) puede llegarse a la muerte del animal. Tal como ya se indicó antes, entre los principales agentes patógenos que la causan están: *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, entre otros, incluso la mastitis clínica se puede diseminar rápidamente en el hato y manifestar en diferentes formas.

La mastitis clínica causada por *Escherichia coli*, *Streptococcus* ambientales, y *Staphylococcus aureus* continúa siendo un problema importante. Y puede ser una condición aguda y dolorosa que afecta el comportamiento animal (Wenz, *et al.*, 2006).

En varios estudios realizados en California, Michigan y Ohio, como hace referencia Magandi, (2008) las incidencias de mastitis que se encontraron fueron de 30, 33 y 37 casos por cada 100 vacas por año respectivamente. Además, el autor relaciona los costos estimados por efectos de la mastitis, para cuyo efecto considera variedad en los mismos dependiendo del país, tipos de manejo y con adición de los costos por tratamiento y honorarios profesionales, las mermas de leche, su afectación en la calidad de la misma, así como los incrementos por riesgos debidos a la enfermedad a corto y mediano plazo. Así por ejemplo, en Noruega, los costos estimados por caso de mastitis son de 460 dólares americanos, en cambio en Finlandia se estiman costos por 215 dólares americanos, mientras que en Estados Unidos varían de 108 a 122 dólares por caso, en base a medicamentos, honorarios, trabajos extras y pérdidas de leche.

4.1.1.3. Sobre-aguda

Este tipo de mastitis produce una intensa reacción sistémica que se traduce en fiebre, decaimiento, anorexia, supresión de la secreción láctea y de los movimientos

ruminales. La glándula mamaria manifiesta una intensa reacción inflamatoria caracterizada por aumento de volumen, enrojecimiento de la piel, y gran sensibilidad. Un ejemplo característico es la mastitis denominada saco azul (blue bag) producida por *Staphylococcus aureus* (Altamirano y Dávila, 2012).

4.1.1.4 Aguda

Para Ten Hag, (2010) la mastitis aguda se caracteriza por una gran inflamación de la glándula, a veces semejante al caso anterior, pero generalmente no hay reacción sistémica o es muy leve. De igual manera presenta con mucha frecuencia después del parto y se reconoce por su aparición repentina con manifestaciones dadas por cambios en la leche como grumos o tolondrones y reducción en la producción de la misma, en muchos casos con presencia de suero sanguíneo. La ubre puede presentar inflamación ligera a dura, caliente y dolorosa. La vaca muestra signos de anorexia, depresión y fiebre.

Así también, Gasque, (2015) manifiesta que la mastitis aguda se caracteriza por su aparecimiento repentina y por cambios físicos evidentes en la leche (hojuelas, grumos o tolondrones), la secreción de leche disminuida y con presencia de suero sanguíneo, variaciones en la apariencia de la ubre, inflamación dura, caliente y dolorosa que involucra a uno o más cuartos. A menudo son evidentes signos de anorexia, depresión y fiebre. En casos severos de toxemia, el animal puede presentar paraplejia similar a la observada en la fiebre de leche.

4.1.1.5 Sub-aguda

Se caracteriza por la presencia de cambios macroscópicos en la secreción láctea, la misma que tiene presencia de coágulos, etc. pero no existe reacción inflamatoria detectable a la exploración clínica local ni general (Ebrahimi, *et al.*, 2008).

4.1.1.6 Mastitis gangrenosa

Es una condición clínica grave de procesos inflamatorios en las glándulas mamarias. Los signos clínicos ocurren comúnmente en las primeras semanas de lactancia, comprometiéndose en uno o dos lados de las glándulas y se caracterizan por fiebre, anorexia, disnea y signos sistémicos de toxemia. Inicialmente, la ubre está caliente, duele y produce hinchazón del lado afectado, con leche acuosa, presencia de pus y / o secreción de sangre floculante. La evolución del proceso se caracteriza por la ubre que se decolora (azul-negruzca o azul-verdoso), frío, con línea de demarcación del tejido afectado, desarrollo de abscesos y drenaje de pus. El curso clínico fatal se caracteriza por un peor estado corporal, neumonía, septicemia y/o toxemia (Ribeiro, *et al.* 2007).

4.1.1.7 Mastitis crónica.

Smith y Hogan, (2017) hacen referencia a casos en los cuales la inflamación aguda de la ubre persiste por más de cinco días con endurecimiento y sensación caliente, con secreciones continuas o intermitentes de leche de apariencia acuosa acompañada de hojuelas, grumos, coágulos o fibrones en los primeros chorros y el animal presenta un cuadro de fiebre, taquicardia, anorexia y atonía ruminal, entre otros síntomas. La mastitis crónica puede manifestarse con eventos agudos, y a su vez la mastitis aguda puede volverse crónica.

El signo principal en este tipo de mastitis es la induración de la glándula producida por la proliferación de tejido fibroso que ha ido reemplazando al tejido noble de la glándula. En este tipo de mastitis la secreción láctea generalmente es acuosa con coloración amarillenta o café. Este tipo de mastitis puede adoptar la modalidad de subclínica que en forma macroscópica aparece normal (*op cit.*).

4.1.1.8 Mastitis ambiental.

Todas las granjas lecheras incurren en pérdidas como resultado de mastitis ambiental. La mastitis clínica causada por los patógenos ambientales generalmente es el mayor problema de mastitis en las granjas lecheras modernas y bien administradas. El control de la mastitis ambiental requiere una menor exposición del extremo del pezón a los patógenos ambientales y la optimización de la resistencia de la vaca a la infección intramamaria. El valor de los antibióticos en el control de la mastitis ambiental es muy reducido en comparación con su valor en el control de los patógenos contagiosos (Desmoures *et al.*, 2006).

Es causada principalmente por organismos que se encuentran comúnmente en las camas, pisos y corrales en donde se adelantan las actividades relacionadas con la producción lechera, y que no pueden ser controlados completamente con la limpieza rutinaria de los animales y de las instalaciones. Los principales organismos causantes son: *Escherichia coli*, *Klebsiella sp*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia sp*, *Citrobacter freundii* y *Pseudomonas aeruginosa*, patógenos que generalmente ingresan a la ubre por el pezón al tener contacto directo con heces, barro o agua contaminada. Este tipo de mastitis se presenta con mayor frecuencia en sistemas de producción lechera bajo estabulación permanente o en época de lluvias (op cit.).

4.1.2 Diagnóstico

Las vacas afectadas con mastitis clínica muestran una marcada declinación en la producción láctea, signos cardinales de la inflamación y cambios macroscópicos en la composición de la leche, no requiriendo de pruebas complementarias para el diagnóstico.

En la mastitis clínica, por el contrario, se observan alteraciones macroscópicas de la leche pero se reduce la producción y se altera la composición química de la misma.

La inflamación debería ser analizada haciendo un seguimiento de diversos mediadores del proceso. Sin embargo, estos compuestos son inestables y su análisis requiere técnicas sofisticadas de laboratorio. Por este motivo, las pruebas de rutina sólo detectan los cambios secundarios que tienen lugar en la composición de la leche (Eckersall, *et al.*, 2001).

Roy, *et al.* (2007) al referirse al diagnóstico de infecciones intramamarias (IIM) consideran que se puede hacer por métodos directos o indirectas, el primero es el aislamiento del agente causal; por tanto, se toman muestras de leche en forma aséptica, las mismas que son sometidas a pruebas microbiológicas, cultivos, aislamientos, caracterizaciones, antibiogramas y otras más. En cambio el segundo se rige a varias técnicas, incluyendo la medición de variables tales como el conteo de células somáticas (CCS), concentración de lactosa, albúmina sérica, N-acetil- β -D glucosaminidasa (NAGasa), antitripsina, enzimas, aumento de la conductividad eléctrica, y presencia de antígenos bacterianos.

4.1.3 Una prueba de uso extensiva es el Test de Mastitis de California

Una de las pruebas desarrolladas para el diagnóstico de mastitis es la técnica denominada California Mastitis Test (CMT), esta prueba mide en forma indirecta la cantidad de células somáticas suspendidas en la leche del cuarto mamario infectado. Es muy práctica para utilizar al pie de la vaca, aunque la interpretación de los resultados tiene cierto grado de subjetividad (Gómez *et al.*, 2015).

Se trata de una prueba empleada durante décadas y sigue aplicándose, a tal punto que constituye la prueba más utilizada a nivel de campo con fines de diagnóstico de esta patología del ganado bovino lechero, de manera que a manera de una cronología de usos de esta prueba por varios investigadores, tal es el caso de Morresey, la empleo en 1999; Radostits, en 2000; Erskine, en 2001, Medina y Montaldo, en 2003; Bedolla, 2008. De todas maneras, es necesario recalcar que se

trata de una prueba fácil de practicarse en cualquier momento (Trujillo, *et al.*, 2011).

Sargeant, *et al.* (2001) hacen referencia al contenido de lactosa como un indicador de la presencia de mastitis en vacas, en la medida en que disminuía su presencia como producto de la síntesis de las células secretorias mamarias. Sin embargo, el porcentaje de reducción es relativamente bajo, por lo que es un indicador poco sensible para la presencia de mastitis.

4.2 Las células somáticas

Schukken, *et al.* (2003) denominan con esta nomenclatura a las células de la leche, aquéllas células propias del cuerpo, por eso son somáticas, desde otro enfoque, determinan a las células somáticas como el conjunto o asociación de leucocitos y células epiteliales.

Los leucocitos se introducen en la leche en respuesta a la inflamación que puede aparecer debido a una infección, en ocasiones a una lesión, mientras que las células epiteliales se desprenden del revestimiento del tejido de la ubre. Estas células provienen de la sangre y del tejido de la glándula mamaria, razón por la cual su número nos permite conocer datos claves sobre la función y el estado de salud de la glándula mamaria lactante, de tal manera que mantienen una cercana relación con la composición de la leche y con el criterio muy importante de calidad de la misma.

Las bacterias ambientales están presentes en el medio ambiente de la vaca, en su piel, charcos de agua y otros lugares estratégicos, desde donde y en relación a ciertas condiciones invaden a la ubre. Una vez que las bacterias atacan las células del interior de la glándula mamaria la respuesta inmunitaria del organismo es enviar glóbulos blancos de la sangre para neutralizar a las bacterias invasoras. Estos glóbulos blancos son en esencia los que constituyen los conteos de células somáticas (CCS). En la leche de vacas individuales o en el tanque de enfriado

significa que las bacterias han invadido la glándula de la vaca, hay presencia de mastitis (Pedraza, *et al.*, 2000). A manera de conclusión, desde el enfoque dado por Usme, *et al.* (2004) las células somáticas son células corporales se hacen presentes en la leche como consecuencia de su génesis en la sangre y del tejido glandular. De tal manera que el contenido de células somáticas en la leche es el reflejo cierto del estado funcional y de salud de la glándula mamaria en periodo lactante; debido a su estrecha relación con la composición de la leche, es un criterio de calidad muy importante y tomado en consideración en las empresas lecheras.

De todas las células de la leche de un cuarto infectado, aproximadamente el 99% serán leucocitos, mientras que el resto serán células secretoras que se originan de los tejidos de la glándula mamaria. Juntos, esos dos tipos de células constituyen la cuenta de células somáticas de la leche que comúnmente es expresada en mililitros (Andresen, 2001).

4.2.1 Conteo de Células Somáticas (CCS).

Este recuento practicado en leche de tanque es una indicación tanto del nivel de mastitis de un rodeo como de la calidad de la leche. Puede realizarse por métodos directos e indirectos. En la actualidad, las empresas lácteas realizan los recuentos e informan al productor, ya que los valores son tomados como parámetro para definir el informan al productor, ya que los valores son tomados como parámetro para definir el precio final de la leche. Los límites de valores aceptables varían en distintos países, sin embargo se considera que por debajo de las 200.000 CS/ml el nivel de infección mastítica del rodeo es muy bajo y la leche de muy buena calidad sanitaria (Chacón, *et al.*, 2006).

Por razones fisiológicas, el número de CS en la leche de vaca es alto inmediatamente luego del parto, pero desciende rápidamente durante la primera semana de lactancia,

aumentando nuevamente hacia el final de la misma. El promedio de CS durante la lactancia se encuentra dentro de un número menor a 100,000 CS/ml (Chacón, *et al*, 2006); dichos valores en una vaca sana se mantienen dentro de estrechos límites diarios, razón por la que el número de CS en leche depende de dos factores, el incremento real en la cantidad como consecuencia de la inflamación y el factor de dilución, que en este caso es la leche misma, de donde se deduce que el contenido de CS de la leche presenta una depende de la disponibilidad de energía metabolizable, así como de otros nutrientes y de la eficiencia de la vaca para convertirlos en leche. Por lo tanto, el bajo estado nutricional tiende a incrementar el recuento de CS (Trujillo, *et al.*, 2011)

Tabla 1

Relación entre Conteo de Células Somáticas

Grado CMT*	Rango de Células Somáticas (#células /ml)	Interpretación
N (Negativo)	0 – 200,000	Cuarto normal
T (Trazas)	200,000 – 400,000	Sospechoso de mastitis
1	400,000 – 1'200,000	Mastitis subclínica
2	1'200,000 – 5'000,000	Mastitis Clínica
3	Más de 5'000,000	Mastitis clínica aguda

Fuente: Adaptado por Aldás, B. de Philpot y Nickerson (2000).

Nota: * **CMT**= California Mastitis Test

4.2.2 Recuento de Organismos Mesófilos

Para hacer referencia a este tema, es necesario tomar las postulaciones de investigadores tales como Camacho, Giles, Ortigón, Palao, Serrano, y Velázquez, (2009) quienes afirman que el recuento de organismos mesófilos hace alusión a un número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC); esto es, organismos que crecen en forma aeróbica a 30°C al cabo de 72 horas de incubación. Esta prueba se la conoce también como recuento estándar en placa (REP) y es una medida de las condiciones de higiene imperantes en la explotación lechera, más no es una indicación confiable de la prevalencia de mastitis en un rodeo. La prueba hace referencia al número total de bacterias aeróbicas presentes en la leche al momento de su recolección, mas no determina el origen de las mismas. Es necesario recalcar que las causas más frecuentes de altos recuentos de organismos mesófilos son la insuficiente higiene en la empresa ganadera, esto es el ordeño con ubres sucias, la falta de enfriamiento rápido de la leche a 4,5°C (Camacho *et al.*, 2009).

Los mismos investigadores consideran que el número de bacterias patógenas de mastitis puede aumentar, dependiendo del tipo de infección intramamarias, por lo que el uso de esta técnica con apoyo de los cultivos bacterianos en medios para patógenos de mastitis, puede dar cierta orientación sobre el tipo de organismos predominantes en la muestra (op cit.).

Pellicer, (2013) considera que los organismos son provenientes del medio ambiente para la vaca y el equipo de ordeño; sin embargo, las bacterias patógenas, productor de mastitis, son destruidas por el calentamiento, de manera que altos recuentos de organismos termorresistentes son generalmente el resultado de higiene inadecuada del equipo de ordeño o de practicarse el ordeño con ubres mojadas o portadoras de suciedad. De la misma manera, los elevados recuentos de microorganismos son causados por la presencia de bombas en mal estado físico y funcional, caso igual con las uniones sanitarias viejas y depósitos de piedra de leche en tubería.

4.3 Bacterias patógenas que generan mastitis en bovinos

Para Harmon, (2013), la mastitis bovina es una enfermedad infecto contagiosa, causada por las bacterias de los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, y algunos microorganismos Gram negativos como *Escherichia coli*, son responsables de más del 90% de los casos clínicos y subclínicos. La enfermedad puede catalogarse como subclínica, incluso la de mayor prevalencia en un hato lechero, o también como clínica, con alteraciones visibles en la calidad de la leche y con síntomas evidenciables en la ubre, incluso llegando a niveles sistémicos en todo el animal.

El mismo autor (op cit.) considera que en la glándula mamaria bovina se han identificado entre 140 especies, subespecies y serovares microbianas. Las técnicas microbiológicas han permitido la determinación precisa de la identidad de muchos microorganismos patógenos productores de mastitis. Más aún y en relación con la epidemiología y la fisiopatología, se han clasificado estos microorganismos como causantes de la mastitis contagiosa o ambiental, en base a sus efectos patológicos propios de la enfermedad y a su tendencia a causar la infección oportunista, persistente o transeúnte, respectivamente. La magnitud y las relaciones temporales de estas respuestas varían con el estado nutricional, otros factores animales y el patógeno involucrado. Debido a que la elevación de CCS es una respuesta de la glándula mamaria y está modulada por mediadores inflamatorios, el principal factor que influye en conteo de células somáticas (CCS) es el estado de infección.

De conformidad con Romero, (2004), los microorganismos contaminantes de la leche cruda se originan principalmente a partir de:

- a) Infecciones de la ubre o conducto del pezón, debido a malas prácticas en el lavado de pezones, polvo en los pisos, aire contaminado, deyecciones de los animales.
- b) Exterior de la ubre y ambiente.

c) Manejo no higiénico de la leche y equipo de almacenamiento; por cierto, que hay que tomar en cuenta la edad de las vacas, la etapa de lactancia, la estación del año, variación de temperatura ambiental durante el día, variaciones climáticas, condiciones de manejo que generen estrés.

Para Zadoks, (2002) los patógenos infectocontagiosos de la mastitis, tales como el *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* que son perjudiciales a nivel individual y de población, han sido reportados bajo control en los hatos lecheros a través del uso de prácticas de manejo que utilizan la desinfección de los pezones después de cada ordeño, tanto como las que afirma Cedolla, (2008), esto es, la terapia de la vaca seca, los diagnósticos fatales que conducen a descartes, mantenimiento del equipo de ordeño, y terapia antibiótica de las infecciones intramamarias.

4.3.1 *Staphylococcus aureus*

Investigadores tales como Silva, *et al.* (2014) los *Staphylococcus*, morfológicamente son cocos Gram-positivos (de 0.5 a 15 μm de diámetro) que se presentan sueltos, en parejas, en pequeñas cadenas (de 3 o 4 células) y más específicamente en grupos irregulares en forma de racimos (su denominación procede del griego staphylé, racimo de uvas). Desde su hábitat son considerados como anaerobios facultativos, son catalasa positiva, generalmente oxidasa negativos, no esporulados, inmóviles y generalmente tienen una limitada formación capsular. En la actualidad en el género *Staphylococcus* se reconocen 32 especies y varias subespecies, si bien sólo algunas de ellas tienen importancia desde el punto de vista clínico, así como desde la acción enzimática, según produzcan o no la coagulasa, se dividen en dos grandes grupos: *Staphylococcus* coagulasa positivos (ECP) y *Staphylococcus* coagulasa negativos (ECN).

A partir del enfoque que le da a esta patología Wolter, *et al.* (2002) este

microorganismo conocido como *Staphylococcus aureus*, es el agente etiológico identificado o prevalente de la mastitis a nivel mundial, razón por la cual constituye uno de los más importantes dentro de esta enfermedad infectocontagiosa que convive con las vacas de producción lecheras; patología que se inicia con un episodio subclínico o clínico agudo, generalmente evoluciona hacia la cronicidad y puede persistir a lo largo de toda la vida del animal. Además, es necesario tomar en cuenta que el hombre puede infectarse mediante el consumo de leche que contiene *S. aureus*, bacteria que ocasiona una intoxicación alimentaria debido a las enterotoxinas que el patógeno produce.

Al respecto, Pereyra, *et al.* (2014) consideran que la eficacia en la curación de casos crónicos, luego del tratamiento con antibióticos, es baja y no existe una terapia efectiva para eliminar de manera absoluta a la infección del cuarto mamario infectado. Por cierto, que estos autores insisten en la existencia de otros factores para el logro de éxitos limitados en la terapia con antibióticos, tal es el caso de la habilidad de *S. aureus* para evadir la respuesta inmune del hospedador y sobrevivir dentro de diferentes tipos de células de la glándula mamaria durante un largo período sin causar inflamación clínica alguna.

Pereyra, *et al.* (2014) *Staphylococcus aureus* vive dentro o fuera de la ubre, esto es en el tejido glandular y en la piel del pezón, de manera que puede causar, tanto mastitis clínica como subclínica. Generalmente se disemina de la misma forma que el *Streptococcus agalactiae*, otro patógeno de importancia epidemiológica para productores y consumidores de leche bovina. De igual manera Wattiaux, (2015), en base a sus experiencias clínicas, ha demostrado que la infección tiende a producir cicatrices, que resultan en focos de infección encerradas en la ubre que son difíciles de alcanzar por los antibióticos, incluso dichos abscesos llegan a romperse o diseminarse a otras partes de la glándula, sea de manera inmediata como a largo plazo.

4.3.2 *Streptococcus agalactiae*

Es una bacteria ubicada en el grupo B (EGB), del genero *Streptococcus*, perteneciente a la familia *Streptococcaceae*, es gran positiva, β -hemolitico- catalasa negativa, oxidasa negativa y anaerobio-facultativa, caracterizada por presentar en su pared antígenos B y que fortalecen al sistema denominado de Lancefield. Este microorganismo es un patógeno para los animales, es el agente causal principalmente de la mastitis bovina, una enfermedad que produce grandes pérdidas económicas en la industria lechera (Fraile, *et al.*, 2014).

Este microorganismo, tal como señala Zadoks, (2002), se caracteriza por su forma esferoidal, razón por la cual se lo clasifica como Coco; de igual manera, por la afinidad a la coloración Gram se los califica como positivo, con agrupación ramificadas en cadena, se localiza en los ductos galactóforos de la glándula mamaria ocasionando mastitis crónica y en ciertos casos mastitis clínica aguda. La forma de contagio se da principalmente durante el ordeño, permitiéndose la diseminación de las bacterias de las glándulas infectadas a las glándulas sanas, ya que se eliminan durante el ordeño, ya sea manual o mecánico; si es manual, pueden trasladarse a otras glándulas e incluso a otras vacas, en especial si las condiciones de higiene son precarias. Para los casos de ordeño mecánico, el equipo disemina a los microorganismos, en especial si la limpieza del sistema es mal realizada, casos en los que se contaminan vacas que son ordeñadas en condiciones no deseables. Este microorganismo posee una cápsula bacteriana de polisacárido rico en ácido siálico que forma parte de la estructura bacteriana; se distinguen 10 serotipos antigénicamente diferentes (Ia, Ib,II a IX, entre otros). Es capaz de burlar los mecanismos de defensa del hospedador e invadir los tejidos y causar infecciones graves (Caetano, *et al.*, 2004).

Ruiz, (2015) referente al *Streptococcus agalactiae* afirma que no tiene capacidad de invadir a los tejidos internos de la glándula mamaria, sin embargo, colonizan la

superficie de los epitelios, por lo que los mecanismos de defensa deben estar presentes a este nivel; de igual manera, cuando logra alcanzar el interior de la glándula se localiza en el seno lactífero del pezón, glándula o ductos galactóforos. Una vez adherido a la pared epitelial, fermenta la lactosa produciendo ácido láctico que irrita a los tejidos, ocasionándose una reacción inflamatoria con leucocitos, fibrina, células epiteliales descamadas y factores plasmáticos, elementos que llegan a ocasionar taponamientos con obstrucción al desplazamiento de la leche.

Wattiaux, (2015), desde su vasta experiencia considera que los *Streptococcus agalactiae* son la causa más común de infecciones subclínicas, sin embargo, muy rara vez produce una severa enfermedad, denominada mastitis aguda. Este microorganismo vive en la ubre de la vaca y fuera de la glándula mamaria sobrevive solamente un corto período de tiempo. Si por una parte esta bacteria se caracteriza por su capacidad de infectar también la ubre de una ternera joven si ha sido alimentada con leche contaminada, permanece en forma indefinida en la glándula mamaria de la novilla, por otro lado, es erradicada del hato si se implementa y cumple un tratamiento rigurosamente controlado.

4.3.3 *Escherichia coli*

Esta bacteria es una de las más conocidas a nivel de ganaderías bovinas, en especial en los sistemas destinados a la recolección de leche. Se trata de un microorganismo más común y que forma parte de la microbiota intestinal; se presenta como un comensal del intestino animal a pocas horas después del nacimiento de este; existen varias cepas de *E. coli* implicadas en un amplio espectro de enfermedades en los animales, son Gram negativas a la coloración o tinción de Gram, razón por la cual se tiñen de rojo. Algunas especies son móviles ya que están dotadas de flagelos peritricos, no esporuladas, fermenta la glucosa y la lactosa son catalasa positivos, oxidasa negativos y reduce nitratos a nitritos. El género *Escherichia* incluye siete especies que son: *E. adecarboxylata*, *E. alberti*, *E. blattae*,

E. fergusonii, *E. hermannii*, *E. vulneris* y *E. Coli* (Molina y Campos, 2015).

Estos microorganismos son ampliamente diseminados en el ambiente de las lecherías, especialmente a través de la ropa, de materiales utilizados para camas, estiércol y agua que son medios activos de infección González, *et al.*, (2008) la mastitis clínica causada por *Escherichia coli* es más frecuente durante los primeros tres meses de iniciada la lactancia, son más críticas las dos primeras semanas iniciada la lactancia; este microorganismo se encuentra en cantidades abundantes en el estiércol de los animales, razón por la cual tiene una frecuente presencia e incrementos al inicio de la lactación y disminuye conforme ésta avanza. Es una enfermedad multifactorial para la que no hay programa de la prevención o los controles no han demostrado resultados satisfactorios, razón por la cual, las medidas preventivas constituyen la opción en la lucha contra este tipo de mastitis (Acuña y Rivadeneira, 2008).

4.4 Secuenciación de bacterias patógenas productora de la mastitis

4.4.1 Caracterización molecular

Cervantes, *et al.* (2014) consideran que las bacterianas antes referidas también puede identificarse a través de técnicas moleculares, tal es el caso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y PCR en tiempo real, utilizando genes específicos de esta especie. Sin embargo, estas técnicas son caras y laboriosas, puesto que en varias ocasiones, se requiere identificar cepas o grupos de cepas con fines epidemiológicos para lo cual se pueden emplear técnicas fenotípicas y genotípicas; así por ejemplo las cepas de *Staphylococcus aureus* datan de 2001 y proceden de las cepas Mu50 y N315, ya que actualmente existen otras diez secuencias genómicas completas provenientes de cepas diferentes de este microorganismo.

De manera general se puede establecer que respecto a la caracterización molecular,

han evolucionado los métodos moleculares con PCR en tiempo real, obteniéndose resultados prometedores en cuanto a mejoramiento de sensibilidad y especificidad frente a los métodos convencionales. Entre los blancos moleculares evaluados se encuentran ensayos dirigidos a 16S rRNA, al gen *cfb* que codifica el factor CAMP, al gen *scpB* que codifica la peptidasa C5a, gen *rib*, gen *sip*, una proteína inmunogénica de superficie, gen *cylE* que codifica una β -hemolisina que es una toxina asociada a la injuria de tejidos y diseminación sistémica, encontrándose diferentes resultados en cuanto a sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos. En un estudio realizado en Chicago, la sensibilidad y especificidad de la PCR en tiempo real, fue del 95.8%, y del 64.5% respectivamente y las del cultivo fueron del 83.3% y 80.6%. Los resultados del estudio realizado en Canadá fueron sensibilidad y especificidad de 90.5% y 96.1%, empleando una prueba rápida de PCR. (Duque, *et al.*, 2016).

4.5 Mecanismos de defensa de la glándula mamaria

De acuerdo con lo indicado por Riollot, *et al.* (2002) la glándula mamaria está protegida por una variedad de mecanismos de defensa que generalmente se los clasifica en dos categorías: la una denominada inmunidad innata, mientras que la otra es conocida como inmunidad específica. La primera conocida también como respuesta inespecífica y es la que se hace presente en las etapas tempranas en la infección; es decir, este tipo de defensa se activa a través de la sangre y los vasos linfáticos del soma de la vaca. Este tipo de protección se hace presente rápidamente en el sitio de infección gracias a los estímulos como presencia de microorganismos intrusos, descargas de cortisol y otros. En cambio la inmunidad específica es la que actúa a través de la presencia de inmunoglobulinas que intervienen como mecanismos de defensa inmunitaria.

Es conocido también, tal como sostienen Riollot, *et al.* (2002) que la leche ayuda a prevenir la invasión de algunos patógenos potenciales, y por sí mismo este líquido

contiene inhibidores bacterianos, conocidas como lacteninas y células fagocitarias. El tejido mamario sintetiza localmente IgA, pese a que muchas de las células que la protegen derivan de patrones originados en el tubo digestivo. De todas maneras es necesario recalcar que estas células son una fuente de anticuerpos generales contra microorganismos específicos intestinales, sin embargo, para el caso de la mastitis se convierten en defensores específicos de la ubre; en cambio la IgG se transfiere de manera selectiva por un mecanismo de transporte activo desde el suero sanguíneo.

4.5.1 Células de defensa y mediadores que intervienen en la inflamación de la glándula mamaria

De manera concreta Meglia et al. (2001) afirman que los linfocitos, las células plasmáticas y los macrófagos se encuentran en escaso número en el tejido conjuntivo de la glándula mamaria bovina considerada como normal; es decir que en la glándula sana se observa una población escasa de los granulocitos neutrófilos de la sangre que viajan hacia el epitelio alveolar y desde aquí a la leche. Para los casos de infecciones fuertes provocadas por bacterias agresivas como *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*, aumentará el número de granulocitos en los vasos sanguíneos y en consecuencia el de CCS en la leche.

Una reacción inflamatoria aguda es crucial para la defensa de los tejidos del hospedador contra bacterias patógenas invasoras; de manera que los leucocitos, especialmente los neutrófilos son los principales participantes de este mecanismo de defensa natural, por tanto su migración al tejido infectado es determinante para el desenlace de la presencia de mastitis clínica o subclínica. Por tanto la fase aguda de la respuesta inflamatoria se caracteriza por una amplia gama de respuestas fisiológicas que se inician inmediatamente después de producida la infección o trauma físico (Trevisi, et al., 2012).

4.5.1.1 Citocinas

Las citocinas son proteínas que regulan la fisiología de las células que las producen sobre otras células, de manera que esta comunicación intercelular encadena células productoras con células diana que son las depositarias de tal o cual función como por ejemplo antiinflamatorias y las inmunoprotectoras, tanto más específico sería la mediación para las respuestas de tejidos huéspedes a la presencia de mastitis de vacas lecheras. Las citocinas son producidas por linfocitos y macrófagos activados, también por leucocitos polimorfonucleares, células endoteliales, por los adipocitos del tejido muscular y conjuntivo; las citocinas secretadas son los agentes responsables de la interacción intercelular, de manera que conducen a la puesta en marcha de receptores de membrana específicos, de las funciones proliferativas y diferenciación celular, el crecimiento y regulación de la secreción de inmunoglobulinas (Grandi, 2010).

4.5.1.2 Factores celulares y humorales defensivos presentes en la leche de vacas

Desde el enfoque investigativo Manifestado por Korhonen, *et al.* (2007) la leche está dotada de efectos inhibitorios para el crecimiento de bacterias, las mata o las hace inofensivas, atenuándolas; al respecto, estos investigadores sostienen que el efecto antibacterial obedece a factores defensivos, tanto celulares como humorales; entre los primeros intervienen los linfocitos polimorfonucleares, en especial y para el caso de la leche los linfocitos y los macrófagos, en tanto que entre los humorales está, los factores del complemento, el sistema lactoperoxidasa-tiocianato-peróxido-hidrógeno, la lactoferrina y la lisozima.

Entre los mecanismos naturales de defensa más destacados contra la mastitis tal como señalan Petzl, *et al.*, (2008) se encuentra el paso acelerado de los leucocitos sanguíneos a la luz alveolar de la glándula mamaria atacada, puesto que si se toma

como referencia una ubre sana, se pueden evidenciar menos de cien mil leucocitos por cada mililitro de leche muestreada, por consiguiente estos mismos investigadores afirman que el número de leucocitos se incrementa como clara respuesta a la presencia de microorganismos patógenos invasores; tanto es así, que en el caso de una mastitis tipo agudo, los leucocitos pueden ser en número de millones de CS/ml de leche, por cierto que los leucocitos más verificados en el curso de mastitis son los granulocitos polimorfonucleares (PMN), ya que éstos reconocen a las bacterias invasoras que han sido marcadas por anticuerpos y las fagocitan, tanto es así que en el curso de una infección mamaria no pasan más de 12 a 24 horas para que los PMN aumenten su población en el lugar de la infección.

4.5.1.3 Los polimorfonucleares o leucocitos neutrófilos

De conformidad con lo afirmado por Sládek y Rysánek, (2000) los leucocitos neutrófilos polimorfonucleares (PMN) son las células que fortalecen la primera línea de defensa inmunológica o de defensa contra bacterias que han logrado superar la barrera física del canal del pezón. De tal manera que los PMN son los protectores de la glándula y a través de la fagocitosis, e incluso la muerte intracelular, debido a la capacidad para fagocitar y matar bacterias, tanto opsonizadas como no opsonizadas, para cuyo fin emplean, ya sea radicales enzimas bactericidas.

De manera concreta y concluyente (Blackburn, 2009) afirma que los neutrófilos, para cumplir una vigilancia inmune exitosa y defensa contra los patógenos intramamarios desempeñan cinco funciones clave: marginación, migración, fagocitosis, estallido respiratorio y degranulación. La marginación y la migración de los neutrófilos son críticas para la vigilancia inmune innata y para confinar la respuesta inflamatoria en el sitio de la infección. La fagocitosis, el estallido respiratorio y la degranulación culminan en la destrucción intracelular del patógeno por neutrófilos de la leche que han migrado desde la sangre hasta el foco de la infección.

4.5.1.4 Linfocitos

Las células somáticas o leucocitos, para los casos de las infecciones de la glándula mamaria de vacas lecheras, constituyen los mecanismos de defensa inmune más importantes, pese a que un número considerable de neutrófilos en leche bovina es crítico para la lucha contra las infecciones, aclarándose también que los macrófagos y los linfocitos T forman parte integrante y activa de las células somáticas en leche procedente de cuartos sanos (Zlotnik, 2002).

Para Concha, *et al.*, (2009) en el sistema inmune, los linfocitos son las únicas células que reconocen antígenos por medio de receptores de membrana, además son específicos para patógenos infectocontagiosos. De igual Stelwagen, *et al.*, (2009) confirman que hay dos tipos de linfocitos que difieren en cuanto a sus funciones y en relación a los productos proteicos, se trata de los linfocitos T y B, cuyos porcentajes en relación a su número son directamente dependientes del estado de lactancia y de su localización en los tejidos infectados, tanto es así que el 20% de los linfocitos están representadas por células B, cuya función es reconocer a los antígenos o sustancias extrañas para producir anticuerpos específicos y secretar inmunoglobulinas localmente. En cambio el 45% de los linfocitos, están representados por células T, encargadas de destruir a los antígenos por contacto directo, produciendo linfocitos, células asesinas y células auxiliaadoras, las mismas que activan el complejo de histocompatibilidad, conocido como inmunidad humoral.

4.6 Los cultivos de bacterias a partir de muestras de leche

Los cultivos bacterianos tienen una especial particularidad e importancia, ya que constituyen los medios a través de los que se pueden cuantificar las bacterias e identificar los microorganismos causantes de mastitis y realizar los conteos de células somáticas. Si los conteos bacterianos se encuentran elevados (>50,000 bacterias/ml), un cultivo puede proveer claves para la fuente de contaminación. La

presencia o ausencia de microorganismos específicos ayuda a formular recomendaciones para prevenir la difusión de agentes infecto contagiosos que se encuentran en el hato lechero; ganaderías bien manejadas son identificadas por el número de células somáticas inferior a 1,000 células/ml (Fuentes, *et al.*, 2013).

4.6.1 Crecimiento de bacterias Gram-Positivas frente a bacterias Gram-Negativas

Es de gran utilidad saber si el tipo de bacteria presente es Gram-positivas o Gram-negativas, para cuyo propósito se utiliza la técnica denominada Tinción de Gram. Ciertos tipos de bacterias retendrá la tinción de Gram (haciéndolos Gram-positiva), mientras que otros tipos de bacterias no retienen la tinción de Gram (haciéndolos Gram-negativa). Este nivel de diagnóstico es útil porque algunas infecciones de mastitis causadas por bacterias Gram-negativas pueden no necesitar terapia antibiótica intra-mamaria. Antes de implementar un Sistema de cultivo en las ganaderías se debe determinar las estrategias de tratamiento (Bowen, *et al.*, 2014).

4.6.1.1 Cultivo de *Staphylococcus aureus*

Para la identificación de *S. aureus* es necesario utilizar algunas pruebas bioquímicas y medios de cultivo especiales que permitan la determinación e identificación, fundamentalmente en base a las enzimas y toxinas que produce (Tovalino *et al.*, 2010).

a. Medios específicos

Tal como recomienda Sabalet, (2010) se debe cultivar *S. aureus* en agar sangre, a una temperatura óptima de crecimiento entre 34-37°C. A las 18-24 horas se observan colonias de 1-3 mm. El color amarillo es debido a la producción de carotenoides, que puede ser favorecida si se incuba a temperatura ambiente y luz

natural durante 24 - 48h. Colonias grandes, cremosas, convexas y de bordes lisos. La mayoría de las cepas de *S. aureus* producen β hemólisis dentro de las 24-36 horas de incubación.

b. Agar Salado Manitol

Se emplea para el aislamiento selectivo de *Staphylococcus aureus*. El agar sal manitol contiene una concentración de cloruro sódico de 7.5%, el cual es el agente activo (34) del medio e inhibe parcial o completamente a los organismos bacterianos diferentes de los estafilococos. Los estafilococos coagulasa (+) (*Staphylococcus aureus*) producen colonias de color amarillo y un medio circundante de color amarillo, mientras que los *Staphylococcus* negativos a la coagulasa producen colonias de color rojo y no provocan cambios en el color del indicador rojo fenol (op.cit.).

c. Agar *Staphylococcus* N° 110

Retomando a Sabaleta, (2010), este agar N° 110 es un medio selectivo para aislar *Staphylococcus* patógenos a partir de muestras clínicas y no clínicas, basado en la fermentación de manitol, la formación de pigmento y la actividad gelatinosa. Este medio también se utiliza para el aislamiento de *Staphylococcus* que contaminan una amplia variedad de alimentos y producen una intoxicación por consumo de éstos. Los *Staphylococcus* coagulasa (+) patógenos crecen en altas concentraciones de NaCl, forman colonias amarillas y doradas. Por otra parte, la fermentación de manitol se detecta por medio de la adición de unas gotas de azul de bromotimol a la placa, se buscan las colonias que tengan un halo amarillento a su alrededor.

d. Agar Baird-Parker

Es un medio excelente para el recuento de *Staphylococcus aureus*, incluso, aunque

se trate de células que sufrieron un daño subletal. Además, es el medio moderadamente selectivo más corrientemente usado. Su composición consta de piruvato sódico el cual ayuda a recuperar las bacterias lesionadas; su poder selectivo se debe a la presencia de telurito, cloruro de litio y glicina (Zendejas, et al., 2014).

4.6.1.2 Cultivo de *Streptococcus agalactiae*

Fraile y López (2017), afirman que *Streptococcus agalactiae* es un estreptococo β -hemolítico del grupo B (EGB), es un coco Gram positivo, catalasa y oxidasa negativo, anaerobio facultativo, que se presenta formando cadenas de longitud variable. El EGB puede crecer en medios simples, aunque los medios suplementados con sangre o suero favorecen su crecimiento. Luego de 18-24 h de incubación en agar sangre, las colonias son de unos 2 mm de diámetro, lisas y rodeadas por un halo de β -hemólisis, aunque existen algunas cepas no hemolíticas; en conclusión, el empleo de medios selectivos favorece la recuperación del EGB.

a. Identificación

Al respecto López, Fraile y de Cueto, (2017) afirman que las pruebas bioquímicas más utilizadas son el CAMP-test, la hidrólisis del hipurato y la resistencia a discos de bacitracina y cotrimoxazol, aunque ninguna de ellas es específica. En medios de cultivo especiales, el EGB produce un pigmento de color rojo naranja, que es característico, y que permite su identificación directa, sin necesidad de otras pruebas. Las cepas no hemolíticas no producen pigmento.

4.6.1.3 Cultivo de *Escherichia coli*

a. Identificación

Se puede desarrollar el cultivo en Agar-hierro-triple azúcar (TSI), se realiza una punción en el medio con una aguja que contenía una pequeña muestra de la bacteria aislada, el medio fue incubado a 37° C por 24 horas; transcurrido este periodo se realizó la lectura en base a la reacción del medio, estas reacciones fueron: coloración de la superficie inclinada y/o del fondo, formación de burbujas, grietas, presencia de sulfuro ferroso (color negro).

De igual manera la prueba de citrato se la realiza para identificar la presencia de un grupo de enterobacterias capaces de desarrollarse en un medio que contenga sales inorgánicas de amonio como única fuente de nitrógeno, citrato, carbono, diferenciándose de otras enterobacterias que carecen de esta capacidad

b. Medio EMB (Eosina-azul de metileno)

Es un medio selectivo que permite el crecimiento de bacilos Gram negativos, principalmente de la Familia *Enterobacteriaceae*, inhibiendo el crecimiento de las bacterias Gram positivos, además es un medio diferencial ya que nos permite saber por la coloración de las colonias si los microorganismos que crecen fermentan lactosa o sacarosa. Si las bacterias fermentan lactosa o sacarosa, acidifican el medio y la eosina revierte con el apareamiento de colonias oscuras, de color rosado a verde brillante (ejemplo *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*). Las bacterias que no fermentan ni lactosa ni sacarosa originan colonias claras o transparentes (Probiotek, 2018).

c. Agar Tergitol 7

Este agar es selectivo para *Escherichia coli* y miembros del grupo coliformes, la adición de Tergitol 7 a un medio que contiene polipeptona y extracto de levadura permite el desarrollo irrestricto de todas las bacterias coliformes, lo que es más inhiben a Gram-negativos formadores de esporas así como a otros organismos Gram-positivos. Los recuentos de coliformes en Tergitol 7 Agar son más altos del 30% que en otros medios selectivos (Acumedia, 2018)

d. El agar MacConkey

Se trata de un medio de cultivo ligeramente selectivo, dado que la concentración de sales biliares, que inhiben los microorganismos Gram positivos, es baja en comparación con otros medios entéricos en placa. Se recomienda el uso de este medio en muestras clínicas con posible flora microbiana mixta, tal como procedentes de la orina, del sistema respiratorio, de heridas y otras, porque permite la agrupación preliminar de bacterias entéricas y otras bacterias Gram negativas en organismos fermentadores y no fermentadores de lactosa. El agar MacConkey también se utiliza en el examen microbiológico de alimentos (BD, 2014).

4.7 Apitoxina

El veneno de abejas (*Apis mellifera*), denominado apitoxina, es un líquido amargo e incoloro, de composición muy compleja, está compuesto por 18 elementos con actividad farmacológica; consta de una mezcla de enzimas y péptidos. Las enzimas en este veneno incluyen fosfolipasa A 2, fosfolipasa B, hialuronidasa, fosfatasa y α -glucosidasa; además, entre los péptidos dispone de melitina, apamina, péptido de desgranulación de mastocitos, adolapina, tertiapina, (Cheon Pak, 2017).

4.7.1 Composición

Valderrama, (2016) incluye dentro de la composición del veneno de abejas sustancias orgánicas de bajo y alto peso molecular, tal es el caso de péptidos simples (como la apamina) y polipéptidos; recientemente demostró que algunos citratos son también componentes mayores de la apitoxina. La melitina y la fosfolipasa A2 son los componentes principales y más abundantes, cerca del 75%, en una relación de 25 a 1 respectivamente. La melitina se adhiere a las membranas de los glóbulos rojos, produciendo hemólisis; la fosfolipasa A2, el mayor de los alérgenos del veneno, actúa como agente bloqueador que puede provocar parálisis respiratoria.

La apamina representa cerca del 2% del veneno total; es menos tóxica que los compuestos anteriores y se comporta como neurotóxica motora; además, desencadena efectos cardioestimulantes parecido al de las drogas adrenérgicas, tiene propiedades antiarrítmicas. Un 2% del veneno lo constituye el péptido MCD (Mast Cell Degranulation) o factor degranulador de los mastocitos, uno de los compuestos responsables de la liberación de histamina y serotonina. Adicionalmente, se han identificado compuestos como fosfatasa ácida, norepinefrina, dopamina e histamina (Gualdrón, 2012).

4.7.2 Conservación de la apitoxina

Tal como expresan Gauldie, *et al.*, (2017), el veneno de abeja se seca rápidamente en contacto con el aire y se convierte en cristales amorfos. Pero durante este secado, aparte del agua, del veneno de abejas se eliminan las fracciones volátiles, las mismas que se consideran entre 12 sustancias distintas. Por este motivo el veneno de abejas debe conservarse en envases cerrados, ya que bien secado, embalado en frescos de vidrio, color ámbar, conserva sus principales características durante 7 a 8 años.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Área de estudio

Por su naturaleza esta investigación fue desarrollada en dos fases, una de laboratorio y la otra de campo:

5.1.1 Fase de laboratorio

Los trabajos fueron desarrollados en instalaciones de los laboratorios de Microbiología, Biología y Biotecnología de la Pontificia Universidad Católica Sede Ibarra (PUCESI), Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales (ECAA), los mismos que se encuentran ubicados geográficamente en las siguientes coordenadas: latitud N 0°21'50", longitud W 78°15'40" y altitud 2220 m.s.n.m, en el barrio La Victoria, parroquia San Francisco, cantón Ibarra, provincia Imbabura.

5.1.2 Fase de Campo

Los trabajos concernientes a las actividades de campo, se ejecutaron en la comunidad de El Sixal, parroquia San Rafael, cantón Bolívar, provincia del Carchi; la ubicación geográfica se encuentra en las siguientes coordenadas: latitud N 0°25'30,3", "W 77°52'32.9" y altitud 3080 m.s.n.m.

5.2 Materiales de laboratorio

Para la realización de los cultivos e identificación bacterias

- Tubos de ensayo de 10 ml
- Gradilla
- Gel refrigerante

- Placas portaobjetos, cubreobjetos
- cámara de flujo laminar
- Vasos de precipitación BOECO[®]
- Pipetas graduadas GILSON[®]
- Autoclave N-BIOTEK[®]
- Termo de refrigeración
- Cajas Petry de vidrio PIREX[®]
- Agar sangre Acumedia[®]
- Caldo cultivo LAB A Neogen Company[®]
- Aza
- Microscopio cuenta colonias stuart[®]
- Estufa, marca MEMMERT[®], modelo INB 500
- Microscopio binocular micros AUSTRIA[®]
- Balanza analítica
- Agua destilada

5.3 Materiales de campo

- Libreta
- Oberol
- Botas de goma
- Guantes de hule
- Cabo manila
- Cámara fotográfica
- Jeringas hipodérmicas de 5 ml (desechables)
- Aguja hipodérmica (desechable)
- Jabón
- Balde plástico

5.4 Métodos

5.4.1 Diseño Experimental

Para la investigación en la fase de laboratorio, se utilizará un diseño completamente al azar (DCA), con arreglo factorial A x B + 2, dando en total 23 tratamientos con 3 repeticiones, para un total de 69 unidades experimentales.

5.4.2. Características del experimento

Variable independiente

Tabla 2

Dosis de Apitoxina (factor A)

Símbolo	Dosis Apitoxina (mg/ml)
A1	0,5
A2	0,6
A3	0,7
A4	0,8
A5	0,9
A6	1,0
A7	1,1
TESTIGO 1	Neomicina
TESTIGO 2	Absoluto

Fuente: El autor, 2019

Tabla 3

Bacterias (factor B)

Descripción	Bacterias
B1	<i>Staphylococcus aureus</i>
B2	<i>Streptococcus agalactiae</i>
B3	<i>Escherichia coli</i>

Fuente: El autor, 2019

Variable dependiente

En cuanto a las variables dependientes, a partir de los resultados logrados en laboratorio, se evidenciaron a través de:

- Halos inhibitorios (mm) *
- UFC (número/ml)
- CS Células Somáticas (número/ml)

*.Standards for Antimicrobial Susceptibility Tests (NCCLS)

<https://watermark.silverchair.com/lab>

Tabla 4

Tratamientos

A1B1	A2B1	A3B1	A4B1	A5B1	A6B1	A7B1
A1B2	A2B2	A3B2	A4B2	A5B2	A6B2	A7B2
A1B3	A2B3	A3B3	A4B3	A5B3	A6B3	A7B3
TESTIGO Neomicina	TESTIGO Absoluto					

Fuente: El autor, 2019

5.5 Colecta de apitoxina

El veneno de abejas (*Apis mellifera*), también conocido como apitoxina se cosechó en el apiario de la granja experimental de la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales (ECAA) mediante el auxilio de un prototipo desarrollado en la Escuela, el mismo que consiste en adecuaciones para que se forme un campo magnético y eléctrico gracias a la alimentación de energía dada por una computadora portátil, mientras que la colecta del producto se realiza a través de una lámina de vidrio color ámbar ubicada en la base del prototipo, la misma que es móvil para que permita el “raspado” del veneno cristalizado que se convierte en polvo color blanquecino-ámbar.

Si los valores de la humedad del aire son superiores a 70%, entonces es necesario que el vidrio con el veneno se ponga a buen recaudo en un lugar aséptico, a la sombra durante unos 20-30 minutos.

Posteriormente y mediante el auxilio de un portaobjetos de vidrio, debidamente esterilizado en autoclave, dentro de una cámara de flujo laminar preparada para el efecto se procedió a raspar con el portaobjetos en posición vertical, mediante movimientos horizontales y ordenados a través de toda la superficie de la lámina de vidrio objeto de la colecta.

El polvo recolectado fue guardado en frascos de vidrio color ámbar, con tapa roscable y preparados asépticamente. Se registró la fecha, hora de colecta, colmena y cantidad de apitoxina obtenida. Los frascos con apitoxina se depositaron en una caja de madera adecuada para este fin y se la guardó en refrigeración, a 4 a 6 °C.

5.6 Recolección de muestras de leche

Previo la colecta de muestras de leche de vacas clínicamente mastíticas, las vacas seleccionadas fueron sometidas a una prueba de CMT para confirmar la presencia de infección mamaria, pese a la evidencia de signos clínicos objeto del muestreo lácteo.

Al momento del respectivo ordeño, se procedió al despunte (drenaje lácteo no muestreable), luego se colectaron entre 8 y 10 ml de leche por pezón y en un tubo de ensayo específico preparado para este fin; esto es, desinfectados para garantía de una asepsia total, identificados con marcador permanente, con un número de orden de colecta, el nombre de la vaca, fecha y lugar del muestreo. A los tubos con leche colectada, se los ubicó en un cooler que contenía gel refrigerante, con temperatura de 5°C aproximadamente; de forma inmediata fueron transportados a los laboratorios de la ECAA, se trasvasaron los tubos a gradillas porta tubos y se colocaron en refrigeración a 4°C.

5.7 Cultivos microbiológicos

Se sembró 1 ml de leche de cada cuarto y cajas Petri en medio de cultivo agar sangre y en EMB, los cultivos fueron llevado a incubación, a 30°C durante 24 horas, cada una de las cajas Petri objeto de los cultivos fueron debidamente identificadas con las siglas para la bacteria y fecha de cultivo. Se procedió a identificar a cada una de las bacterias presentes y se replicaron en otro cultivo con iguales medios y procedimientos que los de los primeros cultivos; de este segundo cultivo se identificaron microscópicamente y mediante colorimetría a la bacteria causante de la mastitis.

5.7.1 Aislamiento de cepas

Se procedió al traslape de cultivo en cajas Petri y con agar específico, esto es agar sangre y agar EMB o agar eosina (Acumedia®), mediante el método de siembra por estrías, así como para su conservación se sembraron en caldo nutritivo, procedimientos realizados con las tres cepas de bacterias objeto de esta investigación.

Todas las cajas Petri en las que se realizaron los cultivos bacterianos fueron llevadas a incubación durante 24 horas y a una temperatura de 37,5°C. Posteriormente se verificó la formación de colonias a través de observación directa, las que fueron repicadas varias veces con la finalidad de obtener cepas totalmente puras y así observar con mayor claridad sus características físicas y químicas.

5.7.2 Identificación de las cepas

Las colonias de cada una de las tres cepas bacterianas fueron aisladas e identificadas a través de la técnica de tinción Gram, lográndose tipificar a las tres bacterias: *Staphylococcus aureus* (amarillo oro), *Streptococcus agalactiae* (amarillo oro) y *Escherichia coli* (verde azulada brillante).

5.7.2.1 Tinción Gram

- a) Se etiquetaron tres portaobjetos por uno de sus extremos con los nombres de: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*.
- b) Se prepararon los frotis bacterianos a partir de cultivos líquidos o sólidos.
- c) Se fijaron con calor (mechero de Bunsen).
- d) Se agregó cristal violeta en cantidad suficiente para cubrir el frote (2 a 3 gotas) y dejar actuar 1 minuto.
- e) Se lavó con el mínimo de agua para eliminar el exceso de colorante.

- f) Se agregó lugol en cantidad suficiente para cubrir el frote (2 a 3 gotas) y dejar actuar 1 minuto.
- g) Se procedió a lavar con el mínimo de agua para eliminar el exceso de sustancia.
- h) Se decoloró con alcohol acetona hasta que el efluente salga incoloro
- i) Se lavó con agua para eliminar el exceso de disolvente.
- j) Se agregó safranina en cantidad suficiente hasta cubrir el frotis (2 ó 3 gotas) y se dejó para que actúe durante un minuto.
- k) Se lavó con agua para eliminar el exceso del colorante de contraste.
- l) Se dejó secar la preparación a temperatura ambiente.
- m) Se observó al microscopio con los objetivos de 10x, 40x y 100x.
- n) Se esquematizaron las observaciones realizadas con el objetivo de mayor aumento y describir las características de los microorganismos observados e indicar si son Gram positivos o Gram negativos.

Una vez aisladas las bacterias, estas cepas puras sirvieron para la determinación de la acción inhibitoria de la apitoxina por medio del antibiograma y la prevalencia de la concentración mínima en el tiempo de crecimiento de las bacterias.

Para certeza de procedimiento y resultados microbiológicos, una vez identificadas las cepas de cada una de las tres bacterias objeto de este estudio, se enviaron muestras de estas bacterias en caldo nutritivo, y cadena de frío (termo de refrigeración) a los laboratorios de la Pontificia Universidad Católica-Quito al Laboratorio de Microbiología de manera especial para reconfirmar las cepas bacterianas encontradas y posteriormente la caracterización molecular de las mismas.

5.8 Secuenciación bacteriana

De conformidad con el personal del laboratorio de Fitopatología y Control Biológico de la Pontificia Universidad Católica-Quito, el protocolo desarrollado fue el siguiente:

5.8.1 Reactivación y reaislamiento de las bacterias

Los aislados bacterianos de los géneros: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y *E. coli* fueron realizados en medios selectivos (agar nutriente) y un medio específico (Eosina y Azul de Metileno, EMB) respectivamente. Se incubaron a 33°C por 24 horas y se procedió a realizar la tinción Gram para la confirmación de su identidad bacteriana.

5.8.2 Extracción de ADN

La extracción se realizó utilizando el protocolo sugerido por el kit *Wizard® Genomic DNA Purification* para aislamiento de ADN genómico a partir de bacterias Gram positivas y Gram negativas, como sigue explica a continuación:

5.8.3 Células de pellet

- a) Centrifugar 1 ml de cultivo durante la noche durante 2 minutos a 13000–16000 * revoluciones.
- b) Deseche el sobrenadante. (Macrogen Inc, 2019).

5.8.4 Para las bacterias Gram positivas

- a) Suspender las células en 480 µl de EDTA 50 mM.
- b) Agregue la (s) enzima (s) lítica (120 µl) [lysozima y / o lysoestima]. 3 Incubar a 37 ° C durante 30–60 minutos.
- c) Centrifugar durante 2 minutos a 13000–16000 × revoluciones y eliminar el sobrenadante (Macrogen Inc, 2019).

5.8.5 Para las bacterias Gram negativas

- a) Centrifugar 1 ml de cultivo durante la noche durante 2 minutos a 13000–16000 × revoluciones.
- b) Deseche el sobrenadante.
- c) Suspender las células en 480 µl de EDTA 50 mM.
- d) Agregue la (s) enzima (s) lítica (120 µl) [lysozima y / o lysoestima].
- e) Incubar a 37 ° C durante 30–60 minutos.
- f) Centrifugar durante 2 minutos a 13000–16000 × revoluciones y eliminar el sobrenadante.
- g) Incube durante 5 minutos a 80 ° C, luego enfríe a temperatura ambiente.
- h) Agregue 3 µl de solución de ARNasa. Mezcle, incube a 37 ° C durante 15–60 minutos, luego enfríe a temperatura ambiente (Macrogen Inc, 2019).

5.8.6 Precipitación de proteínas

- a) Agregue 200 µl de Solución de Precipitación de Proteína. Vórtice.
- b) Incubar en hielo durante 5 minutos.
- c) Centrifugar a 13000–16000 × revoluciones durante 3 minutos (Macrogen Inc, 2019).

5.8.7 Precipitación y Rehidratación de ADN

- a) Transfiera el sobrenadante a un tubo limpio que contenga 600 µl de isopropanol a temperatura ambiente. Mezcla.
- b) Centrifugar como en "Pellet Cells" arriba, y decantar el sobrenadante.
- c) Añadir 600 µl de etanol al 70% a temperatura ambiente. Mezcla.
- d) Centrifugar durante 2 minutos a 13000–16000 × revoluciones.
- e) Aspire el etanol y seque al aire el sedimento durante 10 a 15 minutos.
- f) Rehidrate el sedimento de ADN en 100 µl de solución de rehidratación durante 1

hora a 65 ° C o toda la noche a 4 ° C (Macrogen Inc, 2019).

5.8.8 Verificación de concentración de ADN:

La lectura de concentración de ADN presente en las muestras fue realizada utilizando el espectrofotómetro Nanodrop. Los resultados fueron óptimos y suficientes para la siguiente prueba, los mismos se detallan en el capítulo IV de resultados (Macrogen Inc, 2019).

5.8.9 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés)

Tabla 5

Reactivos utilizados para una master mix de una sola reacción de 25 µl en volumen total

Descripción	(µl)
Agua	9,9
Go taq	12,5
Primer PA forward	0,8
Primer PH reverse	0,8
ADN	1
Volumen total	25

Fuente: (Macrogen Inc, 2019)

Nota: Reactivos utilizados para una master mix de una sola reacción de 25ul en volumen total.

Tabla 6

Condiciones en las que se programó la PCR en el termociclador.

TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (MINUTOS)	CICLOS
95	5	35
94	30	
59	30	
72	1	
72	5	
4	Forever	

Fuente: (Macrogen Inc, 2019)

Nota: Condiciones a las cuales se programó la PCR en el termociclador.

5.8.10 Electroforesis

Se realizó la corrida en gel del ADN de las muestras por duplicado con agarosa al 1%. El resultado del revelado del gel, se reporta en el capítulo correspondiente¹.

5.8.11 Secuenciación

Las secuencias se obtuvieron a través de la empresa Sur-Koreana Macrogen, posteriormente fueron editadas y alineadas mediante la utilización de la herramienta informática MEGA y sometidas al BLAST (NCBI) para confirmar la identidad bacteriana a nivel de especie de cada cepa¹.

¹Jeniffer Yáñez, A. Mtr. Docente Investigadora, Fitopatología y Control Biológico PUCE; Sebastián Aguilar, Becario de Microbiología y Laboratorio de Fitopatología y Control Biológico.

5.9 Determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI)

A partir del cultivo puro ya identificado se realizaron antibiogramas con soluciones de apitoxina en concentraciones que van desde 0,5 a 1,1 mg.l⁻¹ (apitoxina en mg.l⁻¹ de agua grado uno). Se midió la CMI de conformidad con la presencia o ausencia de halos y en mm que se presenten en torno a los discos de papel portadores de las concentraciones de apitoxina objeto de estudio.

5.9.1 Antibiograma

El antibiograma se utilizó con la finalidad de medir la sensibilidad bacteriana frente al uso de siete concentraciones de apitoxina y una de neomicina, en calidad contraste, determinándose la concentración mínima inhibitoria para cada uno de los patógenos en estudio.

Para la ejecución de este proceso se utilizaron las diluciones de 0,5 0,6 0,7 0,8 0,9 1,0 y 1,1 miligramos de apitoxina por cada litro de agua destilada, mientras que como contraste se utilizó neomicina a 0,8 mg/l⁻¹ de agua destilada grado 1, además se utilizó un testigo absoluto (0,0 mg apitoxina.l⁻¹). Se tomaron cultivos de cepas puras de bacterias cultivadas durante 24 horas sin tratamiento alguno; estas fueron sembradas con aza de Neuwaski estéril en cajas Petri y en agar nutritivo, de manera simultánea se colocaron los discos de papel filtro embebido en cada una de las 7 concentraciones de apitoxina y una de neomicina. Los halos de inhibición formados por la apitoxina y la neomicina fueron medidos en milímetros mediante un pie de rey, tanto a las 24 como a las 48 horas de iniciado el proceso.

El protocolo desarrollado para la realización de los antibiogramas es el que se utiliza en los laboratorios de la PUCESI, tal como se detalla a continuación:

a) Se autoclavó el medio de cultivo a 120°C y durante 30 minutos

- b) Se dejó enfriar el agar EMB a 45-50°C, mientras que el agar sangre a 37°C.
- c) Se vierte asépticamente suficiente cantidad de medio de cultivo en una placa de Petri, hasta lograr una capa de 4 mm de espesor aproximadamente.
- d) Para una placa de 10 cm. de diámetro se requieren 30 ml de medio y para una de 15 cm. se requieren 70 ml.
- e) Se dejó solidificar el medio de cultivo y luego se dejó que se sequen las placas durante 30 minutos antes de usarlas para la inoculación.
- f) Se Inocularon la placa con 1 ml de la suspensión de cada cepa bacteriana
- g) Se llevó a incubación durante 18 a 24 horas.
- h) Se colocó la tapa a cada una de las cajas Petri, se dejó secar el inóculo por 3 a 5 minutos.
- i) Se ubicaron los discos con las diferentes concentraciones de apitoxina sobre el agar totalmente condensado y frío, mediante el uso de una pinza.
- j) Se oprimieron suavemente los discos con una pinza para asegurar un buen contacto con el medio de cultivo. Los discos espaciados de manera que su distancia a la pared de la placa fue de 15 mm, en cambio entre ellos a 30 mm.
- k) Se puso a incubar a 35 – 37°C hasta el siguiente día, (aproximadamente 18-19 horas).
- l) Es necesario aclarar que en caso de requerirse los resultados con rapidez se pueden leer las zonas de inhibición después de 6-8 horas de incubación, sin embargo para este estudio, los resultados fueron leídos y confirmados a las 24 y 48 horas después de la incubación.
- m) Se tomó como referencia para la medida del diámetro de la zona de inhibición desde el exterior de la placa, sin quitar la tapa, procedimiento que se lo realizó con el uso de un pie de rey.
- n) Los resultados fueron analizados de acuerdo con el halo o anillo ihibitorio que presentó cada uno de los discos utilizados, determinándose que en ausencia de halo inhibitorio hay crecimiento bacteriano, calificándose al microorganismo como resistente a la apitoxina o la neomicina utilizada como contraste.
- o) El disco que presentó el halo o anillo con mayor diámetro fue considerado el más

efectivo, en relación a la concentración de apitoxina; es decir el microorganismo analizado es sensible a la CMI de la sustancia en estudio.

5.10 Pruebas de campo

Una vez establecida la CMI lograda en la fase uno (laboratorio), se pasó a la fase dos o de campo que consistió en administrar dosis parenterales de soluciones de apitoxina, correspondientes a la CMI, por vía parenteral (intramamaria), con jeringas y agujas hipodérmicas desechables, a razón de 1 ml/pezón/vaca/2 veces al día (después de cada ordeño)/ tres días consecutivos.

A las vacas en tratamiento se les tomaron muestras de leche a las 24 y a las 48 horas post-tratamiento con la finalidad de comprobar en cultivos microbiológicos, de conformidad con el protocolo ya referido antes y aplicable para este fin; se realizaron lecturas de UFC y el número de células somáticas (CCS).

5.10.1. Prueba de California Mastitis Test (CMT)

Se tomaron muestras de leche, una por pezón, de cada una de las vacas clínicamente enfermas, con el empleo de una raqueta de CMT aséptica y el reactivo alquil aril sulfonato. El dispositivo tiene cuatro pequeños compartimentos marcados como A, B, C, y D para identificar los cuartos de los que proviene cada muestra de leche y proceder a la lectura correspondiente.

- a) Se realizó el despunte
- b) Se ordeñó uno o dos chorros de leche de cada cuarto en cada una de las placas de la paleta.
- c) Se inclinó la paleta de modo que se desecha la mayor parte de leche.
- d) Se añadió a la leche un volumen igual de reactivo.
- e) Se mezcló el reactivo y se examinó la presencia de una reacción de gelificación.

f) Antes de continuar con la vaca siguiente se lavó y enjugó la raqueta.

5.10.2 Lectura de la prueba del California Mastitis Test (CMT)

Tanto para las lecturas de CMT como de CCS, se procedió de la siguiente manera:

- a) Ya en la raqueta con muestras de Leche y alquil aril sulfonato, después de los movimientos rotativos para mezcla y acción del reactivo, se tomaron en cuenta los siguientes parámetros cuali-cuantitativos siguientes:
- b) Muestras sin leche gelificada (con grumos), se calificó como leche normal, con un CCS de cero a docientas mil CS.
- c) Muestras con trazas de gelificación, leche sospechosa de mastitis y con un margen de CCS entre docientas y cuatrocientas mil CS.
- d) Muestras con gelificación grado 1, se calificó como leche mastítica subclínica y con un margen de CCS entre cuatrocientas mil a un millón docientas mil CS.
- e) Muestras con gelificación grado 2, se calificó como leche mastítica clínica y con un margen de CCS entre un millón docientas mil a cinco millones de CS.
- f) Muestras con gelificación grado 3, se calificó como leche mastítica clínica aguda y con un CCS mayor a cinco millones de CS.

5.10.3 Determinación de Unidades Formadoras de Colonia (UFC)

Una de las estrategias utilizadas por el ganadero y los profesionales afines a esta línea de producción lechera bovina es el conteo de Unidades Formadoras de Colonias en muestras de leche procedentes de vacas clínicamente mastíticas, las mismas que fueron sometidas a tres días consecutivos de tratamiento con la CMI encontrada en laboratorio de la PUCESI; a las 24 y 48 horas posteriores al último tratamiento, tanto de apitoxina como de neomicina.

Las muestras de cada uno de los cuartos de las ubres de las vacas seleccionadas, mediante el auxilio de una cadena de frío (termo de refrigeración) se llevaron a los

laboratorios de la ECAA para los respectivos cultivos y lecturas de UFC a través del microscopio cuenta colonias aplicando la fórmula para determinar la cantidad de UFC/ml.

En recuento de las UFC (Unidades Formadoras de Colonias) se tomó (1ml) de la muestra la misma que fue preparada con un factor de dilución (FDD) de 10^4 UFC/ml para sembrarla en el medio de cultivo de agar sangre y agar EMB o también conocido como agar eosina (Acumedia®).

$$UFC = \frac{\# Colonias * FDD}{Volumen inicial sembrado}$$

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Fase de laboratorio

6.1.1 Identificación molecular

Todo el proceso destinado a la identificación molecular de las tres especies bacterianas objeto de estudio, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*, fue realizado en el Laboratorio de Fitopatología y Control Biológico de la Pontificia Universidad Católica Matriz, razón por la cual a continuación los resultados correspondientes.

6.1.1.1 Verificación de concentración de ADN

Tabla 7

Verificación de las respectivas concentraciones de ADN

BACTERIAS	ESCALA DE PUREZA 260/280	ESCALA DE PUREZA 260/230	CONCENTRACIÓN (ng/ µl)
<i>Staphylococcus</i> sp.	2,00	1,2	91,5
<i>Streptococcus</i> sp.	2,05	2,09	64,6
<i>E. coli</i>	1,94	1,53	297,3

Nota: Laboratorios de Fisiopatología y Control Biológico PUCE (Yáñez, J. 2019)

La Tabla 7 demuestra, tanto la lectura de concentración de ADN (ng/ µl), presente en las muestras tratadas con el centrifuga Nanodrop, así como los resultados que fueron considerados en un nivel óptimo y suficientes para el desarrollo de pruebas posteriores.

6.1.1.2 Electroforesis

Se realizó la corrida en gel del ADN de las muestras por duplicado con agarosa al 1%. El resultado del revelado del gel, se reporta a continuación.

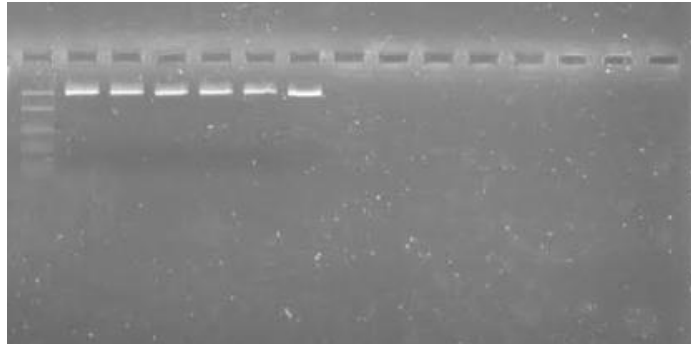


Figura 1. Resultados de la electroforesis de los ADNs bacterianos mediante el uso de agarosa al 1% y revelado del gel.

Fuente: (Yáñez, J. 2019)

En la Figura 1, se aprecia en la primera banda la escalera o ladder utilizado de 1kb aproximadamente, en la segunda y tercera banda se observan los ampliaciones perteneciente a la bacteria *Escherichia coli*, en la cuarta y quinta banda se observan los amplicones pertenecientes a la bacteria *Streptococcus agalactiae* y en las dos últimas bandas se observa los ampliaciones pertenecientes a la bacteria *Staphylococcus aureus*.

6.1.1.3 Secuenciación

Las secuencias se obtuvieron a través de la empresa Sur-coreana Macrogen, posteriormente fueron editadas y alineadas mediante la utilización de la herramienta informática MEGA y sometidas al BLAST (NCBI) para confirmar la identidad bacteriana a nivel de especie de cada cepa. Obteniendo los siguientes resultados:

6.1.1.3.1 *Staphylococcus aureus*:

Con un 96% de porcentaje de identidad se determinó que se trata de la cepa *Staphylococcus aureus* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence: ATCC 25923.

6.1.1.3.2 *Streptococcus agalactiae*

Con un 99% de identidad se puede determinar que la cepa aislada se trata de una especie cultivable de *Streptococcus agalactiae* 16S ribosomal RNA gen, partial sequence: GIGU43060.

6.1.1.3.3 *Escherichia coli*

Con un 99% de porcentaje de identidad se puede determinar que se trata de la cepa *Escherichia coli* RREC III 16S ribosomal RNA gene, partial sequence: AFS27825

6.1.2 Lectura de halos de inhibición de las tres bacterias de estudio

Las diferentes lecturas obtenidas en los Laboratorios de Microbiología y Biotecnología de la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales perteneciente a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra, cuyos resultados correspondientes a los halos y que fueron leídos, tanto a las 24 como a las 48 horas de realizados los cultivos bacterianos de los microorganismos objeto de estudio, son presentados en su orden como sigue:

6.1.2.1 Lecturas de resultados obtenidos a las 24 horas de realizados los cultivos bacterianos

Realizada la prueba de Shapiro Wilk para Normalidad a las 24 horas se determinó p-value > 0,05, esto es 0,1189, por lo que los datos se distribuyen de forma normal.

Tabla 8

Análisis de varianza para la variable diámetro de halos de inhibición a las 24 horas de realizado el cultivo bacteriano

F.V.	GL	SC	CM	F0	P-VALOR	SIGNIFICANCIA
TRATAMIENTOS	26	20,99	2,38	22,29	0,0001	**
FACTOR A (dosis apitoxina)	6	2010,8	2010,8	21386,6	0,0454	*
FACTOR B (bacterias)	2	3070,1	3070,1	21169,9	0,0450	*
T1 VS T2	1	0,07	0,07	0,45	0,0544	ns
T1, T2 VS RESTO	2	16,52	18	18	0,0810	*
ERROR	44	1,96	0,11			
TOTAL	68	20,99				
CV: 3,80 %						
$\bar{X}$ = 8,55 mm						

Fuente: El autor, 2019

Nota: FV= Fuentes de Variación, GL= Grados de Libertad, SC= Suma de Cuadrados, CM= Cuadrados Medios, CV= Coeficiente de variación, $\bar{X}$ = media de los halos

En la Tabla 8, se aprecia el análisis de varianza correspondiente al diámetro de halo inhibitorios a las 24 horas de iniciado el cultivo bacteriológico, mediante la metodología de discos difusión con el inhibidor apitoxina, demostrándose que hay diferencias altamente significativas entre tratamientos, ($p < 0,05$), mientras que tanto el factor A (dosis apitoxina), factor B (bacteria) como interacción T1,T2 vs resto son significativos; en cambio para la interacción T1vsT2 no son significativos; además, se tiene un CV de 3,80 % lo que indica que los datos obtenidos en el experimento, se considera que no presenta mucha variabilidad.

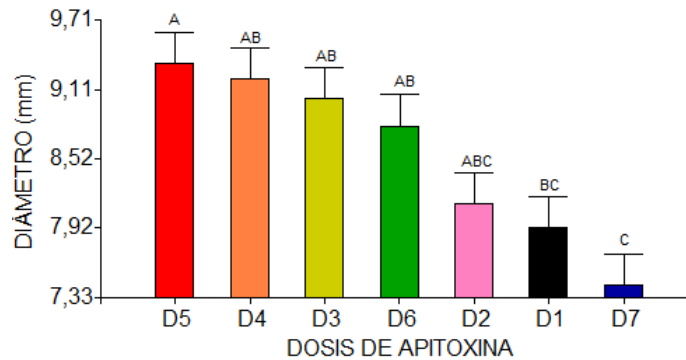


Figura 2. Prueba de significancia Tukey 5% entre el diámetro del halo de inhibición y el factor A (dosis apitoxina) a las 24 horas de realizado el cultivo bacteriano

Fuente: El Autor

Nota: D1=Dosis 0,5 mg de apitoxina/l⁻¹ agua; D2=Dosis 0,6 mg de apitoxina/l⁻¹ agua; D3= 0,7 mg de apitoxina.l⁻¹ agua; D4= 0,8 mg de apitoxina.l⁻¹ agua; D5= 0,9 mg de apitoxina.l⁻¹ agua; D6= 1,00 mg de apitoxina.l⁻¹ agua y D7= 1,1 mg de apitoxina.l⁻¹ agua.

En la Figura 2, con respecto a la prueba Tukey al 5% entre el diámetro del halo de inhibición y el factor A (dosis apitoxina), se pueden observar cinco rangos, de los cuales el primer rango A (D5= 0,9 mg.l⁻¹) es el mayor diámetro de halo inhibitorio, mientras que el último rango C (D7= 1,1mg.l⁻¹), corresponde al menor diámetro del halo encontrado.

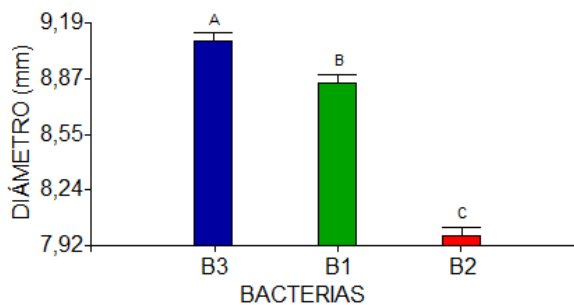


Figura 3. Prueba de significancia Tukey 5% entre el diámetro del halo de inhibición y el factor B (bacterias) a las 24 horas de realizado el cultivo bacteriano

Fuente: El Autor

Nota: B1= *Staphylococcus aureus*, B2= *Streptococcus agalactiae*, B3= *Escherichia coli*

En la Figura 3, con respecto a la prueba Tukey al 5% entre el diámetro del halo de inhibición y el factor B (bacterias), se pueden observar tres rangos, de los cuales el primer rango A (B3= *Escherichia coli*) es el mayor diámetro de halo inhibitorio, mientras que el último rango C (B2= *Streptococcus agalactiae*), corresponde al menor diámetro del halo producido.

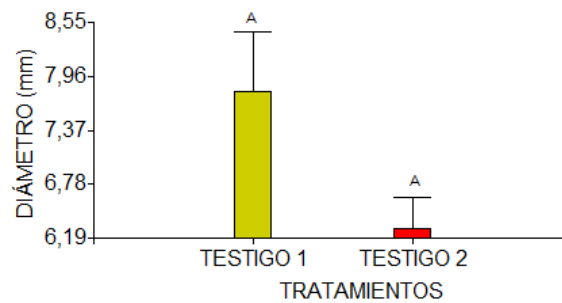


Figura 4. Prueba de significancia Tukey 5% entre el diámetro del halo de inhibición y la interacción de T1 VS T2 a las 24 horas de realizado el cultivo bacteriano

Fuente: El Autor.

En la Figura 4, con respecto a la prueba Tukey al 5% entre el diámetro del halo de inhibición y la interacción de T1 vs T2, se puede observar un rango A (TESTIGO 1= 0,8 mg.l⁻¹) y (TESTIGO 2= 0 mg.l⁻¹), los que no presentan diferencias significativas entre sí.

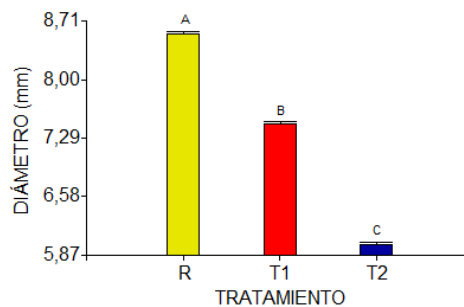


Figura 5. Prueba de significancia Tukey 5% entre el diámetro del halo de inhibición y la interacción de T1, T2 vs RESTO a las 24 horas de realizado el cultivo bacteriano

Fuente: El Autor

Nota: T1= testigo neomicina, T2 Testigo absoluto, R= Resto de tratamiento

En la Figura 5, con respecto a la prueba Tukey al 5% y la interacción de T1, T2 VS RESTO se pueden observar tres rangos, de los cuales el primer rango A ($R = 0,9 \text{ mg.l}^{-1}$) es el mayor diámetro de halo inhibitorio, mientras el rango C ($T_2 = 0 \text{ mg.l}^{-1}$), corresponden al menor diámetro del halo encontrado.

6.1.2.2 Lecturas de resultados obtenidos a las 48 horas de realizados los cultivos bacterianos

Realizada la prueba de Shapiro Wilk para Normalidad se determinó $p\text{-value} > 0,05$ (alfa), esto es 0,0726, por lo que se puede afirmar de manera categórica que los datos siguen una distribución normal.

Tabla 9

Análisis de varianza para la variable diámetro de halos de inhibición a las 48 horas de realizado el cultivo bacteriano

F.V.	GL	SC	CM	F0	P-VALOR	SIGNIFICANCIA
TRATAMIENTOS	22	20,99	26	8,25	0,0001	**
FACTOR A (dosis apitoxina)	6	2002,1	2002,1	43440,35	0,0022	*
FACTOR B (bacterias)	2	3114,5	3114,5	67574,47	0,0030	*
T1 VS T2	1	6,07	7,07	1,60	0,0040	*
T1, T2 VS RESTO	2	23,76	23,76	515,55	0,0200	*
ERROR	44	0,68	0,05			
TOTAL	68	26,35				
			CV:	2,45 %		
			$\bar{X}$ =	8,55 mm		

Fuente: El autor, 2019

Nota: FV= Fuentes de Variación, GL= Grados de Libertad, SC= Suma de Cuadrados, CM= Cuadrados Medios, CV= Coeficiente de variación, $\bar{X}$ = media de los halos

En la Tabla 9, se aprecia el análisis de varianza correspondiente al diámetro de los halos inhibitorios a las 48 horas de iniciado el cultivo bacteriano, mediante la

metodología de discos difusión con el inhibidor apitoxina, demostrándose que hay diferencias altamente significativas entre tratamientos, ($p < 0,05$), mientras que el factor A (dosis apitoxina), factor B (bacteria) como interacción de T1vsT2, e interacción de T1,T2 vs resto son significativos, con un CV de 2,45 % lo que indica que los datos obtenidos del experimento se considera que no presenta mucha variabilidad.

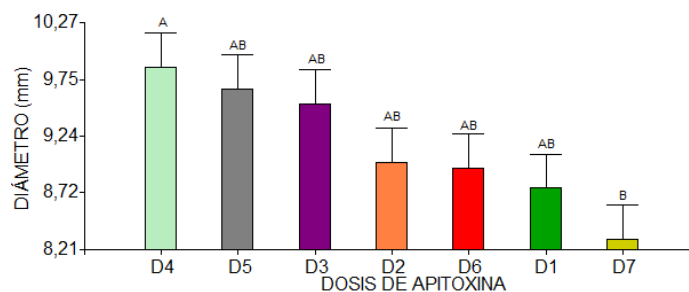


Figura 6. Prueba de significancia Tukey 5% entre el diámetro del halo de inhibición y el factor A (dosis apitoxina) a las 48 horas de realizado el cultivo bacteriano de realizado el cultivo bacteriano.
Fuente: El Autor

Nota: D1=Dosis 0,5 mg de apitoxina.l⁻¹ agua; D2=Dosis 0,6 mg de apitoxina.l⁻¹ agua; D3= 0,7 mg de apitoxina.l⁻¹ agua; D4= 0,8 mg de apitoxina.l⁻¹ agua; D5= 0,9 mg de apitoxina.l⁻¹ agua; D6= 1,00 mg de apitoxina.l⁻¹ agua y D7= 1,1 mg de apitoxina.l⁻¹ agua.

En la Figura 6, con respecto a la prueba Tukey al 5% entre el diámetro del halo de inhibición y el factor A (dosis apitoxina), es el mayor diámetro de halo inhibitorio, se pueden observar tres rangos, de los cuales el primer rango A (D4= 0,8 mg.l⁻¹), mientras que el último rango B (D7= 1,1 mg.l⁻¹), corresponde al menor diámetro del halo producido.

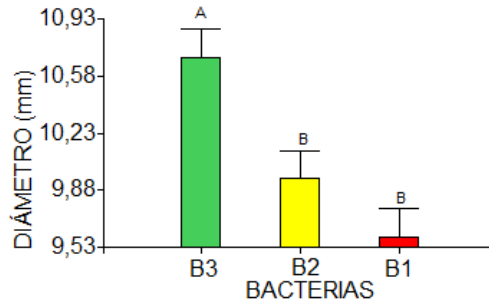


Figura 7. Prueba de significancia Tukey 5% entre el diámetro del halo de inhibición y el factor B (bacterias) a las 48 hora de realizado el cultivo bacteriano.

Fuente: El Autor

Nota: B1= *Staphylococcus aureus*, B2= *Streptococcus agalactiae*, B3= *Escherichia coli*

En la Figura 7, con respecto a la prueba Tukey al 5% entre el diámetro del halo de inhibición y el factor B (bacterias), se pueden observar dos rangos, de los cuales el primer rango A (B3= *Escherichia coli*), mientras que el último rango B (B1= *Staphylococcus aureus*), corresponde al menor diámetro del halo producido.

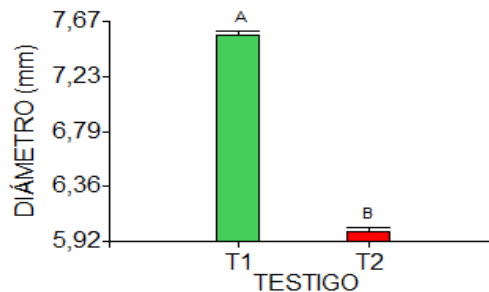


Figura 8. Prueba de significancia Tukey 5% entre el diámetro del halo de inhibición y la interacción de T1 vs T2 a las 48 horas de realizado el cultivo bacteriano.

Fuente: El Autor

Nota: T1= Testigo neomicina, T2= Testigo absoluto

En la Figura 8, con respecto a la prueba Tukey al 5% entre el diámetro del halo de inhibición y la interacción de T1 vs T2, se pueden observar dos rangos, de los cuales el primer rango A (T1 = 0,8 mg.l⁻¹), mientras que el último rango B (T2= 0 mg.l⁻¹), corresponde al menor diámetro del halo producido.

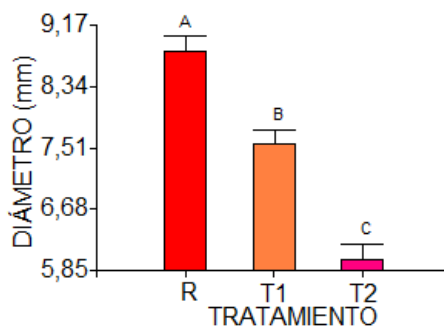


Figura 9. Prueba de significancia Tukey 5% entre el diámetro del halo de inhibición y la interacción de T1, T2 vs RESTO a las 48 horas de realizado el cultivo bacteriano
Fuente: El Autor

Nota: T1= testigo neomicina, T2 Testigo absoluto, R= Resto de tratamientos

En la Figura 9, con respecto a la prueba Tukey al 5% entre el diámetro del halo de inhibición y la interacción de T1, T2 VS RESTO se pueden observar tres rangos, de los cuales el primer rango A ($R = 0,8 \text{ mg.l}^{-1}$), mientras que el último rango C ($T2 = 0 \text{ mg.l}^{-1}$), corresponde al menor diámetro del halo producido como resultante al resto.

6.1.2.3 Discusión referente a la variable halos de inhibición bacteriana

Los halos de inhibición logrados en este ensayo, en lecturas realizadas a las 24 y 48 horas de iniciados los cultivos bacterianos, dieron una media de 9,4 mm de diámetro del halo de inhibición, valor superior en 1,46 milímetros a los diámetros encontrados por Arciniegas, *et al.* (2017), cuyos valores fueron de 7,94 mm por halo de inhibición, en cambio Zolfagharian, *et al.* (2016), encontraron lecturas de halos inhibitorios para *Staphylococcus aureus*, con concentraciones de $45 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$ de apitoxina, un diámetro de 15,30 mm. Por otra parte Arteaga, (2017), logró resultados de inhibición para esta misma bacteria y con $0,8 \text{ mg.l}^{-1}$ de apitoxina, con una lectura de 11,2 mm.

Por los resultados presentados de conformidad con la variable halos de inhibición, se encuentra que el ensayo realizado como objeto de esta investigación, se encuentra dentro de parámetros aceptables y de conformidad con la más variada literatura referente a el uso del veneno de abejas (*Apis mellifera*), corroborándose una acción antimicrobiana para *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*.

En consecuencia, apitoxina o veneno de abejas tiene un efecto antibacteriano en las tres cepas de bacterias objeto de este estudio, incluso es más efectivo que el testigo positivo Neomicina®, producto que fue utilizado a una concentración de 0,8 mg.l⁻¹, para un halo inhibitorio de 7,5 mm. El efecto antibacteriano de la BV, tal como afirma Cheon Pak, S. (2017), puede atribuírsele a la presencia de péptidos, enzimas, aminos biológicamente activos y componente no peptídicos, afirmaciones sustentadas también por Lariviere, et al. (2016), de manera que estos compuestos pueden interactuar con moléculas específicas de las bacterias tratadas.

De igual manera Nuñez, et al. (2012) y Permual, et al. (2017) han informado que uno de los componentes de la apitoxina como es la fosfolipasa A2 (PLA2) tiene un efecto antibacteriano, sin embargo la melitina, el ingrediente de más presencia en la apitoxina, en sinergismo con los otros ingredientes de apitoxina, contribuye al desarrollo de esta acción contra las bacterias como microorganismos patógenos.

Es necesario recalcar los trabajos de Monk, et al. (2016) quienes concuerdan en general con los resultados en este estudio y con lo aseverado por Kondo, et al. (2012), quienes confirman que las bacterias *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* son sensibles al veneno de abejas, en especial atribuida esta cualidad a la melitina, principal componente de esta secreción glandular de insectos como las abejas *Apis mellifera*; además, consideran que los microorganismos Gram negativos son más sensibles que los Gram positivos.

Es oportuno hacer referencia a las afirmaciones realizadas por Hegazi, *et al.* (2017) y Rybak, *et al.* (2015), la apitoxina es activa frente a bacterias específicas, gracias a que son éstas las que han conformado los objetos de estudios realizados hasta el momento, lo que significa que mientras más se adelanten nuevas investigaciones, la nomenclatura bacteriana aumentará a favor del veneno de abejas, verificados mediante antibiogramas.

6.1.3 Unidades Formadoras de Colonias (UFC)

Realizada la prueba de Shapiro Wilk para Normalidad a las 24 horas después del cultivo UFC, se determinó p-value > 0,05 (alfa), esto es 0,0950, por lo que se puede afirmar de manera categórica que los datos siguen una distribución normal.

Tabla 10

Análisis de varianza para la variable Unidades Formadoras de Colonias a las 24 horas de iniciado el cultivo bacteriano

F.V.	SC	GL	CM	F	P-VALOR	SIGNIFICANCIA
TRATAMIENTO	1,28x10 ¹¹	5	2,56X10 ¹¹	17,85	0,0001	**
ERROR	1,28X10 ¹¹	18	1,43X10 ¹¹			
TOTAL	1,54X10 ¹²	23				
CV= 4,79%						
$\bar{X}$ =2,1X10 ⁶						

Fuente: El autor, 2019

Nota: FV= Fuentes de Variación, SC= Suma de Cuadrados, GL= Grados de Libertad, CM= Cuadrados Medios, CV= Coeficiente de variación, $\bar{X}$ = Media de UFC

En la Tabla 10, se hace referencia al análisis de varianza correspondiente a Unidades Formadoras Colonias a las 24 horas de realizado el cultivo microbiano, se aprecian diferencias altamente significativas (p<0,05), con un CV de 4,79%, lo que indica que los datos obtenidos del experimento se considera que no presenta mucha variabilidad.

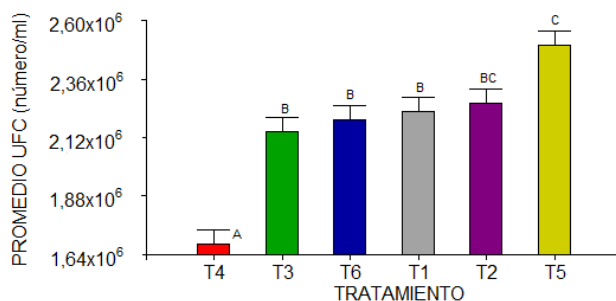


Figura 10. Prueba de significancia Tukey 5% entre el promedio Unidades Formadoras de Colonias y los tratamientos a las 24 horas de realizado el cultivo bacteriano.

Fuente: El Autor

Nota: T1= Unidad 1 (vaca1) + bacteria 1 (*Staphylococcus aureus*); T2= vaca 2 + bacteria 1 (*Staphylococcus aureus*); T3= vaca 3 + bacteria 2 (*Streptococcus agalactiae*); T4= vaca 4 + bacteria 2 (*Streptococcus agalactiae*); T5= vaca 5 + bacteria 3 (*Escherichia coli*) y T6= vaca 6 + bacteria 3 (*Escherichia coli*)

En la Figura 10, después de desarrollada la prueba Tukey al 5%, entre el promedio Unidades Formadoras de Colonias y los tratamientos a las 24 horas se puede evidenciar la conformación de cuatro rangos: A, B, BC y C, demostrándose que el mejor tratamiento es T4 y corresponde al rango A con una media de Unidades Formadoras de Colonias de $1,12 \times 10^6$.

Realizada la prueba de Shapiro Wilk para Normalidad a las 48 horas con Unidades Formadoras de Colonias se determinó p-value > 0,05 (alfa), esto es 0,2210, por lo que se puede afirmar de manera categórica que los datos siguen una distribución normal.

Tabla 11

Análisis de varianza para la variable Unidades Formadoras de Colonias a las 48 horas de iniciado el cultivo bacteriano

F.V.	SC	GL	CM	F	P-VALOR	SIGNIFICANCIA
TRATAMIENTO	4×10^{11}	5	$8,0 \times 10^{10}$	16,38	0,0001	**
ERROR	$8,8 \times 10^{10}$	18	$4,8 \times 10^9$			
TOTAL	$4,8 \times 10^{12}$	23				
CV= 3,93%						
$\bar{X} = 1,7 \times 10^6$						

Fuente: El autor, 2018

Nota: FV= Fuentes de Variación, SC= Suma de Cuadrados, GL= Grados de Libertad, CM= Cuadrados Medios, CV= Coeficiente de variación, $\bar{X}$ = Media de UFC.

En la Tabla 11, se hace referencia al análisis de varianza correspondiente a Unidades Formadoras Colonias a las 48 horas de realizado el cultivo microbiano, se aprecian diferencias altamente significativas ($p < 0,05$), con un CV de 3,93% lo que indica que los datos obtenidos del experimento se considera que no presenta mucha variabilidad.

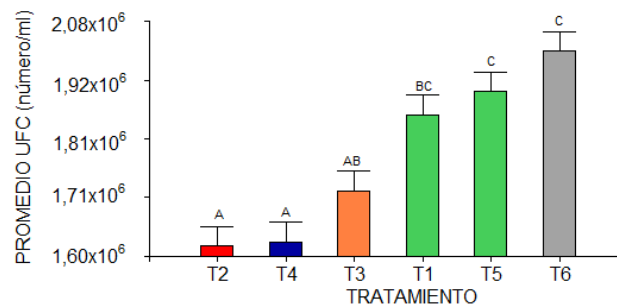


Figura 11. Prueba de significancia Tukey 5% entre el promedio Unidades Formadoras de Colonias y los tratamientos a las 48 horas de realizado el cultivo bacteriano.

Fuente: El Autor

Nota: T1= Unidad 1 (vaca 1) + bacteria 1 (*Staphylococcus aureus*); T2= Vaca 2 + bacteria 1 (*Staphylococcus aureus*); T3= Vaca 3 + bacteria 2 (*Streptococcus agalactae*); T4= Vaca 4 + bacteria 2 (*Streptococcus agalactae*); T5= V5 + bacteria 3 (*Escherichia coli*) y T6= vaca 6 + bacteria 3 (*Escherichia coli*).

En la Figura 11, como después de desarrollada la prueba Tukey al 5%, entre el promedio Unidades Formadoras de Colonias y los tratamientos a las 48 horas, se puede evidenciar la conformación de cuatro rangos: A, AB, BC y C, demostrándose que el mejor tratamiento es T2 y corresponde al rango A con una media para Unidades Formadoras de Colonias igual a $1,61 \times 10^6$.

6.1.3.1 Discusión para Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

De los datos anteriores se puede dilucidar que las Unidades Formadoras de Colonias corresponden a la capacidad que tiene cada cepa bacteriana para reproducirse y crecer en un medio de cultivo específico, de manera que se deben cuantificar las lecturas correspondientes a el número de células bacterianas por milímetros de cultivo, tal como conforman (Philpot y Nickerson, 2000).

Las Unidades Formadoras de Colonias en los tratamientos T1 y T2 para *Staphylococcus aureus*, T3 y T4 *Streptococcus agalactiae*, mientras que T5 y T6 *Escherichia coli*, mediante usos de concentraciones de apitoxina diluidas en agua grado uno, tuvieron un comportamiento significativo, de tal manera que para T1 y T2 el número de UFC fue de $2,6 \times 10^6$, para T5 y T6 fue de $2,3 \times 10^6$, mientras que para T3 y T4 fue de $2,1 \times 10^6$, determinándose una mejor acción bactericida de la apitoxina para *Escherichia coli*, seguido de *Streptococcus agalactiae* (Wattiaux, 2015).(Pereyra, et al. 2014).

Es el número de Unidades Formadoras de Colonias, tal como afirman Pereyra, et al. (2014). Referentes a organismos aeróbicos en condiciones de temperatura de 30°C y en tiempo de 72 horas de incubación, proceso que se ha convertido en una prueba que brinda información sobre el número total de bacterias aeróbicas presentes en leche recolectarla para este propósito, sin embargo no es concluyente sobre el

origen de las mismas, de manera que los resultados logrados en este ensayo corroboran ampliamente lo manifestado por estos investigadores.

6.1.4 Conteo de Células Somáticas (CCS)

Realizada la prueba de Shapiro Wilk para Normalidad a las 24 horas con (CCS) se determinó $p\text{-value} > 0,05$ (alfa), esto es 0,2210, por lo que se puede afirmar de manera categórica que los datos siguen una distribución normal.

Tabla 12

Análisis de varianza para la variable Conteo de Células Somáticas a las 24 horas de iniciado el cultivo bacteriano

F.V.	SC	GL	CM	F	P-VALOR	SIGNIFICANCIA
TRATAMIENTO	$2,19 \times 10^{12}$	5	$4,38 \times 10^{11}$	36,02	0,0001	**
ERROR	$2,19 \times 10^{11}$	18	$1,21 \times 10^{10}$			
TOTAL	$2,41 \times 10^{13}$	23				
CV= 4,98%						
$\bar{X} = 2,2 \times 10^6$						

Fuente: El autor, 2019

Nota: FV= Fuentes de Variación, SC= Suma de Cuadrados, GL= Grados de Libertad, CM= Cuadrados Medios, $\bar{X}$ = Media de CCS.

En la Tabla 12, se hace referencia al análisis de varianza para la variable Conteo de Células Somáticas a las 24 horas de realizado el cultivo microbiano, se aprecian diferencias altamente significativas ($p < 0,05$), con un CV de 4,98%, lo que indica que los datos obtenidos del experimento se considera que no presenta mucha variabilidad.

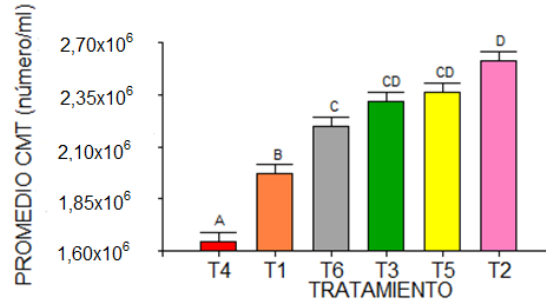


Figura 12. Prueba de significancia Tukey 5% entre el promedio Conteo de Células Somáticas y los tratamientos a las 24 horas de realizado el cultivo bacteriano.

Fuente: El Autor

Nota: T1= Unidad 1 (vaca 1), T2= vaca 2; T3= vaca 3; T4= vaca 4; T5= vaca 5 y T6= vaca 6.

En la Figura 12, como después de desarrollada la prueba Tukey al 5%, entre el promedio Conteo Células Somáticas y los tratamientos a las 24 horas se puede evidenciar la conformación de cinco rangos: A, B, C, CD y D, demostrándose que el mejor tratamiento es T4 y corresponde al rango A con una media para Conteo Células Somáticas igual a $1,65 \times 10^6$.

Realizada la prueba de Shapiro Wilk para Normalidad a las 48 horas con Conteo de Células Somáticas se determinó p-value > 0,05 (alfa), esto es 0,1360, por lo que se puede afirmar de manera categórica que los datos siguen una distribución normal.

Tabla 13

Análisis de varianza para la variable número de Células Somáticas a las 48 horas de iniciado el cultivo bacteriano

F.V.	SC	GL	CM	F	P-VALOR	SIGNIFICANCIA
TRATAMIENTO	$1,60 \times 10^{12}$	5	$3,20 \times 10^{11}$	53,66	0,0001	**
ERROR	$1,07 \times 10^{11}$	18	$5,97 \times 10^{10}$			
TOTAL	$1,71 \times 10^{12}$	23				
CV= 4,10%						
$\bar{X} = 1,6 \times 10^6$						

Fuente: El autor, 2019

Nota: FV= Fuentes de Variación, SC= Suma de Cuadrados, GL= Grados de Libertad, CM= Cuadrados Medios, CV= Coeficiente de variación, $\bar{X}$ = Media de CCS.

.En la Tabla 13, se hace referencia al análisis de varianza para la variable Conteo de Células Somáticas a las 48 horas, apreciándose que hay diferencias significativas ($p<0,05$), con un CV de 4,10%, lo que indica que los datos obtenidos del experimento se considera que no presenta mucha variabilidad.

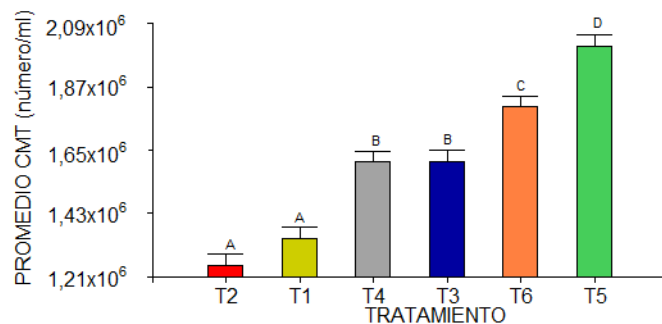


Figura 13. Prueba de Tukey 5% para la variable Conteo de Células Somáticas las 48 horas de realizado el cultivo bacteriano.

Fuente: El Autor

Nota: T1= Unidad 1 (vaca 1), T2= vaca 2; T3= vaca 3; T4= vaca 4; T5=vaca 5 y T6= vaca 6.

En la Figura 13, como después de desarrollada la prueba Tukey al 5%, para la variable Conteo Células Somáticas las 48 horas se puede evidenciar la conformación de cuatro rangos: A, B, C, y D, demostrándose que el mejor tratamiento es T2 y corresponde al rango A con una media igual a $1,25 \times 10^6$.

6.1.4.1 Discusión del Conteo de Células Somáticas (CCS)

Respecto a las células somáticas, de conformidad con los resultados obtenidos se puede afirmar que hay una clara disminución de células somáticas en el orden del 20% de las 24 a las 48 horas; en otras palabras y de manera numérica se tiene una

disminución promedio de 4×10^5 CS.l⁻¹ de leche muestreada. Estos resultados son avalados con investigaciones de Trujillo, *et al.* (2011), quienes afirman que, debido a procesos fisiológicos, el número de CS en la leche de vaca es alto inmediatamente luego del parto, desciende rápidamente durante la primera semana de lactancia, sin embargo, aumenta nuevamente hacia el final de la misma, criterio técnico que sustenta los resultados de esta investigación respecto al conteo de células somáticas.

6.2 Socialización

Se presente trabajo de investigación se llevó a cabo el 20 de diciembre del 2018 a las 09:00 en PUCE sede Ibarra permitiendo un pequeño espacio para dar a conocer la presente investigación.

Dentro del proceso de socialización se repartieron 19 encuestas a diferentes participantes al evento, lo cual busca implementar mejoras en los procesos de socialización de los trabajos de investigación con los siguientes resultados:

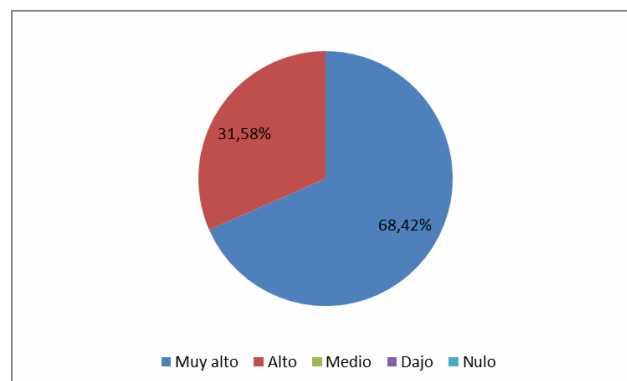


Figura 14. ¿Considera usted que la sala se desarrolló este evento brindando las comodidades necesarias?

Fuente: El Autor

En la Figura 14, se puede apreciar que el 68,42% de los participantes manifestaron un nivel muy alto de conformidad, el 31,58% se inclinó por un nivel alto de satisfacción respecto a la sala de exposición.

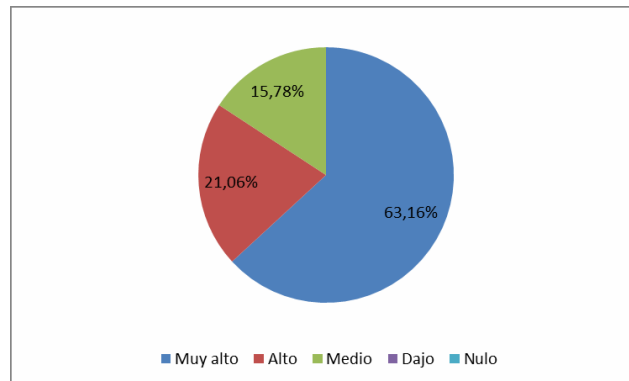


Figura 15. ¿Considera Usted que el material audiovisual utilizado en la presentación fue adecuado?
Fuente: El Autor

En la Figura 15, se puede apreciar que el 63,16% de los participantes se inclinaron por la opción de un nivel muy alto de conformidad, el 21,06% escogieron un nivel alto de satisfacción mientras que 15,78% catalogaron como un nivel medio de satisfacción, al material audiovisual utilizado en la socialización de resultados.

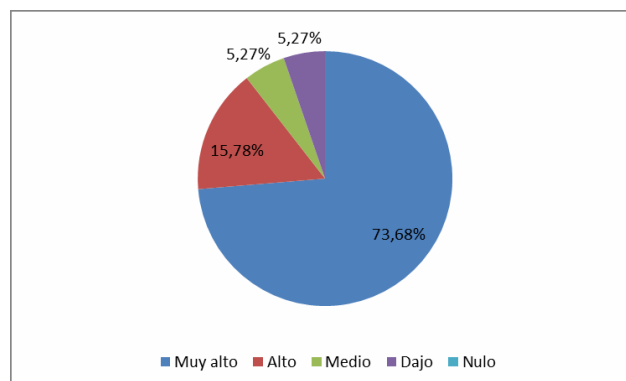


Figura 16. ¿Considera Usted que el expositor mostro dominio del tema?.
Fuente: El Autor

En la Figura 16, se puede apreciar que el 73,68% de los participantes manifestaron un nivel muy alto de conformidad, el 15,78% por un nivel alto de satisfacción mientras que 5,27% catalogaron como un nivel medio y el 5,27% decidieron calificar en un nivel bajo de satisfacción en el dominio del tema.

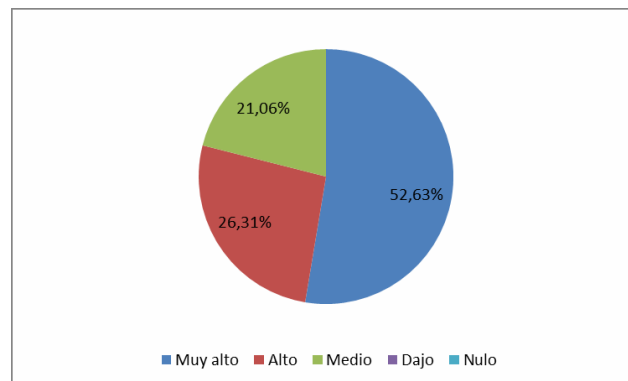


Figura 17. ¿Estima Usted que el manejo del auditorio por parte del expositor fue adecuado?
Fuente: El Autor

En la Figura 17, se puede apreciar que el 52,63% de los participantes manifestaron un nivel muy alto de conformidad, el 26,31% reflejaron un nivel alto de satisfacción mientras que 21,06% catalogaron como un nivel medio de satisfacción, al manejo del auditorio.

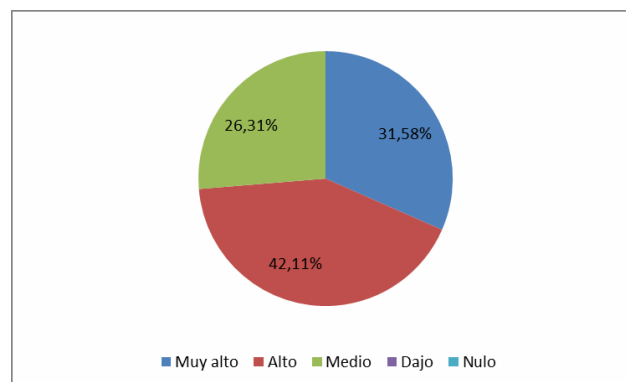


Figura 18. ¿Considera Usted que el Expositor demostró facilidad de expresión?
Fuente: El Autor

En la Figura 18, se puede apreciar que el 31,58% de los participantes manifestaron un nivel muy alto de conformidad, en cambio el 42,11% reflejaron un nivel alto de satisfacción, el 26,31% catalogaron como un nivel medio de satisfacción del expositor demostró facilidad de resultados

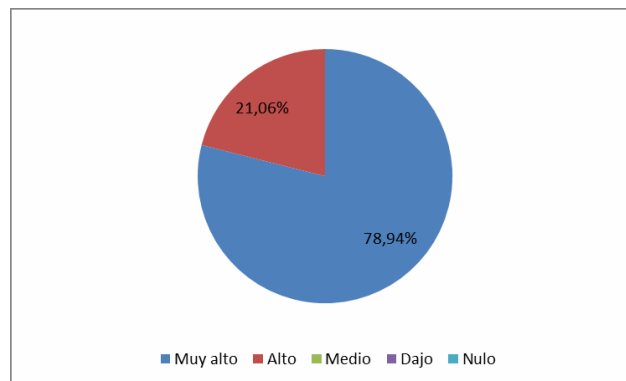


Figura 19. ¿Considera Usted que el tema investigado posee relevancia para algún actor y/o sector de la sociedad?

Fuente: El Autor

En la Figura 19, se puede apreciar que el 78,94% de los participantes manifestaron un nivel muy alto de conformidad, en cambio el 21,06% reflejaron un nivel alto de relevancia al tema de investigación.

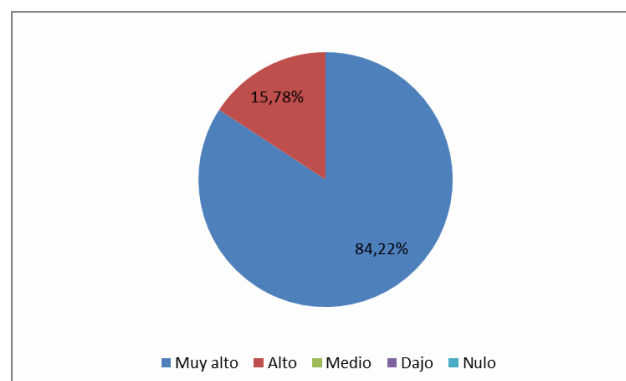


Figura 20. ¿Considera Usted que esta investigación posee perspectivas para estudios completamente posteriores?

Fuente: El Autor

En la Figura 20, se puede apreciar que los participantes respecto a la perspectiva de estudios posteriores que pueden derivarse de esta investigación, en su orden: el 84,22% de los participantes manifestaron un nivel muy alto, mientras el 15,78% reflejaron un nivel alto.

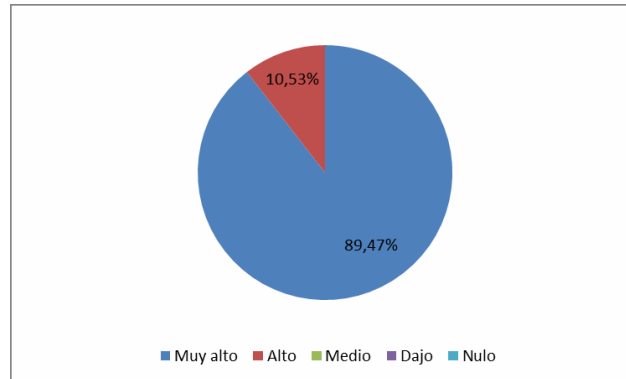


Figura 21. ¿Considera Usted que el tema investigado genera actualmente o a futuro un beneficio concreto para alguna organización, empresa pública o privada, comunidad o institución?

Fuente: El Autor

En la Figura 21, se puede apreciar que el 89,47% de los participantes manifestaron un nivel muy alto para que la generación sea crecente o futura de un beneficio comunitario de esta investigación, mientras que el 10,53% calificaron un nivel alto.

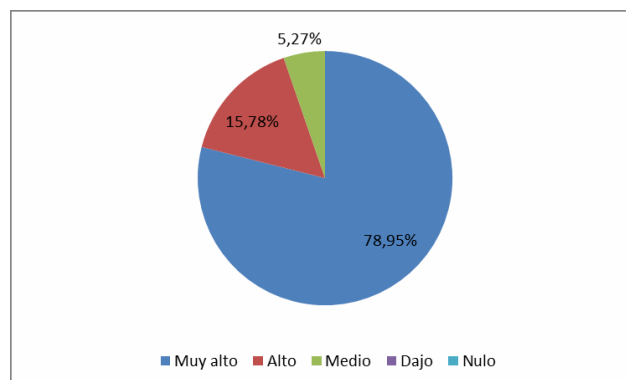


Figura 22. ¿En función de los objetivos planteados expuestos en la investigación, considera Usted que éstos se cumplieron?

Fuente: El Autor

En la Figura 22, se puede apreciar que el 78,95% de los participantes manifestaron un nivel muy alto de conformidad, mientras que el 15,78% se inclinaron por un nivel alto, no así el 5,27% catalogaron en un nivel medio de satisfacción respecto a la función de los objetivos planteados.

6.2.1 Discusión

Concluida la fase de socialización de los principales resultados obtenidos de esta investigación, a la vez concluida a la etapa de preguntas y respuestas de los instrumentos de encuestas aplicados a los diecinueve asistentes a pequeños ganaderos agricultores y estudiantes de la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales, una vez tabulados e interpretados los resultados correspondientes, se puede establecer de manera categórica que el trabajo investigativo fue de mucho interés tanto en el aspecto productivo como en curativo como mastitis bovina, razón por la cual se pudo apreciar una total satisfacción de los asistentes.

Inclusiva se llevaron a concluir recomendaciones tales como: se continúen con este proceso investigativo a mayor profundidad para que los resultados sean más concluyentes; de prioridad que el caso lo amerita a la presencia y tratamiento de las mastitis clínicas y subclínicas; finalmente, que se tome en cuenta a los pequeños y medianos ganaderos para el tratamiento de temas pertinentes al tema de producción lechera.

7. CONCLUSIONES

De conformidad con las secuenciaciones realizadas, se concluye que en un 96% de identidad para la cepa *Staphylococcus aureus* 16S ribosomal RNA gene, secuencia parcial: ATCC 25923; con un 99% y determinada como *Streptococcus agalactiae* 16S ribosomal RNA gen, GIGU43060; finalmente, con un 99% de identidad para la cepa *Escherichia coli* RREC III 16S ribosomal RNA gene, secuencia parcial: AFS27825, se trata de una caracterización inédita.

En relación con los antibiogramas realizados, las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) para cada una de las tres cepas bacterianas objeto de esta investigación son: *Staphylococcus aureus* 0,9 mg de apitoxina.l⁻¹ agua para 9,4 mm de diámetro del halo, referente a *Streptococcus agalactiae* 0,9 mg/l⁻¹ y una lectura de 9,5 mm, en cambio para *Escherichia coli* 1mg/l⁻¹ de agua, lectura de 11,5 mm, de diámetro del halo inhibitorio, estableciéndose que la apitoxina tiene un control antibacteriano sobre las tres cepas patógenas causantes de mastitis clínica en vacas lecheras, constituyéndose en una alternativa natural frente a este mal constante para las vacas lecheras, y en todos los niveles de producción.

Posterior al suministro parenteral de las concentraciones de apitoxina determinadas como CMIs en laboratorio, se concluye que si son adecuadamente administradas, se cuenta con una acción terapéutica de control que no deja acciones residuales ni colaterales en los animales tratados.

Este trabajo de investigación constituyó, a no dudarlo, un tema interesante y de actualidad para los ganaderos que asistieron al acto de difusión de los resultados obtenidos en el mismo, demostrándose de esta manera que la academia puede aportar con estrategias prácticas y viables para beneficio de la colectividad.

8. RECOMENDACIONES

Debe continuarse con esta investigación a fin de establecer los niveles de confianza respecto a la resistencia, que posiblemente pudiera desarrollar las bacterias patógenas causantes de mastitis, para respaldar de fehaciente las cualidades terapéuticas del veneno de abejas.

Se debe confirmar la eficiencia de la apitoxina sobre el control y vulneración de la célula bacteriana a través de la espectrofotometría como instrumento de confirmación del nivel de acción de dicho producto apícola.

Si bien es cierto que las concentraciones logradas como producto de esta investigación dieron resultados positivos, en el orden de *Staphylococcus aureus* (0,9 mg.l⁻¹), para *Streptococcus agalactiae* (0,9 mg.l⁻¹) y para *Escherichia coli* (1mg/l⁻¹), para llegar al uso generalizado y como dosis preestablecidas es necesario fortalecerlas con otras experiencias que confirmen su uso como como una práctica de control clínico en vacas lecheras.

Hacer un buen uso de los recursos naturales existentes en nuestro medio y disponible al momento, de forma que no se impacte negativamente sobre nuestra madre naturaleza, sustento y razón de nuestra existencia.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACUMEDIA®. (2018). Tergitol 7 agar (7187). Recuperado de http://foodsafety.neogen.com/pdf/acumedia_pi/7187_pi.pdf
- Acuña, V. y Rivadeneira, A. (2008). Aislamiento, identificación y antibiograma de patógenos presentes en leche con mastitis en ganaderías bovinas de la provincia de Pichincha. (Tesis de pregrado). Escuela Politécnica del Ejército Ecuador. Recuperado de <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/2553/1/T-ESPE-IASA%20I-003435.pdf>
- Altamirano, J. y Dávila, O. (2012). Prevalencia de mastitis subclínica en vacas lecheras de las fincas asociadas a la red fría de la Cuenta Reto del Millenium (CRM); en las comunidades La Reynaga Malpaisillo y Los Zarzales, Departamento de León. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, UNAN, León. Recuperado de <http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/bitstream/123456789/5660/1/221121.pdf>
- BD, (2014). BD MacConkey II Agar. Recuperado de <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8770>
- Blackburn, P. (2009). The variation in the cell count of cow's milk throughout lactation and from one lactation to the next. Journal of Dairy Research, Volume 33, pp. 193-198. Recuperado de <https://www.cambridge.org/core/journals/journal-of-dairy-research/article/variation-in-the-cell-count-of-cows-milk-throughout-lactation-and-from-one-lactation-to-the-next/FE0250E43A45C11DA2B61A633DBFE116>

- Bowen, C., Mardones. M. y Velasquez. L. (2014). Guía de laboratorio de microbiología. Recuperado de <ftp://ftp.puce.edu.ec/Facultades/Medicina/CEAACES/PLAN%20CURRICULAR/C3.2%20PRACTICAS%20Y%20CORRESPONDENCIA%20CURRICULAR/GU%20DE%20PRACTICA%20DE%20LAB/GU%20DE%20LABORATORIO%20DE%20MICROBIOLOG%20C3%20DA.pdf>
- Camacho, A., Giles, M., Ortegón, A., Palao, M., Serrano, B. y Velázquez, O. (2009). Cuenta en placa de bacterias. Recuperado de http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasicas-Cuenta-en-placa_6527.pdf
- Cedolla, P. (2008). Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina en la industria lechera. Revista electrónica de Veterinaria 1695-7504, Volumen IX Número 4. Recuperado de <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040408/040805.pdf>
- Cervantes, E., García, R. y Salazar, P. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. Revista Latinoamericana Patol Clin Med Lab 2014; 61 (1): 28-40. Recuperado de <http://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2014/pt141e.pdf>
- Chacón, A., Vargas. C. y Jiménez. J. (2006). Incidencia en el conteo de células somáticas de un sellador de barrera (yodo-povidona 0,26%) y un sellador convencional (yoduro 0,44%). Recuperado de <http://www.redalyc.org/html/437/43717208/>
- Cheon Pak, S. (2017). Chemical Composition of Bee Venom. Bee Products - Chemical and Biological Properties, pp 279-285. Recuperado de https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-59689-1_13

- Concha, C., Holmberg, O. y Morein, B. (2009). Proportion of B- and T-lymphocytes in normal bovine milk. *Journal of Dairy Research*, Volume 45, pp. 287-290. Recuperado de <https://www.cambridge.org/core/journals/journal-of-dairy-research/article/proportion-of-b-and-tlymphocytes-in-normal-bovine-milk/16E60F87DE81AD36171CDF3CAD4EF246>
- Cows. *Journal of Dairy Science* . Volume 91, Pages 1391-1402. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030208712669>
- Cruz. A., Estepa. C., Hernández. J. y Sanabria. J. (2018). Identificación de bacterias causantes de Mastitis bovina y su resistencia ante algunos antibacterianos . *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación*, Vol. 10 Núm. Recuperado de <https://revistas.udca.edu.co/index.php/ruadc/article/view/569>
- Desmoures, P. y Repetti, O. (2006). MASTITIS AMBIENTALES . Recuperado de http://www.produccionanimal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciones/bovinos_leche/04-mastitis_ambientales.pdf
- Duque, C., Sánchez, D., Gómez, B., Cifuentes. D., Gaviria, A. y Hernández, O. (2016). *Streptococcus agalactiae*. Alternativas Diagnosticas, Avances En Nuestro Grupo De Investigación. Recuperado de http://www.colmayor.edu.co/archivos/236_s_agalactiae_alternativas__httpvc.pdf
- Ebrahimi. A., Nikookhah. F., Nikpour. S., Majiian. F. y Gholami. G. (2008). Isolation of Streptococci from Milk Samples of Normal, Acute and Subclinical Mastitis Cows and Determination of Their Antibiotic Susceptibility Patterns. *Pakistan Journal of Biological*
- Eckersall, Young, McComb, Hogarth y Safi (2001). Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. Recuperado de <https://search.proquest.com/docview/1771815549?pq-origsite=gscholar>

- Fraile, R. y De Cueto, M. (2014). *Streptococcus agalactiae*. Recuperado de <https://seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/agalac.pdf>
- Fraile, R. y López, M. (2017). *Streptococcus agalactiae*. Recuperado de <https://seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/agalac.pdf>
- Fuentes, G., Ruiz, R., Sánchez, J., Ávila, D. y Escutia, J. (2013). Análisis microbiológico de leche de origen orgánico: atributos deseables para su transformación. Revista Agricultura, sociedad y desarrollo, vol.10 no.4. Recuperado de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S187054722013000400003
- Gasque, R. (2015). Mastitis bovina. Sitio Argentino de Producción Animal. Recuperado de http://www.produccionanimal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciones/bovinos_leche/107-Mastitis_bovina.pdf
- Gómez, O., Santivañez, C., Arauco, F., Espezua, O. y Manrique, J. (2015). Criterios de Interpretación para California Mastitis Test en el Diagnóstico de Mastitis Subclínica en Bovinos. Revista Veterinaria Perú; 26(1): 86-95. Recuperado de <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v26n1/a11v26n1.pdf>
- González, R., Cullor, J., Jasper, D., Farver, T., Bushnell, R. y Oliver, M. (2008). Prevention of clinical coliform mastitis in dairy cows by a mutant *Escherichia coli* vaccine. Canadian Journal of Veterinary Research, Volume 53(3); 255–258. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1255715/>

- Grandi, C. (2010). El rol de la infección en la epidemiología del parto prematuro. Recuperado de https://www.researchgate.net/profile/Carlos_Grandi/publication/237307232_EL_ROL_DE_LA_INFECCION_EN_LA_ETIOLOGIA_DEL_PARTO_PREMATURO_I_REVISION_DE_LA_LITERATURA/links/00b7d530c946231b64000000.pdf
- Gualdrón, A. (2012). Cáncer y terapéutica con productos de la colmena. revisión sistemática de los estudios experimentales. Revista de la Facultad de Medicina, vol.60 no.2. Recuperado de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s012000112012000200002
- Halasa, T., Nielen, M., De Roos, A., Van Hoorne, R., Jong, G., Lam, T., Werven, T. y Hogeveen, H. (2009). Production loss due to new subclinical mastitis in Dutch dairy cows estimated with a test-day model. Journal of Dairy Science. Volume 92, Pages 599-606. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030209703649>
- Hans, A. (2001). Mastitis: prevención y Control. Revista de Investigaciones Pecuarias, 12(2): 55-64. Recuperado de <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v12n2/a10v12n2.pdf>
- Harmon, R. (2013). Physiology of Mastitis and Factors Affecting Somatic Cell Counts. Journal of Dairy Science, Volume 77, Pages 2103-2112. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030294771538>
- Hegazi, A, Moharm, N, Allah, F, Nour, M, y Khair, A. (2017). Antibacterial activity of different Egyptian honeys in relation to some bee products. Recuperado de Egypt J Vet Sci.; 36:31- 42.

- Hernández, R. (2017). Aspectos toxinológicos y biomédicos del veneno de las abejas *Apis mellifera*. Revista médica Universidad de Antioquia, Vol 16, No 3. Recuperado de <https://aprendeonline.udea.edu.co/revistas/index.php/iatreia/article/view/4004>
- Hogeveer, H., Huijps, K. y Lam, T. (2011). Economic aspects of mastitis: New developments. New Zealand Veterinary Journal, Volumen 59; Páginas 16-23. Recuperado de <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00480169.2011.547165>
- Jara, J. y Maldonado, H. (2011). Análisis y aplicación de un modelo de productividad para empresas del sector extractor de leche cruda caso: agroindustrial “Las Lolas” (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Recuperado de <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/3142/TPUCE3499.pdf;sequence=1>
- Kondo, E. Kanai, K. (2012), Bactericidal activity of the membrane fraction isolated from phagocytes of mice and its stimulation by melittin. Recuperado de Japan J Med Sci & Biol:39:9-20.
- Korhonen, H., Marnil, P. y Gill, H. (2007). Milk immunoglobulins and complement factor. British Journal of Nutrition, Volume 84, pp. 75-80. Recuperado de <https://www.cambridge.org/core/journals/britishjournalofnutrition/article/milkimmunoglobulins-and-complementfactors/7AF1296D9BA1EEF840367F33DDBF3BE0>
- Lariviere, W. y Melzack, R. (2016). The bee venom test: a new tonic-pain test. Pain. 66(2-3):271–277. Recuperado de doi: 10.1016/0304-3959(96)03075-8.

- Macrogen, Inc. (2019). Technology Recuperado de <https://dna.macrogen.com/eng/member/login.jsp>
- Magandi, V. (2008). Determinación de mastitis subclínica en vacas lecheras por medio del recuento de células somáticas en el tanque. (Tesis de pregrado). Universidad de El Salvador. Recuperado de <http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/1645>
- Mcdonald, J. (2007). Economic Losses from and the National Research Program on Mastitis in the United States. Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Volume 62, Issue 1, Pages 119–127. Recuperado de [https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(79\)83213-0/abstract](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(79)83213-0/abstract)
- Meglia, G. y Mata, H. (2001). Mecanismos específicos e inespecíficos de defensa, con referencia a la glándula mamaria de los bovinos productores de leche. Recuperado de http://www.produccionanimal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciones/bovinos_leche/10-Inmunidad_en_glandula_mamaria.pdf
- Molina, J. y Campos, C. (2015). *Escherichia coli* diarrogénica. Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, UNAM. Recuperado de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/escherichia-coli.html>
- Monk, J, Beuchat, L, y Hathcox, A. (2016) Inhibitory effects of sucrose monolaurate, alone and in combination with organic acids, on *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. Recuperado de *J Appl Bacteriol*: 81(1):7-18.
- Nielsen. BH., Jacobsen. S., Andersen. PH., Niewold. TA., y Heegaard. PMH. (2004). Acute phase protein concentrations in serum and milk from healthy cows, cows with clinical mastitis and cows with extramammary inflammatory conditions. scientific magazine, p. 361 - 365. Recuperado de <https://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/364321>

- Núñez V, Arce ,V, Gutierrez, J. y Lomonte, B. (2012). Structuer and functional characterization of myotoxin I, a LYS49 Phospholipase A2 homologus from the snake. Recuperado de Bothrops atrox. Toxicon. ;44(1):91–101.
- Pedraza, C., Mansilla, A., Fajardo, P. y Agüero, H. (2000). Cambios en la producción y composición láctea por efecto del incremento de células somáticas en leche de vacas. Revista Agric. Téc. v.60 n.3. Recuperado de https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=s036528072000000300005&script=sci_arttext&tlng=pt
- Pellicer, G. (2013). Recuento de microorganismos aerobios mesófilos. (Tesis de pregrado). Universidad Politécnica de València – España. Recuperado de <https://riunet.upv.es/handle/10251/30606>
- Pereyra, E., Dallarda, B. y Calvnhoc, L. (2014). Aspectos de la respuesta inmune innata en las infecciones intramamarias causadas por *Staphylococcus aureus* en bovinos. Revista Argentina de Microbiología, 46(4):363-375. Recuperado de <http://www.scielo.org.ar/pdf/ram/v46n4/v46n4a14.pdf>
- Permual, S., Gopalakrishnakone, P., Thwin, M., Chow, T., Bow, H. y Yap E.(2017). Antibacterial activity of snake, scorpion and bee venoms: a comparison with purified venom phospholipase A2 enzymes.Recuperado de J Appl Microbiol;102(3):650–659.
- Petzl, W., Zerbe, H., Günther, J., Yang, W., Seyfert, H., Nürnberg, G. y Schuberth, J. (2008). Escherichia coli, but not *Staphylococcus aureus* triggers an early increased expression of factors contributing to the innate immune defense in the udder of the cow. Veterinary Research, Volume 39. Recuperado de <https://www.vetres.org/articles/vetres/abs/2008/02/v07188/v07188.html>

- Philpot y Nickerson (2000). Mastitis el contagio, editorial Surge International-Balson Bros.Co, Alemania. Pp15-20.
- PROBIOTEK. (2018). Agar con eosina y azul de metileno (EMB). Recuperado de <https://www.probiotek.com/productos/reactivos/medios-de-cultivo-reactivos/agar-con-eosina-y-azul-de-metileno-emb/>
- Rainard, P. y Riollot, C. (2003). Mobilization of neutrophils and defense of the bovine mammary gland. *Reproduction Nutrition Development*, Volume 43, Number 5, PP, 439-457. Recuperado de https://rnd.edpsciences.org/articles/rnd/abs/2003/05/RND52003_6/RND52003_6.html
- Ramírez, N., Gaviria, G., Arroyave, O., Sierra, B. y Benjumea, J. (2001). Prevalencia de mastitis en vacas lecheras lactantes en el municipio de San Pedro de los Milagros, Antioquia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, Vol. 14, Nº. 1, págs. 76-87. Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3243763>
- Ribeiro, M., Lara, G., Bicudo, S., Souza, A., Salerno, T., Siqueira, A., y Geraldo, J. (2007). An unusual gangrenous goat mastitis caused by *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* and *Escherichia coli* co-infection. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*. Recuperado de http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010209352007000300037&script=sci_arttext&tlng=es
- Riollot, C., Pascal, R. y Poutrel. B. (2002). Cells and Cytokines in Inflammatory Secretions of Bovine Mammary Gland. *Advances in Experimental Medicine and Biology book series (AEMB, volume 480)*, pp 247-258. Recuperado de https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F0-306-46832-8_30

- Roodt, A., Salomón, O., Orduna, T., Robles, L., Paniagua, J. y Alagón, A. (2004). Envenenamiento por picaduras de abeja. Recuperado de <http://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2005/gm053h.pdf>
- Roy, J., Tremblay, D., Côtéaux, L., Messier, S., Schol, D. y Bouchard, E. (2007). Effect of precalving intramammary treatment with pirlimycin in nulliparous Holstein heifers. Recuperado Veterinary Cananiense Magazine, 71 (4): 283–291. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1940276/>
- Ruiz, A. (2015). Mastitis bacteriana en ganado bovino: etiología y técnicas de diagnóstico en el laboratorio. Recuperado de http://www.ammveb.net/articulos/Mastitis_bacteriana.pdf
- Rybak , C, Szczesna, T, Rybak, M, y Pidek, A. (2015). Some properties of honey bee venom. Recuperado de Pszczelnicze Zeszyty Naukowe: 38:85-90.
- Sabalet, T. (2010). Atlas Bacteriología Staphylococcus aureus. Recuperado de http://fundacionio.org/img/bacteriology/cont/Staphylococcus_aureus.html
- Sargeant, J., Leslie, K., Shirley, J., Pulkrabek, B. y Lim, G. (2001). Sensitivity and Specificity of Somatic Cell Count and California Mastitis Test for Identifying Intramammary Infection in Early Lactation. Journal of Dairy Science, volumen 84, número 9, páginas 2018-2024. Recuperado de [https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(01\)74645-0/abstract](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(01)74645-0/abstract)
- Schukken, Y., Wilson, D., Welcome, W., Garrison, L. y Gonzalez, R. (2003). Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. Recuperado de <https://www.vetres.org/articles/vetres/abs/2003/05/V3509/V3509.html>
- Sciences, Volume 11 (1): 148-150. Recuperado de <https://scialert.net/fulltextmobile/?doi=pjbs.2008.148.150>

- Silva, S., Guimarães. F., Manzi, M., Fernandes, J., Gómez, E., Langoni, H., Rall, V. y Torres, C. (2014). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of lineage ST398 as cause of mastitis in cows. Recuperado de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/lam.12329>
- SIPSA. (2014). La mastitis bovina, enfermedad infecciosa de gran impacto en la producción lechera. Recuperado de https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/sipsa/insumos_factores_de_produccion_ago_2014.pdf
- Smith, L. y Hogan, J. (2017). Environmental Mastitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, Volume 9, Issue 3, Pages 489-498. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0749072015306162>
- Steenefeld, E., Hogeveen, H., Barkema, H., van den Broek, J. y Huirne, R. (2008). The Influence of Cow Factors on the Incidence of Clinical Mastitis in Dairy. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030208712669>
- Stelwagen, K., Carpenter, E., Haigh, B., Hodgkinson, A. y Wheeler, T. (2009). Immune components of bovine colostrum and milk. *Journal of Animal Science*, Volumen 87, Issue suppl_13, 1; Pages 3–9. Recuperado de https://academic.oup.com/jas/article-abstract/87/suppl_13/3/4731038
- Ten Hag, J. (2010). Control de Mastitis y rendimiento reproductivo. Recuperado de <http://www.aprocal.com.ar/wpcontent/uploads/MASTITISYRENDIMIENTOPRODUCTIVO.pdf>
- Tovalino, F. y Contreras, S. (2010). Evaluación in vitro del efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo de Oxapampa - Perú sobre cultivos de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25175)

y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Revista Estomatológica Herediana, vol. 20, núm. 1, pp. 19-24. Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/4215/421539355004.pdf>

Trevisi, E., Amadori, M., Cogrossi, S., Razzuoli, E. y Bertoni, G. (2012). Metabolic stress and inflammatory response in high-yielding, periparturient dairy cows. Book Research in Veterinary Science, Volume 93, Pages 695-704. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0034528811004619>

Trujillo, C., Gallego, A. y Ramírez, N. (2011). Prevalence of mastitis in dairy herds in Eastern Antioquia. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, vol.24 no.1 Medellín. Recuperado de http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-06902011000100003&script=sci_arttext&lng=pt

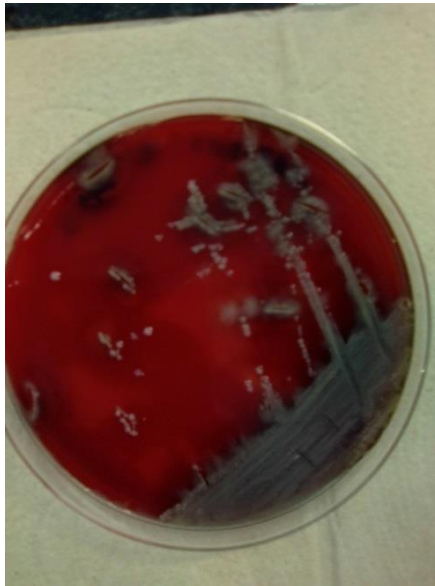
Usme, J., Restrepo, F. y Trujillo, E. (2004). KAPPA-CASEÍNA bovina y su asociación con el recuento de células somáticas en ganado Holstein. Revista Actualidades Biológicas, 26 (80): 17-22, Recuperado de <http://matematicas.udea.edu.co/~actubiol/actualidadesbiologicas/raba2004v26n80art3.pdf>

Viegas Caetano, S. L. (2004). Detección y caracterización de *Streptococcus agalactiae* en muestras para urocultivo. Revista bioquímica clínica latinoamericana. Recuperado de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572004000400004

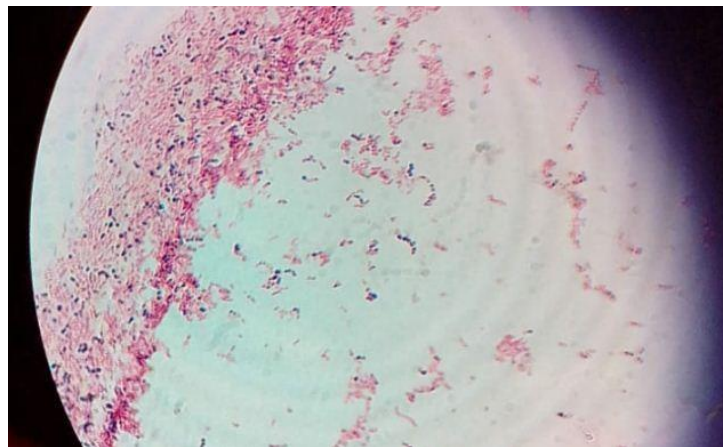
Vieira, O., Manhães, M. y Camargo, C. (2001). Detection of different *staphylococcus aureus* strains in bovine milk from subclinical mastitis using pcr and routine techniques. Brazilian Journal of Microbiology, vol.32 no.1 São Paulo. Recuperado de http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1517-83822001000100007&script=sci_arttext

- Wattiaux, M. (2015). Mastitis: la enfermedad y su transmision. Instituto Babcock. Recuperado de <https://federated.kb.wisc.edu/images/group226/52749/19-25/23Mastitislaenfermedadysutransmision.pdf>
- Wenz, J., Barrington, G., Garry, F., Ellis, R. y Magnuson, R. (2006). Escherichia coli Isolates' Serotypes, Genotypes, and Virulence Genes and Clinical Coliform Mastitis Severity. Journal of Dairy Science Volume 89, Pages 3408-3412. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030206723773>
- Wolter, W., Castañeda, V., Kloppert, B. y Zschoeck, M. (2002). La mastitis bovina. Instituto Estatal de Investigaciones de Hesse. Universidad de Guadalajara Mexico. Recuperado de <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2002/912/pdf/p020003.pdf>
- Zbysek Sládek, D. R. (2000). Apoptosis of polymorphonuclear leukocytes of the juvenile bovine mammary gland during induced influx. Veterinary Research. Volume 34, Pages 579-596. Recuperado de <https://www.vetres.org/articles/vetres/abs/2000/06/v0602/v0602.html>
- Zendejas, G., Avalos, H. y Soto, M. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. Revista Biomédica, 25:129-143. Recuperado de <http://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2014/bio143d.pdf>
- Zlotnik, I. (2002). Types of Cells Present in Cow's Milk. Journal of Comparative Pathology and Therapeutics. Volume 57, Pages 196-208. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0368174247800256>

10. ANEXOS



Anexo 1. Aislamiento de Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae
Fuente: El Autor

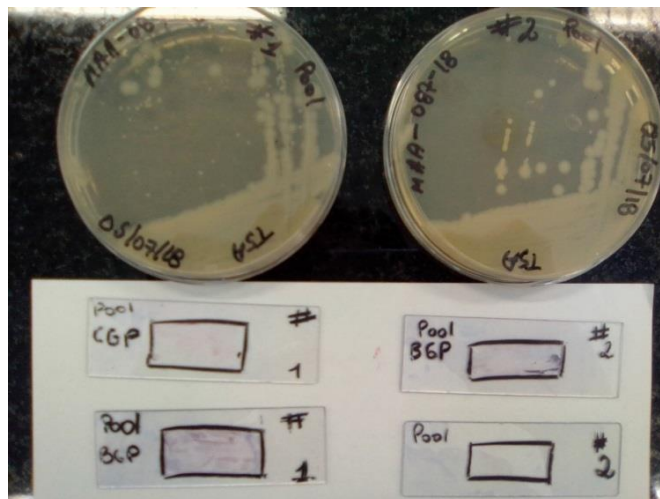


Anexo 2. Aislamiento de Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae
Fuente: El Autor



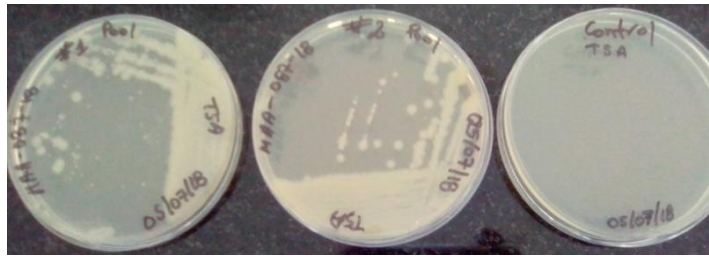
Anexo 3. Identificación de *Staphylococcus aureus*

Fuente: El Autor



Anexo 4. Identificación de *Staphylococcus aureus*

Fuente: El Autor



Anexo 5. Siembra Tryptic Soy Agar (TSA)

Fuente: El Autor



Anexo 6. Conservación de muestras en caldo nutritivo

Fuente: El Autor



Anexo 7. Colecta de apitoxina

Fuente: El Autor

Escherichia coli

>E_coli_1_PA_F

```
GTGGCGACGGTGGTAATGTCTGGGACTGCCTGAGAGGGTACTACGGAACTC
TAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGTTCGGGCCCTCTTGCCA
TCGGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTTGTGGTGGGGTAACGGCTCACCAG
GGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACCTGA
GACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATG
GGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTT
GTAAAGTACTTTACGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCA
TTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCG
GTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCAC
GCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCGGGCTCAACCTGGGAAC
TGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAG
GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGC
GGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGCGGAGCAAA
CAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGG
TTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTG
GGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGGCCGCAC
AAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACC----
```

>E_coli_1_PH_R

```
AGCCTATGCACCTGCCGCGTGTATGGAAGGCCTCGTTTAGTACTTCGCAAGG
GTAGTAAAGATTAAATAGCCTTTGCTCATTACTTCCGCAGAAGAAGCACCG
GCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATC
GGAATTACTGCCCGCGCTAAAGCGCACCCGCGAGGCGGTTTGTAAAGTCAG
ATGTGAAATCCCGGGCTCAACCTGGGAACCTGCATCTGATACTGGCAAGCT
TGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG
AGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGA
CGCTCAGGTGCGAAAGCGT----
```

Anexo 8. Secuencia de *Escherichia coli*

Fuente: (Yáñez, J. 2019)

MEGA Web Browser: NCBI Blast:Nucleotide Sequence (750 letters)

File Edit View Navigate Help

https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

NCBI Blast:Nucleotide Sequence (750 letters)

Sequences producing significant alignments:

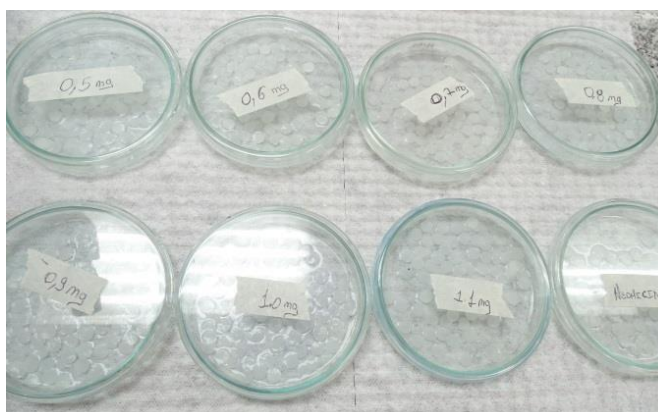
Select: All None Selected 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐ Staphylococcus sp. strain Meziad12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1290	1290	100%	0.0	97%	gi 1343294440 MG948210.1
☐ Staphylococcus pasteurii strain L242 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1277	1277	99%	0.0	96%	gi 323370733 H2739095.1

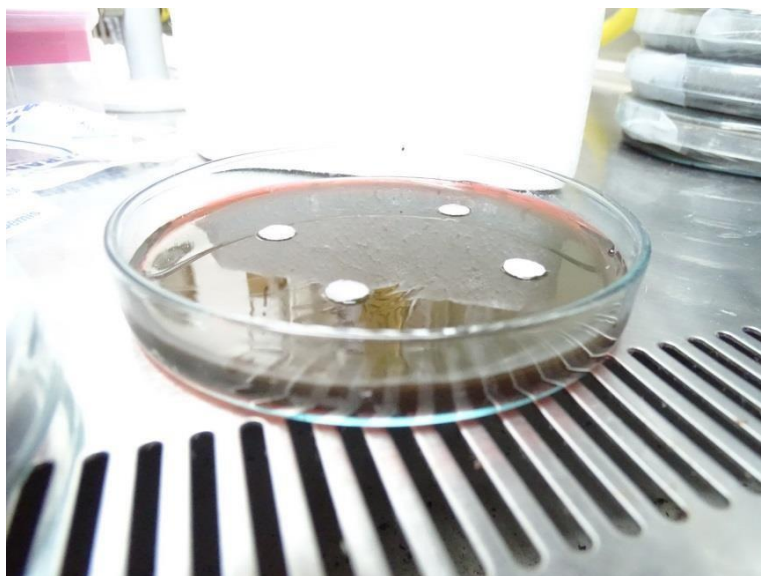
Anexo 9. Herramienta informática MEGA

Fuente: (Yáñez, J. 2019)



Anexo 10. Halos de inhibición

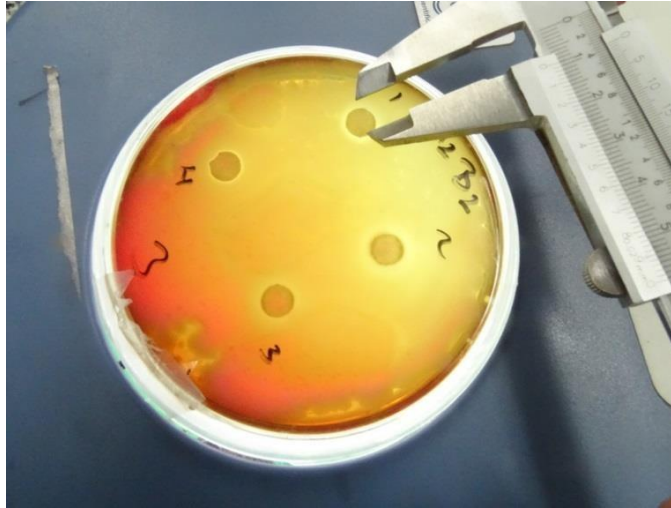
Fuente: El Autor



Anexo 11. Halos de inhibición en Agar específico
Fuente: El Autor



Anexo 12. Incubación de las tres bacterias
Fuente: El Autor



Anexo 13. Diámetro del halo de *Streptococcus agalactiae* a las 24 horas
Fuente: El Autor

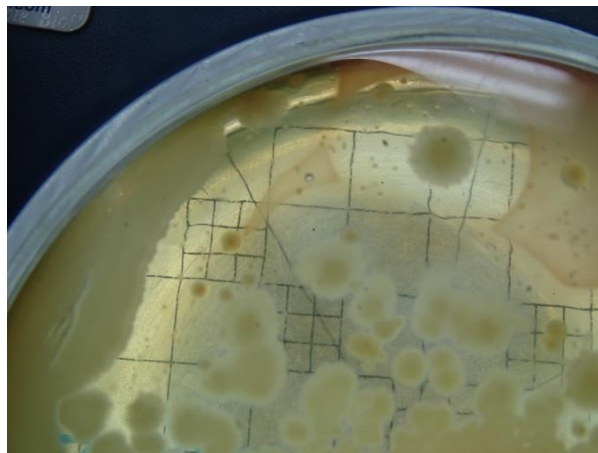


Anexo 14. Diámetro de tratamiento *Escherichia coli* a las 24 horas
Fuente: El Autor



Anexo 15. Diámetro de tratamiento con la bacteria *Staphylococcus aureus* a las 48 horas

Fuente: El Autor



Anexo 16. Colonias de *Staphylococcus aureus* 24 horas

Fuente: El Autor



Anexo 17. Aplicación parenteral

Fuente: El Autor



Anexo 18. Materiales para realizar la prueba California Mastitis Test (CMT)

Fuente: El Autor



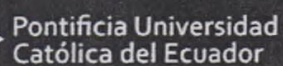
Anexo 19. Muestra de mastitis clínica en vacas

Fuente: El Autor



Anexo 20. Socialización de la investigación

Fuente: El Autor



LISTA DE ASISTENCIA A SOCIALIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN

FECHA: 20 de Diciembre de 2018

[illegible]

102



Pontificia Universidad
Católica del Ecuador

ESCUELA CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES
ÁREA DE VINCULACIÓN CON LA COMUNIDAD

PROCESO DE SOCIALIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN

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

FECHA	20 de Diciembre de 2018		
EXPOSITOR	BRYAN ALDAS CHAMORRO		
LUGAR	DENTRO PUCESI	FUERA PUCESI	

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

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

DETALLE DE VALORACIÓN	1	2	3	4	5
ORGANIZACIÓN DEL EVENTO DE SOCIALIZACIÓN:					
1. ¿Considera Usted que la sala donde se desarrolló este evento brindó las comodidades necesarias?					X
2. ¿Considera Usted que el material audiovisual utilizado en la presentación fue adecuado?				X	
EJECUCIÓN DEL EVENTO POR PARTE DEL EXPOSITOR					
3. ¿Considera Usted que el expositor mostró dominio del tema?					X
4. ¿Estima Usted que el manejo del auditorio por parte del expositor fue adecuado?			X		
5. ¿Considera Usted que el Expositor demostró facilidad de expresión?				X	
MEDICIÓN DE IMPACTO DE LA INVESTIGACIÓN:					
6. ¿Considera Usted que el tema investigado posee relevancia para algún actor y/o sector de la sociedad?					X
7. ¿Considera Usted que esta investigación posee perspectivas para estudios complementarios posteriores?					X
8. ¿Considera Usted que el tema investigado genera actualmente o a futuro un beneficio concreto para alguna organización, empresa pública o privada, comunidad o institución?					X
9. ¿En función de los objetivos planteados expuestos en la investigación, considera Usted que éstos se cumplieron?				X	
REALICE UN COMENTARIO O SUGERENCIA PARA LOS ORGANIZADORES DE ESTE EVENTO					
MENTIONE USTED OTRAS PROBLEMÁTICAS QUE A SU PARECER PODRÍAN SER INVESTIGADAS Y QUE POSEAN IMPORTANCIA PARA ALGÚN ACTOR Y/O SECTOR DE NUESTRA COLECTIVIDAD					
Control de bacterias patógenas de otras especies (Reónar, Capnari)					
INSTITUCIÓN U ORGANIZACIÓN A LA QUE PERTENECE EL ENCUESTADO					
Asociación de Pequeños Comerciantes "EP Quinche"					

Anexo 21. Encuesta entregada a los participantes dentro del proceso de socialización

Fuente: El Autor