



DETERMINACIÓN MOLECULAR DEL AGENTE ETIOLÓGICO DE LA MASTITIS BOVINA DE MUESTRAS PROVENIENTES DE UNIDADES PRODUCTORAS ANDINAS

MOLECULAR DETERMINATION OF THE ETIOLOGICAL AGENT OF BOVINE MASTITIS FROM ANDEAN PRODUCTION UNITS

Nancy Bonifaz*¹, Ximena Galarza², Byron Fuertes³ y Janss Beltrán¹

¹Grupo de investigación NUNKUI WAKAN, Universidad Politécnica Salesiana, Campus el Girón: Isabel la Católica N.23-52 y Madrid, Quito, Ecuador.

²Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública-INSP, Iquique y Yahuachi, Quito, Ecuador.

³Carrera de Biotecnología, Universidad Politécnica Salesiana, Campus el Girón: Isabel la Católica N.23-52 y Madrid, Quito, Ecuador.

*Autor para correspondencia: nbonifaz@ups.edu.ec

Manuscrito recibido el 17 de junio de 2021. Aceptado, tras revisión, el 15 de julio de 2022. Publicado el 1 de marzo de 2024.

Resumen

La mastitis bovina es una enfermedad que afecta a las ganaderías de pequeños y medianos productores de los cantones Cayambe y Pedro Moncayo, Provincia de Pichincha-Ecuador. El tratamiento de esta enfermedad resulta complicado debido a la variedad de microorganismos que la provocan. El presente estudio se enfocó en la determinación molecular por medio de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los agentes etiológicos de la mastitis. Esta técnica presenta múltiples ventajas al reconocer familia, género y especie de microorganismos, y es un método capaz de detectar genes de resistencia de antibióticos, lo que resulta importante al momento de diagnosticar y tratar enfermedades. El objetivo de esta investigación se centró en la identificación de bacterias causantes de la mastitis bovina, utilizando pruebas bioquímicas y moleculares. Las pruebas bioquímicas como tinción Gram, Catalasa, Coagulasa, y Agar Manitol Sal fueron eficientes para obtener cepas puras y determinar el género de algunas bacterias. Se utilizaron primers específicos (RNA16S) para la identificación molecular de 9 agentes etiológicos causantes de la enfermedad en las unidades productivas. Los microorganismos encontrados fueron; *Staphylococcus pasteurii*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus sp.*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Sphingomonas sp.*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, la mayoría presentes en mastitis clínica. Para detectar genes de resistencia se utilizaron primers específicos, de los cuales 7 muestras presentaron el gen para resistencia a blaTEM (β -lactámicos) y 6 muestras presentaron el gen para resistencia a tetA (tetraciclinas). Se identificó multirresistencia en las especies: *Staphylococcus pasteurii*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus uberis*, *Sphingomonas sp.*

Palabras clave: Mastitis, PCR, secuenciación, bioquímica.

Abstract

Bovine mastitis is a disease that affects the farms of small and medium producers in the cantons of Cayambe and Pedro Moncayo, Pichincha Province-Ecuador. Treating this disease is not easy due to the different microorganisms that cause it. This study focused on the molecular determination by means of polymerase chain reaction (PCR) of the etiological agents of mastitis, having multiple advantages when recognizing family, gender and species of microorganisms. It is a method capable of detecting resistance genes of antibiotics, an important analysis when diagnosing and treating diseases. The aim of this research is to identify bacteria causing bovine mastitis by using biochemical and molecular tests. Biochemical tests such as: Gram staining, Catalase, Coagulase, and Mannitol Salt Agar were efficient to obtain pure strains and determine the gender of some bacteria. Specific primers (RNA16S) were used for the molecular identification of 9 etiological agents causing the disease in the productive units. The microorganisms found were *Staphylococcus pasteurii*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus sp.*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Sphingomonas sp.*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, mostly present in clinic mastitis. To detect resistance genes, specific primers were used, of which 7 samples presented the gene for resistance to blaTEM (β -lactam) and 6 samples presented the gene for resistance to tetA (tetracyclines). Multi-resistance was identified in the species *Staphylococcus pasteurii*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus uberis*, *Sphingomonas sp.*

Keywords: Mastitis, PCR, sequencing, biochemistry.

Forma sugerida de citar: Bonifaz, N., Galarza, X., Fuertes, B. y Beltrán, J. (2024). Determinación molecular del agente etiológico de la mastitis bovina de muestras provenientes de unidades productoras andinas. La Granja: Revista de Ciencias de la Vida. Vol. 39(1):137-149. <http://doi.org/10.17163/lgr.n39.2024.08>.

IDs Orcid:

Nancy Bonifaz: <http://orcid.org/0000-0002-1029-057X>
Ximena Galarza: <http://orcid.org/0000-0001-9181-3354>
Byron Fuertes: <http://orcid.org/0000-0003-4045-6195>
Janss Beltrán: <http://orcid.org/0000-0002-5035-7863>

1 Introducción

Según INEC y ESPAC (2016), en el Ecuador se producen 6'202.408 litros de leche diarios, en la región Sierra 4'810.551 litros, (el 75% de la producción nacional), y en la provincia de Pichincha 873.272 litros. Torres (2018) estima que el cantón Cayambe produce alrededor de 425.000 litros diarios de leche, de los cuales destinan para el consumo 51.000 litros, producción artesanal 106.250 litros y venta a granel 267.750 litros. De la misma manera, Céspedes y Pachacama (2012), afirman que en el cantón Pedro Moncayo existe una producción diaria de leche de 13 905 litros diarios.

Bonifaz y Conlago (2016) manifiestan que la mastitis causa grandes molestias a los ganaderos, provocando una disminución en la producción y características de calidad de la leche, viéndose afectada en su composición química, física y bacteriológica, presentando un menor porcentaje de sólidos totales, proteínas, grasa y calcio. Se conoce como mastitis a la inflamación e irritación de la glándula mamaria causada por diversos agentes patógenos, presentando aumento de células somáticas y provocando malestar en el animal; como efecto secundario de esta infección, la textura de la leche cambia sus características organolépticas (Bhattarai y col., 2018). Según Martínez (2012), los síntomas clínicos son aumento en el número de leucocitos, composición y apariencia alterada (grumos), fiebre, cuartos mamaros enrojecidos, hinchados y calientes.

La aparición de la mastitis depende de las condiciones higiénicas de las salas de ordeño (Zhang y col., 2018), edad, raza, partos, periodo de lactancia, producción de leche y condiciones del equipo de ordeño. En caso de que no se utilice equipo de ordeño, se deberá controlar la salud e higiene de la persona encargada del ordeño de las vacas (Ruiz Gil, Peña Rodríguez y Remón Díaz, 2016).

La enfermedad aparece también cuando los factores del medio y el manejo de los animales interactúan de tal manera que la ubre es expuesta a microorganismos patógenos. Hay tres factores esenciales que promueven la mastitis, el hospedador, el agente infeccioso y el medio ambiente (Owens y Nickerson, 2011).

Se han realizado estudios donde se identifican

los agentes etiológicos causantes de mastitis (Cervantes y col., 2017); empleando medios de cultivo selectivos se han aislado *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Klebsiella*, *Pseudomona*, *Candida albicans* y *Proteus mirabilis*.

Hernández y col. (2015) en un estudio sobre identificación de agentes etiológicos determinaron que *Staphylococcus aureus* es el microorganismo más importante, con un 26% de prevalencia sobre el total de microorganismos identificados en el departamento de Boyacá.

El método estándar para la identificación de los agentes patógenos consiste en aislamientos en medios de cultivos selectivos, sin embargo, usando este método solamente se hará un diagnóstico hasta el nivel de género de la bacteria (Peña y col., 2012).

La prevalencia de esta enfermedad en el cantón Cayambe y Pedro Moncayo es preocupante, pues los microorganismos patógenos responsables cambian continuamente su dinámica ecológica por las mutaciones que sufren los agentes etiológicos. Por esta causa se han tomado medidas para identificar los agentes patógenos causantes de la mastitis por medio de pruebas bioquímicas y técnicas moleculares que permiten establecer los agentes patógenos y la resistencia a múltiples antibióticos por el mal uso de estos al tratar esta enfermedad (Bonifaz y Conlago, 2016).

Con base a lo mencionado, los objetivos de esta investigación son determinar mediante técnicas moleculares los agentes etiológicos de la mastitis bovina de muestras provenientes de unidades productoras de los cantones Cayambe y Pedro Moncayo, así como también identificar las bacterias de la enfermedad mediante 3 pruebas bioquímicas, detectar los genes de resistencia blaTEM para betalactámicos y tetA para tetraciclinas, en bacterias aisladas en esta investigación mediante la técnica PCR y por último realizar la identificación molecular de los microorganismos aislados a través del secuenciamiento de la región ribosomal RNA 16S.

2 Materiales y Métodos

2.1 Toma de muestras de leche

Las muestras de leche fueron tomadas en fincas ganaderas ubicadas en los cantones de Cayambe (coordenadas 0°02'38"N 78°09'22"O) y Pedro Moncayo (coordenadas 0°02'37"N 78°20'57"O), las cuales habían sido previamente identificadas como positivas para mastitis mediante California Mastitis Test (CMT).

Se colectaron un total de 24 muestras de leche siguiendo el protocolo LCL 001 del Laboratorio de calidad de leche de la Universidad Politécnica Salesiana, el cual indica que se deben tomar 40 mL de leche por envase, para su análisis en el equipo FOS-SOMATIC células somáticas (CCS) por citometría de flujo. Se seleccionaron para este estudio aquellas muestras que superaron los 500.000 CCS/dL según lo determinado por Nieto y col. (2012).

2.2 Aislamiento microbiano

Las muestras de leche fueron sembradas por hisopado en medio Tripteína Soya Agar (TSA), recomendado para la detección y recuento de una amplia gama de bacterias, y se incubaron a 37 °C por 48 horas (Britania Tripteína Soya Agar, 2015). Posterior a ello, para obtener colonias puras se realizaron varios subcultivos empleando la técnica de siembra por agotamiento en medio TSA (Milián y col., 2014). Se confirmó la presencia de colonias bacterianas puras mediante tinción de Gram.

2.3 Identificación mediante pruebas bioquímicas

Se realizaron cuatro pruebas bioquímicas de identificación bacteriana: Tinción de Gram para diferenciar bacilos y cocos Gram (+) y Gram (-); Catalasa empleando peróxido de hidrógeno al 30%, esperando visualizar presencia o ausencia de burbujeo (Wanger y col., 2017); Prueba Coagulasa en plasma humano, donde se inocularon las cepas puras e incubadas a 37 °C por 24 horas para analizar presencia o ausencia de coagulación (American Society for Microbiology, 2016); y Agar Manitol Sal (AMS) en donde se realizaron siembras de las cepas aisladas y fueron incubadas a 37 °C por 48 horas con la finalidad de diferenciar bacterias del género *Staphylo-*

coccus (Vila, Zhurbenko y Viera, 2004). La aplicación de estas pruebas tuvo como finalidad evitar que los análisis moleculares se realicen en especies bacterianas repetidas.

2.4 Extracción de ADN y amplificación de la región 16S rRNA

Las cepas puras fueron masificadas en medio Tryptic Soya Broth (TSB) hasta llegar a una concentración de 12×10^8 (UFC/mL) la cual fue determinada por comparación con patrones de turbidez de la escala McFarland. En tubos de 1,5 mL se colocó 1mL de cultivo bacteriano de cada cepa masificada y la muestra se centrifugó para formar un pellet de bacterias que fue empleado para la extracción de ADN en base a lo recomendado por Becton et al. (2005). La extracción de ADN total se realizó empleando el protocolo de extracción de ADN de Köchl, Niedersstätter y Parson (2005). La presencia o ausencia de ADN fue confirmada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (Buitrago, 2010). El ADN obtenido fue conservado en una solución de Tris-EDTA a -20 °C (Tan y Yiap, 2009).

La amplificación de la región 16S rRNA se realizó usando los primers 27F (5'TCCTACGGGAGGCAGCAGT3') y 1492R (5'GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT3') diseñados por Marchesi y col. (1998). Se usó la técnica PCR, utilizando el termociclador marca Labnet Multigene bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 minutos, 25 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 minuto, annealing a 60 °C por 2 minutos, extensión inicial por 1 minuto a 72 °C y extensión final de 7 minutos a 72 °C seguido de mantenimiento a 4 °C (Kang y col., 2015). Se determinó la presencia de amplicones realizando electroforesis en gel de agarosa al 1%.

2.5 Secuenciación y análisis de secuencias

Los amplicones fueron secuenciados bajo la técnica de Sanger en MACROGEN, Corea del Sur. Las secuencias obtenidas se compararon con secuencias existentes en el GeneBank del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI).

Posteriormente, las secuencias fueron alineadas con la herramienta Muscle de software Mega 6 para obtener un árbol filogenético empleando la he-

ramienta *neighbor joining* de Mega 6 para realizar una correcta clasificación taxonómica de los agentes etiológicos aislados (Fuertes y Cerna, 2018).

2.6 Amplificación de genes de resistencia a antibióticos blaTEM (β -lactámicos) y tatA (tetraciclinas)

La presencia o ausencia de genes de resistencia a antibióticos se determinó empleando los siguientes primers específicos descritos por Tao y col. (2014), para blaTEM: Forward (5' GCA CGA GTG GGT TAC ATC GA 3') y Reverse (5' GGT CCT CCG ATC GTT GTC AG 3') el tamaño aproximado del gen de resistencia es de 300 pb; para tetA: Forward (5' GCT ACA TCC TGC TTG CCT TC 3') y Reverse (5' CAT AGA TCG CCG TGA AGA GG 3'). Según Belding y Boopathy (2018) el tamaño aproximado del gen de resistencia es de entre 250 a 300 pb. Los resultados obtenidos fueron verificados en electroforesis en gel de agarosa al 1%.

3 Resultados y Discusión

3.1 Identificación mediante pruebas bioquímicas

Se aislaron un total de 17 cepas bacterianas. La tinción Gram dio como resultado 15 especies Gram positivas y 2 especies Gram negativas, como se indica en la Tabla 1.

Tras la aplicación de las pruebas de catalasa se identificaron 11 especies catalasa positivo y 6 especies catalasa negativo. Las pruebas de coagulasa permitieron identificar 1 especie coagulasa positivo y 16 especies coagulasa negativo. Chaneton (2010), afirma que los *Staphylococcus* coagulasa negativos son los patógenos con mayor predominio, al ser identificados en función al tipo de infección 47% en infección latente y 28% en mastitis subclínica.

Las siembras en Agar Manitol Sal (AMS) permitieron catalogar a 4 especies como positivas a fermentación de manitol, 8 especies negativas a fermentación de manitol y 5 especies bacterianas que no dieron un resultado determinado.

Tabla 1. Resultados obtenidos de aplicación de pruebas Bioquímicas

Código de la muestra	Aplicación de Pruebas Bioquímicas			
	Tinción Gram	Catalasa	Coagulasa	Agar Manitol Sal
835	+	+	-	+
A2r	+	+	-	+
D2r	+	+	-	****
I2r	+	+	-	+
A3r	+	+	-	+
809	+	+	-	-
798	+	+	+	****
799c1	+	+	-	-
H3R	+	+	-	-
11	+	-	-	****
11 ^a	+	-	-	****
1C	-	+	-	-
2C	-	+	-	****
1B	+	-	-	-
E1	+	-	-	-
99	+	-	-	-
799	+	-	-	-

Resultado de la clasificación por pruebas bioquímicas de las cepas bacterianas aisladas; (+) = Resultado positivo, (-) = Resultado negativo, (****) = Resultado inconcluso.

3.2 Identificación mediante métodos moleculares

El ADN total obtenido fue de aproximadamente 7000 pb, basándose en la escalera molecular del kit Thermo Scientific 2× Phire Plant Direct (Figura 1).

La amplificación de la región 16S rRNA dio como resultado bandas de aproximadamente 1300 pb (Figuras 2 y 3). La validez de las secuencias obtenidas fue analizada empleando el software FinchTV, con lo cual se descartaron 3 secuencias por no contar con la calidad adecuada. Con las secuencias restantes se obtuvo la identidad de 15 especies correspondientes al dominio Bacteria.

Las secuencias obtenidas en esta investigación fueron comparadas con secuencias presentes en la base de datos en el GeneBank del NCBI. Los porcentajes de identidad superaron el 97% en todos los casos, a excepción de las cepas codificadas como 1C, 2C y E1. Sol-Church y Frenck (2014), sugieren aceptar porcentajes de identidad superiores al 95%. Las secuencias de las especies catalogadas como D2r, 798 y 2C no contaron con un registro taxonómico en la base de datos del NCBI, siendo catalogadas como bacterias no cultivadas. Para realizar una correcta identificación de los agentes etiológicos aislados se elaboró un árbol filogenético empleando las 15 secuencias obtenidas y 4 secuencias externas usadas de referencia descargadas de la base de datos del NCBI (Figura 4).

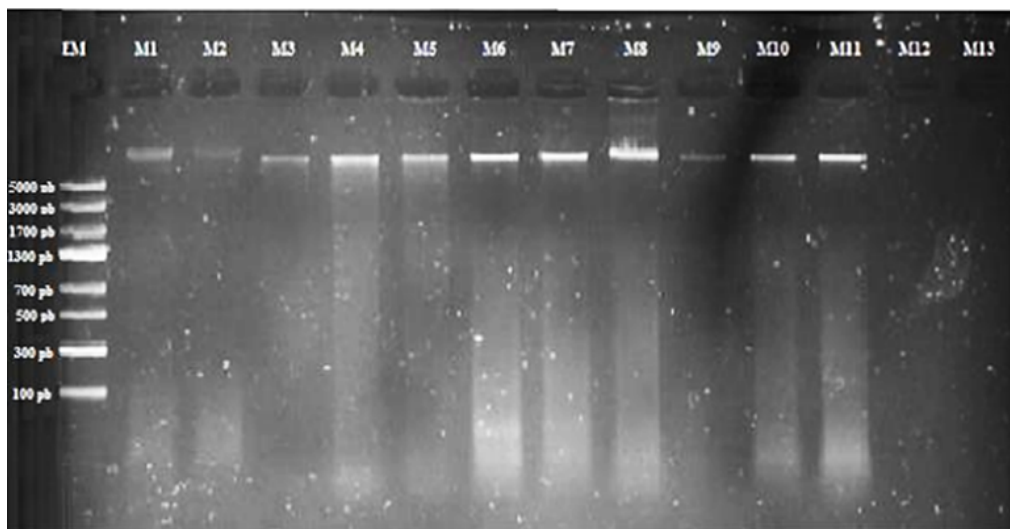


Figura 1. ADN total en gel de electroforesis.

Las especies aisladas fueron identificadas como agentes etiológicos causantes de mastitis en el ganado bovino lechero en la zona de estudio. Basados en la información obtenida con el árbol filogenético, se establecieron tres clados:

- Clado (I): Los aislamientos identificados como *Staphylococcus* sp. (A3r), *S. pasteurii* (835, A2r), *S. Warneri* (I2r), *S. epidermidis* (809) y *S. saprophyticus* (799c1), se encuentran en este clado. Existieron especies que no pudieron ser identificadas a nivel taxonómico como es el caso de *Bacterium* strain 2BL_4 (D2r) la cual se alineó con *S. warneri* y una bacteria no cultivada clone ncd2254e01c2 (798), especies que se agruparon a la secuencia de referencia de *Staphylococcus aureus* usada como especie externa, determinando que estas pueden pertenecer al mismo género, pero de diferente cepa.
- Clado (II): Incluyen a *Sphingomonas* sp. (C1) y *Bacterium* strain 4BL_5 (2C) agrupadas estrechamente con la cepa de referencia tipo de ATCC *Sphingomonas paucimobilis*. Esta relación la confirma Clavijo y col. (2012), ya que existen géneros que se encuentran dentro de

un mismo grupo, comparten características y coinciden también con la identificación molecular.

- Clado (III): Todos los aislamientos en el clado

III coinciden al ser del mismo género *Streptococcus* al agruparse en las siguientes especies *S. uberis* (99, 799), *S. dysgalactiae* (B1) el cual se agrupó con *Streptococcus* sp. (E1).

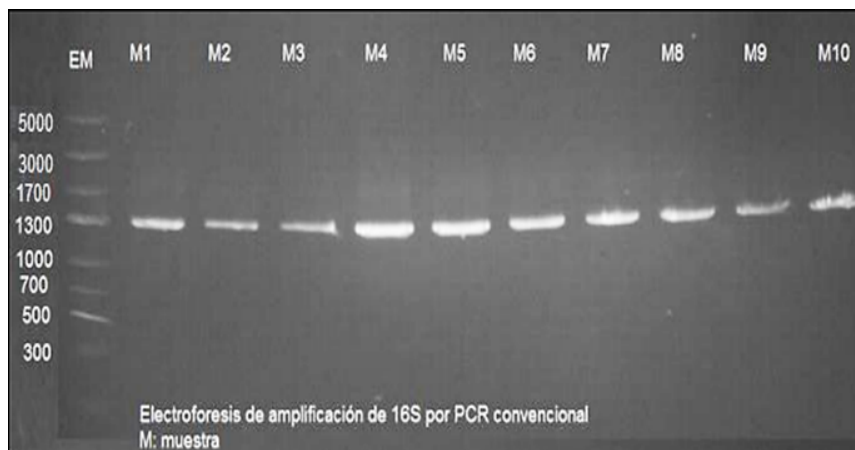


Figura 2. Electroforesis de amplificación de 16S por PCR convencional.

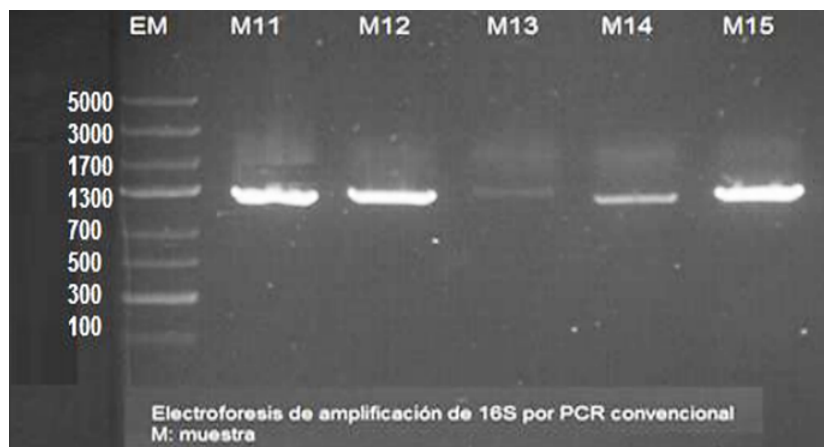


Figura 3. Electroforesis de amplificación de 16S por PCR convencional.

En la Tabla 2 se evidencian los géneros de los agentes patógenos identificados en esta investigación, que son *Staphylococcus*, *Sphingomonas* y *Streptococcus*. Existen bacterias que son componentes normales de la microbiota cutánea, entre ellas bacterias del género *Sphingomonas* y *Streptococcus* (Chen, Fischbach y Belkaid, 2018).

Según Fariña y col. (2013), *Staphylococcus* es

uno de los géneros aislados con mayor frecuencia en estudios de prevalencia de mastitis. Lange y col. (2015) mencionan que las especies pertenecientes al género *Streptococcus* están vinculadas con la mastitis bovina al ser bacterias oportunistas. Ruiz y col. (2011) en un estudio sobre mastitis subclínica asociada al ordeño manual y mecánico determinan a *Staphylococcus* sp. como el agente patógeno principal con un 61% de predominancia seguido de *Strep-*

Staphylococcus sp. con 29,6% de incidencia. Braga y col. (2018) al realizar una identificación de patógenos de la mastitis bovina por espectrofotometría de masas MALDI-TOF determinaron que aproximadamente

el 80% de los casos de mastitis era ocasionado por el grupo de bacterias *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* y *Streptococcus dysgalactiae*.

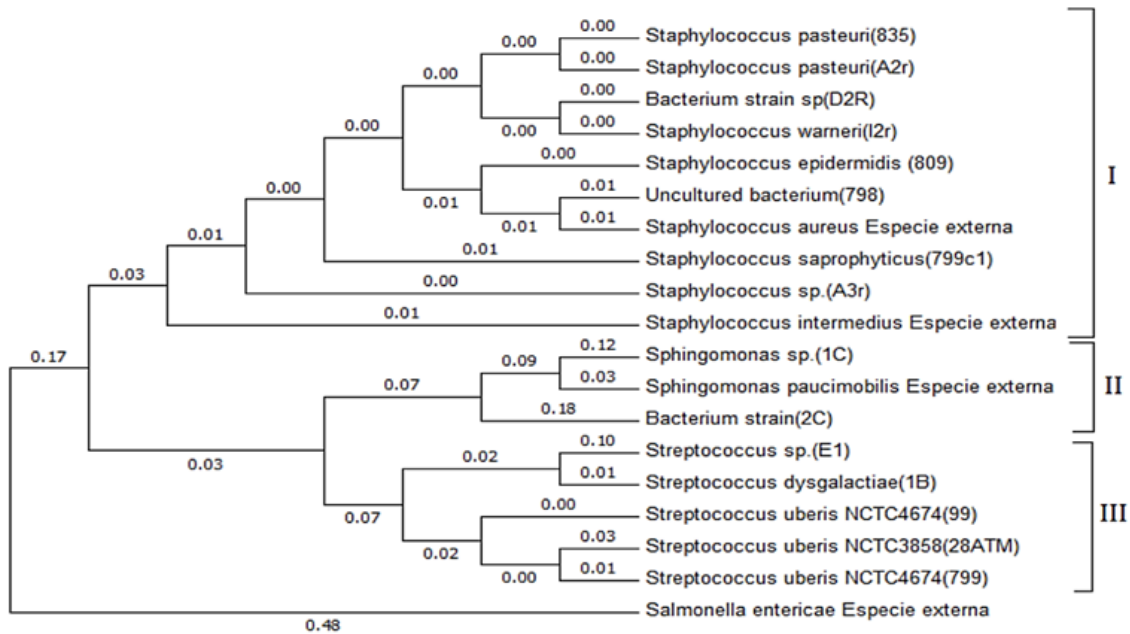


Figura 4. Árbol filogenético elaborado a partir de la secuenciación de la región 16S rRNA de las especies aisladas. Fuente: elaboración propia, 2018

Davies y col. (2016) mencionan que el 63% de los eventos potenciales de transmisión y el 38% de incidencia de mastitis clínica es causada por *S. uberis* en hatos lecheros. Nam y col. (2009) mencionan que cerca del 40% de los casos de mastitis clínica son originados por bacterias Gram (-) vinculadas a la mastitis, y el patógeno no coliforme más comúnmente asociado con las infecciones intramamarias es *Sphingomonas* sp.

3.3 Determinación de resistencia a antibióticos

La amplificación del gen de resistencia blaTEM para la familia de los β-lactámicos dio como resultado bandas de aproximadamente 300 pb, datos corro-

borados por Tao y col. (2014). Se encontró el gen de resistencia en las especies *Staphylococcus pasteurii*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus uberis*, *Sphingomonas* sp. y *Staphylococcus aureus* (Figura 5).

Por otra parte, la amplificación del gen de resistencia tetA para la familia de las tetraciclinas dio como resultado bandas de aproximadamente 250 pb. De acuerdo con Belding y Boopathy (2018), el gen de resistencia para la familia de antibióticos tetraciclinas posee un tamaño de entre 210 a 300 pb. Se encontró el gen de resistencia en las especies *Staphylococcus pasteurii*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Staphylococcus aureus* y *Sphingomonas* sp. (Figura 6).

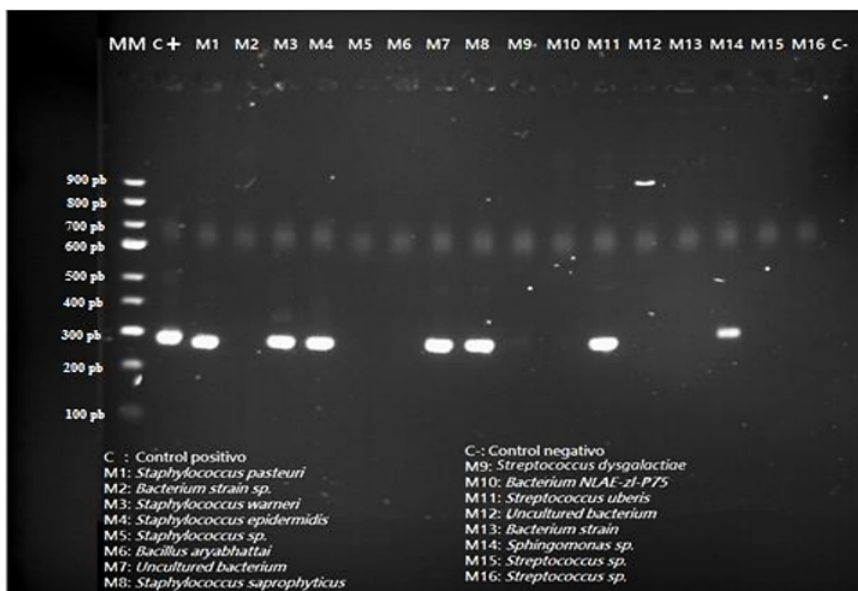


Figura 5. Gel de electroforesis que demuestra la presencia/ausencia del gen de resistencia blaTEM para antibióticos de la familia β -lactámicos.

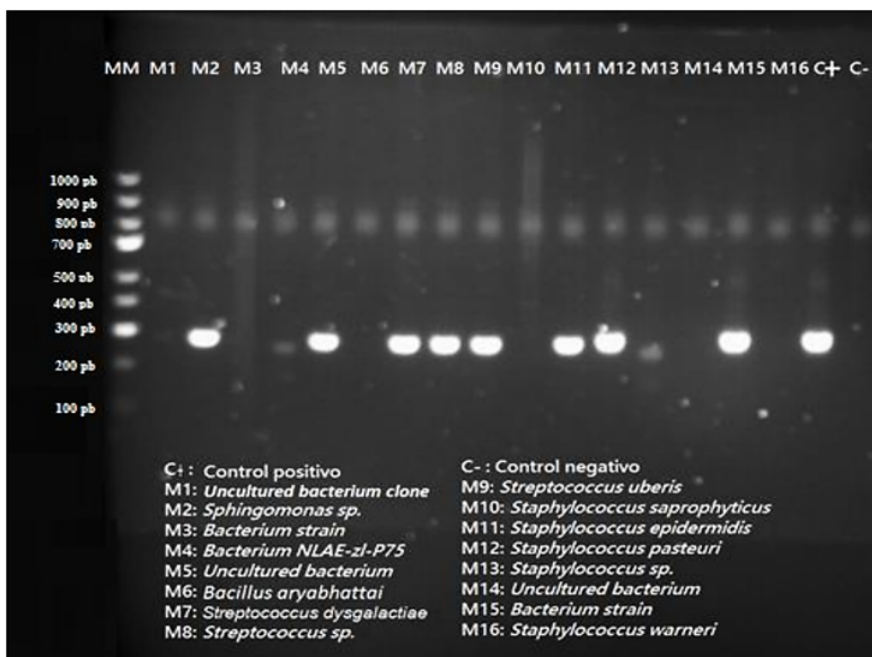


Figura 6. Gel de electroforesis que demuestra presencia/ausencia de gen de resistencia tetA para antibióticos de la familia de tetracilinas.

Corroborando los resultados obtenidos en este estudio (Tabla 3), otros estudios de resistencia a antibióticos en patógenos relacionados a mastitis han determinado que las especies resistentes a β -

lactámicos son *Staphylococcus warneri*, *Streptococcus uberis* (Bonetto, 2014), *Staphylococcus epidermidis* (Fariña y col., 2013), *Staphylococcus saprophyticus*, *Sphingomonas sp.*, *S. aureus* (Ramírez, Fernández y Pala-

cio, 2018) y *Staphylococcus pasteurii* (Arrepia, 2008). De igual manera, de acuerdo con estudios realizados por otros autores las especies *S. epidermidis* presentan resistencia a tetraciclinas (Ramírez, Fernández y Palacio, 2018), *S. uberis*, *S. dysgalactiae*, (Flo-

rentin, 2007) y *S. pasteurii* (Savini y col., 2009), mostrando esta última resistencia a numerosas clases de compuestos antibióticos como meticilina/ oxacilina, macrólidos, lincosamidas, estreptograminas y tetraciclinas.

Tabla 2. Clasificación taxonómica de los agentes etiológicos causantes de mastitis bovina aislados en los cantones de Cayambe y Pedro Moncayo, provincia de Pichincha.

Código	Especie	Query cover (%)	Identidad	Acceso
835	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	99	97	gil388894673 JQ726643.1
A2r	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	100	99	gil762210140 LN623633.1
D2r	<i>Staphylococcus</i> sp.	98	99	gil1193828147 MF112182.1
I2r	<i>Staphylococcus warneri</i>	99	99	gil1409189597 MF662223.1
A3r	<i>Staphylococcus</i> sp. strain CLC-F26	100	99	gil1408623646 MH518208.1
809	<i>Staphylococcus epidermidis</i> strain TWSL_20	96	99	gil846351151 KT184900.1
798	<i>Staphylococcus</i> sp.	91	98	gil322180115 JF194710.1
799c1	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> strain WWi167	99	99	gil1393269660 MH396756.1
1C	<i>Sphingomonas</i> sp. strain Ap02E	78	89	gil1080032407 KX990222.1
2C	<i>Sphingomonas</i> sp.	97	91	gil1193828182 MF112217.1
1B	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> strain JZ R-75	34	99	MH119693.1
E1	<i>Streptococcus</i> sp. XJ150-1212-NJRI	95	90	gil564983989 KF828882.1
99	<i>Streptococcus uberis</i> strain NCTC4674	99	99	gil1403452574 LS483408.1
799	<i>Streptococcus uberis</i> strain NCTC3858	99	97	gil1403426722 LS483397.1

Fuente: NCBI(2019).

4 Conclusiones

El uso de la técnica molecular permitió identificar género y especie en la mayoría de los microorganismos aislados, con lo cual se concluye que la identificación molecular del agente etiológico es importante en el estudio de la mastitis bovina al ser una prueba más específica que las bioquímicas.

Se pudo determinar que los agentes etiológicos

de mayor prevalencia de mastitis bovina en los cantones Cayambe y Pedro Moncayo son los microorganismos pertenecientes a los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus*, siendo los más comunes *Staphylococcus pasteurii*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus* sp., *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Sphingomonas* sp., *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*.

Tabla 3. Especies resistentes a β -lactámicos y tetracilinas

Especies con gen de resistencia blaTEM	Especies con gen de resistencia tetA
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	<i>Staphylococcus pasteurii</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Streptococcus uberis</i>	<i>Streptococcus uberis</i>
<i>Sphingomonas</i> sp.	<i>Sphingomonas</i> sp.
<i>Staphylococcus warneri</i>	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	

La técnica molecular también permitió identificar en las bacterias causantes de la mastitis bovina la presencia de genes de resistencia a dos familias de antibióticos. Las bacterias resistentes a los β -lactámicos fueron *Staphylococcus pasteurii*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus uberis* y *Sphingomonas* sp.; y las bacterias determinadas como resistentes a las tetracilinas fueron *Staphylococcus pasteurii*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus uberis*, *Sphingomonas* sp., *Streptococcus dysgalactiae*.

La identificación molecular de diferentes géneros y especies bacterianas causantes de la mastitis bovina junto con el estudio de los genes de resistencia a los antibióticos permite tener un diagnóstico más seguro para instaurar un tratamiento eficaz contra esta enfermedad multifactorial que aqueja a las vacas lactantes en la gran mayoría de las unidades productivas lecheras del Ecuador.

Contribución de los autores

NFBG; Conceptualización, Administración del proyecto, metodología Investigación, Responsabilidad, Visualización, Escritura borrador original, revisión y edición. XAGJ; Metodología, Investigación de campo y laboratorio, muestreo de leche, microbiología, tratamiento de datos a nivel molecular. BGFF; Metodología, investigación de laboratorio, microbiología tratamiento de datos a nivel molecular. NJBG; Conceptualización, tratamiento de datos, análisis formal, Curación de datos.

Referencias

American Society for Microbiology (2016). «Coagulase Test Protocol». Online: <https://bit.ly/3GVDLqd>.

- Arrepia, E. (2008). «Prevalência da Resistência a Antibióticos, Metais e Desinfectantes em Isolados de *Staphylococcus* Provenientes de uma Etar Municipal». Tesis de mtría. Universidade do Porto. Online: <https://bit.ly/3BfsHRv>.
- Belding, C. y R. Boopathy (2018). «Presence of Antibiotic-Resistant Bacteria and Antibiotic Resistance Genes in Coastal Recreational Waters of Southeast Louisiana, USA». En: *Journal of Water Supply: Research and Technology-AQUA* 67.8, 800-809. Online: <https://bit.ly/41eBvT8>.
- Bhattacharai, D. y col. (2018). «Mechanism of Pattern Recognition Receptors (PRRs) and Host Pathogen Interplay in Bovine Mastitis». En: *Microbial Pathogenesis* 120, 64-70. Online: <https://bit.ly/3mN7bAc>.
- Bonetto, C. (2014). «Mastitis bovina causada por *Staphylococcus* coagulasa negativos. Retrieved from degree Thesis information Doctor en Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de la Plata.» Tesis doct. Universidad Nacional de La Plata. Online: <https://bit.ly/3px3qQ8>.
- Bonifaz, N. y F. Conlago (2016). «Prevalencia e incidencia de mastitis bovina mediante la prueba decaliforniamastitis test con identificación del agente etiológico, en paquiestancia, Ecuador». En: *La Granja* 24.2, 43-52. Online: <https://bit.ly/3KLBbnN>.
- Braga, P. y col. (2018). «Rapid identification of bovine mastitis pathogens by MALDI-TOF Mass Spectrometry». En: *Pesquisa Veterinária Brasileira* 38, 586-594. Online: <https://bit.ly/42OddzT>.
- Britania Tripteína Soya Agar (2015). *Manual uso de Tripteína Soya Agar, Britanialab.com*. Online: <https://bit.ly/40D0Q82>.
- Buitrago, J. González de (2010). «Técnicas y Métodos de Laboratorio Clínico». En: Elsevier España. Cap. 15 - Electroforesis, 211-217. Online: <https://bit.ly/3pLSRzk>.
- Cervantes, P. y col. (2017). «Aislamiento de patógenos causantes de mastitis subclínica en vacas del trópico húmedo en Veracruz, México». En: *Actas Iberoamericanas en Conservación Animal AICA* 10, 103-109. Online: <https://bit.ly/41gDYwk>.
- Céspedes, J. e I. Pachacama (2012). «Situación socio económica de la Parroquia la Esperanza del Cantón Pedro Moncayo, Provincia de Pichincha sobre la base de cadena corta». Tesis de mtría. Universidad Central del Ecuador. Online: <https://bit.ly/3NXkNUw>.

- Chaneton, L. (2010). «Nuevos enfoques en el diagnóstico, prevención y tratamiento de la mastitis bovina a través del uso de moléculas con acción antimicrobiana». Tesis doct. Universidad de Buenos Aires. Online:https://bit.ly/3HUP56I.
- Chen, Y., M. Fischbach e Y. Belkaid (2018). «Skin microbiota-host interactions». En: *Nature* 553, 427-436. Online:https://go.nature.com/3K0mm3R.
- Clavijo, C. y col. (2012). «Aislamiento, caracterización e identificación de bacterias diazotróficas de la rizósfera del cultivo de *Olea europaea* "olivo" en Tacna Perú». En: *Ecología Aplicada* 11.2, 89-102. Online:https://n9.cl/5bpg0.
- Davies, P. y col. (2016). «Molecular epidemiology of *Streptococcus uberis* clinical mastitis in dairy herds: strain heterogeneity and transmission». En: *Journal of Clinical Microbiology* 54.1, 68-74. Online:https://bit.ly/41nnCIL.
- Fariña, N. y col. (2013). «Clinically significant coagulase-negative staphylococci: most frequent species and virulence factors». En: *Revista Chilena de Infectología: Órgano Oficial de La Sociedad Chilena de Infectología* 30.5, 480-488. Online:https://bit.ly/3Ackehp.
- Florentin, C. C. (2007). «Perfil de Resistencia *In Vitro* a Antimicrobianos de Cepas Causantes de Mastitis Aisladas de leche Cruda Bovina en Establecimientos de Pequeña y Mediana Producción». En: *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud* 5.1, 19-25. Online:https://bit.ly/3ULnlkw.
- Fuertes, G. y M. Cerna (2018). «Identificación morfológica y molecular de hongos micorrízicos de especies del género *Dracula* y *Epidendrum* (Orchidaceae)». En: vol. 1. Bionatura Conference Serie 1, 1-17. Online:https://bit.ly/3pkzYwI.
- Hernández, J. y col. (2015). «Agentes etiológicos de mastitis bovina en municipios con importante producción lechera del departamento de Boyacá». En: *Revista Investigación en Salud Universidad de Boyacá* 2.2, 162-176. Online:https://bit.ly/3on9uu5.
- INEC y ESPAC (2016). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua ESPAC 2016*. Inf. téc. Online:https://bit.ly/3UQDYRm.
- Kang, J. y col. (2015). «Rapid origin determination of the Northern Maudslayi Shrimp (*Acetes chinensis*) based on allele specific polymerase chain reaction of partial mitochondrial 16S rRNA gene». En: *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 28.4, 568-572. Online:https://bit.ly/3MT8Iij.
- Köchl, S., H. Niederstätter y W. Parson (2005). «Forensic DNA typing protocols». En: vol. 297. Humana Press. Cap. DNA extraction and quantitation of forensic samples using the phenol-chloroform method and real-time PCR, 13-29. Online:https://bit.ly/41s672W.
- Lange, C. y col. (2015). «Species-level identification of staphylococci isolated from bovine mastitis in Brazil using partial 16S rRNA sequencing». En: *Veterinary Microbiology* 176.3-4, 382-388. Online:https://bit.ly/41r7gbG.
- Marchesi, J. y col. (1998). «Design and Evaluation of Useful Bacterium-Specific PCR Primers that Amplify Genes Coding for Bacterial 16S rRNA». En: *Applied and Environmental Microbiology* 64.2, 795-799. Online:https://bit.ly/41K8rmZ.
- Martínez, G. (2012). «Prácticas de ordeño y prevalencia de mastitis subclínica en vacas lecheras que abastecen el Centro de Acopio ULDESA del municipio El Sauce en el Departamento de León septiembre-noviembre 2011». Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. Online:https://bit.ly/44SdZxI.
- Milián, G. y col. (2014). «Aislamiento e identificación de cepas de *Bacillus spp.* en diferentes ecosistemas con fines probióticos. Su utilización en animales». En: *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 48.4, 347-351. Online:https://bit.ly/3AkYb8l.
- Nam, H. y col. (2009). «Prevalence and antimicrobial susceptibility of gram-negative bacteria isolated from bovine mastitis between 2003 and 2008 in Korea». En: *Journal of Dairy Science* 92.5, 2020-2026. Online:https://bit.ly/3UXqRhi.
- Nieto, D. y col. (2012). *Manual de buenas prácticas de ganadería bovina para la agricultura familiar: Tratamientos bovinos*. Ministerio de Ganadería, Chile. Inf. téc. Online:https://www.fao.org/3/i3055s/i3055s.pdf.
- Owens, W. y S. Nickerson (2011). «Mastitis Therapy and Control | Medical Therapy Options». En: Elsevier. Cap. Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition), 435-439. Online:https://bit.ly/3nPL5xq.
- Peña, W. y col. (2012). «Identificación de bacterias causantes de mastitis subclínica en bovinos de una finca del estado Trujillo-Venezuela». En: *Revista Academia* 11.24, 355-363. Online:https://bit.ly/3MZIBXr.

- Ramírez, N., J. Fernández y L. Palacio (2018). «Taxa de incidência de mastite clínica e susceptibilidade antibiótica de patógenos produtores de mastite em gado leiteiro do norte de Antioquia, Colômbia». En: *Revista de Medicina Veterinaria* 36, 75-87. Online: <https://n9.cl/aq2ze>.
- Ruiz Gil, A., J. Peña Rodríguez y D. Remón Díaz (2016). «Mastitis bovina en Cuba. Artículo de revisión». En: *Revista de Producción Animal* 28.2-3, 39-50. Online: <https://bit.ly/420v6v1>.
- Ruiz, A. y col. (2011). «Prevalencia de mastitis bovina subclínica y microorganismos asociados: comparación entre ordeño manual y mecánico, en Pernambuco, Brasil». En: *Revista de Salud Animal* 33.1, 57-64. Online: <https://n9.cl/n45jo>.
- Savini, V. y col. (2009). «Epidemiology, pathogenicity and emerging resistances in *Staphylococcus pasteurii*: from mammals and lampreys, to man». En: *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery* 4.2, 123-129. Online: <https://bit.ly/3V4ley0>.
- Sol-Church, K. y J. Frenck (2014). *Sequencing Guidelines. Biomolecular Core Facility*. Inf. téc. Online: <https://bit.ly/3AoZW4n>.
- Tan, S. y B. Yiap (2009). «DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present». En: *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2009.574398. Online: <https://bit.ly/3AkdwpL>.
- Tao, C.-W. y col. (2014). «Evaluation of five antibiotic resistance genes in wastewater treatment systems of swine farms by real-time PCR». En: *Science of the Total Environment* 496, 116-121. Online: <https://bit.ly/40vEDIY>.
- Torres, X. (2018). «Estudio de la producción de la industria láctea del cantón Cayambe en el período 2009-2015». Tesis de maestría. Universidad Andina Simón Bolívar, Sede Ecuador. Online: <https://bit.ly/3NZDA1I>.
- Vila, A., R. Zhurbenko y D. Viera (2004). «Propuesta de una modificación en la formulación del medio agar manitol salado utilizado en el aislamiento de estafilococos de importancia clínica». En: *Revista Cubana de Medicina Tropical* 56.3, 172-177. Online: <https://n9.cl/60tsu>.
- Wanger, A. y col. (2017). «Microbiology and Molecular Diagnosis in Pathology». En: Elsevier. Cap. Chapter 5 - Biochemical Tests and Staining Techniques for Microbial Identification, 61-73. Online: <https://bit.ly/3nQxKVy>.
- Zhang, S. y col. (2018). «Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance profiles in *Streptococcus dysgalactiae* isolated from bovine clinical mastitis in 5 provinces of China». En: *Journal of Dairy Science* 101.4, 3344-3355. Online: <https://bit.ly/43Wgw9g>.