



UNIVERSIDAD  
CATÓLICA  
DE CUENCA

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA**

*Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo*

**UNIDAD ACADÉMICA DE SALUD Y BIENESTAR**

**CARRERA DE BIOFARMACIA**

**“AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA E  
IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE *Staphylococcus  
aureus* EN VACAS LECHERAS CON MASTITIS EN LA  
PROVINCIA DE CAÑAR”**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN  
DEL TÍTULO DE QUÍMICAS FARMACEUTAS**

**AUTORAS: DAYANA MISHEL ESCOBAR NARVÁEZ**

**ARIANNA MICHELLE GONZÁLEZ CABRERA**

**DIRECTORA: MSC. LENYS MARGARITA BUELA SALAZAR**

**CUENCA-ECUADOR**

**2022**

**DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO**



**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA**

*Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo*

**UNIDAD ACADÉMICA DE SALUD Y BIENESTAR**

**CARRERA DE BIOFARMACIA**

**“AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA E  
IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE *Staphylococcus  
aureus* EN VACAS LECHERAS CON MASTITIS EN LA  
PROVINCIA DE CAÑAR”**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL  
TÍTULO DE QUÍMICAS FARMACEUTAS**

**AUTORAS: DAYANA MISHEL ESCOBAR NARVÁEZ  
ARIANNA MICHELLE GONZÁLEZ CABRERA**

**DIRECTORA: MSC. LENYS MARGARITA BUELA SALAZAR**

**CUENCA-ECUADOR**

**2022**

**DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO**



**Declaratoria de Autoría y Responsabilidad**

**Dayana Mishel Escobar Narvárez** portadora de la cédula de ciudadanía N° **0401934922**. Declaro ser el autor de la obra: **“Aislamiento, caracterización fenotípica e identificación molecular de cepas de *Staphylococcus aureus* en vacas lecheras con mastitis en la Provincia de Cañar”**, sobre la cual me hago responsable sobre las opiniones, versiones e ideas expresadas. Declaro que la misma ha sido elaborada respetando los derechos de propiedad intelectual de terceros y eximo a la Universidad Católica de Cuenca sobre cualquier reclamación que pudiera existir al respecto. Declaro finalmente que mi obra ha sido realizada cumpliendo con todos los requisitos legales, éticos y bioéticos de investigación, que la misma no incumple con la normativa nacional e internacional en el área específica de investigación, sobre la que también me responsabilizo y eximo a la Universidad Católica de Cuenca de toda reclamación al respecto.

Cuenca, **23 de septiembre de 2022**

  
F: .....

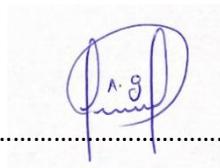
**Dayana Mishel Escobar Narvárez**

**C.I. 0401934922**

**Declaratoria de Autoría y Responsabilidad**

**Arianna Michelle González Cabrera** portadora de la cédula de ciudadanía N° **1105355414**. Declaro ser el autor de la obra: **“Aislamiento, caracterización fenotípica e identificación molecular de cepas de *Staphylococcus aureus* en vacas lecheras con mastitis en la Provincia de Cañar”**, sobre la cual me hago responsable sobre las opiniones, versiones e ideas expresadas. Declaro que la misma ha sido elaborada respetando los derechos de propiedad intelectual de terceros y eximo a la Universidad Católica de Cuenca sobre cualquier reclamación que pudiera existir al respecto. Declaro finalmente que mi obra ha sido realizada cumpliendo con todos los requisitos legales, éticos y bioéticos de investigación, que la misma no incumple con la normativa nacional e internacional en el área específica de investigación, sobre la que también me responsabilizo y eximo a la Universidad Católica de Cuenca de toda reclamación al respecto.

Cuenca, **23 de septiembre de 2022**



F: .....

**Arianna Michelle González Cabrera**

**C.I. 1105355414**

### **CERTIFICACIÓN:**

Certifico que el presente trabajo de titulación denominado “AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE *Staphylococcus aureus* EN VACAS LECHERAS CON MASTITIS EN LA PROVINCIA DE CAÑAR”, realizado por Escobar Narváez Dayana Mishell - González Cabrera Arianna Michelle, ha sido revisado y orientado durante su ejecución bajo el asesoramiento permanente de mi persona en calidad de Tutor/a, por lo que certifico que el presente documento, fue desarrollado siguiendo los parámetros del método científico, se sujeta a las normas éticas de investigación, por lo que está expedito para su sustentación.

Cuenca, **23 de agosto de 2022**



**Firma**

Lic. Lenys Margarita Buela Salazar, MSc.

---

## RESUMEN

La mastitis es una de las enfermedades más graves y frecuentes que padece el ganado lechero, *Staphylococcus aureus* es una especie que, con mayor frecuencia, infecta estas glándulas y causa inflamación. Se trata de una bacteria que posee una gran patogenicidad. Además, ha desarrollado resistencia contra numerosos antibióticos de uso terapéutico.

**OBJETIVO:** Pese a su importancia desde el punto de vista de salud pública, no existen estudios sobre las características fenotípicas y genotípicas de cepas de *S. aureus* que circulan entre el ganado lechero de la región de Cañar. Por ello, el objetivo principal de esta investigación es la caracterización fenotípica y genotípica de las cepas de *S. aureus* causantes de mastitis en vacas lecheras del Cantón Biblián Provincia de Cañar, en el periodo de abril-junio del 2021.

**MATERIALES Y MÉTODOS:** La metodología aplicada fue de tipo básico-orientado, con un diseño observacional y de tipo descriptivo. Para ello, se tomaron muestras de leche de vacas de ordeño que presentaban mastitis clínica y sub-clínica confirmada, luego se realizó la caracterización fenotípica en base a pruebas bioquímicas y caracterización genotípica mediante métodos moleculares.

**RESULTADOS:** Los resultados indican que, *S. aureus* forma parte del conjunto de microorganismos que se encuentran en el tejido mamario causando inflamación, en vacas lecheras criadas en granjas de estudio. La detección de los genes *nucA* y *femB* en todas las cepas de estudio, fue fundamental para lograr una identificación más confiable de esta especie.

**PALABRAS CLAVE:** *Staphylococcus aureus*, mastitis bovina, fenotípica, patógeno, resistencia.

---

## ABSTRACT

Mastitis is one of the most severe and frequent diseases suffered by dairy cattle, and *Staphylococcus aureus* is a species that most frequently infects these glands and causes inflammation. It is a highly pathogenic bacterium. In addition, it has developed resistance against numerous antibiotics in therapeutic use.

**Objective:** Despite its importance from a public health point of view, there are no studies on the phenotypic and genotypic characteristics of *S. aureus* strains circulating among dairy cattle in the Cañar region. Therefore, this research's main objective is the phenotypic and genotypic characterization of *S. aureus* strains causing mastitis in dairy cows from Biblián canton, province of Cañar, in April-June 2021.

**Materials and Methods:** The methodology applied was basic-oriented, with an observational and descriptive design. For this, milk samples were taken from milking cows with confirmed clinical and sub-clinical mastitis, followed by phenotypic characterization based on biochemical tests and genotypic characterization by molecular methods.

**Results:** The results indicate that *S. aureus* is part of the microorganisms found in mammary tissue, causing inflammation in dairy cows raised on study farms. Detecting the *nucA* and *femB* genes in all study strains was fundamental to achieving a more reliable identification of this species.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, bovine mastitis, phenotypic, pathogen, resistance.

---

## INDICE

DEDICATORIA.....	1
AGRADECIMIENTOS:.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	3
I.1.- PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN.....	4
I.2.- JUSTIFICACIÓN.....	5
I.2.1.- PREGUNTA CIENTÍFICA:.....	7
I.3.- OBJETIVOS.....	7
I.3.1.-Objetivo General:.....	7
I.3.2.-Objetivos Específicos:.....	7
I.4.- MARCO TEÓRICO.....	8
I.4.1.- Antecedentes:.....	8
I.4.2.- Marco referencial:.....	9
CAPÍTULO II.....	14
METODOLOGÍA.....	14
II.1.- Diseño de investigación.....	15
II.2.- Población y muestra.....	15
II.2.1. Universo - Población:.....	15
II.3.- Definición y clasificación de las variables.....	15
II.5.- Procedimientos, técnicas e instrumentos para la obtención de datos.....	17
II.5.1.- Procedimientos estadísticos y análisis de datos.....	20
II.6.- Aspectos éticos.....	21
CAPÍTULO III.....	22
III.1.- RESULTADOS.....	23
III.2.- DISCUSIÓN.....	35
CAPÍTULO IV.....	39
IV.1.- CONCLUSIONES.....	40
IV.2.- RECOMENDACIONES.....	41
BIBLIOGRAFÍA.....	42

---

## **DEDICATORIA.**

Mi proyecto de tesis va dedicado primeramente a Dios y a la Purita por guiar mi camino y permitirme culminar esta gran meta de vida.

A mis amados padres Nelson y Alejandra por ser el pilar fundamental en mi vida, mi motor y mi mayor inspiración, por depositar su confianza en mí, enseñarme a no rendirme y por ser quienes me impulsan a luchar por mis sueños, es un orgullo y privilegio ser su hija ....

A mis abuelitos por estar siempre conmigo, brindarme su apoyo y sus consejos que han sido de gran ayuda para mi crecimiento y mi vida.

A mis hermanitas por siempre estar para mí y sacarme sonrisas a diario, A mi querida prima por hacer mi vida feliz incluso en los momentos de dolor, quien a pesar de la distancia siempre está para mí.

A toda mi familia, por brindarme su amor y apoyo incondicional, mi eterna gratitud para ustedes.

Con mucho cariño a mi Compañera de tesis por su amistad e infinita paciencia, por tu apoyo y conocimientos, por ser tan maravillosa y admirable, fuimos un gran equipo. Y para todas las personas que a lo largo de mi carrera universitaria tuve el placer de conocer.

Dayana Mishell Escobar Narváez

---

El presente trabajo de investigación está dedicado a Dios y a la Virgencita del Cisne, por ser mi luz y guía diaria, por brindarme sabiduría y fortaleza para llegar a este momento tan importante de mi vida.

A mi Madre con todo el cariño por ser el pilar fundamental de mi vida. Su amor infinito y apoyo incondicional en todo momento ha sido el motor principal para mi superación profesional y personal. Todos mis logros y metas alcanzadas son gracias a su inigualable esfuerzo.

A mi querido hermano por todo su apoyo, Al Sr. Víctor Cabrera por su acogida y cariño, a mis Abuelitos que están en el cielo, sé que desde arriba continuarán iluminando mi vida. A mi Tía Mercedes y su familia con todo el cariño. Gracias por creer y confiar en mis sueños.

A mi compañera de tesis y gran amiga, por ser una maravillosa persona llena de valores y virtudes. Me alegra haber compartido mágicos momentos llenos de aprendizaje. Su dedicación, esfuerzo y compromiso han sido primordiales para llegar a la etapa final de este proyecto de tesis

Arianna Michelle González Cabrera

---

## **AGRADECIMIENTOS:**

Mi eterno agradecimiento a Dios por brindarme la oportunidad de vivir esta etapa, por guiarme siempre y darme fuerzas para conseguir mis sueños.

A mi tutora de tesis Dra. Lenys Buela y co-tutor Dr. Andrés Yarzábal por permitirme formar parte de este proyecto de investigación. Por su valioso apoyo, tiempo, esfuerzo y dedicación. Gracias por guiarme con sus conocimientos en esta larga trayectoria de mi formación profesional. Un verdadero placer haber podido compartir con excelentes personas como ustedes.

A la Dra. Mercy Cuenca y la Lic. Diana Peláez por brindarnos su apoyo, tiempo y consejos. Mi gratitud por estar siempre pendientes durante este proceso.

A los docentes de la Facultad de Biofarmacia por su calidad humana y por compartirme sus enseñanzas a lo largo de mi formación académica

A los propietarios de las granjas por darnos su consentimiento y colaborarnos para la obtención de las muestras

Millón de gracias a mis padres todo lo que soy se los debo a ustedes, son las personas más importantes y que más amo en el mundo

Gracias a todas aquellas personas que confiaron en mí y me brindaron su apoyo, a mis compañeros y amigos por alegrar este proceso de formación, y con mucho cariño a Fabricio por su amor, apoyo y comprensión. A mi gran amiga Ángeles por ser incondicional y siempre estar para mí.

Millón de gracias a mis padres todo lo que soy se los debo a ustedes, son las personas más importantes y que más amo en el mundo

Dayana Mishell Escobar Narváz

---

A mi directora de tesis, Dra. Lenys Buela y co-tutor, Dr. Andrés Yarzábal por permitirme formar parte de este importante proyecto de investigación. Su tiempo y orientación ha sido esencial para culminar el mismo. Gracias por impartir sus conocimientos, destrezas y consejos muy valiosos dentro de mi formación profesional

A la Dra. Mercy Cuenca, por su tiempo y colaboración durante la toma de muestras.

A la Lic. Diana Peláez por su apoyo incondicional y compromiso en las actividades durante esta investigación. Gracias por ser una excelente persona.

A los docentes de la Facultad de Biofarmacia por compartir todos sus conocimientos a lo largo de mi carrera profesional

A los propietarios de las diferentes granjas por brindarnos su confianza y permiso para la obtención de muestras.

A todas aquellas personas que me brindaron apoyo moral y palabras de aliento durante mi formación académica, a mis compañeros y amigos con quienes compartí agradables momentos, en especial a Leyde y Maribel por su apoyo infinito en este arduo camino y sobre todo por brindarme su amistad sincera.

Arianna Michelle González Cabrera

---

## INTRODUCCIÓN

*Staphylococcus aureus*, una especie bacteriana que se encuentra ampliamente diseminado en el ambiente, es considerado como uno de los patógenos más prevalentes responsable de causar graves infecciones a nivel intrahospitalario y comunitario. La literatura especializada reporta que las infecciones por diferentes cepas de esta especie, particularmente aquellas resistentes a varios antibióticos, pueden ser adquiridas en la comunidad a través del contacto directo y frecuente con animales domésticos y de granja.

A nivel mundial, se ha visto que la diseminación de estas cepas multirresistentes de *S. aureus* resultan difícil de controlar debido a que poseen múltiples factores de virulencia que le permiten invadir y colonizar los órganos y tejidos del hospedero. En efecto, *S. aureus* tiene una gran capacidad de adquirir diferentes elementos genéticos móviles, particularmente aquellos que les confieren resistencia a los antibióticos, mediante mecanismos de transferencia horizontal; por lo general, esto sucede como consecuencia del uso irracional e indebido de los antibióticos por parte de la comunidad y de los actores del sector agropecuario.

Estudios realizados en los últimos años señalan a *S. aureus* como unos de los microorganismos responsables de casos de mastitis clínica o subclínica en vacas lecheras; estas infecciones afectan directamente a la producción y disminución de la calidad de la leche generando notables pérdidas económicas. Más importante aún, la leche contaminada en las diferentes granjas puede causar serios problemas de salud pública.

Esta problemática, de gran relevancia científica y epidemiológica a nivel global, es el objeto principal de numerosas investigaciones; no obstante, hasta la actualidad en nuestro país existen escasos estudios de este tipo. La gran mayoría de los mismos han sido realizados en países como Brasil y Colombia, mientras que en el resto de los países latinoamericanos -incluido el nuestro- sólo se ha podido evidenciar un par de estudios similares al que desarrollamos en la presente investigación. En la mayoría de estos trabajos se destaca la presencia de cepas de *S. aureus* en ganado vacuno; por el contrario, en muy pocos se evaluó la presencia, en dichas cepas, de genes asociados con la resistencia antimicrobiana o la manifestación de la virulencia empleando técnicas de biología molecular.

Por esta razón el objetivo principal de este estudio es caracterizar fenotípica y genotípicamente cepas de *S. aureus* aisladas a partir de muestras de leche obtenidas de vacas que presentan mastitis clínica o subclínica, mediante el empleo de estas técnicas moleculares.

# **CAPÍTULO I**

## **PLANTEAMIENTO TEÓRICO.**

---

---

---

## I.1.- PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN.

En la actualidad, la resistencia microbiana a los antibióticos constituye uno de los problemas más desafiantes de salud pública en el mundo entero. Esto queda claramente reflejado en el aumento de los casos de infecciones causadas por patógenos resistentes a múltiples antibióticos, lo que representa una gran amenaza a nuestra capacidad para tratar infecciones comunes (1). Frente a esta problemática, y con el objetivo de fomentar el uso adecuado de los antibióticos por parte de profesionales de salud y la comunidad en general, la Organización Mundial de la Salud (OMS) presentó en el año 2001 una iniciativa llamada “Estrategia Global para contención de la Resistencia a los Antimicrobianos” (2), (3). Entre otros aspectos, esta estrategia destaca los principales aspectos relacionados con la contención de la resistencia y enfatiza la urgencia de llevar a cabo investigaciones que permitan aportar conocimientos en torno a este grave problema.

Existen bacterias patógenas del ser humano y otros animales de gran relevancia epidemiológica; entre ellas sobresale *Staphylococcus aureus* (4). Se trata de un microorganismo gram positivo, que se encuentra ampliamente distribuido en el ambiente, y que expresa múltiples factores de virulencia que le permiten invadir y colonizar los tejidos del hospedero, causando graves infecciones a nivel intrahospitalario y comunitario. *S. aureus* es capaz de adquirir diferentes elementos genéticos por vía horizontal, que le confieren la resistencia a los antibióticos; por lo general, esto se ve favorecido por el uso irracional e indebido de los antibióticos por parte de la comunidad y del sector agropecuario, con fines de mejorar la producción cárnica o lechera (5), (6).

Estudios realizados en los últimos años indican que *S. aureus* es uno de los microorganismos más frecuentes asociados con la mastitis clínica o subclínica en vacas lecheras, siendo esta una de las mayores limitantes en la producción lechera y disminuyendo, por consiguiente, la calidad de la leche, lo cual genera notables pérdidas económicas. Más importante aún, la leche contaminada puede provocar serios problemas de salud pública (7).

La terapia con antibióticos es una medida primordial para controlar la mastitis bovina y las infecciones humanas(8). Sin embargo, un considerable número de estudios indican que muchas cepas de *S. aureus* son resistentes a múltiples clases de agentes antimicrobianos. Además, la capacidad de formar biopelículas que es característica de esta especie, se asocia con más frecuencia a infecciones crónicas y recurrentes en animales y seres humanos (9).

Por todo lo anterior, la presente investigación tiene gran relevancia puesto que se pretende detectar la presencia de este tipo de microorganismos en la leche de vacas criadas en granjas de la Provincia de Cañar (Ecuador), con la finalidad de

brindar información valiosa, no solo desde el punto de vista científico y epidemiológico, sino para orientar a la implementación de estrategias frente a estas infecciones previniendo la diseminación de este patógeno

## I.2.- JUSTIFICACIÓN

*Staphylococcus aureus* es uno de los principales agentes causales de una amplia gama de infecciones. Particularmente preocupantes son las cepas de *S. aureus* resistentes a antibióticos beta-lactámicos de reciente generación, como la meticilina y oxacilina, pues representan un grave problema de salud humana y animal a nivel mundial (6).

Se ha reportado la presencia de esta bacteria en diversas especies animales, especialmente los que son criados en granjas como vacas, cerdos, conejos, cuyes, y aves de corral; la problemática también se extiende a animales domésticos como perros y gatos (10). Las infecciones *por S. aureus* se reportan con una elevada frecuencia como causa de mastitis en vacas lecheras. Por consiguiente, los profesionales dedicados a la cría, manejo y cuidado en general de este tipo de animales, se encuentran regularmente expuestos a infecciones provocadas por estos patógenos(11).

Por esta razón es de gran importancia la realización de este estudio, ya que permitirá generar información relevante acerca de una realidad que podría tener graves consecuencias. A partir del aislamiento, la caracterización y la identificación molecular de cepas *S. aureus* presentes en los tejidos mamarios de vacas con mastitis, se generarán resultados que serán analizados con el fin de permitir la toma de medidas para el control y prevención de este tipo de infecciones.

Los beneficios de este proyecto están basados en proporcionar y difundir información acerca de la presencia de estas cepas de *S. aureus* y su relación con la mastitis en vacas, de tal manera que los productores conozcan las consecuencias que se pueden generar al consumir un producto con la presencia de microorganismos. Esta información permitirá, además, concientizar a la población del adecuado uso de los antibióticos para un tratamiento efectivo de este tipo de infecciones, garantizando la salud de los animales y evitando así pérdidas económicas a los productores dedicados a la crianza de ganado y la producción de leche.

La ejecución de todas las actividades propuestas en el marco de esta investigación contribuirá a nuestra formación profesional, ya que obtendremos conocimientos teóricos y desarrollaremos habilidades prácticas con respecto a la aplicación de técnicas de microbiología, así como también técnicas de Biología molecular,

tomando en cuentas que las mismas son empleadas en distintas áreas de estudio para la identificación de microorganismos.

Entre los beneficiarios directos de este estudio podemos destacar:

Docentes investigadores pertenecientes a la Carrera de Bioquímica y Farmacia, Carrera de Odontología de la Unidad de Salud y Bienestar; Carrera de Veterinaria, Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias; Centro de Investigación, Innovación y Transferencia de Tecnología (CIITT).

La Universidad Católica de Cuenca también se verá beneficiada con la publicación de los resultados de este trabajo, puesto que el mismo permitirá obtener resultados importantes para la comunidad científica tomando en cuenta que es una de las pocas investigaciones realizadas en la provincia de Cañar sobre este microorganismo y su relación con la mastitis.

Tesistas de pregrado, que participen como asistentes en proyectos de investigación quienes se verán beneficiados ya que obtendrán nuevos conocimientos, así como también reforzarán destrezas y habilidades prácticas en el laboratorio.

Dueños de establecimientos agropecuarios: recibirán la información sobre el estado de salud de sus animales y los cuidados necesarios para evitar cualquier contagio con estas cepas bacterianas, potencialmente patógenas.

Empresas: distribuidores de insumos, reactivos y equipos de laboratorio serán beneficiarios directos del proyecto.

Por otra parte, los beneficiarios indirectos, serán las 281396 personas que habitan en la provincia de Cañar, que podrán conocer las características de los microorganismos potencialmente patógenos, y causantes de enfermedades zoonóticas, que infectan a sus animales.

Estudiantes de las carreras implicadas en este estudio, quienes recibirán información sobre las distintas características de las cepas *S. aureus* que infectan al ganado.

### **I.2.1.- PREGUNTA CIENTÍFICA:**

¿Cuáles son las características genotípicas y fenotípicas de las cepas de *Staphylococcus aureus*, causantes de mastitis clínica y sub-clínica, en vacas lecheras del Cantón Biblián (Provincia de Cañar, Ecuador)?

### **I.3.- OBJETIVOS**

#### **I.3.1.-Objetivo General:**

Caracterizar fenotípicamente y genotípicamente cepas de *S. aureus* causantes de mastitis en vacas lecheras del Cantón Biblián Provincia de Cañar en el periodo de abril-junio del 2021.

#### **I.3.2.-Objetivos Específicos:**

Aislar cepas de *S. aureus* a partir de leche de vacas que presentan mastitis clínica o subclínica, en granjas localizadas en la Provincia de Cañar;

Describir las cepas aisladas de *S. aureus* a nivel fenotípico (morfología de células y colonias, producción de enzimas hidrolíticas, resistencia a antibióticos);

Identificar las cepas de *S. aureus* a partir de la presencia de los genes *nucA* y *femB*.

---

## I.4.- MARCO TEÓRICO

### I.4.1.- Antecedentes:

En el año 2018, Galarza y Molina publicaron datos sobre la determinación molecular de las especies microbianas causantes de la mastitis bovina en los cantones Cayambe y Pedro Moncayo, provincia de Pichincha (Ecuador). En dicho trabajo pretendían identificar las especies bacterianas responsables de la infección bovina mediante pruebas bioquímicas y moleculares. Las mismas incluían cultivo en agar manitol salado, tinción de gram, prueba de catalasa y coagulasa. Para la identificación molecular de los agentes etiológicos y genes de resistencia utilizaron primers específicos (12).

De acuerdo con sus resultados, se destaca a *S. aureus* como uno de los agentes etiológicos que, con mayor frecuencia, causa mastitis en bovinos; de igual forma, los autores determinaron la presencia de cepas de esta especie resistentes a antibióticos (12).

En el 2018, Andrade & Sánchez realizaron un estudio clínico, microbiológico y económico en cuatro fincas de la Cooperativa de Producción Agropecuaria "El Salinerito" (Provincia de Bolívar, Ecuador). En el estudio se incluyeron un total de 58 vacas de producción, evaluando en cada una de ellas todos los cuartos mamarios. Entre los agentes etiológicos más frecuentes, los autores reportaron a *S. aureus* (55,2 %) (13).

Por su parte, Carrillo y sus colaboradores realizaron un estudio en hatos lecheros de Boyacá-Colombia con la finalidad de identificar los microorganismos responsables de las mastitis, tanto clínica como subclínica; de igual forma, valoraron la susceptibilidad de las mismas frente a compuestos antimicrobianos. Se evaluaron un total de 541 vacas en producción, distribuidas en 25 fincas(14). Los autores determinaron que las bacterias Gram positivas eran la principal causa de mastitis en la zona, destacando a *S. aureus* como el agente causante de mastitis clínica y subclínica más frecuente, con porcentajes que variaron de 32 a 42%. Un elevado porcentaje de cepas de *S. aureus* (83.3%) presentaron resistencia a la estreptomycinina y Oxacilina (14).

En el año 2017, Argudo realizó una investigación en las provincias de Azuay y Cañar (Ecuador) con el objetivo de identificar casos de mastitis bovina causadas por *S. aureus* resistentes a antibióticos de uso común; de igual forma, estudiaron los factores de riesgo que contribuyen al desarrollo de la enfermedad en vacas. En sus resultados el autor indica que, en un total de 218 muestras analizadas, el agente

infeccioso detectado más frecuentemente fue *S. aureus* (122 muestras positivas). Por otra parte, el autor determinó que la mayor susceptibilidad de dichas cepas se presentó frente a la estreptomina, amoxicilina + ácido clavulánico, penicilina y cloxacilina; por el contrario, la mayor resistencia de estas cepas fue frente a eritromicina, tetraciclina, cefalexina (15).

#### **I.4.2.- Marco referencial:**

##### **Antibióticos**

Los antibióticos son fármacos que se utilizan para la prevención y tratamiento de infecciones causadas por bacterias en personas y animales. Algunos de ellos son capaces de inhibir la multiplicación (*crecimiento*) y la proliferación de diversas bacterias patógenos. Esto es debido a que los antibióticos pueden actuar con efecto bactericida o bacteriostático (16).

Los antibióticos pueden ser de origen natural -es decir producidos por un organismo vivo- o ser sintetizados químicamente. Generalmente presentan una toxicidad selectiva, es decir que afectan solo a los microorganismos invasores (bacterias) más no a los organismos hospedadores (mamíferos), aunque en eventualmente se puede producir una reacción adversa medicamentosa, que puede afectar a la microbiota normal del hospedador(17), (18).

##### **Resistencia antimicrobiana**

La *resistencia antimicrobiana* se define como la capacidad que posee un microorganismo (virus, bacterias, hongos, parásitos) para neutralizar o resistir al efecto de algún compuesto antimicrobiano (3). Esta resistencia puede ser natural, es decir, propia de cada microorganismo, o adquirida que es la más habitual. En este último caso puede ser debido a mutaciones o por la adquisición de nuevos genes por transferencia horizontal (6).

Los microorganismos resistentes pueden infectar personas, animales, o plantas; también pueden estar presentes en el medio ambiente y los alimentos. Estos agentes pueden propagarse de una persona a otra, o entre las personas y los animales, dando origen en este último caso a enfermedades de tipo *zoonótico* (o *zoonosis*). Entre los principales factores que provocan la aparición de la resistencia antimicrobiana se encuentran el uso inadecuado e indiscriminado de los antimicrobianos, la falta de saneamiento e higiene tanto para las personas como

para los animales, las escasas medidas de prevención y control de las enfermedades y las infecciones en los centros de salud (16),(19).

La resistencia a los antibióticos cada día aumenta a niveles peligrosos debido a que muchos de los tratamientos disponibles para tratar infecciones bacterianas comunes están perdiendo su eficacia por la aparición de nuevos mecanismos de resistencia como consecuencia del uso indebido de los mismos. Esta resistencia antibiótica tiene el potencial de afectar a todas las personas en cualquier etapa de la vida, así como a las industrias de la salud, agricultura y veterinaria, y representa uno de los aspectos más preocupantes de la salud pública (1),(3).

### **Mastitis bovina**

La mastitis bovina es una afección grave y compleja que afecta las glándulas mamarias de las hembras de ciertos mamíferos, en particular los bovinos criados para la producción de leche. Generalmente, la mastitis es causada por diversos agentes infecciosos, entre los que destacan ciertas bacterias como *S. aureus*, *Streptococcus* spp. y bacterias coliformes (20). Estas bacterias pueden dar origen a manifestaciones más o menos graves de mastitis clínica y subclínica, lo que afecta muy significativamente la producción y la calidad de la leche, generando considerables pérdidas económicas. La mastitis también puede ser ocasionada por hongos, levaduras, micoplasmas e incluso, algunos virus (15).

La mastitis es una infección de las glándulas mamarias, que se caracteriza por alteraciones en el tejido glandular, así como por ocasionar diferentes cambios, tanto físicos como químicos en la leche. Entre estos cambios, los más notables son la modificación del color, la presencia de coágulos y un gran número de leucocitos (13).

Existen diversos factores que predisponen a este tipo de infecciones tales como una rutina inadecuada de ordeño, un inadecuado funcionamiento de la ordeñadora automática, heridas en los pezones y presencia de los diversos patógenos en el ambiente que rodea al ganado vacuno (7).

### **Mastitis Subclínica**

La mastitis subclínica es predominante en infecciones intramamarias; en este caso, la infección no presenta cambios visibles en la ubre o en la leche. Es por ello que solamente puede ser diagnosticada a través de métodos que permitan poner en evidencia la presencia de microorganismos patógenos. Como hemos dicho, se

caracteriza por una reducción muy significativa de la calidad y el volumen de leche producida (7).

### **Mastitis clínica**

La mastitis clínica es una anormalidad en la glándula mamaria de la vaca, que puede ser fácilmente observada e identificada. Se caracteriza por el enrojecimiento, inflamación y la tumefacción de la ubre. En la leche se pueden presentar coágulos o flóculos. Por lo general, la mastitis clínica es provocada por bacterias patógenas pertenecientes a los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* y también por algunos coliformes, lo que reduce considerablemente el rendimiento y calidad de la leche (21).

### **Antibiograma**

El antibiograma es una estrategia experimental que permite determinar la susceptibilidad *in vitro* de ciertos patógenos a una variedad de antimicrobianos: los antibióticos. Es una prueba de gran importancia debido a que permite determinar la eficacia que el antibiótico indicado tiene para combatir la infección (22).

Se utiliza básicamente para fines específicos tales como tratamiento de infecciones, monitoreo epidemiológico y diagnóstico (22).

### ***Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* es un microorganismo de gran importancia que se encuentra diseminado en el ambiente, causando diversas infecciones tanto a nivel comunitario como intrahospitalario.

Esta bacteria es un coco gram positivo, cuyas células se agrupan en racimos. *S. aureus* forma parte de la flora normal de diferentes tejidos y órganos en los seres humanos. *S. aureus* se caracteriza por causar infecciones en la piel y tejidos blandos, así como también ocasiona enfermedades que se transmiten a través de los alimentos (23). Tales enfermedades se deben a la capacidad del patógeno de producir toxinas, y son frecuentes en determinados sectores de la población, particularmente en algunas localidades desfavorecidas por el sistema de salud, con ausencia de medidas de control de infecciones adecuadas (24).

Las infecciones causadas por *S. aureus* son de difícil tratamiento, pues las bacterias tienen una gran capacidad de invadir las células del hospedero y colonizar sus órganos; esto es debido a sus características fisiopatológicas, entre las cuales

destacan, la formación de biopelículas (*biofilms* bacterianos) como mecanismo de resistencia (24). Estas biopelículas están formadas por una matriz extracelular, formada por proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos, que rodea y protege a las células. La formación de esta matriz impide que los antibióticos puedan entrar en contacto con las bacterias, determinando el fracaso de los tratamientos (9).

*S. aureus* tiene la capacidad de producir varias enzimas entre ellas la coagulasa y nucleasa, estas le confieren la capacidad de patogenicidad, mecanismos de supervivencia, y la resistencia a algunos antibióticos lo que representa un potencial peligro para la salud tanto humana como animal por lo tanto su identificación es necesaria para controlar y prevenir las diversas patologías (25).

En la actualidad la identificación de cepas de *S. aureus* se lleva cabo gracias al uso de la técnica denominada Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR). Existen diferentes alternativas para implementar esta reacción, que permiten detectar e identificar genes que constituyen marcadores moleculares específicos para la especie *S. aureus*; entre ellos figuran los *nucA*, *coaA*, *femA*, *femB* entre otros (26). *S. aureus* tiene la capacidad de producir una termonucleasa extracelular (TNasa). La mayoría de cepas de *S. aureus* portan el gen *nucA* en su genoma, por lo su detección es utilizada como una forma de identificar a esta especie; este gen almacena la información necesaria para la síntesis de dicha enzima, (27).

Los genes *fem* (del inglés factors essential for methicillin resistance), están relacionados con la resistencia a la meticilina. El gen *femB* forma parte de un grupo de genes co-localizados en el denominado operón *femAB*. Los productos de estos genes participan en la síntesis del inter péptido de pentaglicina, fundamental en la formación del peptidoglucano presente en la pared celular de los estafilococos (26),(28).

## **Biopelículas**

Las biopelículas (también llamadas *biofilms*) son comunidades muy estructuradas y complejas de bacterias y otros microorganismos que se encuentran adheridas a superficies vivas o inertes. Estas biopelículas presentan características muy particulares como una gran heterogeneidad, resistencia a los antimicrobianos, diversidad de ambientes y capacidad de comunicación intercelular, que las transforman en estructuras muy difíciles de erradicar de los ambientes en las que están establecidas (9).

*S. aureus* posee una gran capacidad de formar biopelículas que son de interés clínico, debido a que esto le confiere a la especie una mayor resistencia a los antibióticos y las defensas del hospedero por lo que determina directamente las consecuencias de la infección (24).

**CAPÍTULO II**  
**METODOLOGÍA**

## II.1.- Diseño de investigación.

La investigación es de tipo básico-orientado, y se basa en un diseño observacional y de tipo descriptivo.

## II.2.- Población y muestra.

**II.2.1. Universo - Población:** Por no tratarse de un estudio de tipo epidemiológico no aplica este tipo de consideraciones; sin embargo, el tamaño muestral que se consideró en este estudio fue establecido a conveniencia, tomando en cuenta 50 cepas como valor mínimo de muestras a analizar.

**II.2.2 Muestreo y muestra:** Las cepas de *S. aureus* fueron aisladas a partir de leche de vacas con mastitis clínica o subclínica, en granjas seleccionadas al azar en el cantón Biblián de la provincia de Cañar (Ecuador). La recolección de leche fue realizada sin riesgo ni sufrimiento para los animales y con el consentimiento de los dueños de las granjas. Las muestras de leche fueron recolectadas manualmente en la madrugada, durante el ordeño de rutina. El diagnóstico de la infección intramamaria fue efectuado por veterinarios profesionales.

## II.3.- Definición y clasificación de las variables

1. Frecuencia de *S. aureus* en muestras de leche en vacas con mastitis. Cuantitativa

Definición: Proporción de muestras de leche que contienen células de *S. aureus*

Escala de medición:

-Porcentaje (de 0 a 100%) de muestras de leche

2. Porcentaje de cepas de *S. aureus* resistentes a los antibióticos. Cuantitativa

Definición: Proporción (expresada en porcentaje) de cepas de *S. aureus* resistentes a los antibióticos evaluados

Escala de medición:

-Porcentaje de cepas de *S. aureus* resistentes a los antibióticos

3. Frecuencia de marcadores *nucA* y *femB* a nivel genotípico

Definición: Porcentaje de cepas positivas que presentan los genes *nucA* y *femB* en su genoma, detectado mediante PCR

Escala de medición:

-Porcentaje de cepas positivas para la presencia de los marcadores *nucA* y *femB*

#### 4. Porcentaje de cepas positivas para la producción de DNAsa

Definición: Proporción (expresada en porcentaje de 0 a 100%) de cepas que son capaces de formar un halo claro en medio Agar de ácido desoxirribonucleico (DNA) (lo que se considera una actividad positiva de la enzima)

Escala de medición:

-Porcentaje de 0 a 100% de cepas positivas

#### 5. Morfología de las colonias

Definición: Aspecto de las colonias en manitol salado

Escala de medición:

Color

Tamaño

Textura

#### 6. Tipo de pared celular.

Definición: Respuesta de las células bacterianas frente a la tinción de Gram

Escala de medición:

-Gram positivas

-Gram negativas

#### 7. Resistencia antibiótica

Definición: Capacidad de multiplicarse en presencia de distintos antibióticos, determinado en un ensayo de tipo antibiograma

Escala de medición:

-Sensible

-Resistente

## **II.5.- Procedimientos, técnicas e instrumentos para la obtención de datos.**

Los datos que generemos durante la realización de nuestro trabajo, fueron ingresados en bases de datos que contenían matrices de información resumida en tablas. Para ello utilizamos el programa Excel 2016.

Para el análisis de estos datos, aplicamos estadística descriptiva. De esta manera, resumimos la información en tablas, gráficos, fotografías y cuadros estadísticos. Esto nos permite presentar los resultados finales de tal manera que estos sean claros y concisos.

### **Técnicas e instrumentos:**

**Descripción de la zona de muestreo:** El estudio se realizó en pequeñas fincas ganaderas localizadas en el cantón Biblián, entre las coordenadas geográficas 2,67310° S, 78,90384°O. Su altitud promedio es de 2608 metros sobre el nivel del mar. Este cantón posee un clima frío y húmedo con una temperatura de 14°C.

**Obtención de las muestras:** En primer lugar, se desinfectaron las ubres de las vacas con abundante agua y jabón, luego se procedió a secar con papel absorbente y se evaluó utilizando el Test de Mastitis de California el cual nos permitió identificar la presencia de la infección y a la vez nos sirvió como indicador del cuarto infectado para la toma de muestra. Adicionalmente se realizó el recuento directo de células somáticas con la finalidad de conseguir resultados más precisos.

Posteriormente se procedió a recolectar manualmente 5 ml de leche en tubos falcón estériles, los cuales fueron rotulados con el nombre del animal y el número del cuarto del que se tomó la muestra. Para garantizar la seguridad de las muestras y evitar su derrame o contaminación, se selló la tapa con papel Parafilm®.

Finalmente, conservamos las muestras en el interior de cajas herméticas con hielo seco para mantenerlas refrigeradas durante el traslado hasta el laboratorio.

**Siembra en medios de cultivo:** Las muestras se sembraron con la ayuda de hisopos estériles en medios de cultivo como Agar Nutritivo y Manitol Salado diluido a  $\frac{1}{4}$ ; una vez inoculados, los medios se incubaron a 27°C.

**Identificación de crecimiento microbiano:** Después de 48h se procedió a verificar la aparición de colonias para seleccionar y purificar aquellas que presentan morfología completamente diferente (morfotipos).

**Purificación de cepas:** Una vez seleccionadas las distintas colonias, se procedió a realizar su purificación mediante el método siembra por estrías con la finalidad de obtener colonias puras que nos permitieron realizar posteriores estudios.

**Caracterización morfológica de las colonias:** La morfología de las colonias se determinó en base a la observación de las mismas en medio manitol salado. Para ello, se tomaron en cuenta caracteres como el color (blanco, amarillo, anaranjado, crema), el tamaño (pequeña o grande), la textura (rugosa, seca, mucoide, cremosa y brillante) y la acidificación del medio (cambio de color del sustrato cromogénico de rojo a amarillo).

**Morfología de células (Tinción de Gram):** La tinción de Gram se realizó a partir de aislados puros según el protocolo establecido por Hans Christian Gram. Con la ayuda del microscopio y utilizando el lente 100x se observó en su mayoría cocos teñidos de violeta (Gram positivo), agrupados en racimos. Para el control de calidad de la tinción se utilizó la cepa ATCC de *Staphylococcus aureus* 25923 (Gram positivo) y (control Gram negativo).

### **Caracterización bioquímica**

**Prueba de Catalasa:** Es una prueba utilizada para detectar la presencia de la enzima catalasa y permite identificar específicamente a la especie *Staphylococcus aureus*.

Para realizar esta prueba se depositó una gota de una solución de peróxido de hidrógeno en la superficie de una lámina portaobjetos con la ayuda de una pipeta Pasteur; seguidamente se tomó una colonia con la ayuda de un asa esterilizada y se mezcló con el peróxido para luego observar la reacción del desprendimiento de burbujas de oxígeno, señal de que la prueba resultó ser positiva.

**Prueba de Coagulasa:** Es una prueba utilizada para evidenciar la presencia de la enzima coagulasa, permitiendo diferenciar las cepas de *S. aureus* de otras especies de *Staphylococcus*.

En la prueba de la coagulasa primeramente se tomó una colonia del aislado para agregar a un tubo que contenía plasma y se disolvió, posteriormente se incubó a 37°C durante 4 horas. En el caso de algunas pruebas con reacción tardía se procedió a incubar 24 horas para así poder observar la formación completa del coágulo indicando que las pruebas son positivas para coagulasa.

**Prueba de DNAsa:** Se utiliza el Agar de ácido desoxirribonucleasa (DNA), el cual es un medio elaborado para la demostración de la producción de desoxirribonucleasa por bacterias, en este caso por *S. aureus*.

Para llevar a cabo esta prueba se procedió a sembrar con la ayuda del asa una colonia aislada de *S. aureus* en la superficie del Agar. Se puede sembrar simultáneamente de 4 a 5 muestras diferentes en la misma placa. Luego se incubo durante 24 horas a 37°C. Se observó un halo rosa alrededor de las colonias en las pruebas positivas y por el contrario en las pruebas negativas la ausencia del halo.

## **Caracterización Molecular**

### **Detección de los Genes *nucA* y *femB* por PCR**

#### **Extracción de ADN:**

Para extraer el ADN de cepas de *S. aureus* se utilizó el método de lisis alcalina, Para ello, se resuspendieron colonias individuales de *S. aureus* en un volumen determinado (1 ml) de agua destilada estéril. A continuación, las suspensiones se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos, para posteriormente descartar el sobrenadante. Una vez hecho esto, se añadió 50 ul de solución de lisis (dodecilsulfato sódico o SDS 1% en hidróxido de sodio 0.25N) y se agitó vigorosamente, para luego someterlo a ebullición durante 10 minutos. Una vez terminada esta etapa, se añadieron 450 ul de agua libre de nucleasas y se centrifugo luego durante 20 segundos a 3000 rpm. Finalmente, el ADN obtenido de esta manera fue almacenado a -20°C.

#### **Reacción en Cadena de la Polimerasa:**

Las reacciones de amplificación de los genes *nucA* y *femB* se llevó a cabo en un volumen final de 20 µL, en una mezcla que contenía 10 µL de Master Mix Gotaq Green 2X (Promega Corporation), 1.5 µL de ADN genómico, 5.5 µL de agua ultra pura y 1.5 µL de cada cebador (o *primer*). Como control positivo se utilizó ADN genómico de la cepa de *S. aureus* ATCC 29213. La amplificación de PCR se llevó a cabo en un termociclador Agilent Sure Cyclor 8800. Los fragmentos de ADN fueron sometidos a electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2% p/v, previamente teñidos con SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen Corp.). La corrida electroforética se llevó a cabo en buffer TAE 1X, a 100 V constantes por 60 minutos. Los geles se observaron y fueron fotografiados bajo luz UV en un transiluminador. Se emplearon marcadores de longitud molecular de 1 kb Plus DNA Ladder (Trackit

de Invitrogen). La longitud molecular de los fragmentos amplificados se determinó midiendo la distancia recorrida por cada una de las bandas de ADN en los geles de agarosa, y comparando dichas distancias con las de las bandas correspondientes a los marcadores de longitud de ADN, (29).

## **Estudio de la resistencia a antibióticos**

### **Antibiogramas:**

La técnica del antibiograma permite estimar la susceptibilidad de una cepa bacteriana frente a un antibiótico determinado. Además, por medio del antibiograma podemos determinar la evolución de la resistencia bacteriana.

Para realizar el antibiograma se utilizó el agar de Müller-Hinton, el cual fue preparado 24 horas previo al procedimiento. Posteriormente se inoculó la totalidad de la superficie del medio con un hisopo estéril utilizando una suspensión del germen de 18-24 horas de incubación con una turbidez equivalente  $1,5 \times 10^6$  bacterias/ml. La suspensión cubrió toda la superficie de la placa, por lo cual la siembra se realizó en forma de estrías hacia distintas direcciones con la finalidad de obtener una dispersión uniforme de la bacteria por toda la placa. Una vez listo, el inóculo se dejó secar durante 5 min. Para colocar los discos de papel que contienen los antibióticos sobre el agar se utilizó una pinza estéril tomando en cuenta que la distancia entre discos debe ser de 30 mm. Incubar a 35-37 °C durante 24 horas. Para medir el diámetro de la zona de inhibición se empleó un vernier u otro instrumento similar.

Para determinar la susceptibilidad de las cepas aisladas se empleó la técnica de Kirby – Bauer.

La interpretación de los resultados se realizó siguiendo las pautas establecidas en el Manual del CLSI (Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing) (30).

### **II.5.1.- Procedimientos estadísticos y análisis de datos**

La información obtenida durante la ejecución del trabajo, particularmente los valores numéricos, fue ingresados en bases de datos. Para tal fin, utilizamos el programa Excel 2016.

## **II.6.- Aspectos éticos**

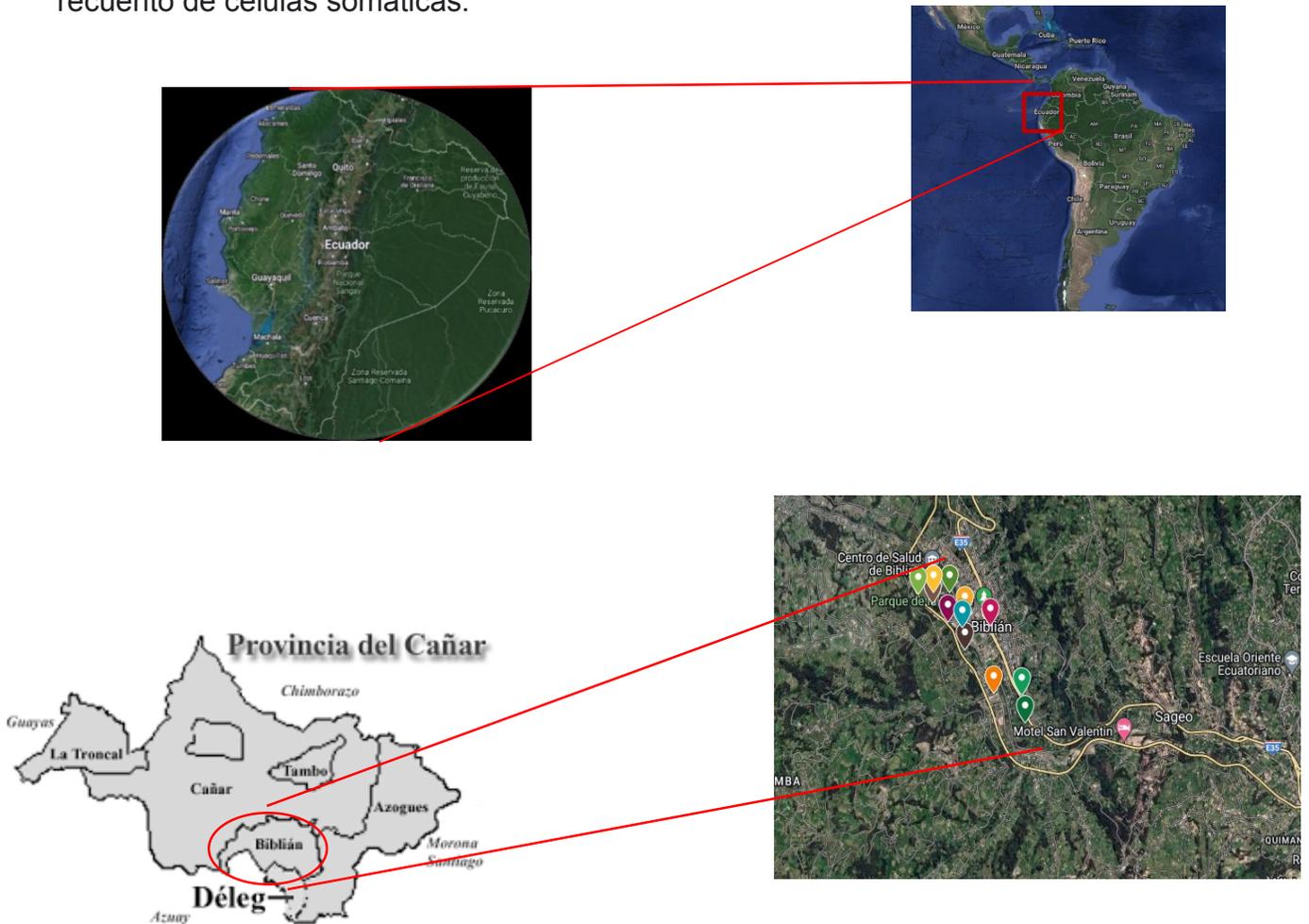
Esta investigación no presenta ningún tipo de conflicto bioético. De acuerdo a las regulaciones nacionales en Ecuador, no es necesario la aprobación ética para la toma de muestras para el diagnóstico en animales de granja. (“Ley Orgánica de Sanidad Agropecuaria” 2017, Asamblea Nacional, República del Ecuador). El consentimiento escrito e informado se obtuvo directamente de los propietarios de las granjas, a quienes se les informará de los resultados de la investigación.

**CAPÍTULO III**  
**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### III.1.- RESULTADOS

#### Muestreo Inicial y aislamiento primario de cepas del género de *S. aureus*

Durante el proceso de toma de muestras de leche de vacas se visitaron 12 fincas localizadas en el Cantón Biblián, Provincia de Cañar (Tabla 1). En total se tomaron muestras a partir de 50 vacas, de las cuales 35 de ellas presentaron uno o todos sus cuartos mamarios afectados con mastitis clínica o subclínica. Esto fue determinado mediante la utilización de la técnica California Mastitis Test (CMT) y recuento de células somáticas.



**Figura 1.** Ubicación del Cantón Biblián, Provincia de Cañar-Ecuador.

Fuente: [https://www.google.com/maps/d/edit?hl=es&mid=1cSWeSsQP147p\\_FU3Pt8vzYS2XPLgpK8&ll=-2.7208865291654982%2C-78.9220180330768&z=13](https://www.google.com/maps/d/edit?hl=es&mid=1cSWeSsQP147p_FU3Pt8vzYS2XPLgpK8&ll=-2.7208865291654982%2C-78.9220180330768&z=13)

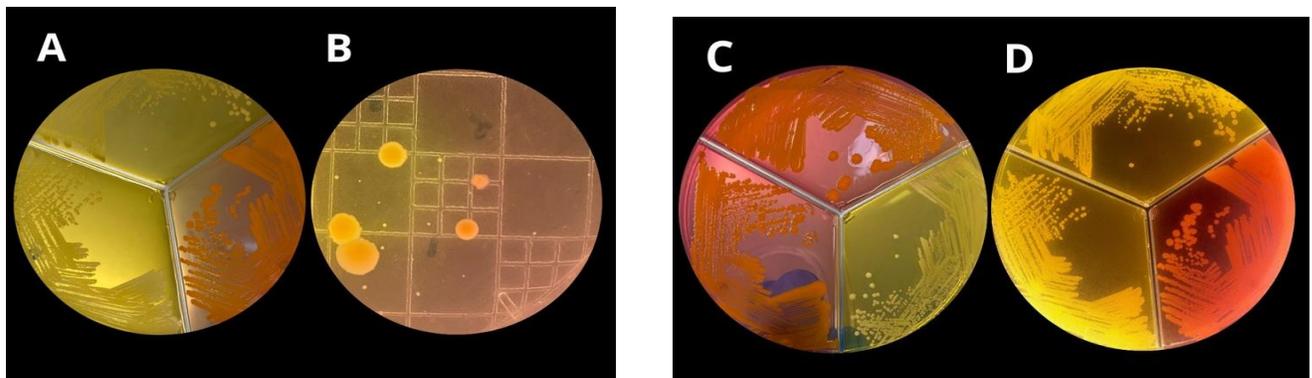
De las 35 vacas afectadas, con mastitis confirmada, se obtuvieron un total de 80 muestras de leche, a partir de las cuales se realizaron los aislamientos primarios en el medio manitol salado. Tras 24 a 48h de incubación se observó la aparición de diferentes morfotipos en cada placa inoculada. Para confirmar la identidad de estas cepas se hicieron repiques sucesivos en el medio manitol salado fresco con la finalidad de obtener colonias puras con la morfología característica de las colonias del género *S. aureus*.

<b>Tabla 1. Registro de propietarios de las vacas muestreadas</b>					
<b>Nombre del propietario de la finca</b>	<b>Código asignado a cada finca</b>	<b>Numero de vacas incluidas en el estudio</b>	<b>Numero de muestras</b>	<b>Aislados</b>	<b>Identificación de los aislados</b>
Benjamín Maldonado (BM)	C	4	12	6	C1b C1c C1d C3b C3d C4b
Pablo Arcentales	E	2	4	1	E5d
Bolívar Ochoa	F	2	3	1	F10c
Patricio Coronel	G	4	8	0	
Samuel Pañora	D	3	6	6	D1c D2d D1a D1b D1d2 D1d1
Maldonado	H	2	4	1	H3c
Italina Coronel	J	3	6	5	J4a2 J4a1 J4b2 J4b1 J5d
Walter Albarado	L	2	5	4	L6c L6d L6a L7b
José Asitimbay	B	4	8	5	B1d B4c B4c2 B3c1 B3c2
Juan Ochoa	I	5	15	12	I5a I1b I7c I2c1 <sup>d</sup> I7b

					I3c I7d I1d1& I7a I4b.1 I4b.2 I3c1
José Fajardo	K	2	6	4	K1a1 K1a2 K3d2 K3d1
Nelson Rodas	A	2	3	1	A4a
Total: 12 Fincas		35	80	46	

### Cribado de cepas de *S. aureus*

En el aislamiento primario se obtuvieron 46 aislados bacterianos, a partir de las 80 muestras de leche. Para la caracterización morfológica de dichos aislados se realizó subcultivos sucesivos hasta obtenerlos puros (cultivos axénicos) en agar manitol salado cuyos resultados se presentan en Tabla 2.



**Figura 2.** A, B, C, D muestran las morfologías de las colonias en medio Manitol salado.

**Tabla 2. Características morfológicas de las colonias aisladas a partir de muestras de leche de vacas con mastitis clínica o sub-clínica**

Aislados	Color	Textura	Borde	Tamaño
C1c.1	Blanca	Brillante	Regular	Pequeñas
C1c.2	Crema	Brillante	Regular	Pequeña
C1c.3	Blanca	Brillante	Regular	Pequeña
C1b	Blanca	Mucoide	Regular	Pequeña

E5d.1	Naranja	Opaca	Regular	Pequeña
E5d.2	Naranja	Brillante	Regular	Pequeña
C4b.1	Naranja	Opaca	Regular	Pequeña
F10c	Amarilla	Brillante	Regular	Pequeña
C1d.1	Crema	Brillante	Regular	Pequeña
C1d.2	Blanca	Opaca	Regular	Pequeña
C4b.2	Naranja	Opaca	Regular	Pequeña
D1c	Naranja	Brillante	Regular	Grande
D2d	Blanca	Mucoide	Regular	Pequeña
H3c	Blanca	Mucoide	Regular	Pequeña
D1a	Blanca	Brillante	Regular	Pequeña
D1b	Naranja	Brillante	Regular	Grande
J4a.2	Blanco	Opaca	Regular	Pequeña
J4a.1	Naranja	Mucoide	Regular	Pequeña
J4b.2	Naranja	Mucoide	Regular	Pequeña
J4b.1	Blanca	Mucoide	Regular	Pequeña
J5d	Blanca	Opaca	Regular	Pequeña
L6c	Naranja	Brillante	Regular	Pequeña
L6d	Naranja	Brillante	Regular	Pequeña
L6a	Naranja	Brillante	Regular	Pequeña
D1d2	Blanca	Opaca	Regular	Pequeña
D1d.1	Naranja	Brillante	Regular	Grande
L7b	Naranja	Mucoide	Regular	Pequeña
I3C1Ø	Amarilla	Brillante	Regular	Pequeña
I5a	Naranja	Mucoide	Regular	Pequeña
I1b	Crema	Brillante	Regular	Pequeña
I7c	Amarilla	Brillante	Regular	Pequeña
B1d	Amarilla	Brillante	Regular	Pequeña
K1a1	Blanca	Brillante	Regular	Pequeña
I2c1 <sup>d</sup>	Blanca	Opaca	Regular	Pequeña
B4c1	Crema	Brillante	Regular	Pequeña
I7b	Amarilla	Mucoide	Regular	Pequeña
I3c	Crema	Brillante	Regular	Pequeña
K1a2	Naranja	Mucoide	Regular	Grande
B4c2	Naranja	Mucoide	Regular	Pequeña
B3c1	Blanca	Opaca	Regular	Pequeña
B3c2	Amarilla	Brillante	Regular	Pequeña
I7d	Amarilla	Brillante	Regular	Pequeña
I1d1&	Crema	Brillante	Regular	Pequeña

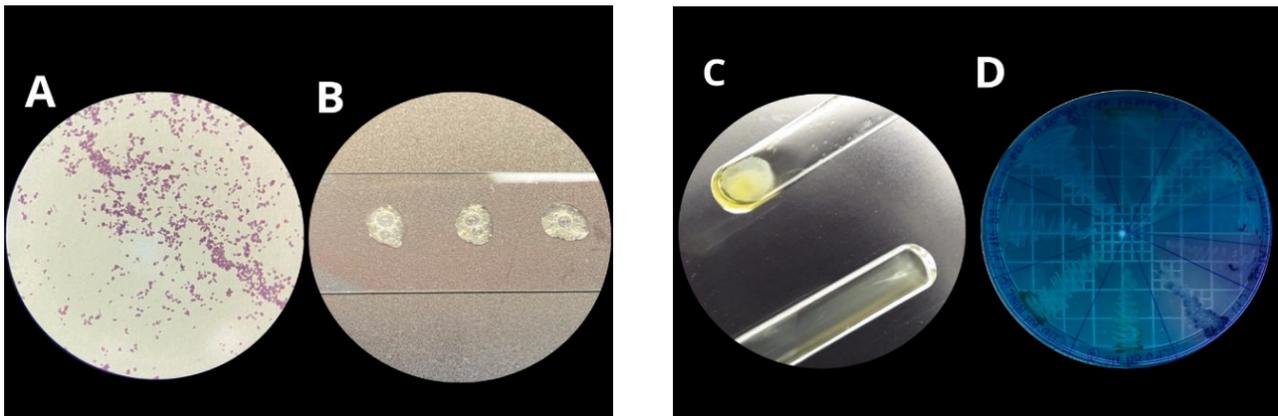
I7a	Amarilla	Brillante	Regular	Pequeña
K3d2	Amarilla	Brillante	Regular	Pequeña
K3d1	Amarilla	Brillante	Regular	Pequeña
A4a	Blanca	Opaca	Regular	Grande
I4b1	Crema	Brillante	Regular	Pequeña
I4b2	Crema	Brillante	Regular	Pequeña

Se puede observar que las colonias de algunos aislados presentan las características típicas de la especie *S. aureus* (color amarillo intenso y textura brillante). Sin embargo, no todas las colonias presentaron ese mismo aspecto; por el contrario, también se observó diferentes pigmentaciones (naranja, blanca, crema) y diferentes texturas (opaca, mucoide). Por esta razón fue necesario pasar a una segunda etapa de confirmación, con una serie de pruebas de microscopia y bioquímica (tinción de gram, producción de catalasa, coagulasa y S) con el fin de seleccionar solamente aquellos aislados que pertenecieran a la especie *S. aureus*. (Tabla 3).

<b>Tabla 3. Propiedades de microscopia y bioquímica de los aislados puros.</b>				
CODIGO	TINCION DE GRAM	CATALASA	COAGULASA	DNASA
C1c.1	Cocos gram +	+	-	-
C1c.2	Cocos gram +	-	-	-
C1c.3	Cocos gram +	+	-	-
C1b	Cocos gram +	+	-	-
E5d.1	Cocos gram +	+	-	-
E5d.2	Cocos gram +	+	-	-
C4b.1	Cocos gram +	+	-	-
F10c	Cocos gram +	+	+	+
C1d.1	Cocos gram +	+	-	-
C1d.2	Cocos gram +	+	-	-
C4b.2	Cocos gram +	+	-	-
D1c	Cocos gram +	+	+	-
D2d	Cocos gram +	+	-	-

H3c	Cocos gram +	+	-	-
D1a	Cocos gram +	+	-	-
D1b	Cocos gram +	+	+	+
D4a.2	Cocos gram +	+	-	-
J4a.1	Cocos gram +	+	+	+
J4b.2	Cocos gram +	+	+	+
J4b.1	Cocos gram +	+	-	-
J5d	Cocos gram +	+	-	-
L6c	Cocos gram +	+	+	+
L6d	Cocos gram +	+	+	-
L6a	Cocos gram +	+	+	+
D1d2	Cocos gram +	+	-	-
D1d.1	Cocos gram +	+	+	+
D7b	Cocos gram +	+	+	+
I3C1Ø	Cocos gram +	+	+	+
I5a	Cocos gram +	+	-	-
I1b	Cocos gram +	+	+	+
I7c	Cocos gram +	+	+	+
B1d	Cocos gram +	+	+	+
K1a1	Cocos gram +	+	-	-
I2c1 <sup>d</sup>	Cocos gram +	+	+	+
B4c1	Cocos gram +	+	+	-
I7b	Cocos gram +	+	+	+
I3c	Cocos gram +	+	-	-
K1a2	Cocos gram +	+	-	-
B4c2	Cocos gram +	+	-	-
B3c1	Cocos gram +	+	-	-

B3c2	Cocos gram +	+	+	+
I7d	Cocos gram +	+	+	+
I1d1&	Cocos gram +	+	+	+
I7a	Cocos gram +	+	+	+
K3d2	Cocos gram +	+	+	+
K3d2	Cocos gram +	+	+	+
A4a	Cocos gram +	+	-	-
I4b1	Cocos gram +	+	+	+
I4b2	Cocos gram +	+	-	-



**Figura 3.** Caracterización morfológica, microscópica y bioquímica de los aislados puros obtenidos a partir de muestras de leche de vacas con mastitis. A) Tinción de Gram, B) Catalasa, C) Coagulasa, D) DNAsa.

Como se puede observar en la tabla 3, algunos de los aislados poseen características que corresponden con los criterios de identificación de la especie *S. aureus* ya que, además de ser cocos Gram positivos, manifestaron resultados positivos en las 3 pruebas bioquímicas realizadas (catalasa, coagulasa y DNAsa). Este es el caso, por ejemplo, de algunos aislados D1b, D4a.1, D6c, B4c1, D1d.1, D6a, D4b.2, D1d.1, D7b, I3C1Ø.

Sin embargo, 3 aislados (D1c, L6d, B4c1) cumplen solo con dos de las tres características típicas de *S. aureus*, lo que sugiere que se trata de cepas atípicas.

Otro grupo de aislados no resultaron positivos para las reacciones de coagulasa y DNAsa, lo cual sugiere que se trata de especies diferentes del género *Staphylococcus*.

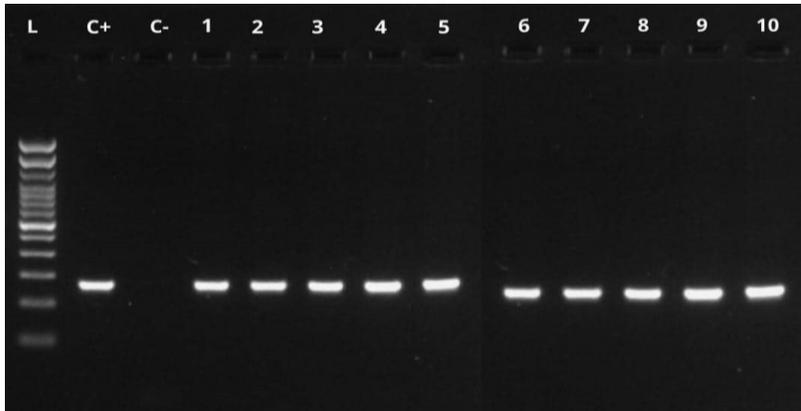
### Detección de genes *nucA* y *femB*

En vista de que algunos de los 46 aislados no correspondían con lo que está descrito en la bibliografía para la identificación de esta especie, para fines de caracterización ulterior seleccionamos un subgrupo de 23 aislados que cumplieran con las características de la especie *S. aureus* desde un punto de vista morfológico, microbiológico y bioquímico.

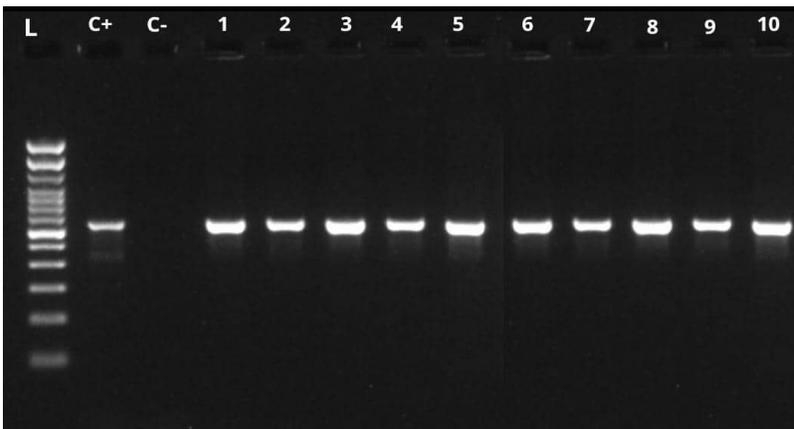
A partir del ADN genómico de estos 23 aislados se procedió a realizar la amplificación por PCR de los genes *nucA* y *femB*, que son característicos de la especie. Los resultados se muestran en las Figuras 4 y 5. Como puede observarse, en todas las cepas se logró la amplificación del gen *nucA*, (cuyo amplicón tiene una longitud calculada de 657 pb), y al gen *femB* (cuyo amplicón tiene una longitud de 224 pb).

**Tabla 4. Resultado de la amplificación mediante PCR de los genes *Nuc A* y *Fem B***

CODIGO	<i>nucA</i>	<i>femB</i>
D1c	+	+
D1b	+	+
D4a.1	+	+
D4b.2	+	+
L6c	+	+
L6d	+	+
L6a	+	+
D1d.1	+	+
D7b	+	+
I3C1Ø	+	+
I1b	+	+
I7c	+	+
B1d	+	+
I2c1 <sup>d</sup>	+	+
B4c1	+	+
I7b	+	+
B3c2	+	+
I7d	+	+
I1d1&	+	+
I7a	+	+
K3d2	+	+
K3d2	+	+
I4b1	+	+
Total: 23		



**Figura 4.** Detección del gen *femB* (224bp) a partir de ADN genómico de cepas de *S. aureus* aislados a partir de muestras de leche con mastitis en vacas lecheras. Electroforesis en gel de agarosa al 2 %. Carril L marcador de peso molecular 100bp; carril C+: cepa control positivo; carril C-: cepa control negativo; carriles 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10 cepas positivas *para femB*.



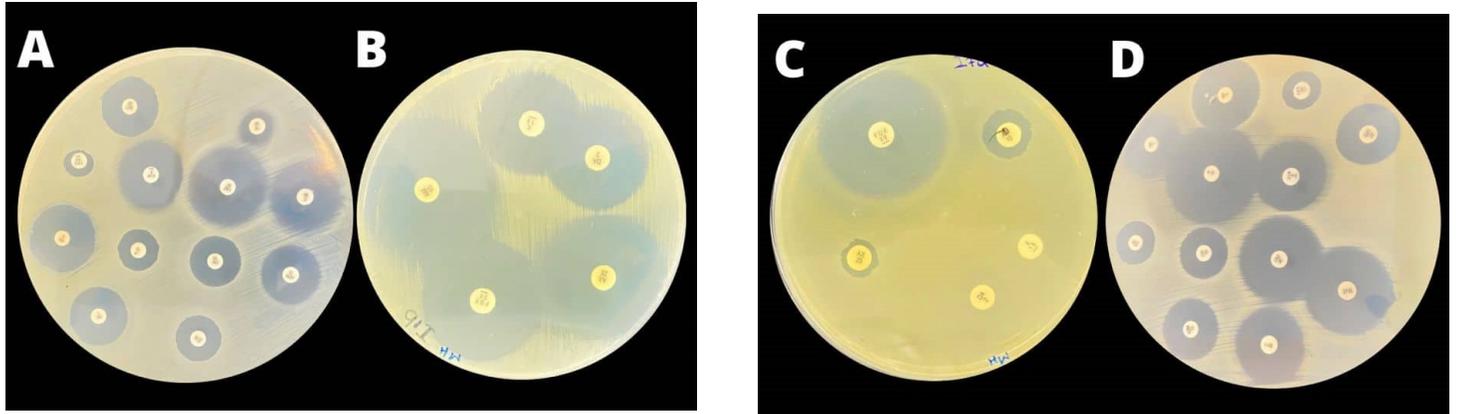
**Figura 5.** Detección del gen *nuca* (657bp) a partir de ADN genómico de cepas de *S. aureus* aislados a partir de muestras de leche con mastitis en vacas lecheras. Electroforesis en gel de agarosa al 2 %. Carril L marcador de peso molecular 100bp; carril C+: cepa control positivo; carril C-: cepa control negativo; carriles 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10 cepas positivas de *nuca*.

### **Determinación de la susceptibilidad de los aislados de *S. aureus* frente a antibióticos (antibiogramas).**

Con el objetivo de conocer la susceptibilidad de los aislados de *S. aureus* a diferentes antibióticos se realizó antibiogramas en agar Müller Hinton. Para llevar a cabo este ensayo se incluyeron 13 antibióticos. Cabe recalcar que cada sensidisco contenía una cantidad diferente de cada antibiótico: Penicilina 10 $\mu$ g (P-10), Tetraciclina 30 $\mu$ g (TE-30), Azitromicina 15 $\mu$ g (AZM-15), Eritromicina 15 $\mu$ g (E- 15), Clindamicina 2 $\mu$ g (DA-2), Oxacilina 1 $\mu$ g (OX-1), Ciprofloxacina 5 $\mu$ g (CIP-5),

Teicoplanina 30 $\mu$ g (TEC-30), Cloranfenicol 30 $\mu$ g (C-30), Cefoxitina 30 $\mu$ g (FOX-30), Linezolid 30 $\mu$ g (LNZ-30), Rifampicina 5 $\mu$ g (RA-5), Sulfatrimetropin 5 $\mu$ g (SXT-5).

La interpretación del diámetro de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano se realizó de acuerdo a los criterios del CLSI (30) como “cepa sensible”, “cepa con sensibilidad intermedia” o “cepa resistente”.



**Figura 5.** A, B, C, D halos de inhibición de crecimiento bacteriano en medio Müller Hinton

**Tabla 5.** Resultado de la medición e interpretación de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano por antibióticos

ID Colonias	P (Penicilina)	TE (Tetraciclina)	AZM (Azitromicina)	E (eritromicina)	DA (clindamicina)	OX (Oxacilina)	CIP (Ciprofloxacina)	TEC (Teicoplanina)	C (Cloranfenicol)	FOX (Cefoxitin)	LNZ (Linezolid)	RA (Rifampicina)	SXT (Sulfatrimetropin)
I7a	R	R	R	R	R	S	S	I	S	S	S	S	S
I7c	R	R	R	R	R	S	S	I	S	S	S	S	S
I7d	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
B1d	R	R	R	R	R	S	S	I	S	S	S	S	S
B3c2	R	R	R	R	R	S	S	I	S	S	S	S	S
F10c	R	R	R	R	R	S	S	I	S	S	S	S	S
I7b	R	R	R	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S
I3C1Ø	R	R	I	I	S	S	R	R	S	S	S	S	S
I4B1	R	R	S	I	S	I	S	I	S	S	S	S	S
I2C1đ	R	R	S	S	I	S	S	I	S	S	S	S	S
D1c	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
J4a.1	R	S	S	I	S	R	S	I	S	S	S	S	S
J4a.2	R	S	I	S	S	R	I	I	S	S	S	S	S
L6c	R	S	I	I	S	R	I	I	S	S	S	S	S
D1d.1	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
K3d1	R	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S
K3d2	R	S	S	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S
I1d1	R	I	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S
D1b	R	S	I	S	S	S	I	S	I	S	S	S	S
L6d	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
L6a	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
L7b	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
I1b	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

En la Tabla 6 (Anexo 8) se presentan los valores exactos de los diámetros de los halos que han sido considerados para la elaboración de la Tabla 5. Como puede verse claramente, la resistencia más frecuentemente registrada fue en relación con la penicilina (22 aislados, equivalentes al 95,65%), seguida por la tetraciclina (10 aislados, equivalentes al 43,47%), la azitromicina (8 aislados, equivalentes al 32%), la eritromicina (7 aislados, equivalentes al 30,43%), la clindamicina (6 aislados, equivalentes 26,08%), la oxacilina (4 aislados, equivalentes al 17,39%) correspondientes a cepas SARM, y finalmente la ciprofloxacina y la teicoplanina (1 aislado c/u, equivalentes al 4,34%).

Quince aislados fueron multiresistentes, es decir, resistentes simultáneamente a dos o más antibióticos (y en algunos casos presentaron resistencia intermedia a un sexto antibiótico). Destacan siete aislados que fueron resistentes a cinco antibióticos, y uno que fue resistente a cuatro antibióticos.

Se detectó que todos los aislados presentaron sensibilidad a 4 antibióticos: cefoxitina, linezolida, rifampicina, sulfatrimetropina. Otros aislados fueron sensibles al cloranfenicol (22 aislados), la ciprofloxacina (19 aislados), la oxacilina (17 aislados), la clindamicina (15 aislados), la tetraciclina (12 aislados), la eritromicina y la azitromicina (11 aislados), la teicoplanina (9 aislados), y finalmente la penicilina (1 aislado).

---

### III.2.- DISCUSIÓN

La mastitis es una de las enfermedades más frecuentes que afecta a nivel mundial al ganado vacuno. Es una infección, generalmente causada por bacterias, que afecta a la glándula mamaria produciendo inflamación. *S. aureus* es uno de los principales agentes etiológicos de esta enfermedad debido a que expresa múltiples factores de virulencia; Algunos estudios indican la importancia de investigar acerca de esta patología, principalmente porque influye en una reducción de la calidad y sanidad de la leche. Pero además es importante conocer mejor a los microorganismos patógenos que causan mastitis, porque pueden llegar a dar origen a infecciones zoonóticas, representando un serio problema de salud pública. Por este motivo el presente estudio tuvo como objetivo principal la caracterización fenotípica y genotípica de cepas de *S. aureus* causantes de mastitis clínicas o subclínicas en vacas lecheras. Los resultados obtenidos permiten confirmar que muchas de las vacas con mastitis clínica o subclínica en la región de Biblián efectivamente se encuentran infectadas en su tejido mamario por cepas de *S. aureus* que presentan algunas características particularmente preocupantes.

Como hemos visto, la mayoría de las cepas que hemos aislado presentaban las características morfológicas y fisiológicas que son típicas de la especie de *S. aureus*; esto incluye una morfología de coco Gram positivo, la producción de un pigmento amarillo en medio Manitol Salado y la acidificación del mismo. Además, la producción de DNAsa termo resistente, coagulasa y catalasa se suman a estas características, que podríamos considerar como típicas o diagnósticas de la especie (31). Sin embargo, algunas de las cepas incluidas en el estudio no presentaron una de estas características (la producción de la DNAsa termo resistente); por esta razón las podemos considerar atípicas.

La circulación de cepas clínicas de *S. aureus* con características atípicas no es del todo inesperada. Por ejemplo, en un estudio realizado entre enero y abril del 2002 en un hospital japonés, el 12.5% de las cepas aisladas (sobre un total de 201) fueron consideradas como atípicas porque no acidificaron el medio manitol salado (32). La identificación debió confirmarse por otros métodos, incluyendo amplificación por PCR de ciertos genes. En otro estudio, esta vez realizado en Brasil, sobre 274 cepas de *S. aureus* aisladas a partir de leche de vacas con mastitis, el 39,4% de las mismas resultó ser atípica (33).

Para verificar la identificación de una cepa que no cumple con la totalidad de las características típicas de la especie, generalmente se llevan a cabo pruebas adicionales. La más utilizada es la amplificación por PCR de genes especie-específicos. En el presente trabajo se incluyó los genes *nucA* y *femB* que han sido previamente descritos como genes característicos de esta especie (26). Por lo tanto, es necesario tener muy presente la circulación de este tipo de cepas atípicas entre el ganado vacuno de la región estudiada, pues su incorrecta identificación puede afectar el tratamiento de los animales.

Al estudiar las posibles causas de la mastitis que presentaban las vacas incluidas en el estudio, se logró aislar 23 cepas que hemos identificado claramente como *Staphylococcus aureus*. Esto lo señala como uno de los microorganismos más frecuentes que invaden la glándula mamaria. En un estudio similar realizado en la provincia de Pichincha demostró que *S. aureus* es el agente causal más frecuente de la mastitis bovina (22).

En cuanto a la resistencia a los antibióticos, hemos visto que la mayoría de las cepas presentó resistencia a la penicilina, seguido de la tetraciclina. La resistencia a otros antibióticos, como, la azitromicina, la eritromicina, la clindamicina y la oxacilina fue menos frecuente.

En un estudio similar realizado en el cantón Mejía (Pichincha, Ecuador) se encontró que el 39,02% de las cepas de *S. aureus* aisladas a partir de vacas con mastitis eran resistentes a la penicilina, mientras que el 21,95% presentaron resistencia a la tetraciclina y el 17,07% a la clindamicina (34). Así mismo en Zulia, Venezuela se realizó un estudio semejante, el cual muestra en sus resultados que la mayoría de cepas de *S. aureus* aisladas a partir de vacas con mastitis también son resistentes a la penicilina (12,3%), la ciprofloxacina (4,9), la eritromicina (3,7%) y finalmente la clindamicina y la rifampicina (2,5%) (35). Estos datos son similares a los que reportamos en este estudio.

De igual manera en dos tambos de Uruguay se realizó una investigación donde se registró un alto porcentaje de cepas de *S. aureus* aisladas a partir de vacas con mastitis resistentes a la penicilina (25). Lo mismo sucede en un estudio realizado en Sangolqui, provincia de Pichincha, Ecuador que se reportó en la mayoría de casos altos porcentajes de resistencia a la penicilina (22).

Como podemos observar existe una gran similitud entre los resultados expuestos en estudios realizados anteriormente con el presente tema de investigación, principalmente en relación con la resistencia a antibióticos. Todo esto indica que

---

efectivamente es un problema de salud pública que se encuentra extendido por toda la región.

Por otra parte, las cepas de *S. aureus* también presentaron alta resistencia a la azitromicina en este estudio; sin embargo, en las investigaciones que hemos consultado, este antibiótico no ha sido incluido en los antibiogramas en estudios anteriores. Por lo tanto, estos datos deberían ser tomados en cuenta en el futuro, ya que en la actualidad la resistencia a los antibióticos es una de las mayores amenazas para la salud mundial.

Otro hallazgo de gran relevancia es la detección de la presencia de cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina (SARM). Estas cepas fueron originalmente descritas como responsables de infecciones nosocomiales; sin embargo, hoy en día sabemos que también se diseminan a nivel comunitario, infectando a distintos animales de granja, y de manera particular al ganado vacuno (36). En el presente estudio se detectaron 4 cepas (17,38%) SARM. Aunque este es un porcentaje relativamente bajo, sigue siendo preocupante, dado que estas cepas pueden resultar un peligro para las personas que se encuentran en contacto frecuente con dichos animales. En un estudio similar realizado en Brasil en el año 2016 se reportó que del total de 60 cepas de *S. aureus* aislados a partir de leche de vacas con mastitis, el 12,2% eran de tipo SARM.

Entre las limitaciones que hemos detectado en nuestro estudio, podemos mencionar el número de vacas que han sido incluidas. En efecto, a pesar de que no se trataba originalmente de una investigación de epidemiología molecular sino de caracterización fenotípica y genotípica de cepas aisladas a partir del tejido mamario infectado, creemos que para futuros estudios sería conveniente incluir un número mayor de muestras.

Por otra parte, el número de cepas de aislados que han sido incluidos en este estudio también podría ampliarse un poco más, incorporando aislados de otras regiones que pertenezcan a la misma provincia. Esto permitiría tener una visión más amplia de la diversidad genotípica de la especie causante de mastitis en ganado lechero. A pesar de estas limitaciones, en nuestro trabajo de investigación hemos incluido, además de técnicas microbiológicas clásicas, técnicas moleculares que permiten obtener una mayor confiabilidad en los resultados. En efecto hemos incluido en el estudio dos marcadores moleculares-los genes *nucA* y *femB* que han sido descrito como característicos del genoma de la especie *Staphylococcus Aureus*.

En síntesis, los resultados obtenidos en esta investigación indican que efectivamente la especie bacteriana *Staphylococcus aureus* forma parte del conjunto de microorganismos que se encuentran en el tejido mamario causando inflamación en aquellas vacas lecheras pertenecientes a las granjas del cantón Biblián, Provincia de Cañar. Destacan, además, que muchas de estas cepas son multiresistentes a distintos antibióticos.

## **CAPÍTULO IV**

# **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

#### IV.1.- CONCLUSIONES

- En algunos casos, la mastitis clínica o subclínica que presentan vacas lecheras del cantón Biblián, provincia de Cañar, puede estar causada por cepas de *S. aureus*.
- Sin embargo, no todas las vacas que presentan mastitis clínica o sub-clínica están infectadas por cepas de *Staphylococcus aureus*;
- La mayoría de cepas de *S. aureus* que hemos caracterizado en el presente trabajo de tesis presentan las características fisiológicas, bioquímicas y morfológicas típicas de la especie *S. aureus*;
- Sin embargo, algunas cepas de *S. aureus* que hemos aislado en el presente trabajo no presentan la totalidad de las características antes mencionadas, que se reconocen tradicionalmente como típicas de esta especie;
- Algunas de las cepas de *S. aureus* presentan características atípicas como la ausencia de la actividad Dnasa;
- La detección de los genes *nucA* y *femB*, sumado a la determinación de otros caracteres fenotípicos, permiten confirmar la identificación de las cepas (típicas y atípicas) como pertenecientes a la especie *S. aureus*
- La casi totalidad de las cepas evaluadas en este estudio (95,65%) son resistentes a la penicilina;
- Aproximadamente un tercio de las cepas incluidas en el estudio presentan multirresistencia a, por lo menos, cinco antibióticos (penicilina, tetraciclina, azitromicina, eritromicina y clindamicina);
- Un porcentaje significativo (17.39%) de las cepas de *Staphylococcus aureus* consideradas este estudio presentaron resistencia a la oxacilina y por lo tanto pueden considerarse de tipo SARM.

## IV.2.- RECOMENDACIONES

-Concientizar a los propietarios de las diversas fincas ganaderas acerca de la inconveniencia del abuso de los antibióticos, sin una prescripción previa de un médico veterinario, puesto que esto es la principal causa para desencadenar una resistencia antibiótica.

-Realizar un diagnóstico de la mastitis para identificar el agente etiológico causante de la enfermedad y, de esta manera, proceder a aplicar un tratamiento oportuno y eficaz, con la finalidad de evitar la diseminación de la misma y sobre todo de microorganismos causantes de la infección.

- Se recomienda aplicar diariamente buenas técnicas de ordeño por parte de los productores, puesto que de esto dependerá la calidad higiénica y sanidad de la leche.

-Comunicar a todos los propietarios de las fincas ganaderas los resultados de esta investigación con la finalidad de que puedan tomar medidas preventivas para evitar cualquier contagio con estas cepas bacterianas que resultan potencialmente patógenas.

-Se recomienda a los estudiantes e Investigadores de la Universidad Católica de Cuenca hacer usos de las cepas conservadas para continuar con futuras investigaciones o a su vez realizar investigaciones similares con más amplitud de tal manera que aporten con información.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Antibiotic resistance. Organización Mundial de la Salud. Ginebra; 2020 julio.
2. Antimicrobial resistance. Organización Mundial de la Salud. Ginebra; 2021 noviembre.
3. González J, Maguiña C, González F. La resistencia a los antibióticos: un problema muy serio. *Acta Médica Perú*; 2019 abril;36(2):145-51.
4. Blot S, Vandewoude K, Colardyn F. *Staphylococcus aureus* infections. *The new england journal of medicine*. Bélgica; 2000 diciembre; 339(27):2025–2027.
5. Gustavo H, Naglaa M, Ingrid L, Scully D, Begier E, Eiden J, Jansen K, Gurtman A, et al. *Staphylococcus aureus*: the current state of disease, pathophysiology and strategies for prevention. *Expert Rev Vaccines*; 2016 noviembre;15(11):1373-92.
6. Gajdács M. The Continuing Threat of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics*. Basilea; 2019 mayo ;8(2):52.
7. Artieda J, Ortíz P, Vega V, Mera R, Muñoz M, González R. Mastitis bovina y su repercusión en la calidad de la leche. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*. España; 2017 noviembre;18(11):1-16.
8. Li T, Lu H, Wang X, Gao Q, Dai Y, Shang J, Li M. Molecular characteristics of *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis between 2014 and 2015. *Frontiers in cellular and infectious microbiology*. Shanghai, China; 2017 abril.
9. Archer K, Mazaitis J, Costerton W, Leid J, Powers M, Shirliff M. *Staphylococcus aureus* biofilms, Virulence; 2011 septiembre; 2-5.
10. Weese J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals. *ILAR J*. 2010;51(3):233-44.
11. Porrero C. Detección y caracterización de *Staphylococcus aureus* procedentes de animales y aguas; 2014 abril.
12. Galarza X, Molino L. Determinación molecular del agente etiológico de la mastitis bovina de muestras provenientes de unidades productoras de los cantones Cayambe y Pedro Moncayo, provincia de Pichincha. Universidad Politécnica Salesiana-QT13552. Quito; 2018 noviembre.
13. Andrade C, Sánchez G. Estudio clínico, microbiológico y estimación económica de mastitis bovina, en la Cooperativa de Producción Agropecuaria “El Salinerito”, provincia Bolívar - Ecuador. Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE; 2018 marzo.

14. Martínez D, Cruz A, Millán A. Evaluación del estado de resistencia de agentes etiológicos de mastitis clínica y subclínica frente a algunos antimicrobianos utilizados en hembras bovinas del Municipio de Sotaquirá. Boyacá, Colombia; 2015 junio; 223-231.
15. Argudo D. Factores que afectan la susceptibilidad antibiótica de *Staphylococcus aureus* aislado de mastitis bovina. Cuenca, Ecuador; 2017.
16. Torres C, Lopez J. La resistencia bacteriana a los antibióticos, siete décadas después Fleming; Zaragoza; 2012 octubre; 18-20.
17. Universidad Nacional del Nordeste Fac. de Agroindustrias. Antibióticos y Antimicrobiano; 2007. (agrovvetmarket.com).
18. Paredes F, Roca J. Acción de los antibióticos. Perspectiva de la medicación antimicrobiana. Offarm; 2004 marzo;23(3):116-24.
19. Carillo A, Estepa C, Lizarazo J, Villate J. Identificación de bacterias causantes de mastitis bovina y su resistencia ante algunos antibacterianos. Rev UDCA Actual Divulg Científica; 2007 junio; 10(1):81-91.
20. Corbellini C. La mastitis bovina y su impacto sobre la calidad de la leche. Buenos Aires, Argentina; 2021 enero.
21. Bedolla C, Etiología de la mastitis bovina. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán; 2017.
22. Acuña V, Rivadeneira A. Aislamiento, identificación y antibiograma de patógenos presentes en leche con mastitis en ganaderías bovinas de la provincia de pichincha; 2008 abril; 70-73.
23. Zendejas G, Flores H, Soto M. Microbiología general de *Staphylococcus aureus*, generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. Revista Biomed. Mexico; 2014;25(3):15.
24. Pasachova J, Ramírez S, Muñoz L. *Staphylococcus aureus*: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular. NOVA; 2019; 17(32): 25-38.
25. Santos R. Caracterización de aislamientos de *Staphylococcus aureus* asociadas a mastitis bovina subclínica aisladas en dos tambos de Uruguay; 2012.
26. Hamdan A, González S, Bustos J. Identificación de *Staphylococcus aureus* utilizando como marcadores los genes *nucA* y *femB*. Ciencias Clínicas. México; 2015 diciembre; 16(2):37-41

27. Brakstad O, Aasbakk K, Maeland J. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. J Clin Microbiol. 1992 julio; 30(7):1654-60.
28. Jonas D, Grundmann H, Hartung D, Daschner F, Towner K. Evaluation of the mecA femB Duplex Polymerase Chain Reaction for Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis; 1999 octubre; 18(9):643-7.
29. Hurtado N, Orellana P, Andrade C. Detección de genes que codifican hemolisinas en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas en pantallas de teléfonos móviles de estudiantes de último año de odontología en Cuenca-Ecuador. Rev Asoc Dent Mex; 2021;78(6):332-8.
29. Clinical & Laboratory Standards Institute: CLSI Guidelines. 32nd ed; 2022.
30. Murray P, Baron E, Jorgensen J, Pfaller M, Tenover F, Tenover R. Manual of Clinical Microbiology. 8th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2003 agosto; 47(4):625-6.
31. Ishii Y, Alba J, Maehara C, Murakami H, Matsumoto T, Tateda K, et al. Identification of biochemically atypical *Staphylococcus aureus* clinical isolates with three automated identification systems. J Med Microbiol; 2006 abril ;55(4):387-92.
32. Silva W, Destro M, Landgraf M, Franco B. Biochemical characteristics of typical and atypical *Staphylococcus aureus* in mastitic milk and environmental samples of Brazilian dairy farms. Brasil; 2000 junio; 31:103-6.
33. Anangonó D, Proaño F, Resistencia antibiótica de *Staphylococcus aureus* en vacas con mastitis en tres estratos lecheros del cantón Mejía. Pichincha; 2020 septiembre.
34. Valero K, Olivares Y, Perozo A, Valbuena E, Boscán L, Colina G, et al. Susceptibilidad a los agentes antimicrobianos en cepas de *staphylococcus aureus* aisladas en leche de bovinos con mastitis subclínica y leche de tanque. Rev Científica. Venezuela; 2010 julio ;20(4):367-76.
35. Galarza M, Yarzabal L. *Staphylococcus aureus* Resistentes a meticilina en animales de granja en Suramérica: una revisión sistemática. Rev Vive. 2021 marzo; 4(11):358-77.
36. Guimarães F, Manzi M, Joaquim S, Richini V, Langoni H. Short communication: Outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)-associated mastitis in a closed dairy herd. J Dairy Sci. 2017 enero;100(1):726-30.

## ANEXOS

---

---

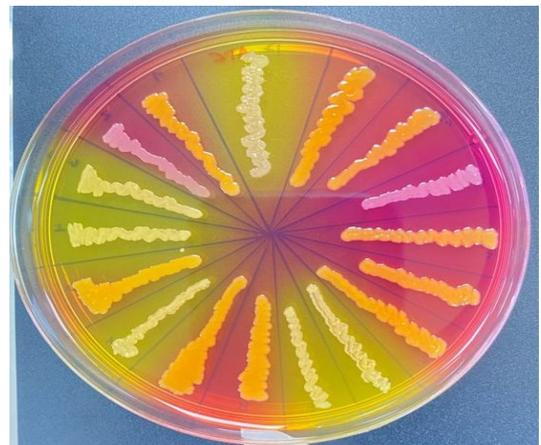
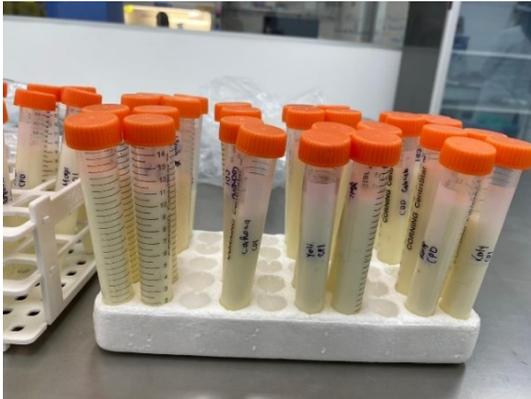
## Anexos 1. Lugar y toma de muestras de leche



Fuente: Universidad Católica de Cuenca

Autoras : Escobar Narváez Dayanna, Gonzalez Cabrera Arianna

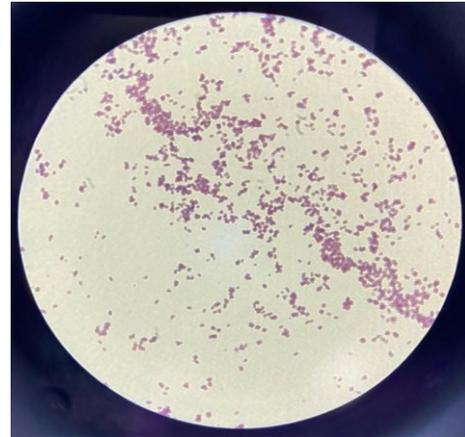
## Anexo 2. Muestras y aislamientos primarios de cepas bacterianas en Agar Manitol Salado.



Fuente: Universidad Católica de Cuenca

Autoras : Escobar Narvárez Dayanna, Gonzalez Cabrera Arianna

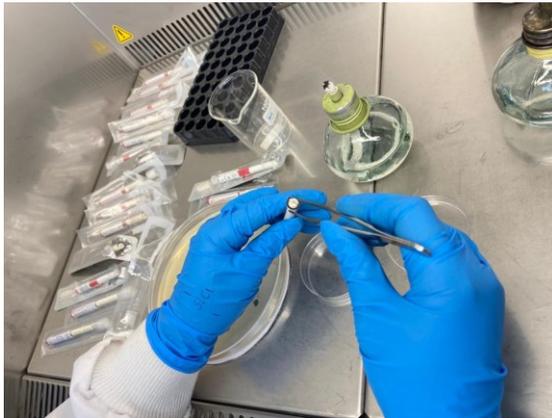
## Anexo 3. Tinción de gram



Fuente: Universidad Católica de Cuenca

Autoras : Escobar Narvaez Dayanna, Gonzalez Cabrera Arianna

#### **Anexo 4. Preparación de antibigramas (colocación de los discos con los diferentes antibióticos en agar Muller-Hinton)**



Fuente: Universidad Católica de Cuenca

Autoras : Escobar Narvaez Dayanna, Gonzalez Cabrera Arianna

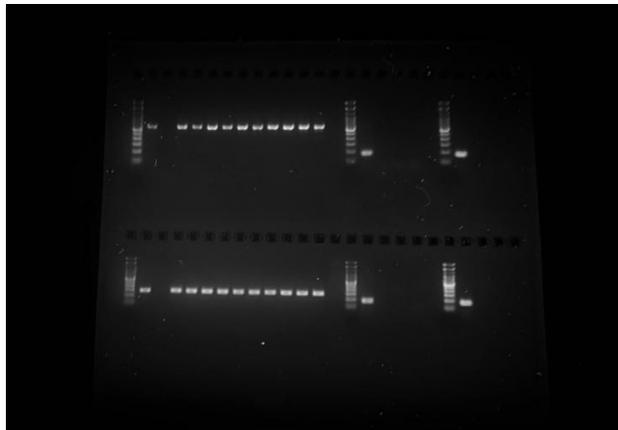
#### **Anexo 5. Gel de agarosa en plena corrida electroforética.**



Fuente: Universidad Católica de Cuenca

Autoras : Escobar Narvaez Dayanna, Gonzalez Cabrera Arianna

**Anexo 6. Amplificación por PCR de los genes *nucA* y *femB* visualizados en geles de agarosa teñidos con SYBR Safe.**



Fuente: Universidad Católica de Cuenca

Autoras : Escobar Narvaez Dayanna, Gonzalez Cabrera Arianna

**Anexo 7**

**Valores para la Medición e Interpretación de halos de inhibición de crecimiento bacteriano (*S. aureus*) de acuerdo al CLSI (30)**

Oxacilina 1ug :  $\geq 22$ (S) (I)  $\leq 21$  (R)

Penicilina 10ug:  $\geq 29$ (S) (I)  $\leq 28$  (R)

Cefoxitina 30ug:  $\geq 25$ (S) (I)  $\leq 25$ (R)

Cloranfenicol:  $\geq 18$  (S) (I)  $\leq$  (R)

Teicoplanina 30 ug :  $>14$  (S) 11-13 (I)  $<10$  (R)

Clindamicina 2ug:  $\geq 21$ (S) 15-20 (I)  $\leq 14$  (R)

Azitromicina 15ug:  $\geq 18$  (S) 14-17 (I)  $\leq 13$ (R)

Eritromicina 15ug:  $\geq 23$  (S) (I)  $\leq 13$  (R)

Linezolid 30ug :  $\geq 21$  (S) (I)  $\leq 20$  (R)

Ciprofloxacina 5ug:  $\geq 21$ (S) 16-20 (I)  $\leq 15$ (R)

Rifampicina 5ug:  $\geq 20$ (S) 17-19(I)  $\leq 16$  (R)

Sulfatrimetropin 25ug:  $\geq 16$ (S) (I)  $\leq 10$ (R)

Tetraciclina 30ug:  $\geq 19$ (S) 15-18 (I)  $\leq 19$ (R)

---

## Anexo 8.

**Tabla 6. Valores de los diámetros de los halos de inhibición**

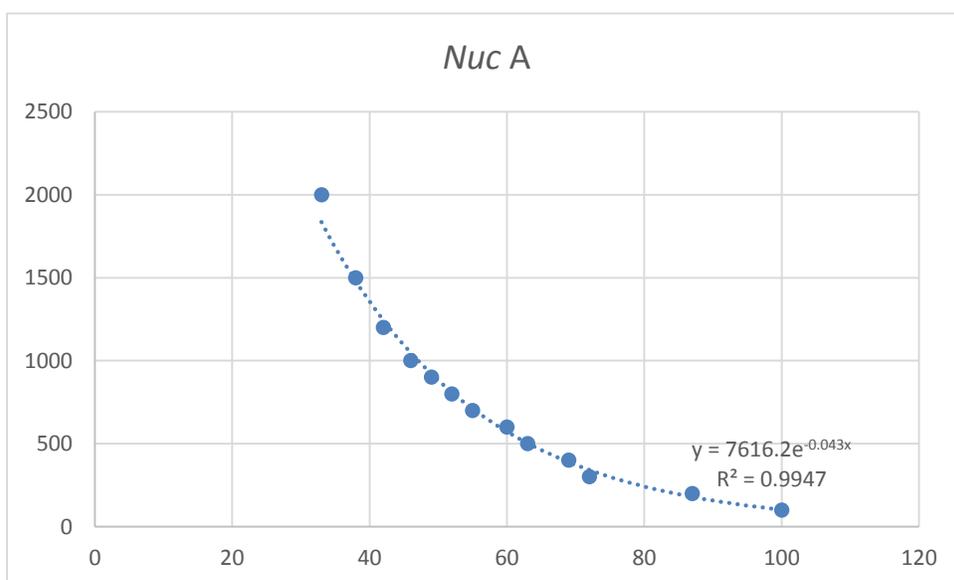
Id Colonias	OX	RA	P	AZM	TEC	CIP	LNZ	C	SXT	TE	FOX	E	DA
	(Oxacilina)	(Rifampicina)	(Penicilina)	(Azitromicina)	(Teicoplanina)	(Ciprofloxacina)	(Linezolid)	(Cloranfenicol)	(Sulfatrimetoprin)	(Tetraciclina)	(Cefoxitin)	(Eritromicina)	(Clindamicina)
	<b>S: ≥22 R: ≤21</b>	<b>S: ≥20 R: ≤16</b>	<b>S: ≥29 R: ≤28</b>	<b>S: ≥18 R: ≤13</b>	<b>S: ≥14 R: ≤10</b>	<b>S: ≥21 R: ≤15</b>	<b>S: ≥21 R: ≤20</b>	<b>S: ≥18 R: ≤12</b>	<b>S: ≥16 R: ≤10</b>	<b>S: ≥19 R: ≤14</b>	<b>S: ≥25 R: ≤25</b>	<b>S: ≥23 R: ≤13</b>	<b>S: ≥21 R: ≤14</b>
I4b1	21.5	26.08	15.3	18.1	13.8	25.9	26.6	22.8	23.8	11.8	31.9	22	22.1
K3d1	26.3	24.4	12.7	18.3	12.4	26.2	27.1	22.6	20.8	27.2	31.7	23	24.2
K3d2	24.4	25.7	13.7	20.8	13.7	29.7	29.2	26.7	22.5	28.6	32.7	21.2	22.5
I7a	23.9	24.3	10.4	0	11.4	22.8	27.9	21.7	20.9	10.4	30.5	0	0
I1d1 y	22.5	25.2	14.2	21.8	12.3	27.5	29.9	29.5	23.2	17.7	32.6	24.4	23.4
I7b	22	25	12.1	0	15.1	26.4	31.5	24.2	22	12	33	0	17
I1b	24.1	27.4	38.7	22	18.4	25.3	29.2	24.4	20.7	28.8	27.8	24.2	24.5
I2c1d	22.8	26.09	15.5	21.6	12.5	25.2	30.2	25	22.8	12.7	31.7	24.3	23
I7c	25	36/25.9	11.6	0	12.1	25.7	29.3	21.7	21.6	9	31.3	0	0
I7d	29.2	29/44	12.6	0	14.7	25	29.5	24.3	25	12.4	33.6	0	0
B1d	30.4	39.5/26.4	10.2	0	13.6	24.9	28.6	25	23.7	11.7	31.3	0	0
B3c2	23	36.5/25	8.5	0	12.4	23.4	29.7	26.8	21.7	12.1	33.7	0	0
F10c	27.4	37/28	10.6	0	13.6	26	31.3	22.3	23	10.8	33.4	0	0
D1c	23.5	38.7/26.8	12.8	12.5	14.3	21	28	22.1	24.3	27.2	32.5	23.5	24.1
D1b	25.6	38.7/26.7	12.9	16.8	14	19.8	27.4	17.4	23.6	26.4	32.7	23.2	23.8
J4a.1	20.2	25.6	12.7	18.2	13.8	22.2	29.6	22.9	27.4	28.4	30	22.2	22
J4b.2	20	23.8	11.2	17.8	12.5	17	28.9	23.3	20.2	27.1	31.1	25.4	23.9
L6c	17.6	25.1	9.7	16.6	13.4	18.4	27.1	20.9	23.7	26.5	29.4	22.8	22.1
L6d	26.2	28.1	16.7	19.6	16.1	22.8	33.4	25.6	26.7	31	34.1	26.5	26.1
D6a	22.2	30.5	17.3	21.8	17.2	23.9	31.9	25.6	27.3	30.1	33.7	26.1	25.2
D1d.1	20	27	19.3	21.3	16.6	22	33.2	26.8	26.5	31	34.5	26.3	24.7
L7b	24.2	27.8	15	20.1	15.2	24.6	31.4	24.6	24	30.2	34	25.3	24.3
I3C1Φ	22	37.2/25.1	13.4	17.2	14.2	0	27.9	21.9	25.4	10.5	30.5	22.4	22.7

## Anexo 9.

### Cálculo del tamaño de los fragmentos amplificados

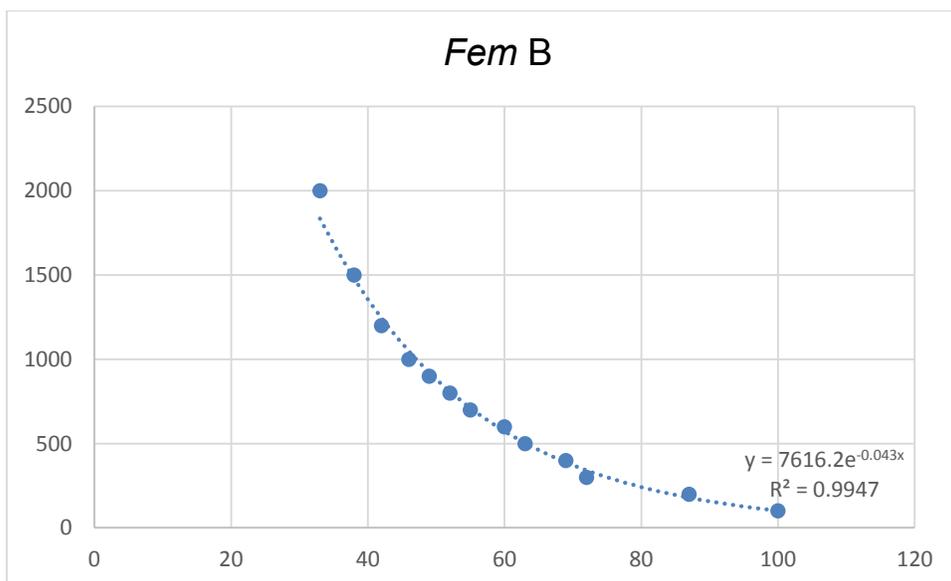
#### *nucA*

Longitud ( en pb) de los marcadores moleculares (" escalera")	Distancia de migración desde el punto de aplicación (mm)	Muestra No.	Tamaño del fragaño calculado en base a la ecuación
2000	33	57	657
1500	38	57	657
1200	42	57	657
1000	46	57	657
900	49	57	657
800	52	57	657
700	55	57	657
600	60	57	657
500	63	57	657
400	69	57	657
300	72	57	657
200	87	57	657
100	100	57	657



## fem B

Longitud ( en pb) de los marcadores moleculares (“ escalera”)	Distancia de migración desde el punto de aplicación (mm)	Muestra No.	Tamaño del fragmento calculado en base a la ecuación
2000	33	82	224
1500	38	82	224
1200	42	82	224
1000	46	82	224
900	49	82	224
800	52	82	224
700	55	82	224
600	60	82	224
500	63	82	224
400	69	82	224
300	72	82	224
200	87	82	224
100	100	82	224



## **ANEXOS REQUERIDOS**

**Dayana Mishel Escobar Narvárez** portadora de la cédula de ciudadanía N° **0401934922**. En calidad de autor/a y titular de los derechos patrimoniales del trabajo de titulación “**Aislamiento, caracterización fenotípica e identificación molecular de cepas de *Staphylococcus aureus* en vacas lecheras con mastitis en la Provincia de Cañar**”, de conformidad a lo establecido en el artículo 114 Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, reconozco a favor de la Universidad Católica de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos y no comerciales. Autorizo además a la Universidad Católica de Cuenca, para que realice la publicación de éste trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, **23 de septiembre de 2022**



F: .....

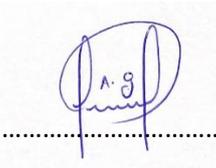
**Dayana Mishel Escobar Narvárez**

**C.I. 0401934922**



**Arianna Michelle González Cabrera** portadora de la cédula de ciudadanía N° **1105355414**. En calidad de autor/a y titular de los derechos patrimoniales del trabajo de titulación “**Aislamiento, caracterización fenotípica e identificación molecular de cepas de *Staphylococcus aureus* en vacas lecheras con mastitis en la Provincia de Cañar**”, de conformidad a lo establecido en el artículo 114 Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, reconozco a favor de la Universidad Católica de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos y no comerciales. Autorizo además a la Universidad Católica de Cuenca, para que realice la publicación de éste trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, **23 de septiembre de 2022**

F: 

**Arianna Michelle González Cabrera**

**C.I. 1105355414**