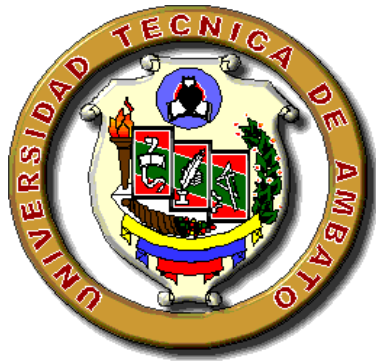


**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**



**CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA**

“Identificación fenotípica de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente mediante cultivo microbiológico a partir de muestras de leche de vacas con mastitis subclínica y muestras de secreciones orofaríngeas del personal encargado del ordeño”

**AUTOR:**

Kevin Marcelo Lozada Escobar

**TUTORA:**

Dra. Andrea Carolina Vela Chiriboga

**CEVALLOS – ECUADOR**

2024

## AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

El suscrito, Kevin Marcelo Lozada Escobar, portador de cedula de identidad número: 180531084-2, libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de investigación titulado: "Identificación fenotípica de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente mediante cultivo microbiológico a partir de muestras de leche de vacas con mastitis subclínica y muestras de secreciones orofaríngeas del personal encargado del ordeño" es original, auténtico y personal. En la virtud, declaro que el contenido es de mi sola responsabilidad legal y académica, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas.



Kevin Marcelo Lozada Escobar

## DERECHOS DEL AUTOR

Al presentar este Informe Final del Trabajo de Titulación titulado “Identificación fenotípica de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente mediante cultivo microbiológico a partir de muestras de leche de vacas con mastitis subclínica y muestras de secreciones orofaríngeas del personal encargado del ordeño” 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.

.....Kevin M. Lozada.....

Lozada Escobar Kevin Marcelo

**APROBACION DEL TRIBUNAL DE GRADO**

"Identificación fenotípica de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente mediante cultivo microbiológico a partir de muestras de leche de vacas con mastitis subclínica y muestras de secreciones orofaríngeas del personal encargado del ordeño"

**REVISADO POR**

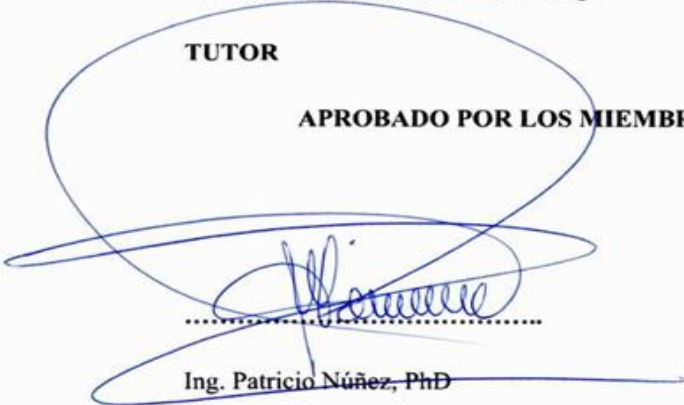
  
.....

Dra. Andrea Carolina Vela Chiriboga

**TUTOR**

**APROBADO POR LOS MIEMBROS DE CALIFICACIÓN**

**Fecha**

  
.....

Ing. Patricio Núñez, PhD

08/02/2024

**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN**

  
.....

08/02/2024

Dra. Cruz Quintana Sandra Margarita, PhD.

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN**

  
.....

08/02/2024

Dr. Mg. Rosero Peñaherrera Marco Antonio

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN**

v

## **DEDICATORIA**

Esta tesis se la dedico a Dios quién supo guiarme por el buen camino, darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban, enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento.

Para mis padres Mónica y Antonio por su apoyo, consejos, comprensión, amor, ayuda en los momentos más difíciles, y por contar siempre con los recursos necesarios para mi desempeño estudiantil. Ustedes, me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi carácter, mi perseverancia y mi coraje para conseguir mis objetivos y sueños.

A mis hermanas Daniela, Ibeth y Belén por estar siempre presentes en mi vida estudiantil con una mano de solidaridad de comprensión en todo momento.

Finalmente, gracias a la Universidad Técnica de Ambato por abrirme las puertas de su institución para mi formación profesional, en especial a, mi tutora Dra. Andrea Vela por ser una guía y gran ayuda en el desarrollo de mi proyecto de investigación.

## **AGRADECIMIENTO**

El presente trabajo de tesis me gustaría agradecer a Dios por bendecirme para llegar hasta donde he llegado, porque hiciste realidad este sueño.

Quiero agradecer a Mónica y Antonio mis padres quien me dieron la oportunidad de crecer como persona y ser un profesional, gracias por su aporte económico y moral que jamás faltó para poder lograr mi objetivo. También a mis hermanas Daniela, Ibeth y Belén que son parte de mi corazón y están en cada momento bueno o malo cuento incondicional con ustedes gracias por ser mi fuente de inspiración y perseverancia para alcanzar este sueño.

Un agradecimiento especial a mis mejores amigos Nicole, Wendy, Santiago, Juanjo, Carlos, gracias por los momentos compartidos y por convertirse en un apoyo incondicional en todo momento.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>3</b>
ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS .....	3
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>5</b>
OBJETIVO GENERAL.....	5
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	5
<b>MARCO CONCEPTUAL</b> .....	<b>5</b>
ETIOLOGÍA .....	6
TIPOS DE MASTITIS.....	7
MASTITIS SUBCLÍNICA .....	7
DIAGNÓSTICO.....	7
PREVALENCIA DE MASTITIS SUBCLÍNICA EN EL ECUADOR .....	8
PREVENCIÓN.....	9
TRATAMIENTO.....	10
STAPHYLOCOCCUS AUREUS .....	10
RESISTENCIA ANTIBIÓTICA .....	12
LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS B- LACTÁMICOS .....	13
Producción de enzimas inactivadoras (penicilinasas o $\beta$ -lactamasas).....	13
Hiperproducción de $\beta$ -lactamasas (Resistencia “border-line” a oxacilina) .....	13
Modificación de las PBPs .....	13
Resistencia intrínseca a meticilina.....	14
STAPHYLOCOCCUS AUREUS METICILINO RESISTENTE .....	14
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>16</b>
<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>16</b>
UBICACIÓN DE LOS HATOS LECHEROS .....	16
Características del lugar.....	16
CARACTERÍSTICAS DE LOS HATOS LECHEROS. ....	16
Características del hato lechero 1. ....	16
Características del hato lechero 2. ....	16

Características del hato lechero 3. ....	17
UBICACIÓN DEL LABORATORIO .....	17
Características del Cantón Cevallos .....	17
<b>MATERIALES Y EQUIPOS .....</b>	<b>17</b>
Materiales de laboratorio .....	17
Reactivos.....	18
Equipos .....	19
Insumos de Oficina .....	19
FACTORES DE ESTUDIO .....	19
<b>VARIABLES RESPUESTA .....</b>	<b>20</b>
Cuantitativa.....	20
Cualitativa.....	20
<b>DISEÑO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>20</b>
SELECCIÓN DE LA MUESTRA .....	20
ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	21
<b>MANEJO DEL EXPERIMENTO .....</b>	<b>21</b>
FASE 1.- IDENTIFICACIÓN DE LAS VACAS CON MASTITIS SUBCLÍNICA POR MEDIO DE LA PRUEBA CALIFORNIAN MASTITIS TEST (CMT). TOMA DE MUESTRAS DE LECHE DE LAS VACAS POSITIVAS A MASTITIS SUBCLÍNICA Y DE LOS ORDEÑADORES.....	22
Procedimiento de la prueba CMT .....	22
INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA PRUEBA CMT.....	22
MUESTRAS DEL PERSONAL ENCARGADO DEL ORDEÑO.....	23
Procedimiento .....	23
Manejo y transporte de las muestras.....	23
FASE 2: IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS A TRAVÉS DE CULTIVO MICROBIOLÓGICO A PARTIR DE LAS MUESTRAS DE LECHE SELECCIONADAS Y DE LOS ORDEÑADORES.....	23
MEDIOS DE CULTIVO .....	23
Agar base sangre de ovino.....	23
Agar tripticasa de soya.....	24
Infusión cerebro corazón .....	24
Agar Mueller Hinton.....	24
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>24</b>
HIPÓTESIS NULA .....	24



HIPÓTESIS ALTERNATIVA.....	24
PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA DIFERENCIAR A LOS COCOS GRAM POSITIVOS E IDENTIFICAR FENOTÍPICAMENTE A S. AUREUS. ....	25
PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO .....	26
Agar base sangre de ovino .....	26
Agar sal manitol.....	26
Agar tripticasa de soya.....	26
Infusión cerebro corazón .....	27
Agar Mueller Hinton.....	27
<b>FASE 3.-IDENTIFICAR CEPAS STAPHYLOCOCCUS AUREUS RESISTENTES A LOS ANTIBIÓTICOS EXPUESTOS POR MEDIO DEL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO KIRBY BAUER.....</b>	<b>27</b>
Procedimiento para el mantenimiento de S. aureus .....	27
Método de Kirby-Bauer.....	28
Método de siembra.....	28
EVALUACIÓN DE RESULTADOS .....	28
<b>CAPITULO III.....</b>	<b>30</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>30</b>
<b>CAPITULO IV .....</b>	<b>44</b>
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>44</b>
CONCLUSIONES .....	44
RECOMENDACIONES .....	45
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>46</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Discos antibióticos .....	20
Tabla 2. Escala de interpretación CMT.....	22
Tabla 3. Pruebas bioquímicas .....	25
Tabla 4. Halos de antibiorresistencia (mm) .....	29
Tabla 5. Total, de las muestras de leche de vacas positivas a mastitis (28), y cultivadas en agar sangre como pre-enriquecimiento y posterior identificación de muestras $\beta$ -hemolíticas (26).....	30
Tabla 6. Pruebas bioquímicas realizadas para la identificación de S.aureus, tinción gram y agar sal-manitol.....	34
Tabla 7. Pruebas bioquímicas realizadas para la identificación de S.aureus, catalasa y coagulasa.....	35
Tabla 8. Resultado del análisis estadístico Kruskal Wallis (vacas con mastitis subclínica). .....	36
Tabla 9. Promedio de sensibilidad antibiótica obtenidos de las vacas positivas a mastitis subclínica. ....	37
Tabla 10. Identificación del tipo de hemolisis, resultados de tinción gram y agar sal manitol.....	40
Tabla 11. Pruebas bioquímicas Catalasa y Coagulasa realizados en las muestras de los hisopados nasales de los ordeñadores. ....	41
Tabla 12. Promedios de sensibilidad antibiótica realizados a partir de S.aureus aisladas de los hisopados nasales de las personas encargadas del ordeño.....	41
Tabla 13. Resultados obtenidos del análisis estadístico Kruskal Wallis (ordeñadores). .....	42
Tabla 14. Halo de inhibición. Hato lechero 1: Gila .....	53
Tabla 15. Halo de inhibición. Hato lechero 1: Sofia.....	53
Tabla 16. Halo de inhibición. Hato lechero 1: Roberta.....	54
Tabla 17. Halo de inhibición. Hato lechero 1: Gala.....	54
Tabla 18. Halo de inhibición. Hato lechero 1: Negra .....	55
Tabla 19. Halo de inhibición. Hato lechero 1: Lupe .....	55
Tabla 20. Halo de inhibición. Hato lechero 2: Cinco.....	56
Tabla 21. Halo de inhibición. Hato lechero 2: Manzana.....	56
Tabla 22. Halo de inhibición. Hato lechero 2: Pistón .....	57
Tabla 23. Halo de inhibición. Hato lechero 2: Siete .....	57
Tabla 24. Halo de inhibición. Hato lechero 3: Silvia.....	58
Tabla 25. Halo de inhibición. Hato lechero 3: 2508 .....	58
Tabla 26. Halo de inhibición. Ordeñador Hato lechero 1: Henry .....	59
Tabla 27. Halo de inhibición. Ordeñador Hato lechero 1: Judith .....	59
Tabla 28. Halo de inhibición. Ordeñador Hato lechero 2: Miriam .....	60
Tabla 29. Halo de inhibición. Ordeñador Hato lechero 3: Daysi.....	60
Tabla 30. Halo de inhibición. Ordeñador Hato lechero 3: Ismael .....	61

## RESUMEN

El objetivo general de la presente investigación es identificar fenotípicamente *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (SARM) mediante, cultivo microbiológico a partir de muestras de leche de vacas con Mastitis subclínica y muestras de secreciones orofaríngeas del personal encargado del ordeño. La ubicación de los hatos lecheros donde se realizaron los muestreos fue en el caserío 12 de octubre, parroquia Yanayacu, cantón Quero-Tungurahua. Para determinar los casos positivos de mastitis se realizó la prueba CMT que reporto una prevalencia del 35% es decir 28 casos positivos a mastitis subclínica de 80 vacas muestreadas. Las pruebas bioquímicas de identificación de *S.aureus* utilizadas fueron: agar sangre, agar sal manitol, tinción gram, prueba catalasa y coagulasa. Se identifico a través en las muestras de leche de vacas positivas a mastitis subclínica una de prevalencia de *S.aureus* del 42%. Los ensayos de sensibilidad antibiótica de las muestras de leche positivas a *S.aureus* evidenciaron una resistencia al 100% a los antibióticos betalactámicos por lo tanto se las considera cepas *Staphylococcus aureus* meticilino resistente. Los cultivos microbiológicos y las pruebas bioquímicas con los hisopados nasales de los ordeñadores se identificó una prevalencia del 100% de *Staphylococcus aureus*. Igualmente, se identificó mediante procesos fenotípicos una prevalencia del 100% de cepas SARM.

**Palabras clave:** Prevalencia, Mastitis subclínica, MRSA, Resistencia, betalactámicos.

## **ABSTRACT**

The general objective of this research is to identify phenotypically methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by means of microbiological culture from milk samples of cows with subclinical mastitis and samples of oropharyngeal secretions from milking personnel. The location of the dairy herds where the samples were taken was in the village of 12 de octubre, Yanayacu parish, Quero-Tungurahua canton. To determine the positive cases of mastitis, the CMT test was performed and reported a prevalence of 35%, that is, 28 positive cases of subclinical mastitis out of 80 cows sampled. The biochemical tests used to identify *S. aureus* were: blood agar, mannitol salt agar, gram stain, catalase and coagulase test. A prevalence of *S. aureus* of 42% was identified in milk samples from subclinical mastitis positive cows. The antibiotic sensitivity tests of the *S. aureus* positive milk samples showed a 100% resistance to beta-lactam antibiotics, therefore they are considered methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. Microbiological cultures and biochemical tests with nasal swabs from the milkers identified a 100% prevalence of *Staphylococcus aureus*. Similarly, a 100% prevalence of MRSA strains was identified through phenotypic processes.

**Key words;** Prevalence, Subclinical mastitis, MRSA, Resistance, betalains.

## CAPÍTULO I

### ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

(**Lozano & Torres, 2017**) menciona en su artículo científico que algunas especies de bacterias Gram positivas representan una amenaza a la salud pública mundial, dichas bacterias son: *Streptococcus pneumoniae*, *-Enterococcus faecalis*, *-Enterococcus faecium*, y *Staphylococcus aureus* debido a que presentan varios mecanismos de resistencia ante el tratamiento antibiótico.

La OMS califica a la resistencia antibiótica como una amenaza para la salud mundial debido a que provocan estancias hospitalarias más largas, incremento en los costos del tratamiento y aumento en el índice de mortalidad. También es una amenaza para la seguridad alimentaria debido a la transmisión directa de cepas bacterianas resistentes partir de productos de consumo de origen animal (**OMS, 2020**).

*Staphylococcus aureus* forma parte de la flora normal en la mayoría de los mamíferos. Los sitios donde coloniza la bacteria en los seres humanos son las fosas nasales, axilas y pliegues inguinales. En los animales la bacteria coloniza regiones como la piel, pelo, cavidad oral y nasal (**Haag, A. F., Fitzgerald, J. R., & Penadés, J. R., 2019**).

La investigación de (**Devriese et al., 1972**) reporta el primer aislamiento en 1972 de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) a partir de muestras de leche provenientes de vacas con mastitis. Desde el primer aislamiento de cepas SARM hasta el presente se han reportado varias cepas SARM en otras especies animales como ovejas, cerdos, caballos, aves y animales de compañía como perros y gatos.

(**Smith et al., 2018**) afirma que el 30% de la población humana esta colonizada por *S.aureus* y específicamente en los Estados Unidos el 1.5% de la población esta colonizada por cepas SARM. Los individuos portadores de dicha bacteria se convierten en reservorios que transmiten el microorganismo a otras especies o al medio ambiente.

Según la revisión de la literatura veterinaria realizada por **(Galarza & Rodríguez, 2021)** se concluye que en Sudamérica las cepas SARM circulan en las comunidades rurales y extraurbanas y confirman que la vaca, cerdo, oveja, conejos y cuyes son los reservorios de dichas cepas. Los investigadores asocian la diseminación de cepas resistentes a causa del uso indebido y por tiempo prolongado de antibióticos.

En Ecuador también circulan cepas (SARM) la investigación realizada por **(Zambrano-Mila et al., 2020)** en cuyes realizada en 6 fincas dedicadas a la crianza de esos animales en la provincia de Azuay- Ecuador. Los resultados obtenidos fueron 24 cuyes dieron positivos a *Staphylococcus aureus*, de las 24 cepas aisladas solamente 6 presentaron resistencia a la oxacilina y cefoxitina. para confirmarlas como cepas (SARM) se realizó un análisis molecular que determinó que las 6 cepas fueron positivas al mecA gen.

La transmisión de *S.aureus* y cepas SARM en las granjas dedicadas a la crianza de animales se da por el contacto directo con animales colonizados con SARM provenientes de otras granjas o el contacto directo con personas colonizadas por SARM. Otro vector de transmisión indirecto es el medio ambiente, las cepas SARM tienen una vida media de 5 días en el polvo. Esas pequeñas partículas pueden adherirse a la ropa de los trabajadores de la granja o a los vehículos provocando la diseminación de las cepas **(Crespo-Piazuelo & Lawlor, 2021)**.

En la opinión de **(Sadat et al., 2022)** *S.aureus* es uno de los microorganismos patógenos presentes en la leche cruda causando infecciones en los seres humanos. Los reservorios de *S.aureus* son las vacas positivas mastitis clínica o subclínica y los equipos e instalaciones donde se realiza el ordeño además de las personas encargadas del cuidado de las vacas. El consumo de leche contaminada se convierte en la principal causa de casos graves de intoxicación alimentaria.

Las infecciones producidas por cepas SARM muestran resistencia a la penicilina y sus derivados (antibióticos betalactámicos). **(Cheung et al., 2021)** afirma que la vancomicina es antibiótico recomendado ante una infección de SARM, cabe resaltar

que ya se han producido cepas altamente resistentes a la vancomicina sin embargo esas cepas no se han diseminado.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Identificar fenotípicamente *Staphylococcus aureus* meticilino resistente mediante, cultivo microbiológico a partir de muestras de leche de vacas con Mastitis subclínica y muestras de secreciones orofaríngeas del personal encargado del ordeño.

### Objetivos específicos

- Identificar fenotípicamente *Staphylococcus aureus* meticilino resistente a partir de muestras de leche obtenidas de vacas con mastitis subclínica a través de cultivos microbiológicos.
- Identificar fenotípicamente *Staphylococcus aureus* meticilino resistente a partir de muestras de secreciones orofaríngeas del personal encargado del ordeño.
- Determinar si las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas presentan resistencia a varias familias de antibióticos (Betalactámicos, Aminoglucósidos, Macrólidos, Tetraciclinas y Sulfonamidas).

## MARCO CONCEPTUAL

La ganadería de producción lechera es uno de los sectores productivos más importantes en la economía nacional, aproximadamente 600.000 campesinos entre hombres y mujeres dependen de la producción de leche (**Braßel & Hidalgo Flor, 2007**). Este sector productivo está expuesto a ciertos factores que lo ponen en riesgo como: enfermedades infecciosas (mastitis), bajo costo en el litro de leche y la resistencia de agentes microbianos a los antibióticos (**Reinoso-García et al., 2021**).

El ganado de lechero ya sea en explotaciones intensivas o en pequeñas producciones traspatio son susceptibles a enfermedades infecciosas. La mastitis es una enfermedad prevalente en los hatos lecheros y es considerada la enfermedad infecciosa que más pérdidas económicas produce en el año. Provoca una merma de entre 4 y 30% en la producción de leche y disminución en su calidad organoléptica por el aumento en el número de células somáticas en la leche, además causa el descarte prematuro de vacas que padezcan la enfermedad **(C. C. Bedolla, 2008)**.

El término Mastitis se refiere a la inflamación de uno o varios cuartos mamarios provocando alteraciones físicas, químicas y bacteriológicas en la leche. La etiología de esta enfermedad puede ser: bacteriológica, fúngica o por lesiones físicas es decir golpes y heridas **(Avellán Vélez et al., 2019)**. En los hatos lecheros dicha enfermedad causará el aumento en los costos totales de producción debido a los tratamientos farmacológicos para controlar y evitar la diseminación de la enfermedad **(Bonifaz & Colango, 2016)**.

#### Etiología

Los agentes patógenos causantes de la infección intramamaria son clasificados en patógenos ambientales y contagiosos. Los microorganismos principales de este grupo son: *Klebsiella spp.*, *Escherichia coli*, *Enterococcus spp.*, *Streptococcus uberis* y *Streptococcus dysgalactiae*. Los reservorios de estos patógenos ambientales son: el agua estancada, estiércol, alimento, equipos de ordeño y la cama. **(C. C. Bedolla, 2008)**. Los microorganismos contagiosos se transmiten por el contacto directo con las vacas infectadas, los reservorios de estos patógenos son los cuartos mamarios infectados, a este grupo pertenecen: *Corynebacterium spp.*, *Mycoplasma spp.*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*. Es importante mencionar que las levaduras *Cándida albicans* y *Cryptococcus neoformans* de igual forma son responsables de causar infecciones en las glándulas mamarias de los bovinos **(C. C. Bedolla, 2008)**.



## Tipos de Mastitis

Tomando en consideración sus manifestaciones clínicas, la mastitis puede ser: clínica o subclínica. En la Mastitis clínica los signos clínicos son muy notables: enrojecimiento, hinchazón, aumento de la temperatura rectal y dolor en la glándula mamaria. La leche tendrá color rojizo o amarillo por la presencia de pus. El agente etiológico responsable de esta infección pueden ser *Estreptococos* ambientales, *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus*. Cabe resaltar que el tratamiento debe ser basado en el agente etiológico. En los casos crónicos la enfermedad se desarrolla en un cuadro de toxemia y muerte del animal (**Salas & Río, 2021**).

## Mastitis subclínica

En la mastitis subclínica la vaca no presentara ningún signo o síntoma clínico y la leche aparentemente no presenta cambios en sus propiedades organolépticas, sin embargo, es evidente la disminución en la producción de leche. *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* son los agentes etiológicos responsables de la enfermedad en la mayoría de los casos (**Salas & Río, 2021**). Los microorganismos ingresan a través del canal del pezón y se multiplican rápidamente e invaden todo el tejido intramamario provocando un cuadro inflamatorio (mastitis) en la glándula mamaria y además aumenta el recuento leucocitario en la leche (**C. C. Bedolla, 2008**).

Las manos de los ordeñadores, las toallas de secado de la ubre reutilizables y el ordeño mecánico se convierten en focos infecciosos, causando la diseminación de los microorganismos a los otros animales cuando no son desinfectados correctamente. Además de aplicar medidas estrictas de bioseguridad en los corrales y en el ordeño es necesario realizar pruebas de laboratorio y pruebas rápidas con el objetivo de determinar la presencia de agentes patógenos causantes de mastitis.

## Diagnóstico

Como se menciona anteriormente, en la mastitis subclínica los síntomas y signos clínicos no son perceptibles por lo tanto se deben realizar exámenes complementarios

como: recuento de células somáticas (RCS), cultivos microbiológicos y la prueba más utilizada California Mastitis Test (CMT) **(Salas & Río, 2021)**.

La prueba CMT es una prueba rápida que tiene la finalidad de crear una reacción química al mezclar el reactivo alquilauril sulfonato de sodio y la leche. Al mezclarse con las células somáticas, el reactivo se gelificará. El grado de gelificación dependerá del grado de la infección en ese cuarto mamario. El objetivo de realizar la prueba CMT es detectar los animales infectados para administrar un tratamiento. CMT es considerada una prueba subjetiva porque su interpretación depende básicamente del operador y además no proporciona un valor exacto de las células somáticas, por lo tanto, este tipo de pruebas debe ser complementado con el recuento de células somáticas **(Pérez, 2022)**.

El objetivo de la cuantificación de las células somáticas es detectar de forma oportuna infecciones bacterianas en las glándulas mamarias con la finalidad de evitar la diseminación de las infecciones en todo el hato lechero y además evitar la transmisión de agentes patógenos en la leche de consumo humano. Un conteo de células somáticas inferior a 100,000CS es considerado normal, que nos indica que la vaca está libre de infecciones en la glándula mamaria y por lo tanto la leche es apropiada para el consumo. Un conteo de células somáticas mayor a 200,000 CS/ml nos indica una infección bacteriana **(Vilca & Oyarce, 2022)**.

Las técnicas de cultivo microbiológico a través de una muestra de leche proveniente de una vaca con mastitis han sido fundamentales en la determinación específica de muchos agentes microbiológicos causantes de mastitis en los hatos ganaderos **(Quevedo, 2018)**. Para el diagnóstico definitivo de mastitis y tratamiento, es necesario realizar un cultivo microbiológico para determinar cuál es el agente etiológico causante de la infección.

Prevalencia de Mastitis subclínica en el Ecuador

Se considera que un tercio de la población total de vacas lecheras es diagnosticada de algún tipo de mastitis **(Aranguren Parra et al., 2009)**. Los nuevos métodos de

diagnóstico y control de mastitis no han sido efectivos ya que la enfermedad sigue causando pérdidas económicas en la industria lechera.

La investigación realizada (**Díaz Arias, 2022**) determinó la prevalencia de mastitis en las vacas raza Holstein mestizas de la asociación ASOPROPEM comunidad de Poatug el 55% resultaron positivas a la prueba CMT. El porcentaje bacterias identificadas fueron de 40% de *Staphylococcus aureus*, 30% de *Staphylococcus coagulasa* positiva, 20% *Staphylococcus* spp., los agentes bacterianos en menor porcentaje fueron 7% *Streptococcus dysgalactiae* y 3% *Streptooccus uberis*.

En el estudio realizado por (**Reinoso-García et al., 2021**) en Ecuador, provincia de Cañar (Biblián) con la finalidad de detectar la presencia de mastitis subclínica, se evaluaron 360 vacas. La fase experimental comenzó con la toma de muestras, se realizó CMT para verificar la categoría de Mastitis subclínica. Los autores determinaron que en la zona de estudio existe una prevalencia de 9,1 % de Mastitis subclínica también determinaron que los factores de trasmisión de la enfermedad están asociados a los equipos de ordeño mecánico y con el uso de una toalla colectiva para el secado de los pezones.

### Prevención

La única forma de controlar la mastitis en un hato ganadero es implementando prácticas de ordeño higiénico y limpieza en los corrales e instalaciones de ordeño. La limpieza de los corrales y las camas debe ser diaria además de aplicar soluciones desinfectantes, que nos permitirán reducir la multiplicación de patógenos ambientales. La limpieza diaria de los equipos de ordeño es fundamental para evitar la diseminación de agentes infecciosos y debe ser complementada con medidas de higiene en los ordeñadores (**C. C. Bedolla, 2008**).

El personal encargado del ordeño debe lavar y desinfectar sus manos antes de manipular los equipos de ordeño, es importante la inmersión de los pezones en un líquido sellador después del ordeño, cuya finalidad es eliminar los microorganismos que están en el pezón además de crear una película de la solución desinfectante que evitará el crecimiento o invasión de los microorganismos en el pezón. Otro aspecto a

tomar en cuenta es la utilización de paños de lavado desechables y toallas de secado desechables para cada animal, lo que evitará la propagación de microorganismos patógenos de una vaca a otra (**Scaramelli & González, 2005**).

#### Tratamiento

Para lograr el éxito en el control de la enfermedad, además de implementar las medidas de higiene antes mencionadas, es indispensable identificar a las vacas positivas a mastitis, mismas que serán separadas del grupo de vacas sanas para su descarte. En el caso de los hatos ganaderos con vacas positivas a mastitis es importante que las vacas sean ordeñadas según el grado de la gravedad en la infección, para evitar el contagio a las vacas sanas. El aspecto nutricional también influye en la salud e inmunidad en las vacas, por lo tanto, se debe complementar su alimentación con vitamina E y minerales como cobre y selenio (**Scaramelli & González, 2005**).

La terapia antibiótica debe ser implementada según los resultados de los cultivos microbiológicos y antibiogramas, es decir conociendo específicamente cual es el agente etiológico para evitar la resistencia antibiótica.

#### *Staphylococcus aureus*

El género Estafilococos se compone de 40 especies, 16 de las cuales se han identificado en seres humanos el resto han sido aisladas de animales mamíferos y aves (**Portillo & Del Pozo, 2018**). En los seres humanos y animales, los estafilococos forman parte de la microflora normal de las mucosas y de la piel. Las especies *S. aureus* y *S. lugdunensis* son las especies de mayor riesgo de infección en los seres humanos, mientras que, en los animales, *S. aureus* y *S.intermedius*. El riesgo de infección por este género bacteriano será mayor en el caso de los huéspedes inmunodeprimidos (**Cervantes-García et al., 2014**).

*Staphylococcus aureus* tiene como huéspedes a todos los mamíferos y a las aves, en los huéspedes inmunodeprimidos causa infecciones en la piel en el caso de los perros, gatos y cerdos. En los bovinos y ovinos es común que cause infecciones en las glándulas mamarias. En las aves causa artritis. Este patógeno es el responsable de

intoxicaciones alimentarias debido a que libera enterotoxinas durante la fase de crecimiento de la bacteria en los alimentos (**Gómez Villaescusa, 2019**).

*Staphylococcus aureus* es el agente etiológico responsable de múltiples infecciones en los humanos como endocarditis, meningitis etc., en los animales especialmente los mamíferos son causantes de neumonías infecciones en la piel y en caso de los bovinos y ovinos mastitis (**Taylor & Unakal, 2023**).

*S. aureus* es una bacteria Grampositiva de un diámetro aproximado de 0,5 y 1,5 micras. Su característica más llamativa es su apariencia de racimos de uva. Sus características fenotípicas son: bacterias no esporuladas, inmóviles, por lo general no son encapsuladas y presentan positividad para catalasa. La mayoría de cepas de *S. aureus* contienen en su superficie exterior el factor de coagulación coagulasa, que es capaz de unirse al fibrinógeno para convertirlo en fibrina insoluble, siendo un importante factor de virulencia (**Silva et al., 2017**).

En los ensayos microbiológicos *in vitro*, *S. aureus* puede crecer en caldo o agar simple que cuente con las siguientes condiciones: pH 7, temperatura de 37 °C, después de 18-24 horas post- incubación las colonias formadas se observaran lisas, brillantes y redondeadas (**Silva et al., 2017**).

La prueba de catalasa se la realiza con la finalidad de probar si el microorganismo es capaz de elaborar la enzima catalasa, se considera la prueba positiva cuando la bacteria realiza una reacción química produciendo burbujas debido a la descomposición del peróxido de hidrogeno en oxígeno y agua. La prueba coagulasa se la realiza para determinar la existencia de *Staphylococcus aureus* ya que tiene la capacidad de coagular dicha enzima. La proteína coagulasa representa un factor de virulencia (**Zendejas-Manzo et al., 2014**).

Para el aislamiento de *Staphylococcus aureus* es necesario utilizar medios de cultivo que inhiban el crecimiento de bacterias que no pertenezcan al género estafilococos. Agar sal manitol es un medio selectivo que permitirá el crecimiento de estafilococos y diferenciar los estafilococos coagulasa positivos de los estafilococos coagulasa negativo, se diferencian a los estafilococos coagulasa positivos debido a que se

observaran colonias de color amarillo y el medio a su alrededor igual de color amarillo intenso por otra parte los estafilococos coagulasa negativos se observaran colonias de color rojo y el medio a su alrededor de igual forma será de color rojo ya que no provocaran cambios en el indicador rojo fenol (**Zendejas-Manzo et al., 2014**).

### Resistencia antibiótica

En los seres humanos y animales existen poblaciones bacterianas en la cavidad oral, piel nasofaringe, mucosas intestinal y genitourinaria denominada microbiota normal, creando un sistema de homeostasis entre las bacterias y el huésped, protegiéndolo ante una colonización de microorganismos patógenos. Ante un desbalance en el microbiota normal, por tratamientos antibióticos o en casos de inmunosupresión en el huésped este tipo de bacterias podrían causar una infección (**Gastelo Acosta, 2020**).

La resistencia bacteriana es considerada una problemática de salud mundial que deja sin opciones terapéuticas a los profesionales de la salud ante infecciones bacterianas. Las causas de esta problemática son la administración de fármacos antibióticos sin prescripción médica, tiempo inapropiado e infra dosificación en el consumo además del uso excesivo de antibióticos en los animales de consumo y en la agricultura (**Fariña, 2016**).

Definimos a la resistencia antimicrobiana como la capacidad que tiene un agente microbiano de sobrevivir y resistir a los efectos farmacológicos de un antibiótico, en otros casos la bacteria inactiva o disminuye la acción de los antibióticos (**Rojas & Ulate, 2016**).

La gran capacidad de adaptación de las bacterias y su capacidad de crear genes de resistencia transmisibles a otra generación u a otras bacterias de la misma especie, permite a las bacterias desarrollar mecanismos de resistencia. Puede ser resistencia adquirida o natural (**Rojas & Ulate, 2016**).

Se trata de una resistencia natural o extrínseca cuando la bacteria carece de diana para un antibiótico. La resistencia adquirida se trata del cambio en la composición genética

causada por la mutación cromosómica o transferencia de genes de la bacteria **(Rojas & Ulate, 2016)**.

En la actualidad cepas de *S. aureus* tienen resistencia a varios antibióticos como la penicilina o la meticilina. Los mecanismos de resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos en *S. aureus* son: modificación de las Proteínas de unión a penicilinas (PBPs), producción de enzimas inactivadoras (penicilinasas o  $\beta$ -lactamasas) y la resistencia intrínseca a meticilina, debida a la presencia del gen *mecA*. **(González, 2010)**.

Los mecanismos de resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos

Producción de enzimas inactivadoras (penicilinasas o  $\beta$ -lactamasas)

Cepas de *S. aureus* actualmente reportan 80%-93% de resistencia a la penicilina, causada por la producción de penicilinasas que inactiva la penicilina G, ureidopenicilinas y carboxipenicilinas. La penicilina y sus análogos estimulan la producción de una proteína antirrepresora, al inhibir el gen represor de la enzima betalactamasa, aumenta la producción de penicilinasas. El mecanismo de resistencia descrito anteriormente es mediado por *bla<sub>Z</sub>*, gen que codifica para la  $\beta$ -lactamasa **(González, 2010)**.

Hiperproducción de  $\beta$ -lactamasas (Resistencia “border-line” a oxacilina)

Su mecanismo consiste en la excesiva producción de penicilinasas estafilocócica normal controlada por los plásmidos. La oxacilina y la meticilina son antibióticos capaces de resistir la acción hidrolítica de la penicilinasas sin embargo las cepas que producen excesivamente esa enzima provocan que la acción de la oxacilina y la meticilina sea lenta e ineficaz **(González, 2010)**.

Modificación de las PBPs

Se refiere a una modificación mínima de las Proteínas de unión a Penicilinas (PBPs) 1, 2 y 4 peso molecular normal. Este tipo de cepas no producen la enzima  $\beta$ -lactamasas

y presentan niveles mínimos de resistencia a meticilina, puede ser causado por la hiperexpresión de alguna de estas PBPs o debido a mutaciones genéticas que modifiquen la afinidad de la proteína final por el fármaco antibiótico (**González, 2010**).

#### Resistencia intrínseca a meticilina

Se la conoce como intrínseca por el motivo que no produce destrucción del fármaco antibiótico por acción de las enzimas  $\beta$ -lactamasas, la inactividad del antibiótico es debida a acción de una PBP (proteína de unión a la penicilina) adicional PB2' o PBP2a, misma que no estará presente en las cepas susceptibles a la meticilina. Específicamente *S. aureus* produce al menos cuatro proteínas de unión a las penicilinas (PBP1, PBP2, PBP3 y PBP4), que impiden la acción de los  $\beta$ -lactámicos, incluyendo la meticilina. El gen *mecA*, es el responsable de la resistencia a la meticilina en *S. aureus* (**González, 2010**).

#### *Staphylococcus aureus* meticilino resistente

El primer aislamiento de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) en animales ocurrió en el año de 1972 a partir de muestras de leche de vacas diagnosticadas con mastitis. Evitar la diseminación y el aumento de las cepas resistentes es uno de los retos actuales más importantes de los profesionales en medicina humana y veterinaria (**Leticia Diana1 et al., 2019**).

Las cepas SARM en los animales actúan como reservorios zoonóticos, debido a la diseminación de las cepas resistentes en los alimentos de origen animal causando infecciones en los seres humanos (**Vindel & Cercenado, 2016**).

La resistencia de *S. aureus* a la meticilina es causada por la síntesis de la proteína PBP2a que es codificada por el gen *mecA*, inhibe la acción de los antibióticos betalactámicos (**Vindel & Cercenado, 2016**). El aislamiento de SARM culmina con la confirmación de la resistencia a la meticilina se pueden emplear el método de difusión en disco o detectando el gen *mecA* por medio de PCR convencional. El método de difusión en disco consiste en colocar discos antibióticos en placas de agar



inoculadas con *S. aureus* y posteriormente medir los halos de inhibición bacteriana. El método genotípico consiste en realizar una PCR con la finalidad de amplificar un fragmento de ADN para identificar gen *mecA* que codifica la PBP2a (Álvarez, 2011).

El estudio realizado por (Landi et al., 2018) evaluó la calidad e inocuidad microbiana de los quesos frescos a través del recuento de *Staphylococcus aureus* y probar su sensibilidad antibiótica. El estudio se realizó en las queserías artesanales ubicadas parroquias rurales: Punin, San Juan y Pungala pertenecientes a la ciudad de Riobamba-Ecuador. Los resultados obtenidos son una prevalencia de *Staphylococcus aureus* de 83,33% la resistencia antibiótica fue cefoxitina (33,33%), eritromicina (80% resistencia intermedia) y penicilina (100%).

Las investigaciones realizadas en el país nos confirman que los animales domésticos y los alimentos de origen animal en la región andina del Ecuador representan un riesgo para la salud de la población ecuatoriana además de un reservorio de cepas *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina.(Landi et al., 2018).

## CAPÍTULO II

### METODOLOGÍA

Ubicación de los Hatos lecheros

Caserío 12 de octubre, Parroquia Yanayacu Cantón Quero, Provincia de Tungurahua-Ecuador.

Características del lugar

**Temperatura °C:** 7º a 15º,

**Clima:** Ecuatorial de alta montaña

**Coordenadas geográficas:** -1.43545-latitud-78.66115-longitud (Cevallos, 2016).

Características de los hatos lecheros.

Características del hato lechero 1.

**Propietario:** Henry Velasco

**Vacas en producción:** 28

**Tipo de ordeño:** 20 vacas en ordeño mecánico y 8 en ordeño manual.

**Hora de ordeño:** 4:30 mañana - 14:00 de la tarde.

Características del hato lechero 2.

**Propietario:** Miriam Coba

**Vacas en producción:** 28 vacas

**Tipo de ordeño:** Ordeño mecánico

**Hora de ordeño:** 4:30 mañana y 14:00 tarde

Características del hato lechero 3.

**Propietario:** Ismael Villacis

**Vacas en producción:**24

**Tipo de ordeño:** Ordeño mecánico

**Hora de ordeño:** 4:30 mañana y 15:00 tarde.

Ubicación del laboratorio

El presente estudio se realizó el Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, ubicado en la Provincia de Tungurahua, Cantón Cevallos, con una extensión de 19.000 km<sup>2</sup>, latitud 2.882 msnm. 1°22'08.7" y longitud 78° 36'23.8".

Características del Cantón Cevallos

**Temperatura °C:** 13 a 16

**Clima:** Ecuatorial Meso Térmico Seco

**Humedad relativa, %:** 60 – 75

**Velocidad del viento, m/s:** 2.1 – 8.9

**Precipitación, mm:** 200 – 500

(GAD Cevallos, 2022)

### **Materiales y equipos**

Materiales de laboratorio

- Asas de siembra
- Gradillas
- Papel Kraft
- Matraz Erlenmeyer
- Mecheros bunsen

- Mascarilla
- Guantes de látex
- Cofia
- Zapatones
- Kit de hisopos nasales
- Papel aluminio
- Cajas Petri
- Portaobjetos
- Tubos de ensayo
- Varilla de agitación
- Vasos de precipitación
- Cuchara de medición
- Micropipeta
- Tubos Falcon de 15 ml
- Puntas de micropipeta
- Cintas testigo
- Mecheros bunsen
- Alcohol
- Paletas para CMT
- Reactivo CMT

#### Reactivos

- Agar Manitol-salado
- Infusión cerebro - corazón
- Agar Müller Hinton
- Agar Tripticasa de soya
- Discos de antibióticos (Penicilina G, Oxacilina, Ciprofloxacina, Azitromicina, Sulfatrimetropin- sulfametoxazol, Tetraciclina).

## Equipos

- Autoclave
- Balanza Analítica FC 2000(2000G;0,01g)
- Nevera
- Espectrofotómetro
- Incubadora
- Centrifuga
- Bortex
- Agitador magnético
- Microscopio

## Insumos de Oficina

- Computadora
- Esferográficos
- Impresora
- Celular
- Cuaderno
- Marcadores
- Cámara

## Factores de estudio

Diámetro del halo de inhibición obtenido después de 18 horas del cultivo de *S.aureus* aislado con los discos antibióticos.

Tabla 1. Discos antibióticos

<b>Antibiótico</b>	<b>Simbología</b>
<b>Penicilina G</b>	P
<b>Oxacilina</b>	OX
<b>Azitromicina</b>	AZM
<b>Sulfatrimetropin-</b>	SxT
<b>Tetraciclina</b>	TE
<b>Ciprofloxacina</b>	CIP

### **Variables respuesta**

#### Cuantitativa

Se tomo datos exactos basados en la medición del diámetro de la zona del halo de inhibición tomando como consideración los 6mm del disco, la medición se realizó con una regla sobre la tapa de la caja Petri. Los diámetros de 6mm demuestran que no hay inhibición.

#### Cualitativa

Según la medida del halo de inhibición se establece las siguientes características:

Sensible, Intermedio y Resistente.

### **Diseño experimental**

#### Selección de la muestra

Las muestras seleccionadas para realizar el cultivo microbiológico serán a partir de las vacas diagnosticadas con mastitis subclínica basados en los resultados de la prueba de CMT y de las muestras obtenidas del personal encargado del ordeño.

Se estima el tamaño de la muestra utilizando el cálculo considerando la prevalencia reportada por (Pérez, 2022) en Píllaro-Tungurahua de acuerdo a la siguiente fórmula:

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

Donde:

n= tamaño de la muestra

Z= nivel de confianza (95%)

p= probabilidad de éxito (24%)

q= probabilidad de fracaso (q= 1-p)

d= precisión absoluta (10%)

Para el cálculo: n= tamaño de la muestra

$$n = \frac{1.96^2 * 0.24 * (1 - 0.24)}{0.1^2} \quad n = 71$$

Los productores solicitaron que se haga la prueba de CMT a todas las vacas en producción (80 vacas) para poder hacer un tratamiento de las vacas positivas a mastitis subclínica con los resultados del antibiograma obtenido. Considerando esa petición de los productores, en este estudio se usaron 80 muestras.

Análisis estadístico

Se comparó la sensibilidad de los diferentes antibióticos mediante la prueba Kruskal Wallis. Escogimos esa prueba porque los datos no se ajustan a una distribución normal.

### **Manejo del experimento**

El cultivo microbiológico y el ensayo de sensibilidad antibiótica se llevará a cabo con 3 fases:

Fase 1.- Identificación de las vacas con mastitis subclínica por medio de la prueba Californian Mastitis Test (CMT). Toma de muestras de leche de las vacas positivas a mastitis subclínica y de los ordeñadores.

#### Procedimiento de la prueba CMT

- Limpieza y secado de los pezones
- Desechar la leche del preordeño (despunte)
- Se ordeñan dos chorros aproximadamente de leche, de cada cuarto mamario y se deposita en cada uno de los pocillos de la paleta.
- Se inclina la paleta para desechar la leche que está en exceso, la cantidad ideal es de 2ml de leche
- Se añade 2 ml de reactivo en la leche en cada una de los pocillos de la paleta.
- Se mezcla el reactivo y le leche dando movimientos suaves en forma circular. El operador examina la presencia de una reacción de gelificación.

Interpretación de los resultados de la prueba CMT.

Tabla 2. Escala de interpretación CMT

<b>Escala de CMT</b>	<b>Rango relativo del nivel de células somáticas</b>
<b>Negativo</b>	<100.000
<b>Trazas</b>	150.000 – 500.000
<b>1</b>	400.000 – 1.500.000
<b>2</b>	800.000 – 5.000.000
<b>3</b>	>5.000.000

Adaptado de (Bolaños et al., 2012)



## Muestras del personal encargado del ordeño

Obtenidas a partir de hisopados nasales. Los tubos de recolección contienen en 3 ml de Medio líquido infusión cerebro corazón. El medio de cultivo y los tubos de ensayo fueron previamente esterilizados.

## Procedimiento

- Colocar a la persona con la cabeza ligeramente inclinada hacia atrás
- Insertamos con suavidad el hisopo por el suelo de la fosa nasal.
- Realizamos movimientos circulares con el hisopo durante unos 5 a 10 segundos.
- Retiramos el hisopo y lo guardamos en los tubos de recolección de la muestra.

## Manejo y transporte de las muestras

- Las muestras de leche de las vacas positivas se recolectaron en tubos Falcon de 15 ml herméticos y estériles.
- La muestra de leche y de los hisopados se transportaron en un contenedor que pueda mantener la temperatura entre 4-8 °C hasta su análisis en el laboratorio.

Fase 2: Identificación fenotípica de *Staphylococcus aureus* a través de cultivo microbiológico a partir de las muestras de leche seleccionadas y de los ordeñadores.

## Medios de cultivo

Las muestras de leche y de los ordeñadores se sembraron en agar base sangre de ovino. Se utilizó agar tripticasa de soya para el mantenimiento de las cepas *S aureus*. Para ensayos de sensibilidad antibiótica utilizaremos agar Mueller Hinton y Medio líquido infusión cerebro corazón.

Agar base sangre de ovino.

Se añade sangre de ovino para observar en los microorganismos si producen características de hemolisis, medio de cultivo que permite aislarse microorganismos

Gram positivos y negativos. Los microorganismos betahemolíticos se observarán colonias con un halo trasparente, específicamente en colonias *S. aureus* se observan de una coloración amarilla o blanca, de gran tamaño, cremosas y opacas con borde circular **(BIO-BACTER, 2023)**.

Agar tripticasa de soya

Es utilizado para el crecimiento, aislamiento y mantenimiento de cultivos de bacterias aerobias, anaerobias, Gram positivos y Gram negativos, además de hongos y levaduras **(Bioser, 2023)**.

Infusión cerebro corazón

Es un medio líquido que permite el crecimiento de microorganismos con escasos requerimientos nutricionales y nutricionalmente exigentes ya sean aerobias o anaerobias **(MDMADMIN, 2017)**.

Agar Mueller Hinton

Permite el desarrollo de microorganismos de crecimiento rápido y es utilizado para determinar la susceptibilidad antibiótica en el método difusión conocido como Kirby y Bauer **(MDMADMIN, 2019)**.

## **Hipótesis**

Hipótesis nula

En las vacas con mastitis subclínica y en el personal encargado del ordeño no existe la presencia de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.

Hipótesis Alternativa

En las vacas con mastitis subclínica y en el personal encargado del ordeño existe la presencia de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.

Pruebas bioquímicas para diferenciar a los cocos Gram positivos e identificar fenotípicamente a *S. aureus*.

Tabla 3. Pruebas bioquímicas

<b>Pruebas bioquímicas</b>		
<b>Tinción Gram</b>	Cocos grampositivos	Cocos gram negativos
	Estafilococos se observan en forma de racimos parecidos a uvas color azul o violeta.	Estreptococos se los observa en cadenas y su color es rosado.
<b>Catalasa</b>	Positiva	Negativa
	Estafilococos: vemos la presencia de burbujas.	Estreptococos: no hay la presencia de burbujas.
<b>Sal manitol</b>	Color amarillo	Color rojo
	Diferencia <i>S. aureus</i> Fermenta el manitol cambian el pH del medio y el indicador (rojo fenol)	Otros Estafilococos El microorganismo no tiene la capacidad de fermentar el
<b>Coagulasa</b>	Positiva	Negativa
	<i>S. aureus</i> Tiene la capacidad de producir la enzima coagulasa. Se observa la formación del coágulo.	Otros Estafilococos No tiene la capacidad de producir el enzima coagulasa.

Adaptado a (RAULILLO91, 2017)

## Preparación de medios de cultivo

### Agar base sangre de ovino

- En un matraz colocamos 21,25 gramos de agar base sangre en 500 ml de agua destilada.
- Mezclamos hasta obtener una dilución sin grumos
- Esterilizamos por medio de la autoclave a una presión de 15 psi a 121°C en el transcurso de 15 minutos.
- Dejamos enfriar el medio de cultivo hasta obtener una temperatura de 37 °C aproximadamente.
- Colocamos el imán de agitación en el Matraz y posteriormente programamos el agitador magnético a una velocidad de 200 rpm.
- Añadimos 5 % de sangre de ovino en este caso 25 ml de sangre.
- Trasvasamos en placas Petri estériles.

### Agar sal manitol

- Disolvemos 55.5 gramos en 500 ml de agua destilada.
- Mezclamos hasta obtener una dilución sin grumos
- Esterilizamos por medio de la autoclave a una presión de 15 psi a 121°C en el transcurso de 15 minutos.
- Dejamos enfriar el medio de cultivo durante 5 minutos
- Trasvasar en placas Petri estériles.

### Agar tripticasa de soya

- Disolvemos 40 gramos en un litro de agua destilada.
- Mezclamos hasta obtener una dilución homogénea
- Esterilizamos por medio de la autoclave a una presión de 15 psi a 121°C en el transcurso de 15 minutos.
- Trasvasamos en placas Petri estériles.

### Infusión cerebro corazón

- Disolvemos 37 gramos en un litro de agua destilada.
- Mezclamos hasta obtener una dilución homogénea
- Esterilizamos por medio de la autoclave a una presión de 15 psi a 121°C en el transcurso de 15 minutos.
- Dejamos enfriar a temperatura ambiente
- Se debe conservar el medio líquido en refrigeración.

### Agar Mueller Hinton

- Diluimos 38 gramos 1 litro de agua destilada.
- Mezclamos uniformemente
- Esterilizamos por medio de la autoclave a 115 psi 121°C en el transcurso de 15 minutos.
- Dejamos enfriar por 5 minutos
- Vertemos en placas Petri esterilizadas.

Nota: Es importante verter los medios de cultivos en áreas que cuenten con mecheros bunsen y en un área estéril para evitar la contaminación de los medios de cultivo.

**Fase 3.-**Identificar cepas *Staphylococcus aureus* resistentes a los antibióticos expuestos por medio del método de difusión en disco Kirby Bauer.

### Procedimiento para el mantenimiento de *S. aureus*

- Sembramos una colonia de *S.aureus* en un tubo de ensayo que contiene 5 ml de Infusión cerebro corazón previamente esterilizados.
- Los tubos inoculados con *S.aureus* se colocan en la incubadora durante 3 horas a una temperatura de 37 °C.
- Después de las 3 horas se observará turbidez en los tubos de ensayo
- Hay que medir la densidad óptica con un espectrofotómetro, la densidad óptica recomendada es de 400-550.

- Se obtiene una muestra de los tubos de ensayos previamente igualados en el espectrofotómetro y se inocula en las cajas Petri de agar Muller Hinton con la ayuda de un hisopo de algodón esterilizado.

#### Método de Kirby-Bauer

Método recomendado por el Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad de NCCLS, de Estados Unidos cuyo objetivo es establecer en forma cuantitativa el efecto de varias sustancias sobre las cepas bacterianas aisladas (**Ramirez & Castaño, 2009**).

#### Procedimiento

- En la placa que esta inoculado *S.aureus*, se colocan los discos de antibióticos
- Las placas se incuban por 16-18 horas a 35- 37°C.
- Se deben observar el halo de inhibición.
- Se debe realizar la medición del diámetro de la zona del halo de inhibición tomando como consideración los 6mm del disco, usando una regla sobre la tapa de la caja Petri.

#### Método de siembra

Se realizará la siembra por estría escocesa.

#### Evaluación de resultados

Según la medida del halo de inhibición se establece las siguientes características: Sensible, Intermedio y Resistente.

Tabla 4. Halos de antibiorresistencia (mm)

<b>Betalactámicos</b>	<b>Sensible</b>	<b>Intermedio</b>	<b>Resistente</b>
<b>Penicilina G</b>	$\geq 29$	-	$\leq 28$
<b>Oxacilina</b>	$\geq 22$	-	$\leq 21$
<b>Aminoglucósidos</b>	<b>Sensible</b>	<b>Intermedio</b>	<b>Resistente</b>
<b>Ciprofloxacina</b>	$\geq 21$	16-20	$\leq 15$
<b>Macrólidos</b>	<b>Sensible</b>	<b>Intermedio</b>	<b>Resistente</b>
<b>Azitromicina</b>	$\geq 18$	14-17	$\leq 13$
<b>Sulfonamidas</b>	<b>Sensible</b>	<b>Intermedio</b>	<b>Resistente</b>
<b>Sulfatrimetropin-sulfametoxazol,</b>	$\geq 16$	11-15	$\leq 10$
<b>Tetraciclinas</b>	<b>Sensible</b>	<b>Intermedio</b>	<b>Resistente</b>
<b>Tetraciclina</b>	$\geq 19$	15-18	$\leq 14$

(CLSI, 2020)

## CAPITULO III

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se describen los resultados que se obtuvieron en las 3 etapas de la fase experimental: en la primera fase se identificó vacas positivas a mastitis subclínica en los 3 hatos lecheros mediante la prueba CMT. En la segunda fase realizó el aislamiento microbiológico de *S.aureus* de las vacas positivas a mastitis subclínica mediante una serie de pruebas bioquímicas. En la tercera fase realizó un antibiograma con las cepas aisladas para su clasificación como sensibles, con sensibilidad intermedia y resistentes sustentándonos en el método de Kirby Bauer para identificar los puntos de corte instituidos por el manual de CLSI 2016 y CLSI 2019.

Los datos obtenidos se muestran en la tabla 5. Se realizó la prueba CMT para identificar las vacas positivas a mastitis subclínica. De las vacas positivas se obtuvo una muestra de leche de 15 ml. Se identificó la muestra de leche con el ID de la vaca y el hato lechero al que pertenece. Tras la incubación de las muestras en agar sangre se observó beta-hemolisis en 26 muestras de 28. En la primera fase se realizó la prueba CMT a 80 vacas en producción lechera en los 3 hatos lecheros, de las cuales 28 resultaron positivas a mastitis subclínica.

Tabla 5. Total, de las muestras de leche de vacas positivas a mastitis (28), y cultivadas en agar sangre como pre-enriquecimiento y posterior identificación de muestras  $\beta$ -hemolíticas (26).



Total, de vacas muestreadas 80 De 3 hatos lecheros			Agar sangre		
Vacas positivas a mastitis subclínica			Tipo de hemolisis		
ID de las vacas			Betahemolíticos		Gamma hemolíticos
Hato 1	Hato 2	Hato 3			
Gila	Cinco	Tigrilla	Gila	Cinco	Dos
Vaca	Pistón	Elisa	Vaca	Pistón	193
Llumi	Dos	Silvia	Llumi	Tigrilla	
Chola	Seis	2508	Chola	Seis	
Lupe	Uno		Lupe	Uno	
Sofia	Siete		Sofia	Siete	
Yeye	Brwon Swiss		Yeye	Brwon Swiss	
Gala	Café		Gala	Café	
Negra	193		Negra	Elisa	
Roberta	853		Roberta	853	
Guila	Visan		Guila	Visan	
Ojos de sapo	Manzana		Ojos de sapo	Manzana	
Total: 28 vacas positivas			Silvia	2508	

Nuestra investigación reportó el 35% de prevalencia de mastitis subclínica, porcentaje relativamente bajo si lo comparamos con el porcentaje de la prevalencia del 55 % reportada en la investigación de **(Díaz Arias, 2022)** en el cantón Patate. El bajo porcentaje de reportado en nuestra investigación se debe a que en uno de los hatos lecheros donde se recolectó las muestras se realizaba el ordeño aplicando medidas bioseguridad como: limpieza, desinfección en las instalaciones y el ordeño mecánico

además del uso de la toalla de secado de los pezones desechables y realizando el sellado de pezones. La prevalencia de nuestro estudio se asemeja al 24 % de prevalencia de mastitis subclínica reportado por **(Pérez, 2022)** en Pillaro - Tungurahua

Antes de hablar de la prevalencia de *S.aureus* obtenida es importante conocer las pruebas de identificación fenotípica.**(Cervantes-García et al., 2014)** menciona en su artículo científico que el medio de cultivo agar sal-manitol es el más recomendado para identificar presuntivamente *S. aureus* debido a que se observa en cultivo post incubación un cambio de color de rojo a amarillo en el caso que el microorganismo se trate de *S.aureus*. Otro medio de igual forma selectivo se trata del agar sangre que permite identificar el tipo de hemolisis del microorganismo además de inhibir el crecimiento de bacterias Gram negativas. Al realizar tinción gram se observarán cocos en forma de racimo de uvas y de color azulado.

La tabla 6 y 7 detalla el proceso de identificación de las bacterias mediante pruebas bioquímicas. El proceso bioquímico para identificar *S. aureus* fue sembrar la muestra de leche en agar sangre e identificar beta-hemolisis posteriormente realizar tinción gram con los microorganismos beta-hemolíticos para descartar microorganismos gram negativos o Bacilos. Los microorganismos cocos gram positivos serán inoculados en placas agar sal-manitol, si existe un cambio de rojo a color amarillo, los microorganismos serán sometidos a la prueba catalasa y coagulasa que debe ser positiva. **(Martín Bermudez, 2020)** coincide acerca de las pruebas bioquímicas realizadas en nuestra investigación. El autor afirma que el proceso de identificación de *S.aureus* se lo realiza por medio de cultivos selectivos como agar sangre y agar sal-manitol y pruebas bioquímicas como catalasa y coagulasa. y menciona que un microorganismo para ser identificado como *Staphylococcus aureus* debe presentar: beta-hemolisis en agar sangre, cambio de color en agar sal manitol, en tinción gram se observarán cocos grampositivos y la prueba de catalasa y coagulasa deben ser positiva.

El perfil de sensibilidad antibiótica determinó una prevalencia del 42% de *S.aureus* (12 aislados de 28). El porcentaje reportado concuerda con la investigación de **(Díaz Arias, 2022)** que reportó el 40 % de prevalencia. **(C. Bedolla, 2017)** afirma que esta

bacteria es el principal agente etiológico causante de infecciones en las glándulas mamarias en los bovinos. Cabe resaltar que a pesar de que existen varios agentes bacterianos causantes de mastitis, *S.aureus* es el más prevalente en varias regiones del mundo. La mastitis causada por *S.aureus* u otros agentes patógenos en países desarrollados como Canadá, Alemania, Reino Unido, Estados Unidos de América, Países Bajos, y la India causa importantes pérdidas económicas. La India es mayor el productor de leche en el mundo y sus pérdidas económicas anualmente debido a la mastitis es de 575 millones aproximadamente y la merma en la producción de leche en un 21% (**Sharun et al., 2021**).

La investigación de (**Tapias, 2020**) especifica que *Staphylococcus aureus*, es el agente infeccioso que causa cuadros graves de mastitis en las vacas, además afirma que es el causante del 90% de casos positivos a mastitis subclínica. (**Camussone & Calvino, 2013**) concuerda con esa afirmación y menciona que es necesario buscar alternativas para prevenir y reducir la prevalencia de la enfermedad.

La colonización de agentes patógenos como *S. aureus* en la glándula mamaria se debe según (**Alvarado C et al., 2019**) a las deficientes prácticas de limpieza e inadecuadas instalaciones para el ordeño. (**Sánchez, 2015**) afirma que una ubre no limpiada previamente tiene más riesgo de contraer mastitis, por lo tanto, el lavado de la ubre y de las manos de los ordeñadores es primordial para evitar infecciones bacterianas.

La tabla 6 y 7 describe los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas. Se realizó tinción gram y observó 21 muestras cocos gram positivos, las 21 muestras fueron inoculadas en agar sal-manitol y se observó 14 muestras tuvieron la capacidad de fermentar el manitol y cambiarlo de color. Finalmente, la prueba de catalasa resulto como positiva a las 14 muestras, la prueba de coagulasa dio como resultado solo a 12 muestras.

Tabla 6. Pruebas bioquímicas realizadas para la identificación de *S.aureus*, tinción gram y agar sal-manitol.

Microorganismos betahemolíticos		Cocos gram positivos	
Tinción Gram		Agar sal manitol	
Cocos Gram positivos	Bacilos Gram positivos	Positivo	Negativo
Gila	Vaca	Gila	Yeye
Chola	Llumi	Chola	Guila
Lupe	Ojos de sapo	Lupe	Uno
Sofia	Seis	Sofia	Café
Yeye	Visan	Gala	853
Gala		Negra	Tigrilla
Negra		Roberta	Elisa
Roberta		Cinco	
Guila		Pistón	
Cinco		Siete	
Pistón		Brow swiss	
Uno		Manzana	
Siete		Silvia	
Brow Swiss		2508	
Café			
853			
Tigrilla			
Manzana			
Silvia			
Elisa			
2508			

Tabla 7. Pruebas bioquímicas realizadas para la identificación de *S.aureus*, catalasa y coagulasa.

Pruebas bioquímicas			
Catalasa	Coagulasa		<i>Staphylococcus aureus</i>
	Positivo	Negativo	
Gila	Gila	Chola	Gila
Chola	Lupe	Brow swiss	Lupe
Lupe	Sofia		Sofia
Sofia	Gala		Gala
Gala	Negra		Negra
Negra	Roberta		Roberta
Roberta	Cinco		Cinco
Cinco	Pistón		Pistón
Pistón	Siete		Siete
Siete	Manzana		Manzana
Brow swiss	Silvia		Silvia
Manzana	2508		2508
Silvia			
2508			

La tabla 7 describe las pruebas bioquímicas realizadas para la identificación de *S.aureus*. Se observa que 12 aislados cumplen con todas las características fenotípicas de *S.aureus* es decir cocos gram positivos, agar sal manitol amarillo, pruebas de catalasa y coagula positiva.

Para los ensayos de sensibilidad antibiótica de los *S. aureus* identificados a partir de las muestras de leche se utilizaron los siguientes antibióticos: penicilina G, oxacilina, ciprofloxacina, azitromicina, sulfatrimetropin- sulfametoxazol y Tetraciclina. Los resultados se interpretaron utilizando la guía de CLSI (CLSI, 2020).

Tabla 8. Resultado del análisis estadístico Kruskal Wallis (vacas con mastitis subclínica).

Variable	ab	N	Medias	D.E	Medianas	H	P
sens	1	36	2,97	0,17	3,00	98,03	<0,0001
sens	2	36	2,36	0,93	3,00		
sens	3	36	1,00	0,00	1,00		
sens	4	36	1,08	0,37	1,00		
sens	5	36	1,00	0,00	1,00		
sens	6	36	1,33	0,76	1,00		
sens	6	36	1,33	0,76	1,00		

Tratamiento	Ranks
5	74,00 <sup>A</sup>
3	74,00 <sup>A</sup>
4	79,13 <sup>A</sup>
6	92,25 <sup>A</sup>
2	149,08 <sup>B</sup>
1	182,54 <sup>C</sup>

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

Tabla 9. Promedio de sensibilidad antibiótica obtenidos de las vacas positivas a mastitis subclínica.

Variable	Diámetro (mm)	Interpretación
Penicilina G	10,42 ± 4,12 <sup>C</sup>	Resistente
Oxacilina	18,68 ± 3,39 <sup>B</sup>	Resistente
Ciprofloxacina	25,95 ± 2,23 <sup>A</sup>	Sensible
Azitromicina	23 ± 2,04 <sup>A</sup>	Sensible
Sulfatrimetropin- sulfametoxazol,	23,15 ± 2,42 <sup>A</sup>	Sensible
Tetraciclina	20,09 ± 5,52 <sup>A</sup>	Sensible

Tabla 9. Resume los promedios obtenidos de la sensibilidad antibiótica en las vacas positivas a mastitis subclínica. Resultaron resistentes a la penicilina en un 100%, un 83.33% resistentes a la oxacilina y un 16,7% presentaron sensibilidad intermedia. El 100% de las bacterias aisladas fueron sensibles a ciprofloxacina, azitromicina, sulfatrimetropin-sulfametoxazol y el 91.6% resultó sensible a la tetraciclina y el 8,4% presentó una sensibilidad intermedia. Los datos expuestos se basan en el resultado del análisis estadístico Kruskal Wallis evidenciado en el anexo 1.

El estudio de **(Aires-de-Sousa, 2017)** asegura que la globalización de la industria ganadera la provocado el intercambio o transmisión de bacterias entre humanos y animales. Existen varios estudios que revelan que cepas resistentes como SARM se transmiten a nuevos huéspedes principalmente a los encargados del cuidado animal dichas cepas bacterianas se han adaptado y han evolucionado con elementos genéticos móviles para colonizar a los nuevos huéspedes.

Los datos publicados por **(Quispe et al., 2021)** reportan una resistencia del 52% a la penicilina y una sensibilidad del 100% a la tetraciclina y sulfatrimetoprim , el porcentaje de resistencia difiere con nuestra investigación ya que se presentó una

resistencia la penicilina del 100 % sin embargo en los porcentajes de sensibilidad de la tetraciclina y sulfatrimetoprim concuerdan con nuestros datos.

(Cuenca et al., 2023) reportaron en su investigación realizada en el cantón Biblián, provincia de Cañar- Ecuador una prevalencia del 70% de mastitis subclínica que representa 35 vacas positivas de 50 vacas muestreadas, su prevalencia de *S.aureus* fue de 32% (23 aislados positivos). El antibiograma demostró una resistencia del 95,65% a la penicilina, la tetraciclina una resistencia de 43%, la azitromicina demostró una resistencia de 32% y la ciprofloxacina una resistencia de 4,34%. Los datos expuestos anteriormente sobre la prevalencia de mastitis subclínica y *S.aureus* no concuerdan con nuestro estudio sin embargo la resistencia de *S.aureus* a la penicilina son parecidos con nuestra investigación.

El estudio realizado por (Zhang et al., 2023) en China con el propósito de identificar prevalencia y resistencia de los aislados de SARM en muestras de leche cruda obtenida de 100 granjas lecheras en 11 provincias de China con un total de 1683 muestras de leche. Determinó una prevalencia de 20,38% (343/1.683) de *S.aureus* y 49 aislamientos de SARM (49/1.683; 2,91 %). Los 49 aislados positivos a SARM expuestos a antibiograma resultaron el 100 % resistentes a la penicilina, y 89,80% resistentes a la eritromicina. Los mismos aislados demostraron una baja resistencia a trimetoprima-sulfametoxazol 10,20 %, gentamicina 14,29% y ofloxacina 6,12%. La prevalencia de *S.aureus* es menor con la reportada en nuestro estudio. A pesar de ello la resistencia a la penicilina de y la baja resistencia que resulto en trimetoprima-sulfametoxazol concuerda con nuestro estudio.

En 2 hatos lecheros donde se obtuvieron las muestras de leche se evidenció la falta de higiene y la falta de desinfección en el equipo de ordeño mecánico además del uso de una única toalla de secado de la ubre para todas las vacas. Los ordeñadores de igual forma no se lavaban las manos antes de manipular la ubre y las pezoneras del ordeño mecánico. Todos esos factores contribuyen a la proliferación de bacterias y otros microorganismos que ingresan a las glándulas mamarias aumentando los casos de infecciones bacterianas. En los hatos lecheros mencionados los casos positivos a mastitis fueron 12 en cada uno.



Es importante mencionar que el hato lechero número 3 se realizaba un ordeño tomando en cuenta los procesos de desinfección y limpieza de las instalaciones y los equipos de ordeño complementaban las prácticas de ordeño con el uso de una solución selladora de los pezones y se evidencio 4 casos positivos de mastitis subclínica.

**(Sánchez, 2015)** asegura que, realizando el adecuado lavado de manos, limpieza y lavado de la ubre y pezones, secado con toallas desechables individuales antes del ordeño, uso de desinfectantes en el área de ordeño y en todos los utensilios además del sellado de los pezones se lograra evitar el crecimiento y desarrollo microbiano y de prevenir la transmisión zoonótica de bacterias resistentes a través de las vacas al ordeñador y viceversa.

**(Vindel & Cercenado, 2016)** manifiesta que, *S.aureus* tiene la capacidad de adaptarse a varias especies animales y produce una colonización asintomática. La colonización asintomática de la bacteria en el huésped lo convierte en un reservorio y facilita la diseminación y la transmisión a otros huéspedes. Nuestra investigación confirma que los ordeñadores son portadores de *S.aureus* sin embargo no presentan ningún signo de infección por otro lado en las vacas está provocando el aumento progresivo de casos de mastitis.

**(Algammal et al., 2020)** afirma que, otra causa de la proliferación de cepas bacterianas resistentes en los animales es por el uso inadecuado de los antibióticos y excesivo de los mismos. El uso inadecuado de antibióticos betalactámicos a lo largo de los años y la transmisión de genes de resistencia por parte de *S.aureus* ha provocado que en la actualidad la penicilina y otros antibióticos sean ineficaces ante una infección de *S.aureus*. **(García Apac, 2011)**.

Como sostiene **(Quispe et al., 2021)** *S. aureus* es uno de los principales agentes etiológicos causantes de mastitis en el ganado lechero, las cepas resistente obligan a los médicos veterinarios a tratar esas enfermedades infecciosas con diferentes fármacos antibióticos, elevando los costos en el tratamiento. La investigación del autor ante mencionado demostró una prevalencia de 35,2% para *S. aureus* y una resistencia a la penicilina en un 52% los antibióticos que mostraron el 100% de sensibilidad fueron

tetraciclina cefalexina, y sulfatrimetoprim. Tomando en cuenta nuestro resultados se puede recomendar en los casos de mastitis subclínica causada por *S.aureus* la administración de ciprofloxacina, azitromicina, sulfatrimetropin-sulfametoxazol resultaron 100% sensibles.

Resultados del aislamiento de *S.aureus* en los ordeñadores: Se obtuvo muestras de hisopado nasal de las personas que participan diariamente en el ordeño. Las muestras fueron identificadas con el nombre y apellido además del hato lechero al que pertenecen.

Tabla 10. Identificación del tipo de hemolisis, resultados de tinción gram y agar sal manitol.

<b>Muestras obtenidas del hisopado nasal</b>		
Hato lechero 1	Hato lechero 2	Hato lechero 3
Henry Velasco	Miriam Coba	Daysi Villacis
Judith Arévalo		Ismael Villacis
Agar sangre	Tinción gram	Agar sal manitol
	Cocos Gram positivos	Amarillos- positivo
Betahemolíticos	Henry Velasco	Henry Velasco
Henry Velasco	Judith Arévalo	Judith Arévalo
Judith Arévalo	Miriam Coba	Miriam Coba
Miriam Coba	Daysi Villacis	Daysi Villacis
Daysi Villacis	Ismael Villacis	Ismael Villacis
Ismael Villacis		

La tabla 10 y tabla 11 resume. Las 5 muestras inoculas en agar sangre resultaron betahemolíticas y en tinción gram se observó cocos gram positivos en todas las muestras. Las pruebas bioquímicas en agar sal manitol resultaron positivas, se observó el cambio de color de rojo a amarillo en todas las muestras. Las pruebas de catalasa y

coagula de igual forma resultaron positivas. Considerando que se observó beta-hemolisis en el agar sangre, cocos gram positivos, agar sal manitol positivo, catalasa y coagulasa positiva se determina que los microorganismos son *Staphylococcus aureus*.

Tabla 11. Pruebas bioquímicas Catalasa y Coagulasa realizados en las muestras de los hisopados nasales de los ordeñadores.

<b>Pruebas bioquímicas</b>		
Catalasa	Coagulasa	<i>Staphylococcus aureus</i>
Positivo	Positivo	Henry Velasco
Henry Velasco	Henry Velasco	Judith Arévalo
Judith Arévalo	Judith Arévalo	Miriam Coba
Miriam Coba	Miriam Coba	Daysi Villacis
Daysi Villacis	Daysi Villacis	Ismael Villacis
Ismael Villacis	Ismael Villacis	

Tabla 12. Promedios de sensibilidad antibiótica realizados a partir de *S.aureus* aisladas de los hisopados nasales de las personas encargadas del ordeño.

Variable	Diámetro mm	Interpretación
Penicilina G	22,9 ± 2,98 <sup>C</sup>	Resistente
Oxacilina	14,42 ± 4,94 <sup>BC</sup>	Resistente
Ciprofloxacina	18,1 ± 4,71 <sup>A</sup>	Intermedia
Azitromicina	21,32 ± 2,59 <sup>A</sup>	Sensible
Sulfatrimetropin-sulfametoxazol,	17,84 ± 4,83 <sup>AB</sup>	Sensible
Tetraciclina	3,6 ± 8,04 <sup>C</sup>	Resistente

En la tabla 12. El 100 % de las bacterias aisladas de los hisopados nasales de los ordeñadores fueron resistentes a la penicilina y oxacilina, y el 80 % resistentes a Tetraciclina. Dos de las 5 muestras fueron sensibles a ciprofloxacina y los 3 restantes resultaron resistentes. Para azitromizina y sulfatrimetropin- sulfametoxazol el 80% de las muestras resultaron sensibles. Los datos expuestos se basan en el resultado del análisis estadístico Kruskal Wallis evidenciado en el anexo 2.

Tabla 13. Resultados obtenidos del análisis estadístico Kruskal Wallis (ordeñadores).

Variable	ab	N	Medias	D.E	Medianas	H	P
Sens ord	1	15	2,73	0,70	3,00	26,43	<0,0001
Sens ord	2	15	2,47	0,92	3,00		
Sens ord	3	15	1,47	0,83	1,00		
Sens ord	4	15	1,40	0,83	1,00		
Sens ord	5	15	1,80	0,86	2,00		
Sens ord	6	15	2,87	0,52	3,00		
Sens ord	6	15	2,87	0,52	3,00		
Tratamiento	Ranks						
4	28,50 <sup>A</sup>						
3	29,90 <sup>A</sup>						
5	37,27 <sup>AB</sup>						
2	53,83 <sup>BC</sup>						
1	60,17 <sup>C</sup>						
6	63,33 <sup>C</sup>						

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

(Rivadeneira Rojas, S. A, 2014) en su investigación realizada de Pichincha-Ecuador identificó *S. aureus* y cepas SARM a partir de hisopados nasales de los trabajadores en contacto continuo con el ganado porcino, obtuvo 115 hisopados nasales. Identificó una prevalencia de *S. aureus* de 30,4% y 6.08% de cepas SARM. Los ensayos de sensibilidad antibiótica demostraron una mayor resistencia en la penicilina 91,4%, tetraciclina (25,7%) en menor porcentaje de resistencia esta la trimetoprima-

sulfametoxazol (5,7%). Los antibióticos con 0% de resistencia fueron rifampicina, vancomicina y linezolid.

Ese estudio confirma que los trabajadores de las granjas de animales son portadores de *S. aureus* y de cepas SARM. Nuestro estudio determinó que el 100% de los ordeñadores son portadores de *S.aureus* y 100% portadores de cepas de *S.aureus* resistentes a los betalactámicos.

**(Gómez Villaescusa, 2019)** afirma que, los animales de granja y los alimentos de origen animales son los reservorios y las fuentes de diseminación de las cepas SARM a los seres humanos. Los alimentos contaminados por *S.aureus* representa un riesgo a la salud pública en la población. La incorrecta manipulación y la falta de inocuidad en los procesos de manufactura en alimentos cárnicos, lácteos y sus derivados productiva provocan la proliferación y diseminación de bacterias afectando directamente a la salud de los consumidores **(Torres Segarra et al., 2021)**.

Las investigaciones expuestas anteriormente confirman la presencia de SARM en animales de granja además de los alimentos de origen animal como la leche. Es fundamental mencionar que los trabajadores o encargados de las granjas dedicadas a la crianza de animales son las fuentes de diseminación de las cepas resistentes. El control para evitar la diseminación de cepas multirresistentes va a ser primordial para salvaguardar la salud en la población.

## CAPITULO IV

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### Conclusiones

Se concluye en base a nuestros resultados la presencia de cepas SARM en la leche y en las personas encargadas del ordeño en el caserío 12 de octubre el. Cabe recalcar que la prevalencia de mastitis subclínica en el caserío 12 de octubre es de 35% relativamente bajo si lo comparamos con otros estudios realizados en años anteriores en el país.

Se identificó a través en las muestras de leche de vacas positivas a mastitis subclínica una de prevalencia de *S.aureus* fue del 42%, por medio de ensayos de sensibilidad antibiótica se concluye que todas las cepas positivas a *S.aureus* evidenciaron una resistencia al 100% a los antibióticos betalactámicos por lo tanto se las considera cepas *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.

Se realizar los cultivos microbiológicos y las pruebas bioquímicas con los hisopados nasales de los ordeñadores de identificó una prevalencia de 100% de *Staphylococcus aureus*. De igual manera se identificó a través de procesos fenotípicos una prevalencia del 100% de cepas SARM.

Se concluye finalmente que las vacas `positivas a mastitis subclínica resultaron resistentes a la penicilina en un 100%, un 83.33% resistentes a la oxacilina y un 16,7 presentaron sensibilidad intermedia. La ciprofloxacina, azitromicina, sulfatrimetropin-sulfametoxazol resultaron 100% sensibles y la tetraciclina resultó 91.6 % sensible y el 8,4 presento una sensibilidad intermedia. De igual forma los hisopados nasales de los ordeñadores resultaron resistentes a la penicilina y oxacilina, mientras que el 80% de las bacterias fueron resistentes a tetraciclina. Dos de las 5 muestras fueron sensibles a ciprofloxacina y los 3 restantes resultaron resistentes. Para azitromicina y sulfatrimetropin- sulfametoxazol el 80% de las muestras resultaron sensibles.

## Recomendaciones

Al realizar las pruebas bioquímicas de identificación de *S.aureus* se descartaron los Estafilococos negativos coagulasa negativos por lo que se recomienda la realizar cultivos microbiológicos para identificarlos y verificar si son causantes de mastitis en el ganado lechero.

Se recomienda realizar pruebas de identificación molecular como PCR convencional para identificar la presencia del gen *mecA* en los aislados identificados fenotípicamente como SARM.

A las personas encargadas del ordeño se recomienda realizar la limpieza de toda el área y de los equipos de ordeño, usar toallas de secado descartables y utilizar soluciones selladoras de los pezones para evitar la proliferación de bacterias y disminuir la prevalencia de Mastitis.

## Referencias bibliográficas

- Aires-de-Sousa, M. (2017). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among animals: Current overview. *Clinical Microbiology and Infection*, 23(6), 373-380. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.11.002>
- Algammal, A., Hetta, H. F., Elkelish, A., Alkhalifah, D., Hozzein, W., Batiha, G., Nahhas, N. E., & Mabrok, M. (2020). *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina (MRSA): Enfoque desde una perspectiva de salud para la epidemiología de las bacterias, los factores de virulencia, la resistencia a los antibióticos y el impacto zoonótico. *Infection and Drug Resistance*, 13, 3255-3265. <https://doi.org/10.2147/IDR.S272733>
- Alvarado C, W., González M, J., Quilcate P, C., Saucedo U, J., & Bardales D, J. (2019). Factores de prevalencia de mastitis subclínica en vacas lecheras del distrito de Florida, Región Amazonas, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 30(2), 923-931. <https://doi.org/10.15381/rivep.v30i2.16088>
- Álvarez, B. (2011). Identificación rápida de *Staphylococcus aureus* metilina resistente. *Staphylococcus aureus*.
- Aranguren Parra, A. J., López Ortega, A. A., Mendoza, C. A., & Delgado, N. (2009). Efecto de la mastitis clínica y subclínica sobre la concentración plasmática de metabolitos, proteínas totales y albúmina en hembras bovinas. *Zootecnia Tropical*, 27(1), 057-064.
- Avellán Vélez, R. H., Zambrano Aguayo, M. D., De La Cruz Veliz, L. M., Cedeño, C. A., Delgado Demera, M., Rezabala Zambrano, P. F., & Macías Moreira, Y. A. (2019). Prevalencia de mastitis subclínica en el ganado bovino, mediante la prueba California Mastitis Test, en el cantón Rocafuerte de la provincia Manabí, Ecuador. *Revista Amazónica Ciencia y Tecnología*, 8(1), 62-70.
- Bedolla, C. (2017). *ETIOLOGÍA DE LA MASTITIS BOVINA*. [https://www.produccion-animal.com.ar/sanidad\\_intoxicaciones\\_metabolicos/infecciosas/bovinos\\_leche/128-Etiologia.pdf](https://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_leche/128-Etiologia.pdf)
- Bedolla, C. C. (2008). *Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina en la industria lechera*.



- BIO-BACTER. (2023). *MEDIO DE CULTIVO AGAR SANGRE. 2.*
- Bioser. (2023). Trypto-Casein Soy Agar (TSA) | Aerobios y Anaerobios. *Bioser*.  
<https://www.bioser.com/productos/trypto-casein-soy-agar-tsa-74p/>
- Bolaños, F., Fernando, O., Graffe, T., Eduardo, J., Cabrera, P., Jaiver, J., & Gallego, C. (2012). *MASTITIS BOVINA: GENERALIDADES Y MÉTODOS DE DIAGNOSTICO. 13.*
- Bonifaz, N., & Colango, F. (2016). Prevalencia e incidencia de mastitis bovina mediante la prueba decaliforniamastitis test con identificación del agente etiológico, en paquiestancia, Ecuador. *La Granja*, 24(2).  
<https://doi.org/10.17163/lgr.n24.2016.04>
- Braßel, F., & Hidalgo Flor, F. (Eds.). (2007). *Libre comercio y lácteos: La producción de leche en el Ecuador entre el mercado nacional y la globalización*. SIPAE [u.a.].
- CLSI. (2020). *CLSI VET01S ED5:2020*. Obtenido de CLSI VET01S ED5:2020:  
<http://clsivet.org/GetDoc.aspx?doc=CLSI%20VET01S%20ED5:2020&xormat=SPDF&src=BB>
- Cervantes-García, E., García-González, R., & Salazar-Schettino, P. M. (2014). *Características generales del Staphylococcus aureus*.
- Cevallos, C. (2016). “*PLAN DE DESARROLLO TURÍSTICO PARA EL CANTÓN QUERO, PROVINCIA DE TUNGURAHUA*”.  
<http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/4767/1/PLAN%20DE%20DESARROLLO%20TUR%3%8DSTICO%20PARA%20EL%20CANT%3%93N%20QUERO.pdf>
- Cheung, G. Y. C., Bae, J. S., & Otto, M. (2021). Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*, 12(1), 547-569.  
<https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1878688>
- Crespo-Piazuelo, D., & Lawlor, P. G. (2021). Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA) prevalence in humans in close contact with animals and measures to reduce on-farm colonisation. *Irish Veterinary Journal*, 74(1), 21. <https://doi.org/10.1186/s13620-021-00200-7>
- Camussone, & L., C. (2013). Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* asociados con infecciones mamarias en bovinos: relevancia y rol como agentes inmunógenos. *Revista Argentina de Microbiología*, 119-130.

- Cuenca, M., Yarzabal, L., Buela, L., Guamán, M., Gonzáles, A., & Escoba, M. (2023). DETECCIÓN DE CEPAS MULTIRRESISTENTES DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS EN LECHE DE VACAS CON MASTITIS CLÍNICA Y SUB-CLÍNICA, EN EL CANTÓN BIBLIÁN, PROVINCIA DE CAÑAR. ECUADOR. *Investigación Clínica*, 63, 425-436.
- Devriese, L. A., Van Damme, L. R., & Fameree, L. (1972). Methicillin (cloxacillin)-resistant Staphylococcus aureus strains isolated from bovine mastitis cases. *Zentralblatt Fur Veterinarmedizin. Reihe B. Journal of Veterinary Medicine. Series B*, 19(7), 598-605. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1972.tb00439.x>
- Díaz Arias, T. J. (2022). *Determinación de la prevalencia de mastitis en vacas Holstein mestizas de la Asociación ASOPROPEM del cantón Patate*. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/17850>
- Fariña, N. (2016). Resistencia bacteriana: Un problema de salud pública mundial de difícil solución. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, 14(1), 04-05. [https://doi.org/10.18004/Mem.iics/1812-9528/2016.014\(01\)04-005](https://doi.org/10.18004/Mem.iics/1812-9528/2016.014(01)04-005)
- GAD Cevallos. (2022). *Municipalidad de Cevallos*. <https://www.cevallos.gob.ec/>
- Galarza, M. I. G., & Rodríguez, L. A. Y. (2021). Staphylococcus aureus Resistentes a metilina en animales de granja en Suramérica: Una revisión sistemática. *Revista Vive*, 4(11), Article 11. <https://doi.org/10.33996/revistavive.v4i11.99>
- García Apac, C. (2011). Staphylococcus aureus metilino resistente adquirido en la comunidad. *Acta Médica Peruana*, 28(3), 159-162.
- Gastelo Acosta, R. (2020). *Mecanismos de resistencia bacteriana*. <http://142.44.242.51/index.php/diagnostico/article/view/82>
- Gómez Villaescusa, P. (2019). *Staphylococcus aureus en animales de vida libre y medioambiente. Resistencia a antimicrobianos, virulencia, líneas genéticas circulantes y genómica comparativa* [Http://purl.org/dc/dcmitype/Text, Universidad de La Rioja]. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=221322>
- González, C. (2010). *Mecanismos de resistencia a antibióticos b-lactámicos en Staphylococcus aureus*. <https://ve.scielo.org/pdf/km/v38n1/art03.pdf>

- Haag, A. F., Fitzgerald, J. R., & Penadés, J. R. (2019). *Staphylococcus aureus en animales / Espectro de microbiología*.  
<https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/microbiolspec.gpp3-0060-2019>
- Landi, A. A., Arrieta, S. E., Iñiguez, L. G., Leal, F. A., Pilamunga, P. Y., & Hernández, P. A. (2018). ELABORADOS EN ZONAS RURALES DE RIOBAMBA-ECUADOR. *Revista Científica*, 2.
- Leticia Diana<sup>1</sup>, Camila Ciuffo<sup>1</sup>, & Hector Musto. (2019). Identificación y caracterización de Staphylococcus resistentes a meticilina aislados de perros. *Veterinaria (Montevideo)*, 55(212). <https://doi.org/10.29155/VET.55.212.1>
- Lozano, C., & Torres, C. (2017). Actualización en la resistencia antibiótica en Gram positivos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 35, 2-8.  
[https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(17\)30028-9](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(17)30028-9)
- Martín Bermudez, A. (2020). *Determinación fenotípica de Staphylococcus aureus resistente a meticilina*. <https://riull.ull.es/xmlui/handle/915/19990>
- MDMADMIN. (2017). *¿Sabes qué es el caldo BHI infusión cerebro corazón? – MDM Científica*. <https://mdmcientifica.com/caldo-bhi-infusion-cerebro-corazon/>
- MDMADMIN. (2019). *Conoce más sobre el medio de cultivo llamado Agar Mueller Hinton – MDM Científica*. <https://mdmcientifica.com/agar-mueller-hinton/>
- OMS. (2020). *Resistencia a los antibióticos*. Organización Mundial de la Salud.  
<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>
- Pérez, J. D. V. (2022). *INGENIERO ZOOTECNISTA*. 92.  
<http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/17844/1/17T01795.pdf>
- Portillo, M. E., & Del Pozo, J. L. (2018). Infecciones por estafilococo. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 12(49), 2890-2894.  
<https://doi.org/10.1016/j.med.2018.02.002>
- Quevedo, W. (2018). Recuento de células somáticas (rsc), como indicador en la resistencia de la mastitis bovina. *Revista de Ciencia, Tecnología e Innovación*, 16(17), 12-12. <https://doi.org/10.56469/rcti.v16i17.134>
- Quispe, R., Peñtilde, G., a, Andiacute, V., & a. (2021). Resistencia antimicrobiana de Staphylococcus aureus y Streptococcus agalactiae aislados de leche de vacas con mastitis. *Revista Veterinaria*, 32(1), 79-84.

- Ramirez, L. S., & Castaño, D. M. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*, 2(42), Article 42. <https://doi.org/10.22517/23447214.2687>
- RAULILLO91. (2017, marzo 10). Pruebas bioquímicas cocos Gram +. *¡Pipetéaló!* <https://pipetealo.wordpress.com/2017/03/10/pruebas-bioquimicas-cocos-gram/>
- Reinoso-García, L., González-Rojas, J., Esteban, T.-C., & Cuenca, M. (2021). Detection of Subclinic Bovine Mastitis and associated factors, in dairy farms of the Province of Cañar -Biblián, Ecuador. *Revista Científica*, 31, 93-97. <https://doi.org/10.52973/rcfcv-luz313.art3>
- Rivadeneira Rojas, S. A, S. (2014). *Prevalencia de Staphylococcus aureus resistente a la meticilina, aislados en trabajadores de granjas porcinas de la provincia de Pichincha 2014*. <https://core.ac.uk/reader/143437990>
- Rojas, G. C., & Ulate, L. A. (2016). *RESISTENCIA ANTIMICROBIANA: MICROORGANISMOS MÁS RESISTENTES Y ANTIBIÓTICOS CON MENOR ACTIVIDAD*. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revmedcoscen/rmc-2016/rmc164c.pdf>
- Sadat, A., Shata, R. R., Farag, A. M. M., Ramadan, H., Alkhedaide, A., Soliman, M. M., Elbadawy, M., Abugomaa, A., & Awad, A. (2022). Prevalence and Characterization of PVL-Positive Staphylococcus aureus Isolated from Raw Cow's Milk. *Toxins*, 14(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/toxins14020097>
- Salas, R. G., & Río, M. M. V. del. (2021). Mastitis bovina y calidad de la leche, un desafío para la salud humana. *Universidad y Sociedad*, 13(S1), Article S1.
- Sánchez, J. M. R. (2015). Prevalencia y factores predisponentes a mastitis subclínica en establos lecheros de la provincia de Trujillo. *CEDAMAZ*, 5(1), Article 1. <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/cedamaz/article/view/41>
- Scaramelli, A., & González, Z. (2005). *Prevención y control de la mastitis bovina*.
- Sharun, K., Dhama, K., Tiwari, R., Gugjoo, M. B., Iqbal Yattoo, Mohd., Patel, S. K., Pathak, M., Karthik, K., Khurana, S. K., Singh, R., Puvvala, B., Amarpal, Singh, R., Singh, K. P., & Chaicumpa, W. (2021). Advances in therapeutic and managemental approaches of bovine mastitis: A comprehensive review. *The Veterinary Quarterly*, 41(1), 107-136. <https://doi.org/10.1080/01652176.2021.1882713>

- Silva, J. F. M., Feitosa, A. C., & Rodrigues, R. M. (2017). STAPHYLOCOCCUS AUREUS EM ALIMENTOS. *DESAFIOS - Revista Interdisciplinar da Universidade Federal do Tocantins*, 4(4), Article 4. <https://doi.org/10.20873/uft.2359-3652.2017v4n4p15>
- Smith, T. C., Thapaliya, D., Bhatta, S., Mackey, S., Engohang-Ndong, J., & Carrel, M. (2018). Geographic distribution of livestock-associated *Staphylococcus aureus* in the United States. *Microbes and Infection*, 20(6), 323-327. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2018.05.004>
- Taylor, T. A., & Unakal, C. G. (2023). *Staphylococcus aureus* Infection. En *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441868/>
- Torres Segarra, S. M., Pacheco Cárdenas, K. E., Torres Segarra, S. M., & Pacheco Cárdenas, K. E. (2021). *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina en alimentos. *Vive Revista de Salud*, 4(12), 23-35. <https://doi.org/10.33996/revistavive.v4i12.106>
- Vilca, J. C., & Oyarce, R. R. (2022). Células somáticas y composición nutricional de la leche en tanque, Bongara Amazonas, Perú, 2021. *Revista Científica UNTRM: Ciencias Naturales e Ingeniería*, 5(1), Article 1. <https://doi.org/10.25127/ucni.v4i3.809>
- Vindel, A., & Cercenado, E. (2016). *Staphylococcus aureus* resistentes a la metilina portadores del gen mecC: ¿un problema emergente? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 34(5), 277-279. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.01.010>
- Zhang, Z., Jianzhong, W., & Hejia., W. (2023 ). Molecular Surveillance of MRSA in Raw Milk Provides Insight into MRSA Cross Species Evolution. *Microbiology Spectrum*, e00311-23.
- Zambrano-Mila, M., Rodriguez, A. S., Rivera-Olivero, I. A., Salas-Rueda, M., Caceres-Orellana, M. V., de Waard, J. H., & Garcia-Bereguain, M. A. (2020). Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* carriage among guinea pigs raised as livestock in Ecuador. *One Health*, 9, 100118. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2019.100118>

Zendejas-Manzo, G. S., Avalos-Flores, H., & Soto-Padilla, M. Y. (2014).  
Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades,.  
*Staphylococcus aureus*, 25(3).

## ANEXOS

Halo de inhibición obtenido a partir de las muestras de leche de vacas positivas a mastitis subclínica.

Tabla 14. Halo de inhibición. Hato lechero 1: Gila

Antibióticos	Simbología	Halo de inhibición (mm)	Interpretación
Penicilina G	P	7	Resistente
Oxacilina	OX	18.5	Resistente
Ciprofloxacina	CIP	25	Sensible
Azitromicina	AZM	24.5	Sensible
Sulfatrimetropin-sulfametoxazol	SxT	24	Sensible
Tetraciclina	TE	21.5	Sensible

Tabla 15. Halo de inhibición. Hato lechero 1: Sofia

Antibióticos	Simbología	Halo de inhibición (mm)	Interpretación
Penicilina G	P	8	Resistente
Oxacilina	OX	20.5	Resistente
Ciprofloxacina	CIP	29.5	Sensible
Azitromicina	AZM	26.5	Sensible
Sulfatrimetropin- sulfametoxazol	SxT	25	Sensible
Tetraciclina	TE	21	Sensible

Tabla 16. Halo de inhibición. Hato lechero 1: Roberta

Antibióticos	Simbología	Halo de inhibición (mm)	Interpretación
Penicilina G	P	7	Resistente
Oxacilina	OX	19	Resistente
Ciprofloxacina	CIP	27.5	Sensible
Azitromicina	AZM	22.5	Sensible
Sulfatrimetropin- sulfametoxazol	SxT	25	Sensible
Tetraciclina	TE	22	Sensible

Tabla 17. Halo de inhibición. Hato lechero 1: Gala

Antibióticos	Simbología	Halo de inhibición (mm)	Interpretación
Penicilina G	P	10.5	Resistente
Oxacilina	OX	22	Resistente
Ciprofloxacina	CIP	27	Sensible
Azitromicina	AZM	21.5	Sensible
Sulfatrimetropin- sulfametoxazol	SxT	23.5	Sensible
Tetraciclina	TE	21	Sensible



Tabla 18. Halo de inhibición. Hato lechero 1: Negra

Antibióticos	Simbología	Halo de inhibición (mm)	Interpretación
Penicilina G	P	6	Resistente
Oxacilina	OX	20	Resistente
Ciprofloxacina	CIP	26.5	Sensible
Azitromicina	AZM	23	Sensible
Sulfatrimetropin-sulfametoxazol	SxT	21.5	Sensible
Tetraciclina	TE	22.5	Sensible

Tabla 19. Halo de inhibición. Hato lechero 1: Lupe

Antibióticos	Simbología	Halo de inhibición (mm)	Interpretación
Penicilina G	P	12	Resistente
Oxacilina	OX	22	Sensible
Ciprofloxacina	CIP	26	Sensible
Azitromicina	AZM	24	Sensible
Sulfatrimetropin-sulfametoxazol	SxT	26	Sensible
Tetraciclina	TE	26	Sensible

Tabla 20. Halo de inhibición. Hato lechero 2: Cinco

Antibióticos	Simbología	Halo de inhibición (mm)	Interpretación
Penicilina G	P	19.6	Resistente
Oxacilina	OX	10.6	Resistente
Ciprofloxacina	CIP	22.6	Sensible
Azitromicina	AZM	22	Sensible
Sulfatrimetropin-sulfametoxazol	SxT	20	Sensible
Tetraciclina	TE	21.6	Sensible

Tabla 21. Halo de inhibición. Hato lechero 2: Manzana

Antibióticos	Simbología	Halo de inhibición (mm)	Interpretación
Penicilina G	P	17	Resistente
Oxacilina	OX	14	Resistente
Ciprofloxacina	CIP	24	Sensible
Azitromicina	AZM	18	Sensible
Sulfatrimetropin-sulfametoxazol	SxT	19.5	Sensible
Tetraciclina	TE	21.5	Sensible

Tabla 22. Halo de inhibición. Hato lechero 2: Pistón

Antibióticos	Simbología	Halo de inhibición (mm)	Interpretación
Penicilina G	P	8	Resistente
Oxacilina	OX	19	Resistente
Ciprofloxacina	CIP	26	Sensible
Azitromicina	AZM	24	Sensible
Sulfatrimetropin-sulfametoxazol	SxT	23	Sensible
Tetraciclina	TE	22	Sensible

Tabla 23. Halo de inhibición. Hato lechero 2: Siete

Antibióticos	Simbología	Halo de inhibición (mm)	Interpretación
Penicilina G	P	10	Resistente
Oxacilina	OX	22	Sensible
Ciprofloxacina	CIP	26	Sensible
Azitromicina	AZM	23	Sensible
Sulfatrimetropin-sulfametoxazol	SxT	23	Sensible
Tetraciclina	TE	4	Resistente

Tabla 24. Halo de inhibición. Hato lechero 3: Silvia

Antibióticos	Simbología	Halo de inhibición (mm)	Interpretación
Penicilina G	P	9	Resistente
Oxacilina	OX	17.6	Resistente
Ciprofloxacina	CIP	22.3	Sensible
Azitromicina	AZM	24	Sensible
Sulfatrimetropin- sulfametoxazol	SxT	20.3	Sensible
Tetraciclina	TE	16	Intermedio

Tabla 25. Halo de inhibición. Hato lechero 3: 2508

Antibióticos	Simbología	Halo de inhibición (mm)	Interpretación
Penicilina G	P	11	Resistente
Oxacilina	OX	19	Resistente
Ciprofloxacina	CIP	29	Sensible
Azitromicina	AZM	23	Sensible
Sulfatrimetropin- sulfametoxazol	SxT	27	Sensible
Tetraciclina	TE	22	Sensible

Halo de inhibición obtenido a partir de hisopados nasales de las personas encargadas del ordeño diario.

## Ordeñadores Hato lechero 1

Tabla 26. Halo de inhibición. Ordeñador Hato lechero 1: Henry

Antibióticos	Simbología	Halo de inhibición (mm)	Interpretación
Penicilina G	P	25	Resistente
Oxacilina	OX	8	Resistente
Ciprofloxacina	CIP	22	Sensible
Azitromicina	AZM	22	Sensible
Sulfatrimetropin-sulfametoxazol	SxT	18	Sensible
Tetraciclina	TE	18	Intermedia

Tabla 27. Halo de inhibición. Ordeñador Hato lechero 1: Judith

Antibióticos	Simbología	Halo de inhibición (mm)	Interpretación
Penicilina G	P	21	Resistente
Oxacilina	OX	16.6	Resistente
Ciprofloxacina	CIP	15.6	Intermedio
Azitromicina	AZM	22	Sensible
Sulfatrimetropin-sulfametoxazol	SxT	19.3	Sensible
Tetraciclina	TE	Sin halo	Resistente

## Ordeñador Hato lechero 2

Tabla 28. Halo de inhibición. Ordeñador Hato lechero 2: Miriam

Antibióticos	Simbología	Halo de inhibición (mm)	Interpretación
Penicilina G	P	24.3	Resistente
Oxacilina	OX	18.6	Resistente
Ciprofloxacina	CIP	14	Resistente
Azitromicina	AZM	21.6	Sensible
Sulfatrimetropin-sulfametoxazol,	SxT	20.3	Sensible
Tetraciclina	TE	Sin halo	Resistente

## Ordeñadores Hato lechero 3

Tabla 29. Halo de inhibición. Ordeñador Hato lechero 3: Daysi

Antibióticos	Simbología	Halo de inhibición (mm)	Interpretación
Penicilina G	P	18.6	Resistente
Oxacilina	OX	10.3	Resistente
Ciprofloxacina	CIP	14.6	Resistente
Azitromicina	AZM	17	Intermedio
Sulfatrimetropin-sulfametoxazol	SxT	9.6	Resistente
Tetraciclina	TE	3.3	Resistente

Tabla 30. Halo de inhibición. Ordeñador Hato lechero 3: Ismael

Antibióticos	Simbología	Halo de inhibición (mm)	Interpretación
Penicilina G	P	25.6	Resistente
Oxacilina	OX	18.6	Resistente
Ciprofloxacina	CIP	24.3	Sensible
Azitromicina	AZM	24	Sensible
Sulfatrimetropin-sulfametoxazol,	SxT	22	Sensible
Tetraciclina	TE	Sin halo	Resistente

**Anexo 1.** Resultados del cálculo estadístico de la sensibilidad antibiótica obtenidas a partir del aislamiento de *S.aureus* de las vacas positivas a mastitis subclínica.

Variable	ab	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
sens	1	36	2,97	0,17	3,00	98,03	<0,0001
sens	2	36	2,36	0,93	3,00		
sens	3	36	1,00	0,00	1,00		
sens	4	36	1,08	0,37	1,00		
sens	5	36	1,00	0,00	1,00		
sens	6	36	1,33	0,76	1,00		

Trat.	Ranks	
5	74,00	A
3	74,00	A
4	79,13	A
6	92,25	A
2	149,08	B
1	182,54	C

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

**Anexo 2.** Resultados del cálculo estadístico de la sensibilidad antibiótica obtenidas a partir del aislamiento de *S.aureus* de las muestras de los hisopados nasales de los ordeñadores.

Variable	ab	ord	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
sens ord 1			15	2,73	0,70	3,00	26,43	<0,0001
sens ord 2			15	2,47	0,92	3,00		
sens ord 3			15	1,47	0,83	1,00		
sens ord 4			15	1,40	0,83	1,00		
sens ord 5			15	1,80	0,86	2,00		
sens ord 6			15	2,87	0,52	3,00		

Trat.	Ranks
4	28,50 A
3	29,90 A
5	37,27 A B
2	53,83 B C
1	60,17 C
6	63,33 C

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

### Anexo 3. Identificación de las vacas positivas a mastitis por medio de la Prueba CMT.



Limpieza y desinfección de los pezones.



Prueba CMT.





Interpretación de la prueba CMT.

**Anexo 4.** Identificación fenotípica de *S.aureus*.



Siembra de la muestra de leche en agar sangre.

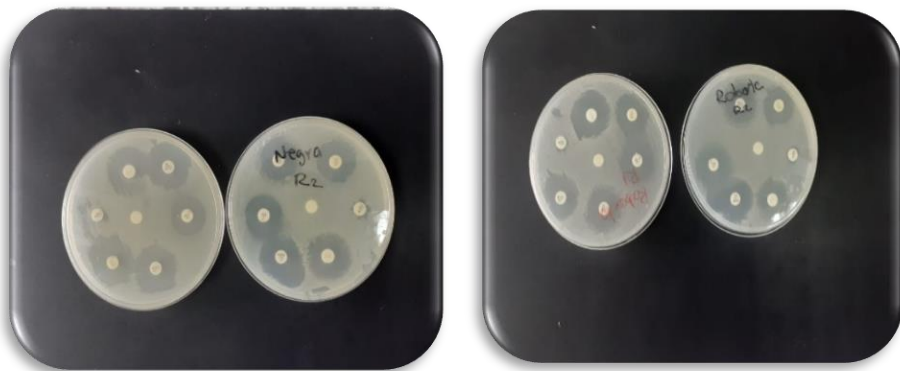


Siembra en agar sal manitol.



Prueba catalasa y Coagulasa.

**Anexo 5. Ensayos de sensibilidad antibiótica.**



Halos de inhibición ensayos de sensibilidad antibiótica.



Halos de inhibición ensayos de sensibilidad antibiótica.