

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA



“Potencial de resistencia a los antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* inductor de mastitis subclínica de bovinos lecheros y presente en secreciones nasales de los ordeñadores”

AUTOR:

PAUL SEBASTIAN BEDOYA LOZADA

TUTORA:

DRA. ANDREA CAROLINA VELA CHIRIBOGA

CEVALLOS-ECUADOR 2024

DERECHOS DEL AUTOR

Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado “Potencial de resistencia a los antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* inductor de mastitis subclínica de bovinos lecheros y presente en secreciones nasales de los ordeñadores”. como uno de los requisitos previos para la obtención del título de grado de Médico Veterinario, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura, según las normas de la Universidad.

Estoy de acuerdo en que se realice cualquier copia de este Informe Final, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica potencial.

Sin perjuicio de ejercer mi derecho de autor, autorizo a la Universidad Técnica de Ambato la publicación de este Informe Final, o de parte de él.



.....

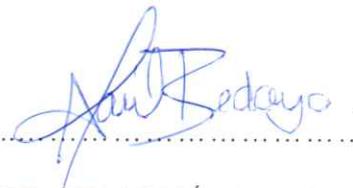
PAUL SEBASTIAN BEDOYA LOZADA

C.I. 1804631214

AUTOR

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

El suscrito, PAUL SEBASTIAN BEDOYA LOZADA, portador de la cédula de identidad número: 1804631214, libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de Investigación titulado: “Potencial de resistencia a los antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* inductor de mastitis subclínica de bovinos lecheros y presente en secreciones nasales de los ordeñadores”.es original, auténtico y personal. En la virtud, declaro que el contenido es de mi sola responsabilidad legal y académica, excepto donde se indica las fuentes de información consultadas.



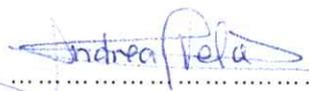
PAUL SEBASTIÁN BEDOYA LOZADA

C.I: 1804631214

AUTOR

“Potencial de resistencia a los antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* inductor de mastitis subclínica de bovinos lecheros y presente en secreciones nasales de los ordeñadores”

REVISADO POR:

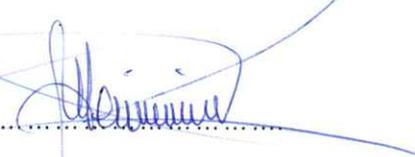

.....

Mvz. Vela Chiriboga Andrea Carolina, PhD.

APROBADO POR LOS MIEMBROS DE CALIFICACIÓN:

Fecha

06/02/2024


.....
Ing. Núñez Torres Oscar Patricio. PhD

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

06/02/2024


.....
Dr. Mg. Rosero Peñaherrera Marco Antonio

MIEMBRO DE TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

06/02/2024


.....
Méd. Quinteros Pozo Orlando Roberto, PhD.

MIEMBRO DE TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

DEDICATORIA

A mis padres Jorge Bedoya y Lilian Lozada

A mis hermanos Israel, Josué y Anita

A mi abuela Mercedes Ramos

A mis abuelos Jorge Lozada y Graciela Andaluz

A Myriam Raquel por su cariño incondicional en este trayecto.

INDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
CAPITULO I.....	3
MARCO TEÓRICO.....	3
1.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS.....	4
1.2 CATEGORIAS FUNDAMENTALES.....	8
1.2.1 Mastitis.....	8
1.2.2 Mastitis clínica.....	8
1.2.3 Mastitis subclínica.....	9
1.2.4 <i>Staphylococcus aureus</i>	9
1.2.5 <i>Staphylococcus coagulasa negativa (SCN)</i>	10
1.2.6 Epidemiología.....	10
1.2.7 Prueba biológica de CMT.....	11
1.2.8 Resistencia a los antibióticos.....	12
1.3 OBJETIVOS.....	12
1.3.1 Objetivos general.....	12
1.3.2 Objetivos específicos.....	12
1.4 HIPÓTESIS.....	12
CAPITULO II.....	14
METODOLOGÍA	
2.1 Ubicación del experimento.....	14
2.2 Características del lugar.....	14
2.3 Ubicación del laboratorio.....	14
2.4 Características del lugar.....	15
2.5 Equipos y materiales.....	15

2.6 Factores de estudio.....	18
2.7 ANALISIS ESTADÍSTICO	19
2.5.1. Tamaño de la muestra.....	19
2.5.2. Diseño experimental.....	20
2.6 METODOLOGÍA.....	20
2.6.1 Fase 1 Toma de muestras.....	20
2.6.1.1 Prueba de California Mastitis Test.....	20
2.6.1.2 Hisopado a los ordeñadores.....	21
2.6.1.3 Preparación de Agar Base Sangre.....	22
2.6.1.4 Siembra de la muestra en Agar Sangre.....	22
2.6.1.5 Tinción gram.....	23
2.6.2 Fase II Siembra en Manitol Salado Agar y prueba.....	24
catalasa/coagulasa	
2.6.2.1 Preparación de Manitol Salado Agar.....	24
2.6.2.2 Siembra de Staphylococcus gram positivos en Manitol salado Agar.....	24
2.6.2.3 Prueba catalasa/coagulasa.....	24
2.6.2.4 Prueba catalasa.....	25
2.6.2.5 Prueba coagulasa.....	25
2.6.2.6 Preparación de Agar Tripticasa Soya.....	26
2.6.2.7 Siembra en Agar Tripticasa Soya.....	26

2.6.3 Fase III Medición de densidad óptica/antibiograma.....	27
2.6.3.1 Preparación de infusión Cerebro-Corazón.....	27
2.6.3.2 Muestras de Agar Tripticasa Soya a caldo	
Cerebro Corazón.....	27
2.6.3.3 Medición de densidad óptica.....	27
2.6.3.4 Preparación de Agar Müller-Hilton.....	28
2.6.3.5 Antibiograma.....	29
2.6.3.6 Lectura del antibiograma.....	29
2.7 VARIABLE RESPUESTA.....	30
2.7.1 Cualitativas.....	30
2.7.2 Cuantitativas.....	30
2.8 PROCESAMIENTO DE DATOS.....	31
CAPITULO III.....	32
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
3.1 Tipo de hemolisis y tinción gram en vacas lecheras.....	33
3.2 Pruebas bioquímicas en vacas lecheras	34
3.3 Antibiograma y resultados en muestras en vacas lecheras.....	36
3.4 Tipo de Hemolisis y tinción gram en ordeñadores.....	41
3.5 Pruebas bioquímicas en ordeñadores.....	42
3.6 Antibiograma y resultados en ordeñadores.....	43
3.7. Verificación de hipótesis.....	46

CAPITULO IV.....	47
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	47
4.1. CONCLUSIONES.....	47
4.2 RECOMENDACIONES	47
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
ANEXOS.....	51

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de <i>Staphylococcus aureus</i>	9
Tabla 2. Relación numérica del conteo de células somáticas y CMT	11
Tabla 3. Condiciones meteorológicas de lugar.....	14
Tabla 4. Condiciones meteorológicas de laboratorio.....	15
Tabla 5. Disco de antibióticos.....	18
Tabla 6. Lectura de la reacción de C.M.T.....	21
Tabla 7. Perfil de sensibilidad a los antibióticos de <i>Staphylococcus áureas</i>	29
Tabla 8. Prueba de hemólisis y tinción gram en vacas lecheras	31
Tabla 9. Pruebas bioquímicas a vacas lecheras.....	35
Tabla 10. Sensibilidad y resistencia de <i>Staphylococcus aureus</i> en vacas lecheras.....	36
Tabla 11. Cantidad de cepas sensibles, intermedio y resistentes en vacas lecheras	38
Tabla 12. Comparación de sensibilidad a diferentes antibióticos en vacas lecheras	40
Tabla 13. Prueba de hemólisis y tinción gram a ordeñadores.....	41
Tabla 14. Pruebas bioquímicas a ordeñadores.....	42
Tabla 15. Sensibilidad y resistencia de <i>Staphylococcus aureus</i> en hisopado de ordeñadores.....	43
Tabla 16. Cantidad de cepas sensibles, intermedio y resistentes en ordeñadores	45
Tabla 17. Comparación de sensibilidad a diferentes antibióticos en ordeñadores.....	46

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Resistencia antibiótica por *Staphylococcus aureus* en vacas lecheras.....38

Figura 2. Resistencia antibiótica por *Staphylococcus aureus* en ordeñadores.....44

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Toma de muestras.....	51
Anexo 2. Prueba de C.M.T.....	51
Anexo 3. Preparación de Agar Sangre.....	51
Anexo 4. Siembra en Agar sangre.....	52
Anexo 5. Muestras en Agar Sangre.....	52
Anexo 6. Tinción Gram.....	52
Anexo 7. Muestras de Staphylococcus visto en el microscopio.....	53
Anexo 8. Agar Manitol positivo en la incubadora.....	53
Anexo 9. Prueba Catalasa.....	53
Anexo 10. Prueba Coagulasa.....	54
Anexo 11. Caldo cerebro-corazón y Agar Tripticasa.....	54
Anexo 12. Preparación de Agra Tripticasa.....	54
Anexo 13. Antibiogramas.....	55
Anexo 14. Análisis estadístico Kuskal Wallis en vacas lecheras.....	55
Anexo 15. Análisis estadístico Kuskal Wallis en ordeñadores.....	55

RESUMEN

El *Staphylococcus aureus* es una de las bacterias saprofita comúnmente hallada en piel y mucosas de los animales, siendo una de las bacterias de mayor incidencia en la mastitis subclínica. Uno de los problemas de mayor relevancia en la actualidad es la aplicación imprudente e indiscriminada de antibióticos conllevando a que la mastitis subclínica presente diferentes mecanismos de resistencia a varios antibióticos disponibles en el mercado. El objetivo de la siguiente investigación es evaluar la resistencia antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* en vacas lechereas y en ordeñadores en el cantón Quero, parroquia Yanayacu-Mochapata, provincia de Tungurahua, Caserío 12 de Octubre en la hacienda de la familia Velazco. En el campo se recolectaron 80 muestras de vacas lecheras por medio de la prueba de California Mastitis Test, resultando 28 bovinos positivos a mastitis subclínica. De estas, 12 muestras fueron positivas a *Staphylococcus aureus*. También se tomaron 5 muestra a los ordeñadores por medio de un hisopado nasal resultando todas las muestras positivas a *Staphylococcus aureus*. Las muestras fueron llevadas al laboratorio de microbiología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato en donde se realizó: tipo de hemolisis, tinción gram, pruebas bioquímicas en manitol y prueba catalasa/coagulasa y finalmente se aisló la bacteria y se realizó el respectivo antibiograma con el método Kirby-Bauer. La prevalencia de la mastitis subclínica fue del 35 % del total de las muestras y el 42% fueron muestras positivas a *Staphylococcus aureus*. Los resultados de los antibiogramas fueron: ninguna de las muestras resistentes a la gentamicina, cloranfenicol y rifampicina; 8.3% resistentes a la clindamicina, 25% de las cepas resistentes a novobiocina y 16.6% resistentes a linezolid. En los ordeñadores los resultados fueron 40% de las cepas resistentes a la gentamicina, 40% de resistencia a la rifampicina, 60% de las muestras resistente a la clindamicina y 60% a la Novobiocina.

Palabras clave: mastitis subclínica, *Staphylococcus aureus*, pruebas bioquímicas, resistencia.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is one of the saprophytic bacteria commonly found on the skin and mucous membranes of animals, being one of the bacteria with the highest incidence in subclinical mastitis. At present, one of the most relevant problems is the reckless and indiscriminate application of antibiotics, leading to subclinical mastitis presenting different resistance mechanisms to various antibiotics available on the market. The objective of the following research is to evaluate the antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* in dairy cows and milkers in the Quero canton, Yanayacu-Mochapata parish, Tungurahua province, Caserío 12 de Octubre on the Velazco family farm. Eighty milk samples were collected and tested for subclinical mastitis using the California Mastitis Test. We found 28 positive animals for subclinical mastitis, of which 12 were positive for *Staphylococcus aureus*. Five samples were also taken from the milkers by means of a nasal swab, resulting in all samples positive for *Staphylococcus aureus*. The samples were taken to the microbiology laboratory of the Faculty of Agricultural Sciences of the Technical University of Ambato where: type of hemolysis, gram staining, biochemical tests in salt-mannitol and catalase/coagulase test were carried out. Finally, the bacteria were isolated and the respective antibiogram with the Kirby-Bauer method was performed. The prevalence of subclinical mastitis was 35% of the total samples and 42% were samples positive for *Staphylococcus aureus*. The results in dairy cows were: none of the samples were resistant to gentamicin, chloramphenicol and rifampicin; 8.3% were resistant to clindamycin, 25% of the strains were resistant to novobiocin and 16.6% were resistant to linezolid. In the milkers the results were 40% of the strains resistant to gentamicin, 40% resistant to rifampin, 60% of the samples resistant to clindamycin and 60% resistant to novobiocin.

Keywords: subclinical mastitis, *Staphylococcus aureus*, biochemical tests, resistance.

CAPITULO I

MARCO TEÓRICO

La mastitis es una de las patologías de mayor relevancia en hatos lecheros causante de importantes pérdidas económicas en la industria de la leche; es por ello que prevenir esta enfermedad toma un protagonismo importante para el médico veterinario especializado quien busca disminuir los costes de la producción de la leche (*Sanchez, 2013*).

Esta enfermedad se ve reflejada principalmente en la alteración de la calidad de la leche y subproductos, bajo rendimiento y presencia de antibióticos, considerada hoy en día como una tecnopatía al estar condicionada y determinada por nuevos diseños de máquinas ordeñadoras, recursos biológicos, profilácticos, quimioterapéuticos, con el fin de atenuar, combatir y así disminuir el impacto de la patología. Desde el punto de vista clínico y patológico el *Staphylococcus aureus* afecta a las ubres de las vacas causando alteraciones en el parénquima y el contenido lácteo; esto puede estar causado por errores al momento de ordeñar, ambientes agresivos, ausencia de higiene en ubres y en la sala de ordeño, patologías dérmicas a nivel de ubres y pezones, deficiencias hereditarias, susceptibilidades en periodos de tiempo en las glándulas mamarias y edad de las vacas (*Justino, 2016*).

La mastitis se clasifica en: clínica y subclínica. La primera, como su nombre lo indica, presenta signos clínicos los cuales son observables y no representa mayor dificultad para el profesional en diagnosticarla. En cambio, la mastitis subclínica es más frecuente y es la causante de las mayores pérdidas económicas en la producción de leche. Según (*Herencia, 2022*) la mastitis subclínica representa más del 70% de casos y es el 95% ocasionada por estreptococos y estafilococos además es mucho más peligrosa por ser difícil de advertirla por la carencia de síntomas manifiestos. Este tipo de mastitis se puede diagnosticar por medio de la prueba de California (CMT) o por medio del conteo de células somáticas (RCS) en la leche.

Las cepas de *S. aureus* que han desarrollado resistencia a diferentes tipos de antibióticos representa un riesgo directo en la producción de leche y con ello a la salud pública. Muchas

de las enfermedades causadas por bacterias gram positivas han dejado de responder a los diferentes antibióticos frecuentemente empleados tanto por el uso indiscriminado como por la necesidad de nuevos agentes en el mercado. Aunque la resistencia a los antibióticos es un fenómeno natural, el uso descontrolado en humanos y animales ha ocasionado que este proceso sea precipitado. Existen diversas maneras en las que tanto los humanos como los animales pueden adquirir bacterias resistentes. En primer lugar, el uso de antibióticos en la producción agropecuaria que es una fuente significativa de generación de bacterias resistentes. En segundo lugar, la integración de genes resistentes intencionalmente en el proceso de elaboración de alimentos, tanto para humanos y animales, y por último la contaminación de alimentos con bacterias resistentes (Sánchez, 2016).

Las enfermedades zoonóticas son infecciones que se transmiten de forma natural entre animales y humanos en esta investigación se realizará un hisopado nasal conocido como hisopado de cornete medio a los ordeñadores con el fin de determinar *S. aureus* y corroborar si la fuente de la patología es por causa de una transmisión del ordeñador hacia el bovino.

La presencia de microorganismos patógenos resistentes tiene varias consecuencias negativas, como es el fracaso de los tratamientos médicos, una selección limitada, complicada y costosa en opciones de tratamientos, y un mayor riesgo de virulencia cuando se combinan con plásmidos resistentes. Por ello este trabajo experimental evalúa la resistencia de 6 antibióticos para combatir el *S. aureus* en hatos lecheros del cantón Guano parroquia Yanayacu-Mochapata.

1.1 Antecedentes investigativos.

Estudios realizados por (Medrano-Galarza, 2020) determinaron que existe una relación entre la elevada prevalencia mastitis subclínica (MSC), con un alto balance de células somáticas (RCS) y el recuento de bacterias en tanque o en cantina. Los factores predisponentes incluyen: ubres sucias, inadecuado uso del presellador y falta de capacitación de los ordeñadores, estas circunstancias son factores determinantes que pueden prevenir y controlar la mastitis subclínica.

(Pellegrino, 2021) realiza una investigación en Córdoba, Argentina y obtiene 271 muestras de 7 establecimientos en el que el 85.7% de la población analizada presenta RCS (> 200.000 cel/ml) asociada a una producción baja de leche, y cabe destacar que 5 de los establecimientos no llevaban a cabo la desinfección post-ordeño para el control y prevención de mastitis subclínica. De las muestras se aislaron 300 cepas bacterianas de las que 226 (75.3%) presentaron Staphylococcus (S) y en el 63 (27.9%) se identificaron con *S. aureus* y las demás se identificaron con otros microorganismos como *Streptococcus* sp, *Escherichia* spp. (E) y *Staphylococcus* coagulasa negativo (SCN). Al evaluar la resistencia de las cepas de *S. aureus* con 7 agentes antimicrobianos; de las 63 cepas, el 58,7% se hallaron resistentes a eritromicina, penicilina, y estreptomina. En total, 5 de los establecimientos lecheros en donde se aislaron cepas de *S. aureus* resistentes a la penicilina, 4 a eritromicina y 3 a la estreptomina; sin embargo, todas las muestras se fueron sensibles a la rifampicina, ampicilina, gentamicina y oxacilina.

En la localidad de Schoenweide-Paraguay se realizan análisis a 83 bovinos con un total de 332 muestra por cada cuarto, de las cuales el 19% de las muestras son positivas a *S. aureus* asociadas a mastitis subclínica presentando resistencia del 18,5% y 14,8 del total de las cepas de *S. aureus* resistentes a la penicilina y cefpodoxia, respectivamente. Del estudio todas las cepas analizadas fueron sensibles a amoxicilina, ácido clavulánico, gentamicina, trimetoprima sulfametoxazol, oxacilina, cefalotina y vancomicina. (Franco Meza, 2020) otros estudios llevados a cabo por (Jiménez Velásquez, 2020) determinan que de 101 cepas analizadas el 64% se clasificó como *S.aureus* y el 35% como ECN; de las cuales el 57.4% presentaron sensibilidad a la mayoría de antibióticos como la clindamicina y la eritromicina a diferencia de los β lactámicos que representaron mayor resistencia en todas las cepas con el 14.8% que otros antibióticos. Sin embargo, la clindamicina representó ser el antibiótico con mayor resistencia en las cepas de *S. aureus* que en las cepas de ECN.

Otros estudios determinan que, en un hato de 31 vacas con mastitis ubicada en distrito de Laredo en Perú, se hallaron varias cepas de *Staphylococcus*, *E. coli* y *Klebsiella* spp. y que presentaron resistencia a los distintos agentes microbianos. Se tomaron 140 muestras de 10ml de leche de cada cuadrante, se colocaron en frascos estériles y se transportaron a 4°C.

Después fueron sembradas en agar sangre y agar Mac Conkey e incubadas a 37°C por 48h. El procedimiento continuó con la tinción de Gram confirmando la pureza y caracterización de las bacterias gram positivas y negativas. Posteriormente, con ayuda de la prueba de catalasa se diferenciaron *Staphylococcus* de *Streptococcus*, se realizaron pruebas de TSI (agar-hierro-triple azúcar) a las colonias de gram negativos con el fin de identificar bacterias fermentadoras de sacarosa, glucosa o lactosa y se evaluó LIA (hierro-lisina) observando producción de H₂S y desaminación de lisina. La presencia de *S. aureus* fue de 16%, *Streptococcus* spp. 8%, y a una escala mayor *E. Coli* (28%) y *Klebsiella* spp. (24%). La resistencia de las bacterias aisladas se presentó contra la oxacilina y la rifampicina en donde 7 colonias de bacterias Gram negativas tuvieron resistencia. Finalmente *S. aureus* y *Streptococcus* spp. presentaron susceptibilidad a la rifampicina, eritromicina y oxacilina. (Pérez, 2020).

Investigaciones realizadas por (Holko, 2020) examinó muestras tomadas de 512 vacas lecheras en Eslovaquia en Nitra las cuales se comprobó mastitis subclínica por la prueba de California (CMT). Las reacciones se calificaron como 0 para negativo, +1, +2, +3 para positivo y todas las muestras positivas de CMT fueron considerados para cultivo bacteriológico. Se cultivaron aeróbicamente las muestras de leche (10 µl de inóculo) en una placa de agar sangre y en agar McConkey a 37 °C durante 24 h. El *S. aureus* se identificó mediante la morfología típica de la colonia y β-hemólisis, o por reacción de coagulasa (coagulasa positiva) cuando las zonas típicas de hemólisis no estaban presentes. Los SCN (*Staphylococcus* coagulasa negativo) fueron identificado mediante la morfología típica de las colonias y la reacción de coagulasa. Los patógenos identificados con mayor frecuencia fueron los SCN y demostraron resistencia a la estreptomina, neomicina, cloxacilina y penicilina. Las cepas analizadas no fueron resistentes a amoxicilina, tetraciclina, ceftiofur, cefquinoma, rifaximina y enrofloxacina, sulfametoxazol reforzado con trimetoprima y enrofloxacina. Se encontró que los *S. aureus* aislados eran resistentes a la estreptomina, neomicina, novobiocina y penicilina (44.6%, 21.5%, 15.4% y 10,8%). *Str. ubéris* mostraron resistencia a estreptomina (78,9%), neomicina (74%), cloxacilina (42,1%) y rifaximina (26,3%). Con frecuencia se encontró resistencia a la cefalexina (22,8%) y a la penicilina (10,5%). No se demostró resistencia a la lincomicina ni a la enrofloxacina en los pacientes

analizados. *Str. ubéris* y *Srt. agalactiae* demostraron ser resistentes a neomicina y estreptomicina (80% y 70% respectivamente), penicilina (23,3%) y enrofloxacina (23,3%) y, por el contrario, no presentaron resistencia a amoxicilina reforzada con ácido clavulánico, ceftiofur, cefquinoma, rifaximina o sulfametoxazol-trimetoprima.

En Piauí al nordeste de Brasil se obtienen 312 muestras positivas a mastitis por medio de CMT de 17 tambos lecheros. Se identificó por medio de espectroscopía de masas diferentes tipos de *Staphylococcus*. Posteriormente se realiza el antibiograma y reacción en cadena de polimerasa con el fin de revelar genes de resistencia. El 59.45% de bacterias encontradas perteneció al género *Staphylococcus*, detectando *S. aureus*, 68,1%; *S. chromogenes*, 12,7%; *S. epidermidis*, 5,4%; *S. sciuri*, 4,5%; *S. warneri*, 2,7%; *S. haemolyticus*, 1,8%; *S. hominis*, 1,8%; *Str. arlettae*, 0,9%; *S. capitis*, 0,9%; y *S. gallinarum*, 0,9%. El estudio muestra una alta resistencia a la ampicilina y penicilinas, 61.8% y 70.0% respectivamente y baja resistencia a la vancomicina 11.8% y gentamicina 10.9%. Además, cabe destacar que de las diferentes especies de *Staphylococcus* spp se encontraron genes de resistencia (Oliveira, 2022).

(Maldonado-Arias, 2022) Realiza una investigación con 16 bovinos de producción lechera de raza Holstein en la Estación Tunchi-Facultad de Ciencias Pecuaria, ESPOCH en donde se evalúan tres métodos de diagnóstico para mastitis subclínica: Milk Checker, Draminski y California Mastitis Test (CMT) siendo la más eficaz la prueba de CMT con un 92.12% de efectividad; de las muestras se obtuvieron *Staphylococcus aureus* en un 51.4% y Bacilos hemolíticos y no hemolíticos 48.6%. Representaron sensibilidad a tetraciclinas, penicilina y resistencia a la ciprofloxacina. La investigación concluye en realizar control de aguas realizando un antibiograma una vez al año para determinar si existen residuos de antibióticos que causen resistencia antibiótica. Otras investigaciones (Lucas, Buldain, Marchetti, & Mestorino, 2021) evalúan un total de 44 cepas aisladas de *Staphylococcus aureus* por medio de difusión de disco en agar (DDA) en donde muestran una resistencia del 2.27% a la clindamicina y eritromicina y el 95.45% de las muestras sensibilidad a la oxacilina, cefoxitina, eritromicina, rifampicina y rifaximinay. En la misma investigación a partir de los halos inhibitorios causadas por la oxacilina y rifampicina 10 se confirmaron como cepas de

S. aureus; realizando otra prueba de DDA en donde la resistencia a la eritromicina es del 20% y el 70% a la rifaximina y rifampicina.

Se realizan en fincas lecheras de la sabana de Bogotá la identificación de bacterias bajo ordeño mecánico en donde el 70.1% resulta positiva a la prueba de C.M.T en donde 30.2% pertenecen a *S. aureus*, 16.2% a *Estafilococos* no aureus y el 14.4% a *Streptococos sp*; en cambio en los ordeñadores el *S. aureus* resultó el 25.0%, al igual que el *S. Epidermis* 25.0% y otros el 17.5%. El estudio concluye que el agente etiológico de mayor frecuencia por ordeño mecánico es el *S. aureus* presentando varias diversidad y alta similitud entre aislamientos de los diferentes orígenes con cepas que se han adaptado al ambiente, relacionado con la falta de higiene tanto de los ordeñadores y vacas lecheras. (Álvarez, 2022)

1.2 Categorías fundamentales

1.2.1 Mastitis

El término mastitis es utilizado para referirse a la inflamación de la glándula mamaria causada por microorganismo patógenos, caracterizado por daños en del epitelio glandular y seguido por inflamación. La mastitis provoca en la leche alteraciones físicas, químicas y microbiológicas y esto causa pérdidas económicas elevadas en la producción debido a la disminución de la cantidad y calidad de la leche y el valor de los tratamientos (Fernandez, 2012). En casos graves la funcionalidad de uno de los cuartos o en la totalidad de la ubre se ve gravemente afectada. Por estas causas la mastitis sigue siendo unas de las patologías de mayor relevancia en la producción de leche y una de las más controladas en la salud pública. Los agentes infecciosos de mayor impacto en los tejidos mamarios son el *S. aureus* y *Streptococos agalactiae* La mastitis puede presentarse como clínica o subclínica. (Cobirka, 2020).

1.2.2 Mastitis clínica

Caracterizada por presentarse de una manera súbita y de forma aguda con inflamación y enrojecimiento en la ubre, baja producción y calidad de leche, tumefacción de la ubre,

alteraciones en las mamas y la leche se presenta con grumos. La vaca presenta fiebre, anorexia, letargo y depresión, incluso puede causar la muerte. Es fácilmente diagnosticable a simple vista (*Fernández Bolaños, 2012*).

1.2.3 Mastitis subclínica:

Existe una imperceptible inflamación en la glándula mamaria y la leche tiene apariencia normal con los cuatro cuartos sin ninguna alteración; sin embargo, cuando se realizan pruebas diagnósticas específicas como el recuento de células somáticas estas se encontrarán elevadas (CCS); también se puede realizar la prueba de California Mastitis Test (CMT) y conductividad eléctrica. Cabe destacar que este tipo de patología no presenta signos visibles, por lo que el uso de los métodos diagnósticos antes mencionados es fundamental (*Palacio, 2016*).

1.2.4 Staphylococcus aureus

Tabla 1. Taxonomía de Staphylococcus aureus

<i>Dominio</i>	<i>Bacteria</i>
<i>Filo</i>	<i>Fimicutes</i>
<i>Clase</i>	<i>Bacilli</i>
<i>Orden</i>	<i>Bacillales</i>
<i>Familia</i>	<i>Staphylococaceae</i>
<i>Genero</i>	<i>Staphylococcus</i>

Es una de las bacterias de mayor incidencia en la mastitis. El *S. aureus* puede causar problemas que pueden ser moderados y severos; y se encuentra con mayor frecuencia en mastitis subclínica. Cabe destacar que los brotes de esta enfermedad inician principalmente al incorporar animales nuevos al hato, al ser transportados tienen contacto con animales enfermos, agua, tierra, camas contaminadas y estiércol. Autores como (*Fierro N. , 2015*)

describen que las moscas también desempeñan el papel de vectores para la propagación de la enfermedad en el hato y hatos aledaños; también recomiendan apartar a los animales o sacrificarlos cuando las células somáticas superan las 500.000 células/ml ya que la patología es altamente virulenta y crónica.

1.2.5 Staphylococcus coagulasa negativos (SCN)

Este tipo de bacterias se caracterizan por ser multirresistentes a los antibióticos produciendo enzimas que alteran, impiden e inactivan las enzimas de los antibióticos. Los betalactámicos son los antibióticos que mayor resistencia han presentado por ser utilizados con mayor frecuencia. (*Garzón, 2019*)

1.2.6 Epidemiología

Existen varias maneras en que las que puede darse la infección de la glándula mamaria, pero el papel que desempeña el ordeñador es una de las más relevantes. Las manos de ordeñador se consideran un medio directo para que los microorganismos se propaguen y contamine otras vacas, las manos contienen innumerables bacterias que al momento del ordeño tocan el pezón; una mano que estuvo en contacto con una ubre con mastitis puede llegar a contaminar vacas sanas. Los microorganismos pueden ingresar al pezón de distintas maneras:

- Falta de higiene, aseo de manos e implementos al momento del ordeño.
- Falta de desinfección de los pezones.
- Tirar o halar demasiado de los pezones.
- Golpes en los pezones.
- Máquina de ordeño y pezonera sin mantenimiento.
- No implementar sellante para los pezones al final del ordeño.
- Uso de sondas intramamarias reutilizadas.
- Escurrimiento de los cuartos mamarios parcial.

Las etapas principales para que la mastitis se desarrolle son 3:

Invasión: los microorganismos ingresan desde la ubre hacia la leche que se encuentra en la cisterna del pezón. Se da un ambiente propicio para la multiplicación bacteriana e invasión del tejido mamario.

Infección: la población bacteriana se disemina hacia toda la glándula, dependiendo de la virulencia del microorganismo.

Inflamación: Aumento de leucocitos que causa inflamación. (Padilla, 2020)

1.2.7 Prueba biológica de CMT

De gran utilidad para diagnosticar mastitis subclínica ya que es un método rápido sencillo y económico que se puede hacer en el sitio inmediato y de manera temprana; no proporciona un valor numérico, pero se identifica si las células somáticas son altas o bajas de acuerdo con la tabla 2. La prueba se lleva a cabo en hembras en lactación y en especies como ovinos, caprinos camellos llamas y bovinos. El reactivo de CMT actúa como detergente, disolviendo las paredes celulares de los leucocitos, que están constituidas por grasas, esto causa que la célula libere desde el núcleo su ADN y se gelifique formando masas fibrosas cuando entra en contacto con el reactivo.

Tabla 2. Relación numérica del conteo de células somáticas y CMT

CMT	CCS/ml
N	20.000 ± 10.000
T	91.000 ± 22.000
1 (+)	198.000 ± 73.000
2 (++)	497.000 ± 147.000
3 (+++)	2'258.000 ± 678.000

*N= negativo; T=trazas posibles; 1(+)=Positivo débil; 2(++)=Positivo evidente; 3(+++)=Positivo fuerte.

Fuente: (González, 2011)

1.2.8 Resistencia a los antibióticos

Se puede definir como la ausencia de susceptibilidad de la bacteria al antimicrobiano mediante la inactivación o disminución de la actividad del fármaco. La resistencia que los microorganismos desarrollan a los distintos antibióticos obedece a la capacidad de las bacterias de modificarse genéticamente y a otros mecanismos que permiten la transferencia material genético de bacterias resistentes a bacterias susceptibles. Este proceso se ha visto facilitado por el uso indiscriminado de antibióticos usados en lechería para el control de mastitis.

1.3 OBJETIVO

1.3.1 Objetivo general

Identificar el potencial de resistencia a los antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* inductor de mastitis subclínica de bovinos lecheros y presente en secreciones nasales de los ordeñadores.”

1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar *Staphylococcus aureus* a partir de muestras de leche obtenidas de vacas con mastitis subclínica y secreciones nasales del personal de ordeño a través de cultivos microbiológicos.
- Confirmar mediante pruebas bioquímicas que las bacterias aisladas corresponden a *Staphylococcus aureus*
- Determinar si las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas presentan resistencia a varias familias de antibióticos: clindamicina, gentamicina, rifampicina, novobiocina, cloranfenicol y linezolid.

1.4. HIPÓTESIS

HO: Las cepas de *Staphylococcus aureus* evaluadas y las muestras del personal de ordeño no presentaron resistencia a los antibióticos: clindamicina, gentamicina, rifampicina, novobiocina, cloranfenicol y linezolid.

H1: Las cepas de *Staphylococcus aureus* evaluadas y las muestras evaluadas del personal de ordeño presentaron resistencia a los antibióticos: clindamicina, gentamicina, rifampicina, novobiocina, cloranfenicol y linezolid.

CAPITULO II

METODOLOGÍA

2.1 Ubicación del experimento

La investigación se realizó en el cantón Quero parroquia Yanayacu-Mochapata provincia de Tungurahua Caserío. 12 de Octubre en la hacienda de la familia Velazco. Las coordenadas geográficas son: S1°29'13.2"S latitud sur y O78°42'09.5" longitud Oeste (*Earth, 2023*)

2.2 Características del lugar

Tabla 3. *Condiciones meteorológicas de lugar*

<i>Parámetros</i>	<i>Datos anuales</i>
<i>Clima</i>	<i>Frio</i>
<i>Humedad relativa, %</i>	<i>72</i>
<i>Altitud, msnm</i>	<i>3609</i>
<i>Temperatura media, °C</i>	<i>9°</i>
<i>Precipitación media mensual, mm</i>	<i>374</i>
<i>Velocidad media del viento, Km/h</i>	<i>7.8</i>

Fuente: (INHAMI, 2023)

2.3 Ubicación del laboratorio

La fase experimental se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, localizado en la provincia de Tungurahua, Cantón Cevallos kilómetro 2, su extensión 19.000 km² y las coordenadas geográficas son: 1°22'08.7" S latitud sur y 78° 36'23.8" longitud Oeste (*Earth, 2023*).

2.4 Catacteríticas del lugar

Tabla 4. *Condiciones meteorológicas de laboratorio*

<i>Parámetros</i>	<i>Datos anuales</i>
<i>Clima</i>	<i>Ecuatorial Meso Térmico Seco</i>
<i>Humedad relativa, %</i>	<i>60-75</i>
<i>Altitud, msnm</i>	<i>2.882</i>
<i>Temperatura media, °C</i>	<i>13-16</i>
<i>Precipitación media mensual, mm</i>	<i>200-500</i>
<i>Velocidad media del viento, Km/h</i>	<i>2.1-8.9</i>

Fuente: (GAD, 2022)

2.3 Equipos materiales

Material biológico experimental

- Especímenes 80 Semovientes: Bos taurus

Materiales de campo

- Paleta para CMT
- Botas
- Overol
- Guantes de látex
- Tubos para muestras de leche
- Rollo de papel

Materiales de laboratorio

- Asa de siembra
- Cajas Petri
- Gradilla
- Portaobjetos
- Matraz Erlenmeyer
- Tubos de ensayo
- Mechero bunsen
- Varilla de agitación
- Vaso de precipitación
- Cuchara de medición
- Micropipeta
- Tubos Falcon 15ml
- Kit para hisopado nasal
- Puntas de micropipetas

Equipos:

- Agitador
- Incubadora
- Balanza analítica
- Nevera
- Autoclave

Reactivos

- Reactivos de CMT
- Agar Müller-Hilton
- Agar Manitol-salado

- Agar sangre base
- Agar Trypticase Soya
- Antibióticos (clindamicina, gentamicina, rifampicina, novobiocina, cloranfenicol y linezolid)
- Infusión corazón-cerebro

Insumos de oficina:

- Computadora
- Esferográficos
- Cámara
- Cuadernos
- Impresora
- Marcador

2.4 Factores en estudio

Tabla 5. Disco de antibióticos.

Antibiótico	Simbología	Descripción
Gentamicina	CN	Aminoglucósido con una acción bactericida inhiben la síntesis proteica bacteriana, su mecanismo de acción depende de su concentración, lo que produce un efecto postantibiótico.
Cloranfenicol	C	Antimicrobiano del grupo de los a fenicoles, bacteriostático que actúan uniéndose a la subunidad 50S de los ribosomas de las bacterias susceptibles, evitando la síntesis de proteínas de las bacterias.
Rifampicina	RD	Antibiótico del grupo de la rifampicina de amplio espectro que se une a la subunidad beta de la ARN polimerasa y produce un inicio fallido en la síntesis de ARN.
Clindamicina	DA	Antibiótico del grupo de las lincosamidas que se une a la subunidad 50S, ribosomal, inhibiendo así la formación de enlaces peptídicos. Puede ser bactericida o bacteriostático, dependiendo de la susceptibilidad
Novobiocina	NOV	Bacteriostático que interfiere en la síntesis de la pared bacteriana. Principalmente utilizado para infección de S. aureus e infecciones urinarias.
Linezolid	LZD	Nuevo antibiótico de la familia de las oxazolidionas que actúa inhibiendo la fase de iniciación de la síntesis proteica

(Fierro G. B., 2022)

2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

2.5.1 Tamaño de la muestra

Se calcularon 71 muestras de vacas lecheras por lo cual se emplea la siguiente fórmula con el fin de obtener resultados significativos y representativos en la población de interés.

$$n = \frac{Z^2 P(1 - P)}{d^2}$$

Donde:

Z es el nivel de confianza.

P es la prevalencia.

d es la precisión absoluta.

Para el cálculo:

Z= 1.96 nivel de confianza de 95%.

P= 24%.

d=0.1.

$$n = \frac{1.96^2 * 0.24 (1 - 0.24)}{0.1^2}$$

$$n = 71$$

En total se muestrearon 80 vacas lecheras que son las que se encontraban en producción en el momento de realizar la investigación de cualquier raza y edad, mayores a 5 años, alimentados con balanceado y cuyo diagnóstico de mastitis subclínica se realizó en el campo.

2.5.2 Diseño experimental

La investigación se desarrolló en 3 fases

En la primera fase se tomaron muestras de vacas lecheras realizando pruebas de CMT como también muestras a los ordeñadores por medio de un hisopado en los cornetes inferiores y colocando las muestras de vacas lecheras y ordeñadores en tubos esterilizados para ser transportados al laboratorio.

En la segunda da fase se realizaron pruebas de tipo de hemólisis y tinción gram por lo cual los consideramos como variables cualitativas al no presentar homogeneidad.

En la tercera fase se llevó a cabo pruebas bioquímicas como el de manitol salado, pruebas catalasa/coagulasa y antibiograma utilizando la prueba de Kruskal Wallis con una prueba Post Hoc de Dunn con el fin de observar las diferencias entre los grupos de antibióticos

2.6. METODOLOGÍA

Para el presente trabajo investigativo se utilizaron muestras de leche de 80 vacas lecheras en producción, las mismas que fueron sometidas a CMT para identificar los animales positivos a mastitis subclínica. Tras la prueba, 28 fueron positivas. a leche de estos animales fue llevada al laboratorio para aislamiento de *S.aureus* mediante una serie de pruebas bioquímicas, que se detallan a continuación. Al finalizar esta fase, se obtuvieron 12 muestras positivas *S. aureus*. Finalmente, se utilizaron estos aislados para construir el perfil de resistencia antibiótica mediante antibiograma por difusión en disco. Las muestras fueron conservadas y almacenadas a -20°C para futuras investigaciones en los Laboratorios de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato

2.6.1 Fase I. Toma de muestras

2.6.1.1 Prueba de California Mastitis Test

El reactivo C.M.T utilizado para la detección de mastitis subclínica pertenece a Laboratorios Life. Esta prueba inicia con la limpieza la ubre de la vaca con agua y su posterior secado con

papel periódico. Se descarta el primer chorro de leche (despunte) y se recolecta en la paleta de C.M.T cerca de 2ml a 3ml de leche de cada cuarto de la ubre y se agrega la misma cantidad del reactivo C.M.T a la leche recolectada. Finalmente se agita la paleta formando círculos hasta que el reactivo y la leche se mezclen interpretando la reacción de acuerdo con la siguiente tabla:

Tabla 6. Lectura de la reacción de C.M.T

<i>Grado</i>	<i>Interpretación</i>
<i>N</i>	Solución inalterada en estado líquido
<i>1 (+)</i>	No hay formación de gel, pero mayor precipitado
<i>2 (++)</i>	Precipitado denso y concentración en el centro
<i>3 (+++)</i>	Gel denso adherido a la paleta

(Life-Ecuador, 2022)

Al identificar el cuadrante afectado se tomó una muestra de 15 ml en un tubo estéril y se identificó cada una con el nombre y el cuadrante de la vaca. Se mantuvo en un cooler con hielo hasta llegar al laboratorio.

Se preparó previamente Agar Base Sangre en cajas Petri plásticas de suplementado con sangre ovina para permitir el crecimiento de microorganismos y la detección de hemolisis como un primer paso para el aislamiento e identificación de *S. aureus*.

2.6.1.2 Hisopado de los ordeñadores

1. Se leyó la carta de consentimiento a los ordeñadores y se solicitó su autorización para llevar a cabo el hisopado.
2. Se inclina hacia atrás la cabeza del ordeñador

3. Se introduce de 5 a 6 cm el hisopo con suma precaución desde el suelo hasta la fosa nasal.
4. Se verificó que el hisopo no haga resistencia y se realizó un giro de 10 a 15 seg en la fosa nasal.
5. Con precaución se retira el hisopo y se lleva en el tubo de transporte de la muestra. (Angulo, 2020).

2.6.1.3 Preparación de Agar Base Sangre

1. Se inicia con la esterilización de todo el material requerido en la autoclave a 120°C
2. Se pesó con la balanza analítica 21.2g de Agar Base Sangre y se disolvió en 500ml de agua destilada esterilizada en un matraz de 500ml o 1000ml con el fin de obtener un estimado de 15 placas Petri.
3. Se homogenizó la solución y se envió a la autoclave a 120 °C para esterilización.
4. Se colocó el matraz en el agitador magnético esperando que la solución llegue a una temperatura de entre 45-50°C.
5. Se agregó 5% de sangre de ovino desfibrinada estéril procurando que la sangre baje por el borde del matraz hacia la solución.
6. Se plaqueó inmediatamente en placas Petri estériles en una zona estéril ayudados por un mechero.
7. Se dejó reposar por 40 minutos hasta obtener un aspecto sólido
8. Se giró las placas por 15 minutos.

2.6.1.4 Siembra de la muestra en Agar Sangre

1. Se utilizó una micropipeta de 1000 ml para extraer 2ml de la muestra de leche previamente homogenizada colocándola en las cajas Petri con el Agar Sangre. Este procedimiento se realiza en una zona desinfectada y en un perímetro estéril alrededor del mechero, evitamos tocar la base de agar con la punta de la micropipeta y ubicamos la muestra no tan cerca a los bordes de la caja Petri.
2. Se esperó que la muestra se seque, alrededor de 5 a 6h.

3. Con ayuda del asa de siembra se estrió la muestra por cuadrantes en el sentido de las agujas de reloj y esterilizando el asa antes de continuar con otra muestra.
4. Se rotuló las cajas Petri con un marcador
5. Se voltearon las placas boca abajo.
6. Se llevó a la incubadora por 24h a 37°C.
7. Aquellas muestras β -Hemolítico positivas pasan a Tinción gram.

2.6.1.5 Tinción gram.

1. Después de 24 horas en la incubadora clasificamos las placas por la apreciación de hemolisis que se presentan con un halo transparente de color amarillo.
2. Con una pipeta se colocó una gota de agua destilada en el portaobjetos
3. Con el asa de siembra esterilizada en el mechero seleccionamos la mitad de la colonia que presentó hemolisis.
4. Se disgregó la colonia en el agua destilada
5. Se rotuló la muestra
6. Esperamos que la muestra seque por 20min.
7. Se agregó cristal violeta sobre la muestra esperando 1 minuto antes de lavar con agua destilada sin tocar directamente la muestra
8. Se agregó lugol aguardando 1 minuto y se lavó con agua destilada
9. Se agregó alcohol-acetona con el fin de eliminar el exceso de cristal violeta por 10 segundos y se lavó con agua destilada
10. Se agregó colorante safranina por 1 min y se lavó con agua destilada
11. Se observó las muestras secas con aceite de inmersión en el microscopio
12. Se discriminó las muestras que presenten bacilos gran negativos de *Staphylococcus* gran positivos.
13. Aquellas muestras positivas a tinción gram pasan a la siembra en Manitol Salado Agar

2.6.2 Fase II. Siembra en Manitol Salado Agar y prueba catalasa/coagulasa

2.6.2.1 Preparación de Manitol Salado Agar

1. Se pesó con la balanza analítica 55.5g de Manitol Salado Agar
2. Se disolvió en 500ml de agua destilada esterilizada en un matraz de 500ml o 1000ml con el fin de obtener un estimado de 15 placas Petri.
3. Se envió a la autoclave a 120 °C.
4. Se retiró de la autoclave y se esperó que la temperatura de la solución llegue entre 40 y 50°C.
5. Se plaqueó inmediatamente dentro de la zona estéril usando placas Petri estériles.
6. Se dejó reposar por 40 minutos hasta obtener un aspecto sólido
7. Se voltearon las placas por 15 minutos.

2.6.2.2 Siembra de Staphylococcus gram positivos en Manitol Salado Agar

1. Previamente se desinfectó la zona de trabajo y se encendió el mechero con el fin de trabajar dentro de un perímetro estéril.
2. Se usaron las cajas Petri de Agar Sangre que fueron clasificadas anteriormente y se recogió la otra mitad de la colonia con el asa de siembra esterilizada en el mechero.
3. Se sembró la colonia en Agar Manitol Salado estriando con ayuda del asa de siembra por cuadrantes en el sentido de las agujas de reloj, prosiguiendo cuadrante por cuadrante y esterilizando el asa antes de continuar con otra muestra.
4. Se rotularon las cajas Petri
5. Se incubaron boca abajo las muestras de Manitol Salado Agar por 24h a 37°C.
6. Aquellas muestras positivas a Manitol Salado Agar pasan a la prueba Catalasa

2.6.2.3 Prueba catalasa/coagulasa

Esta prueba se realizó en los agares que dieron positivo a Manitol es decir aquellas que cambiaron de color rojizo a color amarillo después de extraerlas de la incubadora.

2.6.2.4 Prueba catalasa

1. Se desinfectó previamente la zona de trabajo y se encendió el mechero con el fin de trabajar dentro de un perímetro estéril.
2. Se colocó una gota de agua oxigenada en un portaobjeto
3. Se juntó una muestra de las colonias en Manitol Salado por medio del asa de siembra esterilizada en el mechero.
4. Se colocó la muestra sobre la gota de agua oxigenada
5. Se esperó que la muestra reaccione produciendo espuma
6. Aquellas que produzcan espuma se clasificaron como positivas y se descartaron las muestras negativas.
7. Aquellas muestras positivas a la prueba a catalasa pasan a la prueba coagulasa.

2.6.2.5 Prueba coagulasa

Para realizar esta prueba necesitamos anticipadamente obtener sangre de bovino fresca recolectada en tubos estériles con el fin de llevarla a la centrifugadora y obtener plasma. (*Britania, 2020*).

1. Se dividió el portaobjetos en dos secciones la primera dirá control y la segunda prueba coagulasa
2. En la primera sección se agregó 1 ml de agua destilada
3. En la segunda sección se agregó 1ml de plasma
4. De las colonias en Manitol Salado positivo se eligieron colonias con el asa de siembra estéril
5. En el portaobjetos se colocó la colonia seleccionada sobre el agua destilada mezclándola y formando pequeños círculos.
6. Se esterilizó el asa de siembra
7. Se eligió una colonia del Manitol Salado y la colocamos sobre el plasma mezclándola en forma de círculos.

8. Se observó las muestras en busca de aglutinación en el plasma comparándola con la muestra control en agua destilada; el cual no aglutina. Registramos como prueba coagulasa positiva al visualizar aglutinación en plasma mas no en agua destilada.
9. Las muestras positivas a coagulasa son candidatas para continuar con el antibiograma.

2.6.2.6 Preparación de Agar Trypticasa Soya

1. Se pesó con la balanza analítica 55.5g de Agar Trypticasa Soya
2. Se disolvió en 500ml de agua destilada esterilizada en un matraz de 500 ml o 1000 ml con el fin de obtener un estimado de 15 placas Petri.
3. Se envió a la autoclave a 120 °C.
4. Se retiró de la autoclave y se esperó a que la temperatura de la solución llegue entre 40 y 50°C.
5. Se plaqueó inmediatamente dentro de la zona estéril usando placas Petri.
6. Se dejó reposar por 40 minutos hasta obtener un aspecto sólido
7. Se giraron las placas por 15 minutos.

2.6.2.7 Siembra en Agar Trypticasa Soya

De las muestras de Agar Manitol Salado positivas a coagulasa y catalasa sembramos en Agar Trypticasa Soya.

1. Se desinfectó la zona de trabajo y encendemos el mechero con el fin de trabajar dentro de un perímetro estéril.
2. Se tomaron la muestra del Agar Manitol Salado con palillos de madera esterilizados
3. Se sembró la colonia en Agar Trypticasa Soya estriando por cuadrantes en el sentido de las agujas de reloj, prosiguiendo cuadrante por cuadrante y quemando los palillos de madera antes ser desechados.
4. Se rotuló las cajas Petri
5. Se incubó boca abajo las muestras de Agar Trypticasa Soya por 24h a 37°C

2.6.3 Fase III. Medición de densidad óptica / antibiograma

2.6.3.1 Preparación de infusión Cerebro-Corazón

1. Se pesó con la balanza analítica 14g de infusión Cerebro Corazón
2. Se homogenizó en 500ml de agua destilada esterilizada en un matraz de 1000ml
3. Se llevó a la autoclave a 120 °C.
4. Se retiró de la autoclave, se esperó a que la temperatura de la solución disminuya hasta los 40-50°C.
5. Se descontaminó el área de trabajo y se encendió el mechero para realizar nuestras labores en un entorno libre de gérmenes.
6. Se extrajo con una micropipeta 5ml de caldo cerebro corazón y se depositó en tubos de ensayo esterilizados con sus respectivos tapones.

2.6.3.2 Muestras de Agar Tripticasa Soya a caldo Cerebro Corazón.

1. Se tomó una caja Petri de Agar Tripticasa Soya y con el asa de siembra estéril se seleccionaron varias colonias.
2. Se depositaron las colonias extraídas a los tubos de ensayo con caldo Cerebro-Corazón procurando desprender las colonias del asa de siembra para después taponarlas.
3. Se rotuló los tubos de ensayo colocándolos en la gradilla.
4. Se incubó las muestras por 3h a 37°C

2.6.3.3 Medición de densidad óptica

1. Se desinfectó el área y encendemos el mechero con el fin de trabajar en un perímetro estéril.
2. Se encendió el espectrofotómetro y se calibró a una longitud de onda de 600nm

3. Se usó como blanco una cubeta para espectrofotómetro con 1ml de caldo cerebro corazón estéril, se encendió el espectrofotómetro
4. Se retiró el blanco y lo encendimos cada 3 muestras de acuerdo vayamos balanceando las muestras
5. Se tomó un tubo de ensayo con la muestra en caldo cerebro corazón y se homogenizó con ayuda del Vortexer.
6. Se retiró el tapón y se extrajo con una micropipeta 1000ul de la muestra, depositándolo en una cubeta para espectrofotómetro.
7. Se midió la densidad óptica en el espectrofotómetro en un rango de concentración entre 0.450A a 0.550 A
8. A las muestras que sobrepasen los valores requeridos se agregó caldo cerebro corazón; a diferencia de las muestras que indiquen valores menores a los necesarios; en ese caso agregamos colonias de bacterias. Repitiendo el proceso hasta obtener el rango requerido.
9. Se rotuló las muestras equilibradas y las colocamos en otra gradilla para pasarlo al Agar Müller-Hilton.

2.6.3.4 Preparación de Agar Müller-Hilton

1. Se pesó con la balanza analítica 15.5g de Agar Müller-Hilton.
2. Se homogenizó en 400ml de agua destilada esterilizada en un matraz de 1000ml
3. Se llevó a la autoclave a 120 °C.
4. Se retiró de la autoclave y se esperó a que la temperatura de la solución llegue entre 40-50°C.
5. Se descontaminó el área de trabajo y se encendió el mechero para realizar nuestras labores en un entorno libre de gérmenes.
6. Se vertió el Agar en las cajas Petri esperando 20 minutos a que tengas una apariencia sólida.
7. Se ubicaron las cajas Petri boca abajo con Agar Müller-Hilton

2.6.3.5 Antibiograma

1. Se desinfectó el área y se encendió el mechero con el fin de trabajar en el perímetro estéril.
2. Se tomó las cajas Petri con Müller-Hilton y agregamos 100 ul de la muestra balanceada anteriormente.
3. Se extendió con ayuda de un hisopo esterilizado en toda la superficie del agar y se esperó que seque por 20 minutos.
4. Se agregó el blanco en cada una de las cajas Petri de Müller-Hilton.
5. Se agregó los antibióticos con mucho cuidado de manera equidistante.
6. Se rotuló y se apiló en grupos de 6.
7. Incubamos por 18h a 37°C.

2.6.3.6 Lectura del antibiograma

Para realizar la lectura nos basamos en las concentraciones registradas por la Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)

Tabla 7. Perfil de sensibilidad a los antibióticos de Staphylococcus áureas

Antibiótico	Simbología	Sensible	Intermedio	Resistente
Gentamicina	<i>CN</i>	≥ 15	<i>13-14</i>	≤ 12
Cloranfenicol	<i>C</i>	≥ 18	<i>13-17</i>	≤ 12
Rifampicina	<i>RD</i>	≥ 20	<i>17-19</i>	≤ 16
Clindamicina	<i>DA</i>	≥ 21	<i>15-20</i>	≤ 14
Novobiocina	<i>NOV</i>	≥ 16	----	≤ 15
Linezolid	<i>LZD</i>	≥ 21	----	≤ 20

Fuente: (Institute, 2022)

2.7 VARIABLE RESPUESTA

2.7.1 Cuantitativa

Se califican cepas de *S. aureus* como (S) Sensibles, (I) Intermedia, (R) Resistente, a partir de la extensión de los halos presentes y comparando con valores de referencia de Clinical and Laboratory Standards Institute.

2.7.2 Cualitativa

Pruebas bioquímicas

Manitol:

Es un medio de cultivo selectivo el cual actúa en la detección de *S. aureus*; constituido por Pluripeptona y extracto de carne rico en carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales; al ser alto en NaCl inhibe la flora acompañante siendo el rojo fenol el indicador de pH

- *Staphylococcus coagulasa positiva* van a acidificar el medio de cultivo y las colonias se presentarán de color amarillo brillante
- *Staphylococcus coagulasa negativa* presentaran las colonias de zonas de color rojo o purpura. (Gaibor, 2019)

Catalasa:

Determinar la ausencia o presencia de catalasa nos permite diferenciar *Staphylococcus* de *Streptococos*, siendo los primeros coagulasa positivos y los segundos catalasa negativa. Para realizar esta prueba colocamos la colonia en estudio en el portaobjetos y soltamos una gota de peróxido de hidrógeno dando como resultado la formación de burbujas al ser coagulasa positiva. (Lopez, 2019)

Coagulasa:

La prueba que nos permite determinar la presencia de staaphylocoagulasa extracelular que al actuar con la protrombina produce la formación de coágulos en el plasma. Se requiere plasma

fresco bovino el cual al mezclarlos va a reaccionar formando aglutinación marcándola como prueba coagulasa positiva.

2.8 Procesamiento de datos

Los resultados obtenidos durante la presente investigación se registraron en una base de datos en Microsoft Excel® 2016 y procesaron en el programa estadístico infoStat; para comparar la sensibilidad de las bacterias aisladas a los diferentes antibióticos se realizó la prueba de Kruskal Wallis ya que los datos no siguen una distribución normal.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizaron pruebas de California Mastitis Test a 80 vacas lecheras de 3 hatos diferentes durante los ordeños de la mañana (04:30 Am) en el cantón Quero parroquia Yanayacu-Mochapata, provincia de Tungurahua, Caserío 12 de Octubre. En la tabla 8, se han identificado 28 muestras de vacas lecheras positivas a mastitis subclínica después de someterse a las correspondientes pruebas de C.M.T. Las muestras positivas fueron cultivadas en agar sangre como pre-enriquecimiento y para detección de bacterias β -hemolíticas., Se realizaron tres repeticiones por cada muestra. Debido a este proceso se excluyen 2 muestras (Dos, 193) debido a su incapacidad de los microorganismos presentes de producir hemólisis, lo que resulta en 26 muestras con Beta hemólisis (92%). Las muestras Betahemolíticas estas fueron sometidas a un descarte adicional mediante tinción Gram, excluyendo 5 muestras (Visan, Seis, Ojos de sapo, Vaca y Llumi) por la presencia de bacilos gram positivos las que se caracterizan por formar largas cadenas a diferencia de los Staphylococcus que se forman en racimos parecido a las uvas como se aprecia en el Anexo 7. Esto conduce a un total de 21 muestras, que representan el 75% del conjunto original

3.1 Tipo de hemolisis y tinción gram en vacas lecheras

Tabla 8. Prueba de hemolisis y tinción gram en vacas lecheras

<i>Muestras</i>	<i>Tipo de hemólisis</i>		<i>Tinción Gram</i>	
	<i>Γ-Hemolítico</i>	<i>β-Hemolítico</i>	<i>Bacilos Gram</i>	<i>positi Cocos gran positiv</i>
<i>Gila</i>		X		X
<i>Vaca</i>		X	X	
<i>Llumi</i>		X	X	
<i>Chola</i>		X		X
<i>Lupe</i>		X		X
<i>Sofía</i>		X		X
<i>Yeye</i>		X		X
<i>Gala</i>		X		X
<i>Negra</i>		X		X
<i>Roberta</i>		X		X
<i>Guila</i>		X		X
<i>Ojos de sapo</i>		X	X	
<i>Cinco</i>		X		X
<i>Pistón 56</i>		X		X
<i>Dos</i>	X			
<i>Seis</i>		X	X	
<i>Uno</i>		X		X
<i>Siete</i>		X		X
<i>Brown Swiss</i>		X		X
<i>Café</i>		X		X
<i>193</i>	X			
<i>853</i>		X		X
<i>Visan</i>		X	X	
<i>Manzana 51</i>		X		X
<i>Tigrilla</i>		X		X
<i>Elisa</i>		X		X
<i>Silvia</i>		X		X
<i>2508</i>		X		X
<i>Casos negativos</i>	2		5	
TOTAL	28	26		21

3.2 Pruebas bioquímicas en vacas lecheras

Las 21 muestras anteriormente descritas se sometieron a pruebas bioquímicas adicionales, mismas que se describen en la tabla 9. Después de la siembra en manitol salado se descartan 7 muestras en manitol (Yeye, 853, Guila Tigrilla, Uno, Elisa, Café) al no presentar cambio de color a amarillo al ser incubado, como se aprecia en el Anexo 8. Este cambio de color es resultado de una acidificación del medio de cultivo rico en NaCl, resultando un total de 14 muestras que representa el 50%. A continuación, se realizó la prueba catalasa resultando cero muestras negativas. Al ser fusionadas las bacterias con peróxido de hidrógeno, actuará la enzima catalasa, hallada en una gran mayoría de bacterias anaerobias y aerobias que encierran citocromo oxidasa. Finalmente se realizó la prueba de coagulasa en donde nos resultan dos muestras negativas (Brown Swiss y Chola) al ser mezclada con el plasma sanguíneo y no presentar aglutinación. Finalmente, tras estos ensayos, se confirma la presencia de *S. aureus* en 12 muestras, que representan el 42% de las muestras positivas a mastitis subclínica. Estas muestras se utilizaron para la realización del antibiograma.

Tabla 9. Pruebas bioquímicas a vacas lecheras

Muestras	Manitol		Catalasa		Coagulasa	
	Rojo negativo	Amarillo positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
Gila		X	-	X		X
Vaca			-			
Llumi			-			
Chola		X	-	X	X	
Lupe		X	-	X		X
Sofía		X	-	X		X
Yeye	X		-			
Gala		X	-	X		X
Negra		X	-	X		X
Roberta		X	-	X		X
Guila	X		-			
Ojos de sapo			-			
Cinco		X	-	X		X
Pistón 56		X	-	X		X
Dos			-			
Seis			-			
Uno	X		-			
Siete		X	-	X		X
Brown Swiss		X	-	X	X	
Cafè	X		-			
193			-			
853	X		-			
Visan			-			
Manzana 51		X	-	X		X
Tigrilla	X		-			
Elisa	X		-			
Silvia		X	-	X		X
2508		X	-	X		X
Casos negativos	7		0		2	
TOTAL		14		14		12

3.3 Antibiograma y resultados en muestras en vacas lecheras

Tabla 10. Sensibilidad y resistencia de *Staphylococcus aureus* en vacas lecheras

<i>Muestras</i>	<i>Antibióticos</i>					
	<i>CN</i>	<i>C</i>	<i>RD</i>	<i>DA</i>	<i>NOV</i>	<i>LZD</i>
<i>Gila</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>
<i>Lupe</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>
<i>Sofia</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>
<i>Roberta</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>
<i>Pistón</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>
<i>Gala</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>
<i>Cinco</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>I</i>	<i>R</i>	<i>R</i>
<i>Siete</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>
<i>Negra</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>R</i>	<i>S</i>	<i>S</i>
<i>2508</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>R</i>	<i>S</i>
<i>Manzana</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>I</i>	<i>R</i>	<i>R</i>
<i>Silvia</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>

*CN=Gentamicina, C=Cloranfenicol, RD=Rifampicina, DA=Clindamicina, NOV=Novobiocina, LZD=Linezolid, S= Sensible, I=Intermedio, R=Resistente. Halos de inhibición en mm, de acuerdo con Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

CN: S: <=12 I: 13-14. R: >=15. **C:** S: >=18 I: 13-17 R: <=12. **RD:** S: <=16 I: 17-19 R: >=20. **DA:** S: <=14. I: 15-20. R: >=21.

NOV: S: <=15 I: --- R: >=16. **LZD:** S: <=20 I: --- R: >=21.

La tabla 10 muestra los resultados obtenidos de los ensayos de sensibilidad de *S. aureus* frente a los distintos antibióticos empleados, presentándose sensibles en la mayoría de los casos; sin embargo, podemos apreciar resistencia en la muestra identificada como Cinco a la Novobiocina y al Linezolid e intermedio con la Clindamicina. Presentan también resistencia la muestra denominada Negra frente a la clindamicina y la muestra 2508 resistencia a la novobiocina. Finalmente, Manzana presentó intermedia a clindamicina, resistente a la novobiocina y resistente al linezolid.

CN=Gentamicina, C=Cloranfenicol, RD=Rifampicina,
 DA=Clindamicina, NOV=Novobiocina, LZD=Linezolid

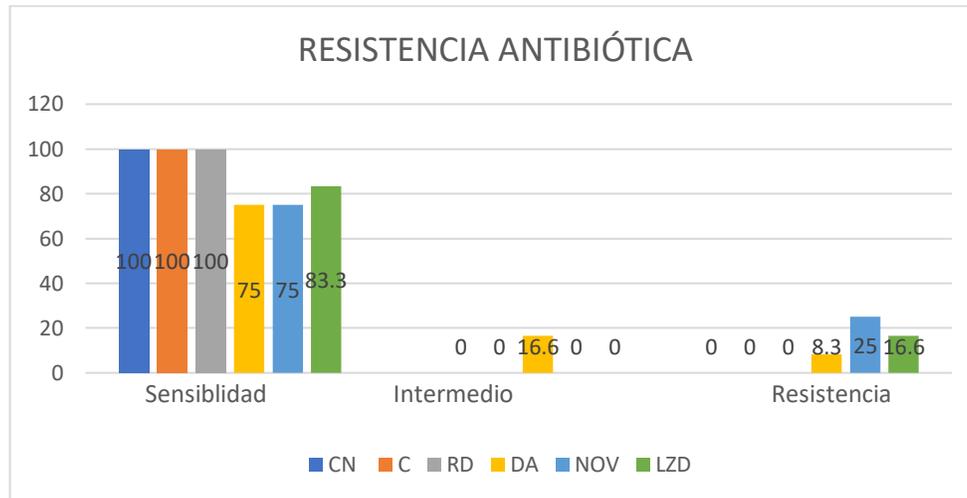


Figura 1. Resistencia antibiótica por *Staphylococcus aureus* en vacas lecheras.

En la **Figura 1.** se presenta el porcentaje de colonias que resultaron sensibles intermedios y resistentes a los antibióticos en estudio, se aprecia que la gentamicina, cloranfenicol y rifampicina representan una susceptibilidad del 100% a diferencia de la clindamicina que presenta el 8.3% de resistencia y el 16.6% de resistencia intermedia, el linezolid represento el 16.6% de resistencia y la novobiocina que presenta una resistencia del 25% y una susceptibilidad del 75%.

Procesados los datos se organizan las cepas obtenidas iniciando desde los antibióticos de mayor susceptibilidad hasta los de mayor hasta el de menor resistencia.

Tabla 11. Cantidad de cepas sensibles, intermedio y resistentes en vacas lecheras

Antibióticos	Simbología	Sensible	Intermedio	Resistente
Gentamicina	CN	12/12 (100%)	0/12(0%)	0/12(0%)
Cloranfenicol,	C	12/12 (100%)	0/12(0%)	0/12(0%)
Rifampicina,	RD	12/12(100%)	0/12(0%)	0/12(0%)
Clindamicina,	DA	9/12 (74.9%)	2/12(16.6%)	1/12(8.3%)
Novobiocina	NOV	9/12(75%)	0/12(0%)	3/12(25%)
Linezolid	LZD	10/12(83.3%)	0/12 (0%)	2/12(16.6%)

Los datos descritos en la tabla 11 nos indican la baja cantidad de cepas de *S. aureus* multirresistentes lo que resulta ser un género altamente sensible mostrando sensibilidad del 100% hacia la gentamicina, cloranfenicol y rifampicina a diferencia de la clindamicina que describe 9 cepas sensibles (74.9%), 2 cepas de resistencia intermedia (16.6%) y tan sola 1 cepa resistente (8.3%). La novobiocina presento resistencia en 3 cepas (25%) y el linezolid representa sensibilidad en 10 cepas (83.3%) y en 2 cepas (16.6%)

Según Aliverti F1, (2021) los resultados obtenidos en nuestra investigación se encuentran sustentado, ya que en su estudio evalúa 44 cepas de *S. aureus* dando como resultados 2.27% de cepas resistentes a la clindamicina, es decir representan a tan solo 1 cepa y, por otro lado; todas las cepas evaluadas en este estudio fueron sensibles a la rifampicina. Otro estudio realizado por (*Pellegrino M. F., 2011*) evalúa 63 cepas de *S. aureus* de los cuales todas las cepas aisladas presentaron sensibilidad a la gentamicina y rifampicina como en la presente investigación, cabe destacar que en estos dos estudios el número de cepas es mayor al de esta investigación pero no representan mayor diferencia a nivel estadístico, finalmente investigaciones realizadas por (*Kutchynskaya Valero-Leal 1*, 2011*)

muestra que de 81 cepas aisladas de *S. aureus* el cloranfenicol, al igual que nuestro estudio representa 100% de sensibilidad; de la misma investigación la gentamicina presenta de 81 cepas 100% de sensibilidad; sin embargo, la clindamicina a diferencia de nuestro estudio que representa 1 cepa resistente, en la investigación representa 2 cepas resistentes siendo aun así un número bastante bajo acercándonos al estudio en cuestión. Por otro lado, distinto a nuestros resultados la rifampicina de 81 cepas 79 son sensibles es decir 2 muestras presentan resistencia (2.5%)

Tabla 12. Comparación de sensibilidad a diferentes antibióticos en vacas lecheras

Antibiótico	Diámetro (mm)	Interpretación
Gentamicina	24.0 ± 2.5^A	SENSIBLE
Cloranfenicol	24.6 ± 2.7^A	SEINSIBLE
Rifampicina	29.2 ± 2.0^A	SENSIBLE
Clindamicina	25.2 ± 3.5^A	SENSIBLE
Novobiocina	24.1 ± 4.2^A	SEINSIBLE
Linezolid	21.1 ± 2.0^A	SENSIBLE

Los promedios que se identifican con la misma letra son idénticas según la prueba de Kruskal Wallis para $p < 0.05$ esta prueba nos permite utilizar datos que no se ajustan a una distribución normal. Ver Anexo 13 Análisis estadístico Kuskal Wallis en vacas lecheras para los resultados del programa.

Se hizo una prueba de Kruskal Wallis con una prueba Post Hoc de Dunn para ver las diferencias entre los grupos $p\text{-value} < 0.05$ en donde me indican diferencia significativa entre las sensibilidades a los antibióticos primero entre la Gentamicina y la Novobiocina con un $p\text{-value} < 0.02$ También el cloranfenicol y clindamicina $p\text{-value} < 0.02$ y el rifampicina y clindamicina con $p\text{-value} < 0.02$.

3.4 Tipo de hemólisis y tinción gram en ordeñadores

Tabla 13. Prueba de hemólisis y tinción gram a ordeñadores

<i>Muestras</i>	<i>Tipo de hemólisis</i>		<i>Tinción Gram</i>	
	<i>γ-Hemolítico</i>	<i>β-Hemolítico</i>	<i>Bacilos Gram positivos</i>	<i>Cocos Gram positivos</i>
<i>Henry Velasco</i>	-	X	-	X
<i>Judith Arévalo</i>	-	X	-	X
<i>Daysi Villacis</i>	-	X	-	X
<i>Ismael Villacis</i>	-	X	-	X
<i>Miriam Coba</i>	-	X	-	X
<i>Casos negativos</i>	0		0	
<i>Total</i>	5	5		5

Para los ordeñadores se tomaron las muestras por tres ocasiones como se describe en la tabla 12 sin presentar ningún caso negativo de hemólisis manteniendo cinco muestras; del mismo modo la prueba de tinción gram describe un total de cinco muestras positivas a cocos gram positivas sin descartan ninguna de las muestras.

3.5 Pruebas bioquímicas en ordeñadores

Tabla 14. Pruebas bioquímicas a ordeñadores.

Muestras	Manitol		Catalasa		Coagulasa	
	Rojo negativo	Amarillo positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
Henry Velasco	-	X	-	X	-	X
Judith Arévalo	-	X	-	X	-	X
Daysi Villacis	-	X	-	X	-	X
Ismael Villacis	-	X	-	X	-	X
Miriam Coba	-	X	-	X	-	X
<i>Casos negativos</i>	0		0		0	
<i>Total</i>		5		5		5

Se presentan cero casos negativos al agar manitol y en las pruebas catalasa/coagulasa todas las muestras fueron positivas con un total de 5 muestras de ordeñadores resultando el 100% del total de las muestras.

3.6 Antibiograma y resultados en ordeñadores.

Tabla 15. Sensibilidad y resistencia de *Staphylococcus aureus* en hisopado de ordeñadores

<i>Muestras</i>	<i>Antibióticos</i>					
	<i>CN</i>	<i>C</i>	<i>RD</i>	<i>DA</i>	<i>NOV</i>	<i>LZD</i>
<i>Henry Velasco</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>I</i>	<i>R</i>	<i>R</i>
<i>Judith Arévalo</i>	<i>R</i>	<i>I</i>	<i>R</i>	<i>R</i>	<i>R</i>	<i>R</i>
<i>Daysi Villacis</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>R</i>	<i>R</i>	<i>R</i>	<i>R</i>
<i>Ismael Villacis</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>R</i>
<i>Miriam Coba</i>	<i>R</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>R</i>	<i>S</i>	<i>R</i>

*CN=Gentamicina, C=Cloranfenicol, RD=Rifampicina, DA=Clindamicina, NOV=Novobiocina, LZD=Linezolid, S= Sensible, I=Intermedio, R=Resistente. Halos de inhibición en mm, de acuerdo con Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **CN:** S: <=12 I: 13-14. R: >=15. **C:** S: >=18 I: 13-17 R: <=12. **RD:** S: <=16 I: 17-19 R: >=20. **DA:** S: <=14. I: 15-20. R: >=21. **NOV:** S: <=15 I: --- R: >=16. **LZD:** S: <=20 I: --- R: >=21.

En la tabla 15 observamos los resultados del antibiograma en los ordeñadores, en la primera muestra observamos un caso intermedio a la clindamicina y resistencia a la novobiocina y el linezolid; siendo sensibles a la gentamicina, cloranfenicol y rifampicina. En el segundo caso solamente intermedio al cloranfenicol y resistente a la gentamicina, rifampicina, clindamicina, novobiocina y al linezolid. En la tercera muestra observamos resistencia a la rifampicina, clindamicina, novobiocina y al linezolid y sensible tan solo a la gentamicina y al cloranfenicol. En el siguiente caso encontramos sensibilidad a la mayoría de los antibióticos empleados a excepción del linezolid que presenta resistencia, Finalmente registramos resistencia a la gentamicina, clindamicina y linezolid y sensibilidad al cloranfenicol, rifampicina y linezolid.

CN=Gentamicina, C=Cloranfenicol, RD=Rifampicina,
 DA=Clindamicina, NOV=Novobiocina, LZD=Linezolid

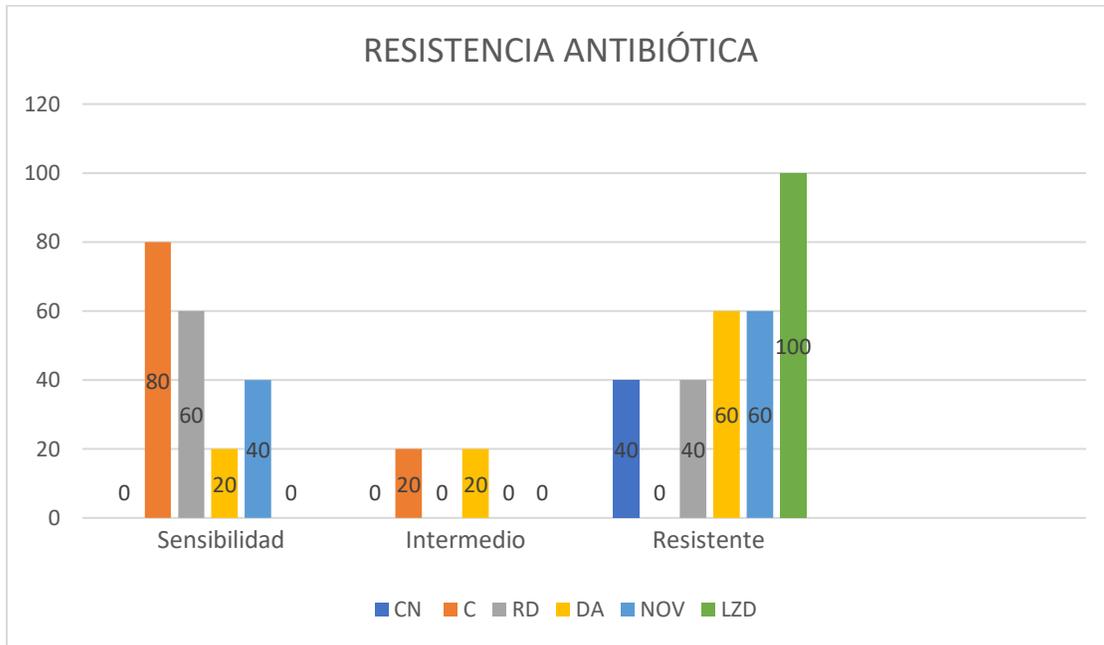


Figura 2. Resistencia antibiótica por *Staphylococcus aureus* en ordeñadores

En la figura 2 podemos observar los porcentajes del antibiograma en ordeñadores, estos resultados demuestran una menor susceptibilidad a obtenidos anteriormente. La gentamicina representa una susceptibilidad del 60% y resistencia del 40%, el cloranfenicol una susceptibilidad del 80% y resistencia intermedia del 20%, la rifampicina susceptibilidad del 60% y resistencia del 40%, la clindamicina es susceptible en un 20%, intermedio 20% y resistente el 60%, la novobiocina representa susceptibilidad en el 40% y resistencia al 60% y finalmente el linezolid que representa resistencia al 100%. Los resultados en ordeñadores demuestran una resistencia a los antibióticos mayor a resultados obtenidos anteriormente, ordenándolos de mayor a menor: linezolid 100%, novobiocina 60%, rifampicina 40%, gentamicina 40%, rifampicina 40%.

Tabla 16. Cantidad de cepas sensibles, intermedio y resistentes en ordeñadores.

Antibióticos	Simbología	Sensible	Intermedio	Resistente
Gentamicina	CN	3/5 (60%)	0/5(0%)	2/5(40%)
Cloranfenicol,	C	4/5 (80%)	1/5(20%)	0/5(0%)
Rifampicina,	RD	3/5(60%)	0/5(0%)	2/5(40%)
Clindamicina,	DA	1/5 (20%)	1/5(20%)	3/5(60%)
Novobiocina	NOV	1/5(20%)	1/5(20%)	3/5(60%)
Linezolid	LZD	0/5(0%)	0/5(0%)	5/5(100%)

La tabla 15 describe el número de cepas que resultaron resistentes a los cinco antibióticos, principalmente se destaca el linezolid en donde las 5 cepas de *S. aureus* fueron resistentes, seguidos por la novobiocina y la clindamicina con 3 cepas resistentes respectivamente, rifampicina y gentamicina con 2 cepas resistentes cada una y finalmente el cloranfenicol sin ninguna cepa resistente.

Se realizó una prueba de Kruskal Wallis con una prueba Post Hoc de Dunn para ver las diferencias entre los grupos p-value < 0.05 en donde se indica diferencia significativa entre las sensibilidades a los antibióticos en ordeñadores: cloranfenicol y linezolid con un p-value < 0.02.

Tabla 17. Comparación de sensibilidad a diferentes antibióticos en ordeñadores

Antibiótico	Diámetro (mm)	Interpretación
Gentamicina	14.6 ± 5.7 ^A	INTERMEDIO
Cloranfenicol	19.9 ± 0.6 ^A	SENSIBLE
Rifampicina	20.8 ± 4.5 ^A	SENSIBLE
Clindamicina	16.1 ± 6.0 ^A	INTERMEDIO
Novobiocina	18.4 ± 5.6 ^A	SENSIBLE
Linezolid	17.7 ± 3.2 ^B	RESISTENTE

Rangos promedios que no compartan la misma letra indica diferencia de sensibilidad de acuerdo con la prueba de Kruskal Wallis para $p < 0.05$. Esta prueba nos permite analizar datos que no se ajustan a una distribución normal. Ver Anexo 14 Análisis estadístico Kuskal Wallis en ordeñadores para los resultados del programa.

El perfil del *Staphylococcus aureus* asilados en esta investigación tanto en vacas lecheras como en el personal de ordeño corresponden a la familia Staphylococcaceae, de naturaleza gram positiva y tienen una forma esférica, pudiendo agruparse en parejas, cadenas o racimos. Tienen un tamaño que varía entre 0,8 y 1,5 micrómetros (μm) de diámetro y carecen de movimiento propio. Algunas cepas tienen la capacidad de producir una cápsula externa mucosa que incrementa su capacidad para causar infecciones. En cuanto a su metabolismo, son anaerobios facultativos y dan positivo a la prueba coagulasa y catalasa positivas.

3.4 Verificación de hipótesis

De acuerdo con los resultados obtenidos y evaluados en el trabajo de investigación se confirma que las cepas de *Staphylococcus aureus* evaluadas y las muestras del personal de ordeño presentaron resistencia a los antibióticos: clindamicina, gentamicina, rifampicina, novobiocina, cloranfenicol y linezolid.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

- Se aislaron 12 muestras de *Staphylococcus aureus* a partir de muestras de leche obtenidas de vacas lecheras y 5 muestras aisladas de *Staphylococcus aureus* a partir de secreciones del personal de ordeñado obtenidas por medio de un hisopado nasal
- Se corrobora por medio de pruebas bioquímicas de manitol salado y pruebas coagulasa/catalasa que las bacterias aisladas de *Staphylococcus aureus* corresponden al 42% (12/28) del total de las muestras obtenidas.
- Las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas en vacas lecheras presentan resistencia a la Novobiocina, Linezolid y Clindamicina y en ordeñadores representan resistencia al Linezolid y la Novobiocina.

4.2 Recomendaciones

- Se recomienda principalmente utilizar protocolos de higiene al momento del ordeño que permitan mantener las buenas prácticas sanitarias con el uso de presellador como también el mantenimiento y limpieza de las maquinas ordeñadoras después de su uso.
- No fomentar ni utilizar antibióticos de manera imprudente sin los pertinentes exámenes y bajo la guía de un médico veterinario competente.
- Se recomienda realizar pruebas moleculares y de secuenciación para confirmar que los clones aislados entre ordeñadores y vacas lecheras sean las mismas

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aliverti F1, L. M. (2021). SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE Staphylococcus aureus AISLADOS DE VACAS HOLSTEIN PORTADORAS DE MASTITIS SUBCLÍNICA EN LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES, ARGENTINA. *San Luis: Laboratorio de Estudios Farmacológicos y Toxicológicos, Facultad de Ciencias Veterinarias. Obtenido de chrome-extension://efaidnbmnnnibpajpcglclefindmkaj/https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/169878/CONICET_Digital_Nro.357717f9-3a44-4f6d-8c01-b7bce6d6b0d8_B.pdf?sequence=2&isAllowed=y*
- Álvarez, M. F. (2022). Ecología de las bacterias que ocasionan mastitis subclínica bovina en la Sabana de Bogotá. *Bogotá: Universidad de La Salle, Bogota. Obtenido de https://ciencia.lasalle.edu.co/doct_agrociencias/13/*
- Angulo, C. M. (2020). Toma de muestras nasofaríngeas para diagnóstico de COVID-19. *Cantabria: Scielo. Obtenido de https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2444-79862020000400001*
- Britania, L. (2020). Manitol Salado Agar. CABA: Britania. Obtenido de chrome-extension://efaidnbmnnnibpajpcglclefindmkaj/https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_607073c954fa9.pdf
- Cobirka, M. (2020). Epidemiology and Classification of Mastitis. *Zemedelska: MDPI. doi:https://doi.org/10.3390/ani10122212*
- Earth, G. (2023). Coordenadas. Chimborazo. Obtenido de <https://www.google.com/maps/place/1%C2%B029'13.2%22S+78%C2%B042'09.5%22W/@-1.4879575,-78.7070365,18z/data=!4m4!3m3!8m2!3d-1.4869864!4d-78.7026427?hl=es&entry=ttu>
- Fernandez. (2012). Adaptive and Mutational Resistance : Role of Porins and Efflux Pumps in Drug Resistance. *Brooklin: Clinical Microbiology. doi:https://doi.org/10.1128/CMR.00043-12*
- Fernández Bolaños, O. F. (2012). Mastitis Bovina: Generalidad y Métodos de Diagnosticos. *Florencia: Universidad de La Amazonia. Obtenido de chrome-extension://efaidnbmnnnibpajpcglclefindmkaj/https://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_leche/78-mastitis.pdf*
- Fierro, G. B. (2022). *Vedemecun Veterianrio (Decimo sexto ed., Vol. Decimo sexto). Guayaquil: Edifarm.*
- Fierro, N. (2015). Manual De Mastitis. *Zamora Chinchipe: Scielo. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/304825982_Manual_de_mastitis*
- Franco Meza, F. C. (2020). PREVALENCIA Y PERFIL DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DE BACTERIAS CAUSANTES DE MASTITIS AISLADAS EN LECHE CRUDA BOVINA EN UN ESTABLECIMIENTO DE LA LOCALIDAD DE SHOENWEIDE DEL DEPARTAMENTO DE PRESIDENTE HAYES – PARAGUAY. *Asunción: UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS. Obtenido de chrome-extension://efaidnbmnnnibpajpcglclefindmkaj/https://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/124897/Documento_completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y*
- GAD. (2022). Cevallos. *Cevallos: GAD . Obtenido de http://www.cevallos.gob.ec/*
- Gaibor, F. (2019). Agar manitol salado. *Slideshare. Obtenido de https://es.slideshare.net/FridaGuzman2/agar-manitol-salado*
- Garzón, P. (2019). Staphylococcus aureus: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular. *Scielo. Obtenido de https://www.google.com/search?q=staphylococcus+aureus+pdf&sca_esv=577490029&rlz=1C1CHB D_esEC929EC929&sxsrf=AM9HkKmJPs8Gpl0SKd0R5kMq0jliPtMQsA%3A1698527393477&ei=oXg9ZerIHNamqtsPhI60gA0&ved=0ahUKEwiqnbfp05mCAxVWk2oFHQQHDdAQ4dUDCBA&uact=5&oaq=staphylococcus+*
- González, E. G. (2011). Correlación de los métodos California Mastitis Test (CMT), Conductividad Eléctrica (CE) y Conteo de Células Somáticas (CCS) en el laboratorio de calidad de leche de la UPS. *Cayambe: UPS. Obtenido de chrome-extension://efaidnbmnnnibpajpcglclefindmkaj/https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/10852/1/Correlacion%20de%20los%20metodos%20California%20Mastitis%20Test%20CMT%20Condutividad%20electrica%20CE%20y%20Conteo%20de%20Celulas%20Somaticas%20CCS%*

- GUZMAN, M. B. (1984). El antibiograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby Bauer. *Biomedica*.
Obtenido de file:///C:/Users/SamejHP/Desktop/Nueva%20tesis/Igomez,+vol4no3y4_Parte5.pdf
- Herencia, D. S. (2022). Mastitis subclínica bovina y factores de riesgo ambientales en pequeños productores de ganado lechero criado en alta montaña. *Cusco: Scielo*. Obtenido de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1609-91172022000100021&script=sci_arttext
- Holko, I. (2020). Prevalence and antimicrobial susceptibility of. *Slovakian: Cambridge University press*.
Obtenido de <https://doi.org/10.1017/S0022029919000694>
- INHAMI. (2023). Anuario meteorológico. *Guayaquil: INHAMI*.
- INHAMI. (2023). Características meteorológicas. *Chimborazo: Gobierno del Ecuador*. Obtenido de <https://www.inamhi.gob.ec/>
- Institute, C. a. (2022). Antibiotics. Obtenido de <https://clsi.org/about/>
- Jiménez Velásquez, T. H. (2020). Perfil de resistencia antimicrobiana en aislamientos de *Staphylococcus* spp. obtenidos de leche bovina en Colombia. *Medellín: Revista Argentina de Microbiología*. Obtenido de <https://medes.com/publication/153684>
- Justino, M. (2016). Patología clínica bovina recopilación de las clases y relatos de la experiencia práctica de un veterinario de campo (Primera ed.). *Buenos Aires: Inter-médico*.
- Kutchynskaya Valero-Leal 1*, Y. O. (2011). SUSCEPTIBILIDAD A LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS EN CEPAS DE *Staphylococcus aureus* AISLADAS EN LECHE DE BOVINOS CON MASTITIS SUBCLÍNICA Y LECHE DE TANQUE. *Marcaibo: Scielo*. Obtenido de https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592010000400006
- Life-Ecuador, L. (2022). California Mastitis Test. *Quito: Laboratorios Life*. Obtenido de https://www.life.com.ec/upcp_product/c-m-t/
- Lopez, I. S. (2019). El tema de la catalasa en los diferentes niveles de enseñanza y aprendizaje. *Puebla: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla*. Obtenido de [file:///C:/Users/SamejHP/Desktop/Nueva%20tesis/265-Texto%20del%20art%C3%ADculo-1108-1-10-20150116%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/SamejHP/Desktop/Nueva%20tesis/265-Texto%20del%20art%C3%ADculo-1108-1-10-20150116%20(1).pdf)
- Lucas, M., Buldain, D. C., Marchetti, M. L., & Mestorino, O. N. (2021). Susceptibilidad antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* aislados de vacas Holstein portadoras de mastitis subclínica en la provincia de Buenos Aires, Argentina. *CABA: Universidad Católica de Cuyo. Facultad de Ciencias Veterinarias*. Obtenido de [Susceptibilidad antimicrohttps://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/169878](https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/169878)
- Maldonado-Arias, D. F.-C. (2022). Diagnóstico de Mastitis Subclínica Mediante Tres Métodos para el Control y Tratamiento en Bovinos de Leche Holstein. *Riobamba: ESPOCH*. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8383375>
- Medrano-Galarza, C. (2020). Prevalencia, incidencia y factores de riesgo de mastitis subclínica en lecherías especializadas en Colombia. *Tibaitatá: Universidad de Costa Rica*. Obtenido de chrome-extension://efaidnbmnnnibpajpcglclefindmkaj/https://www.mag.go.cr/rev_mesov32n02_487.pdf
- Oliveira, R. P. (2022). Diversidad y aparición de *Staphylococcus* spp multirresistentes . aislado de mastitis subclínica en vacas del estado de Piauí, Brasil. *Piauí: Revista brasileña de microbiología*. Obtenido de <https://link.springer.com/article/10.1007/s42770-022-00822-1>
- Padilla, C. A. (2020). RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN BACTERIAS CAUSANTES DE MASTITIS BOVINA. *Fusagassu: Universidad de Cundinamarca Facultad de Ciencias Agropecuarias Programa de zootenia* . Obtenido de <chrome-extension://efaidnbmnnnibpajpcglclefindmkaj/https://repositorio.ucundinamarca.edu.co/bitstream/handle/20.500.12558/3458/CARLOS%20ANDR%C3%89S%20RIOS%20PADILLA.pdf?sequence=2&isAllowed=y>
- Palacio, N. R.-S. (2016). Tasa de incidencia de mastitis clínica y susceptibilidad antibiótica de patógenos productores de mastitis en ganado lechero del norte de Antioquia, Colombia. *Antioquia: Scielo*. doi:<http://dx.doi.org/10.19052/mv.5173>
- Pellegrino. (2021). Mastitis Bovina: Resistencia a antibióticos de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de leche. *Malaga: REDVET*. Obtenido de <chrome-extension://efaidnbmnnnibpajpcglclefindmkaj/https://www.redalyc.org/pdf/636/63622567006.pdf>

- Pellegrino, M. F. (2011). Mastitis Bovina: Resistencia a antibióticos de cepas de Staphylococcus aureus aisladas de leche. Cordoba: Redvet. Obtenido de chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.redalyc.org/pdf/636/63622567006.pdf*
- Pérez, R. R. (2020). Frecuencia y Susceptibilidad Antimicrobiana de Bacterias Causantes de Mastitis en Bovinos de un Establo de Trujillo, Perú. Trujillo: Scielo. Obtenido de chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v28n4/a25v28n4.pdf*
- Ruiz-García, L. F. (2018). DIAGNÓSTICO DE MASTITIS SUBCLÍNICA DE VACUNOS LECHEROS MEDIANTE EL CONTEO DE CÉLULAS SOMÁTICAS EMPLEANDO DOS MÉTODOS DIAGNÓSTICO. Zulia: Universidad de San Marcos . Obtenido de https://www.redalyc.org/journal/959/95955158006/html/*
- Sanchez, M. F. (2013). El periparto de la vaca. Zaragoza: SERVET.*
- Sánchez, R. E. (2016). Determinación de la resistencia microbiana de cepas de Staphylococcus aureus aisladas de quesos frescos provenientes de mercados de Lima Metropolitana. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Obtenido de chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/5194/Lopez_sr.pdf?sequence=3*
- Valero-Leal, K. (2010). SUSCEPTIBILIDAD A LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS EN CEPAS DE Staphylococcus aureus AISLADAS EN LECHE DE BOVINOS CON MASTITIS SUBCLÍNICA Y LECHE DE TANQUE. Maracaibo: Scielo. Obtenido de https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592010000400006*
- Werckenthin, C. (2007). Resistencia a los antimicrobianos en estafilococos de animales, con especial referencia al Staphylococcus aureus bovino, el Staphylococcus hyicus porcino y el Staphylococcus intermedius canino. Bethesda: Scielo. Obtenido de https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11432424/*

ANEXOS

Anexo 1. Toma de muestras



Anexo 2. Prueba de C.M.T



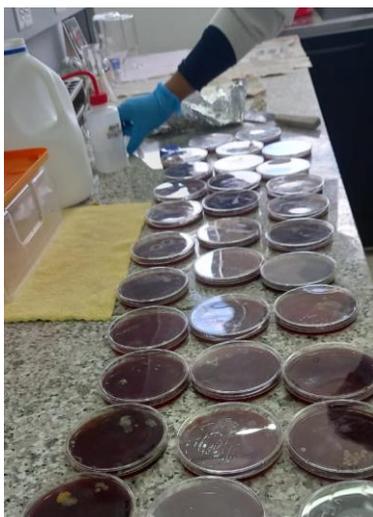
Anexo 3. Preparación de Agar Sangre



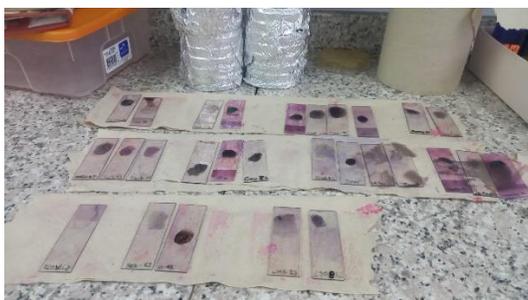
Anexo 4. Siembra en Agar sangre



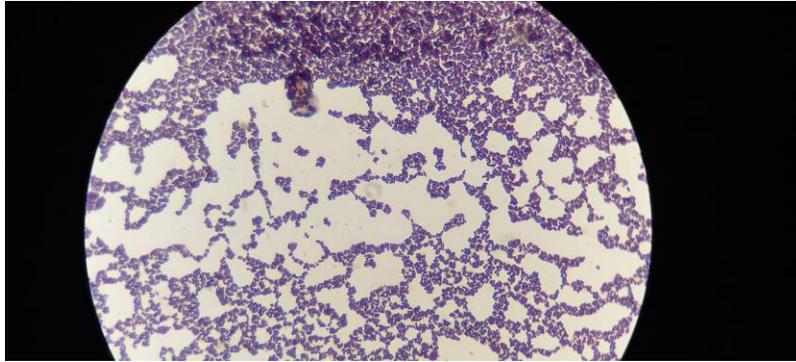
Anexo 5. Muestras hemolíticas en Agar Sangre



Anexo 6. Tinción Gram



Anexo 7. Muestras de Staphylococcus visto en el microscopio



Anexo 8. Agar Manitol positivo en la incubadora



Anexo 9. Prueba Catalasa



Anexo 9. Prueba Coagulasa



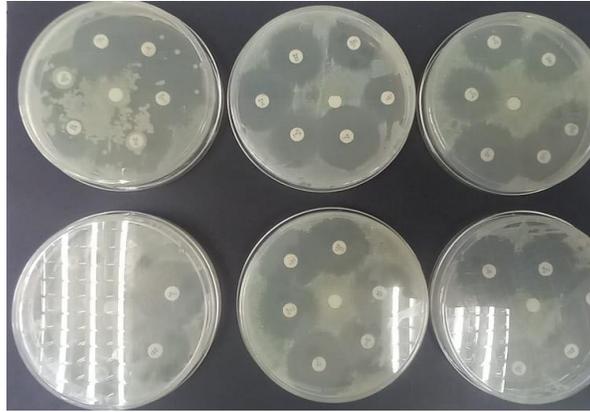
Anexo 10. Caldo cerebro corazón y Agar Tripticasa



Anexo 11. Preparación de Agra Tripticasa



Anexo 12. Antibiógramas.



Anexo 13

Análisis estadístico Kuskal Wallis en vacas lecheras

Variable	Columnal	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Columna2	1	36	1,00	0,00	1,00	2,89	0,0072
Columna2	2	36	1,00	0,00	1,00		
Columna2	3	36	1,00	0,00	1,00		
Columna2	4	36	1,19	0,47	1,00		
Columna2	5	36	1,19	0,58	1,00		
Columna2	6	36	1,19	0,58	1,00		

Trat.	Ranks
3	101,50 A
2	101,50 A
1	101,50 A
5	113,69 A
6	113,69 A
4	119,11 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 14

Análisis estadístico Kuskal Wallis en ordeñadores

Variable	Columnal	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Columna2	1	27	1,63	0,93	1,00	16,01	0,0001
Columna2	2	12	1,00	0,00	1,00		
Columna2	3	15	1,27	0,70	1,00		
Columna2	4	12	1,50	0,90	1,00		
Columna2	5	12	1,17	0,58	1,00		
Columna2	6	12	2,58	0,79	3,00		

Trat.	Ranks
2	33,00 A
5	36,83 A
3	39,13 A
4	44,50 A
1	47,87 A
6	70,29 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)