

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**  
**SEDE QUITO**

**Carrera:**

**INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:**

**INGENIEROS EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**TEMA:**

**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**

**AUTORES:**

**XIMENA ANDREA GALARZA JUCA**  
**LUIS ANDRÉS MOLINA VILLAVICENCIO**

**DIRECTORA:**

**NANCY FABIOLA BONIFÁZ GARCÍA**

**Quito, noviembre del 2018**

## Cesión de derechos de autor

Nosotros Galarza Juca Ximena Andrea y Molina Villavicencio Luis Andrés con documento de identificación N° 172759298-0 y N° 172184424-7 respectivamente, manifestamos nuestra voluntad y cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del trabajo de titulación intitulado: **“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”**, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingenieros en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en nuestra condición de autores nos reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Firmas:



Nombre: Ximena Andrea Galarza Juca  
Cédula: 172759298-0  
Fecha: Quito, noviembre 2018.

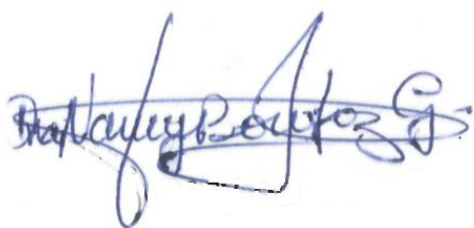


Nombre: Luis Andrés Molina Villavicencio  
Cédula: 172184424-7  
Fecha: Quito, noviembre 2018.

### **Declaratoria de coautoría de la docente tutora**

Yo declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación, **“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”**, realizado por Ximena Andrea Galarza Juca y Luis Andrés Molina Villavicencio, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana, para ser considerado como trabajo final de titulación.

Quito, noviembre 2018

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Nancy Fabiola Bonifaz García', written in a cursive style.

Dra. Nancy Fabiola Bonifaz García

C.I: 060208511-0

## **Dedicatoria**

**Ximena Galarza Juca**

A mis padres, Marcelo y Lilia, por ser la muestra viva de un amor abnegado, fuerte e infinito, al permitirme ser libre y cumplir mis sueños; la virtud de unos grandes padres como Uds., vivirá para siempre como un legado en mi corazón, los amo.

A mis hermanas Cristina y Salomé, mi fiel sombra y reflejo, son la alianza y el tesoro más valioso que la vida pudo obsequiarme.

A mi tía Ruth Juca, y su familia por el apoyo brindado, su cariño sincero y desinteresado, mi eterna gratitud para ustedes.

A mis raíces Carmelina, Edelina y Mariana, su bendición es el abrazo que me refugia y su sabiduría ha acompañado cada una de mis decisiones.

**Luis Molina Villavicencio**

A mi madre Carmen Isabel Villavicencio, porque me diste todo de ti y me enseñaste el respeto y la humildad, siempre te encuentras presente en mi corazón, siempre serás mi fortaleza.

A mi padre Luis German Molina, y hermanos Margarita, David, Andrea y Gabriela, por siempre apoyarme en mis estudios y enseñarme a ser una mejor persona cada día y brindarme su amor incondicional, por sus consejos y compañía en todas las decisiones de mi vida.

A Evelin por siempre brindarme todo su amor y apoyo, porque a su lado el mundo es un lugar mejor en donde junto a ella puedo cumplir todas mis metas y sueños.

## **Agradecimientos**

Agradecemos a la Universidad Politécnica Salesiana, institución que nos formó e impartió conocimientos para la vida profesional, a través de la carrera Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales.

Al grupo de investigación NUKUI WAKAN y al Laboratorio de Calidad de Leche UPS Cayambe por permitirnos el uso de sus instalaciones para la ejecución y desarrollo de este proyecto de investigación.

A nuestra tutora Dra. Nancy Bonifaz por brindarnos su confianza, dedicación y apoyo para realizar esta investigación, al permitirnos trabajar a su lado, nuestra eterna gratitud para ella.

A nuestro cotutor Ing. Byron Fuertes por el apoyo, paciencia y dedicación brindada en el desarrollo de esta investigación.

A todos los amigos de quienes nos llevamos los mejores recuerdos y momentos compartidos en la vida universitaria, a Jossue Ramírez, Michelle Campaña, Andrea Flores, Tatiana Arias, Michelle Toapanta

## Índice

Introducción .....	1
Capítulo 1 .....	4
1.1    Mastitis Bovina.....	4
1.1.1    Mastitis Subclínica .....	5
1.1.2    Mastitis Clínica .....	6
1.1.3    Células Somáticas (CCS).....	6
1.2    Mastitis y Resistencia Antibióticos .....	7
1.2.1    Genes de Resistencia Antibióticos .....	9
1.2.1.1    blaTEM.....	9
1.2.1.2    tetA .....	10
1.3    Técnicas moleculares de identificación.....	10
1.3.1    Extracción de ADN .....	11
1.3.2    ARNr 16S.....	12
1.3.3    Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	12
1.3.4    Electroforesis.....	13
1.3.5    Secuenciación.....	14
1.3.6    Secuenciación Sanger.....	14
Capítulo 2.....	16
2.1    Reactivación de muestras mastitis provenientes de los cantones Cayambe y Pedro Moncayo.....	16

2.2	Obtención de muestras de leche de bovinos diagnosticados positivos a mastitis.....	16
2.3	Aislamiento y purificación de bacterias obtenidas de muestras de leche....	17
2.3.1	Siembra de cepas activadas .....	18
2.4	Identificación Bioquímica de bacterias .....	18
2.4.1	Agar Manitol Sal.....	19
2.4.2	Tinción Gram .....	19
2.4.3	Catalasa .....	19
2.4.4	Coagulasa .....	20
2.5	Masificación en medio líquido .....	20
2.6	Identificación molecular de bacterias aisladas de mastitis .....	20
2.6.1	Extracción de ADN .....	20
2.6.2	Amplificación de la región 16S .....	22
2.7	Secuenciación .....	23
2.7.1	Análisis de secuencias.....	23
2.8	Amplificación de los genes de resistencia blaTEM (betalactámicos), tetA (tetraciclinas).....	24
	Capítulo 3.....	26
3.1	Reactivación de cepas bacterianas y aislamiento de bacterias en cultivos puros	26
3.2	Pruebas Bioquímicas .....	26
3.3	Extracción ADN.....	28

3.4	Amplificación de la región 16S.....	28
3.5	Análisis de secuencias .....	29
3.6	Filogenia de los agentes etiológicos de la Mastitis. ....	33
3.7	Cepas Bacterianas Resistentes a Antibióticos .....	35
3.7.1	Betalactámicos .....	35
3.7.2	Tetraciclinas .....	37
	Conclusiones .....	41
	Recomendaciones.....	43
	Referencias.....	44
	Anexos .....	58



## Índice de tablas

Tabla 1. Diagnóstico de un cuarto según el conteo de células somáticas. ....	7
Tabla 2 Código de las Bacterias aisladas y purificadas. ....	18
Tabla 3 Condiciones para PCR amplificación de la región 16S. ....	23
Tabla 4 Condiciones de PCR para Primers blaTEM. ....	24
Tabla 5 Condiciones de PCR para Primers tetA ....	25
Tabla 6 Resultados obtenidos de aplicación de pruebas Bioquímicas. ....	27
Tabla 7 Análisis de secuencias en el software BLAST de agentes etiológicos aislados. ....	32
Tabla 8 Especies resistentes a Betalactámicos y Tetraciclinas. ....	39

## Índice de Figuras

Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de presencia de ADN. ....	28
Figura 2. Árbol filogenético elaborado a partir de la secuenciación de la región 16S de las especies aisladas.....	34
Figura 3. Gel de electroforesis que demuestra presencia/ausencia de gen de resistencia para antibióticos blaTEM. ....	36
Figura 4. Gel de electroforesis que demuestra presencia/ausencia de gen de resistencia para antibióticos tetA. ....	38

## Índice de Anexos

Anexo 1. Siembra de cepas reactivadas. ....	58
Anexo 2. Protocolo LCL 001 del Laboratorio de calidad de la leche en Cayambe... ..	58
Anexo 3. Resiembras por estriado compuesto. ....	59
Anexo 4. Siembra En Agar Manitol Sal.....	59
Anexo 5. Observación en microscopio en lente de 100X. ....	60
Anexo 6. Prueba Catalasa Negativa y Positiva. ....	60
Anexo 7. Prueba de Coagulasa Positiva.....	61
Anexo 8. Amplificación de la región 16S.....	61
Anexo 9. Análisis de secuencias en el software BLAST. ....	62

## Resumen

La determinación molecular por medio de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los agentes etiológicos de la mastitis presenta múltiples ventajas al reconocer familia, género y la especie de microorganismos, es un método capaz de detectar genes de resistencia con primers importante al momento de diagnosticar y tratar enfermedades. En la presente investigación se buscó identificar bacterias causantes de la mastitis bovina utilizando pruebas bioquímicas y moleculares. Las pruebas bioquímicas como: manitol sal, coagulasa, catalasa y tinción Gram 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 de los cantones Cayambe y Pedro Mucano, 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 utilizó primers específicos, de los cuales 7 muestras presentaron el gen para resistencia a blaTEM (betalactámicos) 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 bovina, PCR, secuenciación molecular, antibióticos.

## Abstract

The molecular determination by polymerase chain reaction (PCR) of the etiological agents of mastitis presents multiple advantages when recognizing family, genus and species of microorganisms, it is a method capable of detecting resistance genes with important primers at the moment to diagnose and treat diseases. In the present investigation, we sought to identify bacteria that cause bovine mastitis using biochemical and molecular tests. The biochemical tests such as: mannitol salt, coagulase, catalase and Gram stain were efficient, to obtain pure strains and determine the genus of some bacteria. Specific primers (RNA16S) were used for the molecular identification of 9 etiological agents causing the disease in the productive units of Cayambe and Pedro Mocanyo cantons, the microorganisms found were; *Staphylococcus pasteurii*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus* sp., *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Sphingomonas* sp., *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, the majority present in clinical mastitis. Specific primers were used to detect resistance genes, of which 7 samples presented the gene for resistance to blaTEM (beta-lactams) and 6 samples presented the gene for resistance to tetA (tetracyclines). Multiresistance was identified in the following species: *Staphylococcus pasteurii*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus uberis*, *Sphingomonas* sp

**Keywords:** Bovine mastitis, PCR, molecular sequencing, antibiotics.

## Introducción

Según INEC & ESPAC (2016), en el Ecuador se produce 6'202.408 litros de leche diarios, en la región Sierra 4'810.551 litros, (el 75 % de la producción nacional), en la provincia de Pichincha 873.272 litros, Torres (2018), estima que el cantón Cayambe produce alrededor de 425.000 litros diarios de leche la cual se destina para el consumo 51.000 litros, a la producción artesanal 106.250 litros y 267.750 litros a la venta (p.3), de la misma manera Céspedes & Pachacama (2012), afirman que en el Cantón Pedro Moncayo existe una producción diaria de leche de 13.905 litros diarios (p.25). La alta producción y el manejo sanitario de los animales son factores que predisponen la presencia de mastitis bovina que es una patología latente en la producción de leche. La prevalencia e incidencia de este padecimiento en los animales origina la disminución en la producción, mala calidad de la materia prima, gastos de tratamiento e incremento de los costos de producción por litro de leche.

Los ganaderos de pequeña y mediana producción son los que más pierden cuando existe la presencia de mastitis, siempre asociado con problemas sanitarios. Según Bonifaz & Colango (2016) los microorganismos patógenos que causan esta enfermedad cambian continuamente su dinámica ecológica por las mutaciones que sufren los agentes etiológicos (p.45). La dificultad de su tratamiento radica en que esta enfermedad es provocada por diversos factores y eso dificulta el control apropiado de la misma y así lograr erradicarla adecuadamente.

Bonifaz & Colango (2016) manifiesta 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 (p.45).

En si el problema real está en los costos que conlleva el tratamiento que serán cubiertos por los ganaderos provocando grandes pérdidas económicas.

Todos los microorganismos poseen características metabólicas distintas dependiendo del género o especie, gracias a esto se las puede diferenciar y clasificar por medio de pruebas bioquímicas, estas consisten en determinar por medio de un sustrato la actividad de una vía metabólica específica para cada microorganismo (Del Coco, 2015). Las pruebas bioquímicas constituyen la base fundamental para la identificación microbiológica y determinar el tratamiento adecuado para varias enfermedades infecciosas.

Aunque las pruebas bioquímicas son efectivas pueden no ser siempre exactas o solo darnos una idea de cuál microorganismo estamos tratando, es por ello la gran importancia de las técnicas de identificación molecular como PCR que nos permite la amplificación de un segmento específico del ADN y con ayuda de programas bioinformáticos determinar la especie de un microorganismo en específico.

La prevalencia de esta enfermedad en el cantón Cayambe y Pedro Moncayo es preocupante según Bonifaz & Colango (2016), por esta causa se han tomado medidas para identificar los agentes patógenos causantes de la mastitis por medio de pruebas bioquímicas y técnicas moleculares y así establecer los agentes patógenos y la resistencia a múltiples antibióticos por el mal uso de los mismos al tratar esta enfermedad (p.45).

Con base a lo mencionado, los objetivos de esta investigación fueron: 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

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.



## Capítulo 1

### Marco Conceptual

#### 1.1 Mastitis Bovina

Es la enfermedad más costosa de tratar en todo el mundo, Breser *et al.*, (2018), afirma que la incidencia de esta enfermedad varía según el manejo y el cuidado de los bovinos en donde se han llegado a registrar hasta el 10 % de pérdida total de las ganancias de los productores lecheros. Vissio *et al.*, (2015), indican que también tiene repercusiones en la salud pública esto debido a que el consumo de leche con altos niveles de microorganismos patógenos puede causar graves problemas de salud (p.8).

Cuando la glándula mamaria se inflama o posee irritaciones se la denomina mastitis, presentando aumento de células somáticas, lo cual es resultado de diversos agentes patógenos, esto provoca que la textura de la leche cambie sus características organolépticas y provocando malestar al animal Bhattarai *et al.*, (2018).

Los síntomas clínicos según (Martínez, 2012), son: “aumento en el número de leucocitos, composición y apariencia alterada (grumos), fiebre, cuartos mamarios enrojecidos, hinchados y calientes”.

Por lo general el ganado lechero está constantemente expuesto a contraer la enfermedad mastitis, puede existir la posibilidad de contraer la enfermedad en las salas de ordeño (Zhang *et al.*, 2018).

Otros factores que intervienen en la aparición de mastitis son las condiciones de la vaca: edad, raza, partos, periodo de lactancia, producción de leche y condiciones del equipo de ordeño, en este caso si no se utiliza equipo de ordeño se deberá controlar la

salud e higiene de la persona encargada del ordeño de las vacas (Gil Ruiz *et al.*, 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, tres son los factores esenciales que promueven la mastitis, el hospedador, el agente infeccioso y el medio ambiente (Owens & Nickerson, 2011).

La mastitis se clasifica de dos formas en función de los diversos síntomas, mastitis subclínica y clínica.

### **1.1.1 Mastitis Subclínica**

Según Ferronato *et al.*, (2018), no es fácil de diagnosticar debido a que no existe síntomas visibles de la enfermedad en el animal ni en la leche. Se presenta de forma ligera y muy complicada de controlar debido a que el bovino parece saludable, la ubre no presenta ningún signo de inflamación y la apariencia de la leche es normal sin cambios organolépticos en ella (Morales *et al.*, 2005). Sin embargo, el conteo del número de células somáticas es elevado y es indicativo de una respuesta inflamatoria también está acompañado de un elevado número de microorganismo en la muestra de leche. Esto provoca una disminución en la producción lechera, así como alteraciones en la composición de la misma (Gonçalves *et al.*, 2018).

Por lo general es difícil de tratar con antibióticos, de larga duración, reduce gran porcentaje la producción de leche, difícil de diagnosticar, tiene efectos colaterales en la calidad de la leche y lo más importante es un peligro para los otros animales debido a que puede infectarlos (Gonçalves *et al.*, 2018). Los principales microorganismos causantes de mastitis subclínica son “*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y coliformes” (Mendoza, Vera, & Peña, 2017). *Escherichia*

*coli* es de gran importancia debido a su presencia en mastitis subclínica, definida por inflamación, aumentos de células somáticas (SCC), disminuyendo la calidad de leche aun después de realizado el tratamiento y se lo declara como curada (Breiser *et al.*, 2018).

### **1.1.2 Mastitis Clínica**

Se diagnostica cuando existe síntomas que se pueden observar fácilmente por el ganadero y estos son muy evidentes (Ferronato *et al.*, 2018).

La mastitis clínica según (Dettileux, 2018), se puede diagnosticar al observar la leche de color anormal, viscosidad o consistencia anormal, con o sin signos de calor, dolor o enrojecimiento (p.3334). Aproximadamente del 60 a 70 % de los antibióticos que se utiliza para prevenir y controlar la mastitis, el 50 % se utiliza para el tratamiento de la mastitis clínica (Zhang *et al.*, 2018). En la mastitis clínica se puede encontrar microorganismos patógenos como, “*Escherichia coli*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* y *Staphylococcus aureus*” (Ferronato *et al.*, 2018).

Para tratar mastitis se usa por lo regular antibióticos de acción corta y de larga duración, durante los periodos de lactancia y al finalizar la lactancia (Silva *et al.*, 2018).

### **1.1.3 Células Somáticas (CCS)**

Wall *et al.*, (2018), afirma que cuanto existe una infección intramamaria comienza una acción inflamatoria lo que provoca el aumento en el conteo de células somáticas (CCS) (p. 5362). El CCS indica la concentración que existe en un mililitro de leche de diferentes leucocitos y células epiteliales, hoy en día CCS es muy utilizado y

reconocido a nivel mundial como un método clásico para realizar seguimientos al estado de salud de la glándula mamaria (Cerón, Agudelo, & Maldonado, n.d.).

Cuando existen una lesión o infección los leucocitos aumentan como respuesta y las células epiteliales aparecen como resultado de lesión o infección. Con el aumento en la concentración de leucocitos en la leche, incrementa las células somáticas por la destrucción de tejidos de la ubre por las distintas bacterias patógenas presentes lo que produce una disminución de producción de leche (Wall *et al.*, 2018). Según L. R. García & Monzón, (2018), a mayor número de células somáticas en la leche, menor será la producción de la misma (p.129). Es inversamente proporcional el conteo de células somáticas y la producción de leche, lo normal es obtener un CCS de 200.000 cel/mL o menos en leche de tanque como observamos en el cuadro 1 (Hernández, 2008).

Tabla 1.

Diagnóstico de un cuarto según el conteo de células somáticas.

<b>Células/mL de Leche</b>	<b>Estado de la ubre</b>
Hasta 100.000	Sana, leche normal
De 100.000 a 200.000	Sospechoso, nivel superior Fisiológico
Más de 200.000	Mastitis, leche anormal

Fuente: (Hernández, 2008).

## **1.2 Mastitis y Resistencia Antibióticos**

Tradicionalmente las bacterias Gram (-) son clasificadas como patógenos infecciosos y ambientales estas bacterias por lo general son enterobacterias como “*Escherichia*

*coli*, *Klebsiella* sp., *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, y *Enterococcus* spp, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium* spp, *Mycoplasma* spp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Nocardia*” (Jong *et al.*, 2018), lo que tienen en común estos microorganismos es que son fáciles de transmitir de entre vacas, siendo el reservorio el animal infectado o el cuarto de la ubre (Jong *et al.*, 2018).

Los tratamientos con antibióticos según Sánchez *et al.*, (2018), son la principal arma contra la mastitis durante su etapa de lactancia y en vacas secas, pero algunos microorganismos patógenos presentan resistencia completa o parcial algunos tipos de antibióticos debido al uso inadecuado de estos (Sánchez *et al.*, 2018).

Los microorganismos poseen características de defensa parcial o completa a la acción de los antibióticos, este fenómeno progresivo es considerado como resistencia a los antibióticos, la resistencia surge principalmente al uso desmesurado e irresponsable de los antibióticos, así como malos diagnósticos y prescripciones de dosis y medicamentos incorrectas, también aplicaciones de tratamientos con duraciones inapropiadas (Jong *et al.*, 2018).

Resientes estudios realizados por Villanueva & Morales, (2017), demuestran que la multiresistencia que poseen algunas bacterias se debe a las pocas barreras que impiden que exista la transferencia de genes de resistencia entre microorganismos de diferentes géneros y familias. Los mecanismos de resistencia son la alteración en la estructura enzimática del antibiótico, bomba de salida, cambio en la permeabilidad de membrana externa, y alteraciones del sitio de acción. Las bacterias resistentes pueden ser transmitidas a los humanos, esto por medio de alimentos de origen animal como leche y carne de bovino donde, además se encuentra altas concentraciones de antibióticos nocivos para la salud humana presente en la leche (Sánchez *et al.*, 2018).

### **1.2.1 Genes de Resistencia Antibióticos**

Los genes de resistencia le confieren la habilidad al microorganismo de presentar resistencia completa o parcial ante los antibióticos, los siguientes genes son de mucha importancia debido que confiere la resistencia para antibióticos muy usados en tratamiento de mastitis, estos son: tetA y tetW son resistentes a tetraciclinas, y blaTEM a betalactámicos (Tao *et al.*, 2014).

#### **1.2.1.1 blaTEM**

La enzima TEM-1 es la betalactamasas que se ha descrito con mayor frecuencia en Gram (-) y está codificada por el gen blaTEM-1. Esta enzima confiere resistencia a ampicilina, penicilina y cefalosporinas de primera generación como cefalotina, según Tao *et al.*, (2014), el gen posee un tamaño aproximado de 300 pb (p.118).

La producción de betalactamasas es el mecanismo que genera resistencia a los betalactámicos, debido a que estas enzimas hidrolizan el anillo betalactámico y lo transforma en biológicamente inactivos. Estas enzimas pueden ser producidas tanto por bacterias Gram (+) como bacterias Gram (-) (Muñoz, 2011).

Existen 4 tipos de ellas:

1. Clase A, representada por betalactamasas de tipo TEM.
2. Clase B, que corresponden a metaloenzimas poco frecuentes.
3. Clase C, representadas por cefalosporinasas de enterobacterias.
4. Clase D, representadas por las cloxacilinasas.

Entre ellas la más importantes son codificadas por el gen blaTEM (Muñoz, 2011).

### **1.2.1.2 tetA**

En bacterias Gram (-), los genes que comúnmente producen resistencia a tetraciclina por la presencia de bombas de flujo específicas para estos antibióticos son, los genes tetA y tetB que codifican sistemas de eflujo, según Belding & Boopathy (2018) el gen posee un tamaño aproximado de entre 210 a 300 (p.5).

La tetraciclina es un antibiótico de amplio espectro con un efecto bacteriostático provoca una asociación reversible entre el antibiótico y el ribosoma. Actúan uniéndose a la subunidad 30s del ribosoma de la bacteria en la etapa inicial de síntesis proteica (Martí *et al.*, 2006).

Las bacterias poseen 2 principales mecanismos de resistencia contra tetraciclinas: la protección ribosomal y la expulsión activa, el mecanismo más común de las bacterias para generar resistencia es expulsión activa donde aparecen los genes “tet” que codifican una proteína de membrana citoplasmática que permite la transportación activa, esta proteína produce un complejo intercambio tetraciclina-cación. Según Martí *et al.*, (2006), en bacterias patógenas son resistentes con frecuencia las bacterias Gram (-) y los genes que más comúnmente producen resistencia a tetraciclina por este mecanismo son tetA y tetB, la manera más fácil de transferir el gen de resistencia es por transferencia horizontal entre microorganismos.

### **1.3 Técnicas moleculares de identificación**

Rahman *et al.*, (2016), dice que la adecuada caracterización del patógeno causante de la mastitis es un factor trascendental para el tratamiento y prevención de esta infección (p.1). Según Xavier *et al.*, (2017), en la actualidad las técnicas de tipificación molecular basados en ADN tienen alta sensibilidad y especificidad para reconocer los microorganismos causantes de esta condición (p.2).

Hiitiö *et al.*, (2018), expresa que en la actualidad la industria láctea se apoya en análisis moleculares comprendidos en la extracción de ADN, amplificación de secuencias específicas del genoma de diferentes especies microbianas relacionadas con mastitis, estas se multiplican y detectan simultáneamente de una muestra de leche con mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y finalmente la secuenciación (p.5267).

### **1.3.1 Extracción de ADN**

Köchler *et al.*, (2005), indican los pasos generales de la purificación de ácidos nucleicos incluyen la lisis celular, que altera la estructura celular para crear un lisado, al impedir la acción de nucleasas celulares tales como DNasa y RNasa, y la separación del ácido nucleico deseado de restos celulares (p.15). Tan & Yiap (2009), mencionan que una de las principales técnicas para aislar ácidos nucleicos es la extracción con disolvente orgánico fenol-cloroformo (p.4).

Según Tan & Yiap (2009), el fenol es un ácido carbónico inflamable, corrosivo y tóxico puede desnaturizar las proteínas eficazmente, no impide por completo la actividad de la RNasa. Este problema se puede resolver usando una mezcla de fenol: cloroformo. Las proteínas, los lípidos, los carbohidratos y los restos celulares se descartan por medio de la extracción de la fase acuosa con la mezcla orgánica de fenol y cloroformo (p.4). Al añadir fenol y cloroformo se origina una mezcla bifásica. La capa hidrofóbica de la emulsión se depositará en la base y la capa hidrófila en la zona superior por centrifugación. La fase superior que contenía ADN se colecta y se precipita el ADN del sobrenadante al agregar etanol o isopropanol a una alta concentración de sal. Se recolecta el precipitado de ADN por centrifugación, y el sobrante de sal se enjuaga con etanol al 70 % y se centrifuga para desechar el



sobrenadante de etanol. El pellet de ADN se diluye luego con tampón TE o agua destilada estéril (p.5).

### **1.3.2 ARNr 16S**

Rodicio & Mendoza (2004), indican que el ADN ribosomal 16S (ADNr 16S), es un polirribonucleótido a partir de cuya secuencia se puede lograr relaciones filogenética y taxonómica del mundo procariota, ocasionando un profundo impacto en nuestra visión de la evolución y la clasificación e identificación bacteriana (p.238).

Patel *et al.*, (2017), señalan que las secuencias encontradas se confrontan con las depositadas en bases de datos, como el National Center for Biotechnology Information (NCBI) y la correlación de los microorganismos (p.261).

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

Esta técnica revolucionó la genética “En el año 1983, el Dr. Kary Mullis perfeccionó la técnica de la PCR conocida así por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction” (Lozada, 2009, p.4); Tamay *et al.*, (2013), indica que el objetivo es replicar una gran cantidad de fragmentos específicos de ADN durante varios ciclos por medio de una catálisis ejecutada por la enzima ADN polimerasa (p.70).

“Este ensayo enzimático los componentes primordiales son el molde de ADN, la enzima ADN Polimerasa, primers, dNTPs, el ion magnesio (Mg<sup>+</sup>), buffer y H<sub>2</sub>O” (Lozada, 2009, p.4).

Según Tamay *et al.*, (2013), los primers son secuencias flanqueantes específicas de oligonucleótidos que delimitan la secuencia blanco a amplificar y son complementarios a la misma (p.71), ofreciendo un punto de inicio y fin para extensión de la ADN polimerasa. Geyer & Hanson, (2013), mencionan que la enzima

bacteriana ADN polimerasa, es considerada termoestable pues adapta su funcionalidad a temperaturas altas, cumpliendo la función de añadir nucleótidos a partir de un grupo 3'-OH teniendo como precursor el primer el cual permite delinear la región específica de secuencia blanco (p.2).

Cornejo *et al.*, (2014), indican que la mezcla de los elementos mencionados anteriormente interactúa en el equipo llamado termociclador, diseñado para conservar condiciones homogéneas de tiempo y temperatura evitando modificación en cada uno de los ciclos (p.4).

La PCR inicia con la desnaturalización incrementando de temperatura entre 94 °C y 96 °C separando la doble hélice, seguido de un alineamiento obligatorio de los primers para que esto se disminuye la temperatura entre 40 °C y 60 °C y por último, se sintetiza una nueva cadena en sentido 5' a 3' con el aumento de la temperatura a 72 °C, a la cual la ADN polimerasa se une a los primers e inicia la replicación (Cornejo *et al.*, 2014, p.4).

#### **1.3.4 Electroforesis**

Según Salazar *et al.*, (2013), la electroforesis es un método de separación de biomoléculas en función de su carga eléctrica, cuya magnitud depende del pH del medio al que han sido expuestas; Cornejo *et al.*, (2014), afirma que la composición de residuos alternantes de D-galactosa y 3,6-anhidro-L-galactosa unidos por enlaces glucosídicos  $\alpha$  (1→3) y  $\beta$  (1→4) el gel de agarosa, determina el contenido de ácidos nucleicos de una muestra, teniendo una estimación de su pureza y grado de entereza (p.5).

La muestra y el buffer de carga deben colocarse juntos en los pocillos previamente formados sobre el gel de agarosa el cual debe estar cubierto en su totalidad de buffer

de corrimiento y colocado en la cámara de electroforesis que cuenta con un electrodo positivo en un extremo y un electrodo negativo en el otro sometiendo a la muestra a un campo eléctrico, donde el ADN se moverá en dirección al ánodo pues posee carga negativa (Salazar *et al.*, 2013).

Para la visualización de las biomoléculas se emplean un colorante fluorescente que posee la propiedad de intercalarse entre las bases nitrogenadas de las antes mencionadas (Cornejo *et al.*, 2014), en la actualidad el bromuro de etidio se ha suplido por el compuesto comercial SYBR Safe, colorante que se observa con una luz ultravioleta en el rango de 470 a 530 nm (Salazar *et al.*, 2013).

### **1.3.5 Secuenciación**

“Proceso de lectura que establece el orden de los cuatro componentes elementales químicos (adenina, timina, citosina y guanina), llamados "bases", que forman la molécula de ADN” (NHGRI, 2015).

### **1.3.6 Secuenciación Sanger**

NHGRI (2015) manifiesta que es un método enzimático basado en sintetizar, de forma secuencial, una hebra de ADN complementaria a una hebra de cadena simple que actúa como molde (O’Connell, 2018, p.11), en donde participan el ADN polimerasa, los 4 2'-deoxinucleótidos (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) y 4 dideoxinucleótidos (ddATP, ddGTP, ddCTP y ddTTP) usados por la ADN polimerasa al construir la nueva hebra, pero una vez incorporados, imposibilitan la adición de nuevos nucleótidos.

Para la secuenciación es necesario realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para lo cual se prepara cuatro tubos distintos, cada uno contiene el ADN

molde, el cebador específico marcado radiactivamente (Brunstein, 2017), la enzima ADN polimerasa que incorpora aleatoriamente uno de los cuatro didesoxirribonucleótido trifosfato (ddNTP) deteniendo la reacción y generando fragmentos de distinta longitud, todos ellos con el mismo ddNTP terminal (Ebili *et al.*, 2017, p.97).

Por último los fragmentos obtenidos que fueron interrumpidos por un ddNTP específico se separan en función de su tamaño mediante electroforesis capilar en gel de acrilamida, como resultados de la marcación del correspondiente fluoróforo, avanzando por el gel a través de un tubo capilar de la cámara detectora, el fluoróforo es estimulado con un láser, manifestando una fluorescencia de un color definido permitiendo asignar el nombre de la base correspondiente y el orden de las emisiones (Sanschagrin & Yergeau, 2014, p.3).

## **Capítulo 2**

### **Metodología**

#### **2.1 Reactivación de muestras mastitis provenientes de los cantones Cayambe y Pedro Moncayo**

Los microorganismos que se analizaron fueron proporcionadas por la investigación previa de “Estudio de la problemática epidemiológica de la mastitis bovina en el cantón Cayambe” (Ballesteros & Valdivieso, 2018), provenientes de los cantones Cayambe y Pedro Moncayo.

Las cepas puras fueron previamente aisladas de muestras de leche, conservadas en solución de glicerina y reactivadas para su uso posterior en el área de microbiología del laboratorio de Calidad de leche del Centro de Apoyo Cayambe de la UPS (Anexo 1).

#### **2.2 Obtención de muestras de leche de bovinos diagnosticados positivos a mastitis**

Se presentó la necesidad de realizar muestreo de leche para obtener mayor número de bacterias provenientes de mastitis. Esto debido a que el método utilizado para la conservación de bacterias de la investigación anterior no tuvo buenos resultados preservándolas de manera óptima, ocasionando la pérdida de algunas bacterias obligándonos a realizar nuevos muestreos. La toma de las muestras se realizó en las mismas fincas ganaderas donde dieron positivo las vacas a la enfermedad en el anterior proyecto, pertenecientes a centros de acopio ubicadas en el cantón Cayambe y Pedro Moncayo.

Se tomó muestras de la leche de 40 mL como indica el protocolo LCL 001 (Laboratorio de calidad de leche de la Universidad Politécnica Salesiana) (Anexo 2). Las muestras fueron analizadas en el equipo FOSSOMATIC por citometría de flujo en el laboratorio para conteo de células somáticas (CCS), se seleccionaron como positivas todas las muestras que superaron los 700.000 CCS/mL, según García, (2004), indica que en conteos mayores de 500.000 CCS/dL ya existe presencia de mastitis subclínica, la glándula mamaria se encuentra infectada y la pérdida de leche es mayor al 10 %.

Con los resultados previos fue necesaria una segunda toma de muestras a las mismas fincas ganaderas con posible mastitis clínica o subclínica, las muestras de leche obtenidas directamente de la vaca fueron sometidas a la prueba de campo California Mastitis Test (CMT), primero se efectuó un despunte por cada cuarto mamario, añadiendo aproximadamente 5 mL de leche en cada pocillo de la paleta y adicionando aproximadamente 5 mL del reactivo CMT. Finalmente, al observar la reacción si presenta o no gelificación es un indicativo a presencia o ausencia de mastitis.

Las muestras positivas para mastitis fueron almacenadas en tubos Falcon a 4 °C y transportadas al laboratorio de microbiología de la carrera de Biotecnología de los Recursos Naturales Universidad Politécnica Salesiana en Quito.

### **2.3 Aislamiento y purificación de bacterias obtenidas de muestras de leche**

La siembra fue realizada por medio de la técnica de hisopado en TSA, medio recomendado para la detección y recuento de una amplia gama de bacterias a todas las muestras de leche positivas para mastitis, con un asa estéril por estriado compuesto. La incubación se la realizo a 37 °C por 24 horas posteriormente fue

necesario una resiembra con el mismo procedimiento por 2 o hasta 3 veces para obtener colonias puras de bacterias (Anexo 3).

La confirmación y verificación de obtención de colonias puras se realizó mediante las pruebas bioquímicas antes mencionadas en el marco conceptual, de estas la tinción Gram fue la más útil debido a que proporciona una visualización más clara de la morfología microscópica de la bacteria permitiéndonos diferenciar contaminaciones cruzadas entre cocos, bacillus, espirilos u otros.

### **2.3.1 Siembra de cepas activadas**

Las cepas activadas fueron sembradas en medio TSA realizando un estriado en ángulo recto. Las bacterias aisladas se identificaron con códigos como se indica en la Tabla 2, posteriormente colocadas en la incubadora por 48 horas a 37 °C (Britania, 2015).

Tabla 2

Código de las Bacterias aisladas y purificadas.

<b>Códigos designados a Bacterias</b>					
835	I2r	798	11	2C	28ATM
A2r	A3r	799c1	11A	1B	99
D2r	809	H3R	1C	E1	799

Elaborado por: Los autores 2018

### **2.4 Identificación Bioquímica de bacterias**

Las cepas fueron sometidas a pruebas bioquímicas diferentes: Tinción Gram, Catalasa, Coagulasa y Agar Manitol Sal.

### **2.4.1 Agar Manitol Sal**

Los microorganismos fueron sembrados en Agar Manitol Sal, es un medio de cultivo diferencial y selectivo utilizado para el aislamiento y diferenciación de estafilococos, posteriormente se incubó a 37 °C por 24 hora (Vila *et al.*, 2004) (Anexo 4).

### **2.4.2 Tinción Gram**

En un portaobjetos es colocada una gota de agua destilada y posteriormente con el asa una pequeña muestra de la cepa sobre la gota de agua, luego es expuesta al mechero hasta que toda el agua desaparezca por completo (Perez & Dias, 2013).

Se colocó cristal violeta cubriendo la muestra por 1 min, posteriormente varios enjuagues son realizados con agua destilada con la pizeta. Se agregó el lugol repitiendo el procedimiento del cristal violeta por 1 min y luego un lavado con agua destilada. Posteriormente el alcohol cetona por 30 seg en forma de lavado, consecutivamente con abundante agua destilada para un segundo lavado (Costa, 2018). Por último la safranina, colocada por 1 min y posteriormente lavado con agua destilada. Terminado este procediendo las placas fueron llevadas al microscopio para su observación con aceite de inmersión en el lente de 100X (Anexo 5).

Dependiendo de la coloración observada en el microscopio Costa, (2018), afirma “si es color violeta o morado es Gram (+) si el color es rosáceo o rojizo es Gram (-)”(p.83-117).

### **2.4.3 Catalasa**

En una muestra de la cepa colocada en un portaobjetos se agregó un par de gotas de peróxido de hidrogeno al 30 %, esperando visualizar presencia o ausencia de burbujeo (Anexo 6), si existe significa que hay presencia de la enzima catalasa por lo



que el resultado es positivo a la prueba de la catalasa si no existe ninguna reacción la sepa es catalasa negativa (Wanger *et al.*, 2017).

#### **2.4.4 Coagulasa**

En tubos eppendorf esterilizados fue colocado 0.5 mL de plasma humano previamente tratado y posteriormente fue recogido con el asa una gran cantidad de la cepa de la placa de agar puro de 48 horas. Delicadamente el tubo eppendorf fue virado para obtener la suspensión del microorganismo (Anexo 7), nunca agitar (Sah *et al.*, 2018).

#### **2.5 Masificación en medio líquido**

Con una asa estéril se tomó una muestra de la cepa aislada en medio TSA y se la inoculó en el medio líquido TSB, para luego incubar a 90 rpm por 24 horas a 37 °C (Britania, 2015).

#### **2.6 Identificación molecular de bacterias aisladas de mastitis**

##### **2.6.1 Extracción de ADN**

El método utilizado es descrito por (Köchler *et al.*, 2005, p.113), algunas adaptaciones fueron realizadas para obtener mejores resultados en las condiciones del laboratorio de la UPS en Quito. La concentración bacteriana se aproxima a  $12 \times 10^8$  (UFC/mL) determinada por comparación con patrones de turbidez de la escala McFarland adecuada para la extracción de ADN como indican Becton & Company, (2005), posteriormente 1000  $\mu$ L de muestra fueron tomados con la micropipeta en un tubo eppendorf, de las bacterias masificadas en TSB. Las muestras fueron centrifugadas por 3 minutos a 13000 rpm, desechando el sobrenadante quedando la formación de un pellet y posteriormente colocando 500  $\mu$ L de búfer de lisis (200 mM Tris HCl pH

8.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5 % SDS) para uniformar la solución con el pellet se realizó vórtex por 1 minuto y colocándolo después en el termo bloque por 20 minutos a 60 °C. ulteriormente fue colocado 400 µL de fenol cloroformo en proporción 1:1 a 4 °C y después fue aplicado vórtex por 1 minuto y los tubos eppendorf fueron colocados en la centrifuga a 13000 rpm por 30 minutos, así poder separar proteínas presentes del ADN requerido, formando 2 fases una de fenol con proteínas y cloroformo con ADN (Köchler *et al.*, 2005, p.114).

Al salir de la centrifuga el sobrenadante es colocado a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 mL y posteriormente se agregó 400 µL de cloroformo a una temperatura de -20 °C, para homogenizar fue realizada una mezcla por inversión por 1 minuto y luego colocado en la centrifuga a 13000 rpm por 5 minutos (Tan & Yiap, 2009).

El sobrenadante resultado de la centrifuga fue trasladado a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 mL junto con 4 µL ARNasas (10 mg/mL), incubado por 30 minutos a 37 °C. Agregando luego 500 µL de isopropanol a 4 °C, procediendo luego a mezclar por inversión por 1 minuto, al final se encubo a -20 °C por 15 minutos y centrifuga a 13000 rpm por 5 minutos.

El sobrenadante es desechado quedando la formación de un pellet entonces 500 µL de etanol al 70 % a -20 °C son añadidos, el cual por un minuto es mezclado por inversión. Posteriormente centrifugado a 13000 rpm por 5 minutos es desechado el sobrenadante e incubado a 37 °C por 30 minutos o hasta que no quede presencia de etanol, por último 50 µL de TE es añadido al pellet libre de etanol, es aplicado vórtex hasta que el pellet sea disuelto por completo, por último fue conservado a -20 °C (Tan & Yiap, 2009).

Una vez culminado el protocolo de extracción se verificó la presencia de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% preparado con 50 mL de TBE 1X, 0.5 g de agarosa y 5  $\mu$ L de Sybr safe. La cámara de electroforesis Labnet fue corrida a 90 V por 40 minutos (González de Buitrago, 2010), con muestras de 4  $\mu$ L de ADN y 4  $\mu$ L de tampón de carga Blue Juice. Para la revelación del gel se utilizó el foto documentador Bio-imaging systems ®.

### **2.6.2 Amplificación de la región 16S**

Para amplificar la región 16S se utilizó los siguientes primers Forward 27F (5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3') y Reverse 1492R (5' CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT 3'), para amplificar mediante PCR se realizó una solución en un tubo eppendorf adecuado para el termociclador marca Labnet Multigene ®, esta solución contenía: 0.5  $\mu$ L de primer 27F Forward, 0.5  $\mu$ L de primer 1492R Reverse, 10  $\mu$ L de agua libre de nucleasas, 12.5  $\mu$ L de Master Mix Go Taq *Promega* y 1  $\mu$ L de ADN, dando como resultado 25  $\mu$ L en cada tubo eppendorf (Méndez-Vilas, 2016).

Las condiciones en las que se ejecutó la PCR en el termo bloque fueron tomadas de (Kang *et al.*, 2015), presentadas en la tabla 3 con algunas modificaciones en la temperatura elevándola en 2 °C para desnaturalización inicial, 2 °C para desnaturalización y 1 °C para temperatura annealing debido que con las condiciones originales se obtenía resultados erróneos o nulos.

Tabla 3

Condiciones para PCR amplificación de la región 16S.

<b>ETAPA</b>	<b>TEMPERATURA (°C)</b>	<b>TIEMPO</b>	<b>CICLOS</b>
Desnaturalización inicial	95	5 min	
Desnaturalización	95	10 seg	33 ciclos
Annealing	55	2 min	
Extensión	72	1 min	
Extensión final	72	7 min	
Mantenimiento	4	∞	

Elaborado por: Los Autores 2018.

Los eppendorf obtenidos del termociclador se corrió en gel de agarosa al 1 % para evidenciar la amplificación de la región 16S, utilizando las mismas condiciones realizadas para verificar presencia de ADN.

## **2.7 Secuenciación**

Las muestras provenientes de los PCR obtenidas, fueron preparadas en tubos eppendorf con 20  $\mu$ L, aproximadamente con una concentración de 20 ng y enviadas a la empresa MACROGEN de Corea del Sur, para ser analizadas por medio de la técnica Sanger.

### **2.7.1 Análisis de secuencias**

Las secuencias obtenidas, fueron editadas con el software FinchTV versión 1.4.0, , seguidamente analizadas en software MEGA 7 para alinear las bases nitrogenadas, para finalmente utilizar la herramienta Blast del NCBI para comparar las secuencias de esta investigación con las secuencias almacenadas en el Gene Bank.

## 2.8 Amplificación de los genes de resistencia blaTEM (betalactámicos), tetA (tetraciclinas)

La amplificación de los genes de resistencia se determinaron utilizando los siguientes primers específicos descritos por Tao *et al.*, (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. (p.118 ); 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 & Boopathy (2018) el tamaño aproximado del gen de resistencia es de entre 250 a 300 pb. (p.5). Las condiciones de amplificación se muestran en la Tabla 4 y 5.

Los resultados obtenidos fueron verificados en electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Tabla 4

Condiciones de PCR para Primers blaTEM.

ETAPAS	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	CICLOS
Desnaturalización inicial	95	5 min	
Desnaturalización	95	10 seg	33 ciclos
Annealing	48	2 min	
Extensión	72	1 min	
Extensión final	72	7 min	
Mantenimiento	4	∞	

Elaborado por: Los Autores 2018

Tabla 5

Condiciones de PCR para Primers tetA

<b>ETAPA</b>	<b>TEMPERATURA (°C)</b>	<b>TIEMPO</b>	<b>CICLOS</b>
Desnaturalización inicial	95	5 min	
Desnaturalización	95	10 seg	33 ciclos
Annealing	55	2 min	
Extensión	72	1 min	
Extensión final	72	7 min	
Mantenimiento	4	∞	

Elaborado por: Los Autores 2018

## Capítulo 3

### Resultados y discusión

#### 3.1 Reactivación de cepas bacterianas y aislamiento de bacterias en cultivos puros

Fueron reactivadas 5 cepas bacterianas conservadas del proyecto de investigación “Estudio de la problemática epidemiológica de la mastitis bovina en el cantón Cayambe” (Ballesteros & Valdivieso, 2018).

De las 24 muestras de leche tomadas de cuartos mamarios de vacas con mastitis se aisló 13 cepas bacterianas, más las 5 del proyecto anterior, se procesaron en total 18 muestras. La tinción Gram dio como resultado 16 especies Gram (+) y 2 especies Gram (-).

#### 3.2 Pruebas Bioquímicas

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 (p.71).

Los resultados de las pruebas bioquímicas catalasa y coagulasa permitieron la identificación de 11 especies catalasa positivo y 7 especies catalasa negativo, a su vez, 1 especie coagulasa positivo y 17 especies coagulasa negativo.

En el caso de la Prueba Agar Manitol Sal se obtuvo como resultado la presencia de 4 especies positivas, 9 especies negativas y 5 especies bacterianas que no dieron un resultado preciso, razón por la cual posteriormente se realizaron análisis moleculares que brindaron resultados concluyentes como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6

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	+	-	-	****
11A	+	-	-	****
1C	-	+	-	-
2C	-	+	-	****
1B	+	-	-	-
E1	+	-	-	-
28ATM	+	-	-	-
99	+	-	-	-
799	+	-	-	-

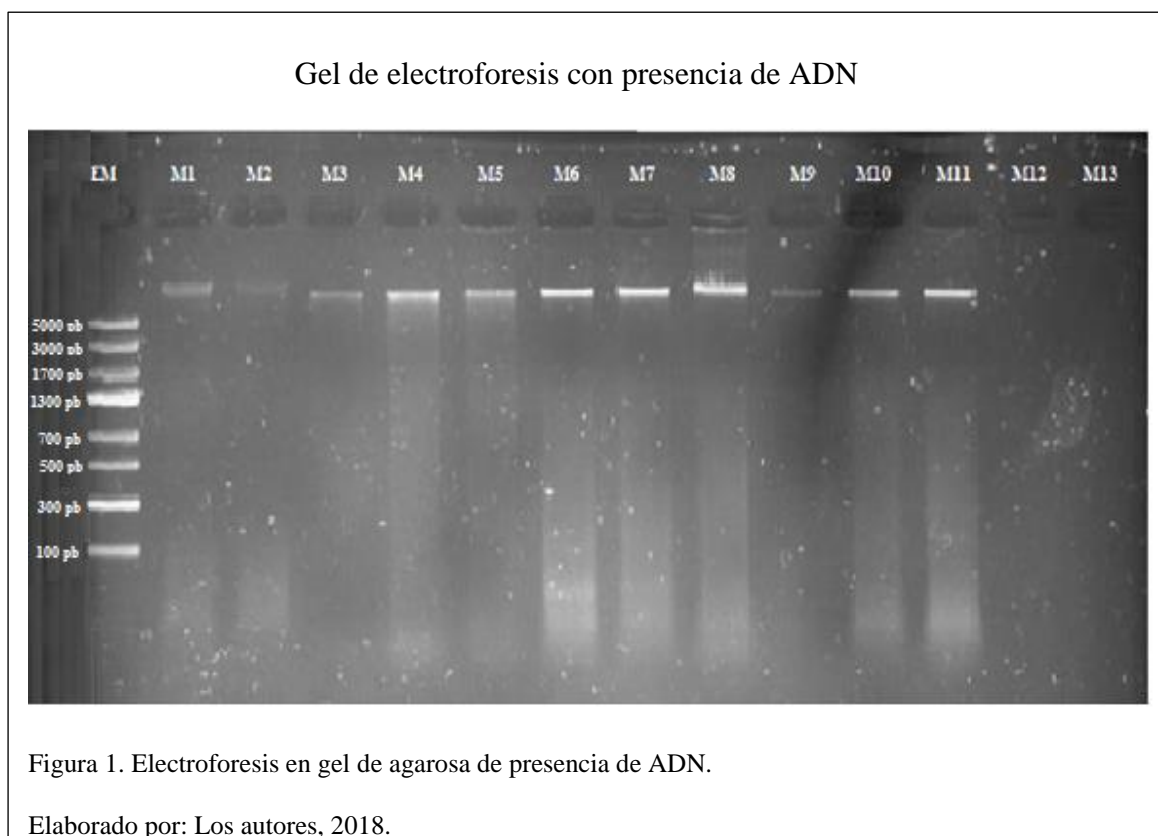
(+) =Resultado positivo, (-) = Resultado negativo, (\*\*\*\*) = Resultado inconcluso.

Elaborado por: Los Autores 2018



### 3.3 Extracción ADN

Se obtuvo ADN de tamaño aproximado de 5000 pb, basándose en la escalera molecular del kit Thermo Scientific 2x Phire Plant Direct al observar la (Figura 1) del gel de electroforesis podemos evidenciar que no existe una cuantiosa degradación del ADN, en función de la cantidad de barridos presentes en el gel.



### 3.4 Amplificación de la región 16S.

La región 16S fue amplificada para identificar a nivel molecular las cepas aisladas mediante la técnica de PCR convencional, obteniendo bandas de aproximadamente 1300 pb (Anexo 8); este resultado es consistente al obtenido por Marchesi *et al.*, (1998), quienes amplificaron genes que codifican ARNr bacteriano 16S con los primers 27F y 1492R los mismos usados en esta investigación obtenido una longitud de banda de 1300 pb (p. 797).

### 3.5 Análisis de secuencias

Al analizar las secuencias, algunas de las especies catalogadas como coagulasas positivo o negativo del proyecto anterior, fueron identificadas a nivel de especie esclareciendo los resultados obtenidos con las pruebas bioquímicas que no fueron concluyentes, empleando el software Finch TV se determinó que del total de 18 secuencias, tres no eran válidas H3R, 11 y 11A, razón por la cual fueron descartadas consiguiendo así la identidad de 15 especies correspondientes al dominio Bacteria, en su mayoría con una identidad y cobertura superior al 97 % (Anexo 9) asemejándose a lo manifestado por Sol - Church & Frenck, (2014), en su libro Sequencing Guidelines que sugiere aceptar muestras a partir del 95 %.

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las secuencias almacenadas en la base de datos del gene BANK de NCBI, fueron A3r identificada como *Staphylococcus* sp., I2r identificada como *Staphylococcus warneri*, 809 identificada como *Staphylococcus epidermidis*, la cual según Fariña *et al.*, (2013), es uno de los géneros que con mayor frecuencia se aíslan en estudios de prevalencia de mastitis (p. 483), 799c1 identificada como *Staphylococcus saprophyticus*, todas con una identidad del 99 %.

“Las especies del género *Staphylococcus* se encuentran entre los agentes más frecuentemente aislados de casos de mastitis bovina en todo el mundo”. (Lange *et al.*, 2015, p. 382), esto es evidente en la coincidencia de identidad entre microorganismos identificados a partir del secuenciamiento de los productos de PCR este es el caso de *Staphylococcus pasteurii* identificado en dos aislamientos 835 y A2r con una identidad del 97 % y 99 % correspondientemente.

Los aislamientos pertenecientes al género *Streptococcus* sp. con una identidad del 90 %, siendo muy bajo pero estas especies se encuentran en el mismo género. Lange *et al.*, (2015), asegura que la mastitis ocasionada por bacterias oportunistas, como los *Streptococcus* sp, habitualmente es vinculada con la mastitis bovina (p. 382); Ruiz *et al.*, (2011), aisló microorganismos patógenos de la mastitis subclínica en su estudio “Prevalencia de Mastitis Bovina Subclínica y Microorganismos Asociados: Comparación entre Ordeño Manual y Mecánico, en Pernambuco, Brasil” donde en el 61 % de las muestras predomina, *Staphylococcus* sp. (29,6 %) y *Streptococcus* sp. (14,6 %) en ordeño manual así como *Staphylococcus* sp. (36,4 %), y *Streptococcus* sp. (12,9 %) en ordeño mecánico (p. 57), desde otra perspectiva en Bangalore - India y sus alrededores Sumathi *et al.*, (2008), en su estudio “Prevalence and antibiogram profile of bacterial Isolates from clinical bovine mastitis” encontró prevalencia relevante del 16 % para *Streptococcus* spp. agente patógeno causante de la mastitis clínica en el ganado lechero (p. 237).

La muestra 1B fue identificada como *Streptococcus dysgalactiae*, el cual a pesar de tener un Query cover del 34 % su identidad es del 99 % y fue confirmada con ayuda de pruebas bioquímicas y alineamiento con secuencias externas en árbol filogenético como se puede observar en la Figura 2, Braga *et al.*, (2018), en su estudio “Rapid identification of bovine mastitis pathogens by MALDI-TOF Mass Spectrometry” afirma que en la gran mayoría de casos, el grupo de bacterias (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* y *Streptococcus dysgalactiae*) son los causantes de aproximadamente el 80 % de casos de mastitis (p.587).

Los aislamientos 28ATM, 799 y 99 fueron identificados como *Streptococcus uberis* con una identidad superior al 97 %, Davies *et al.*, (2016), en su estudio “Molecular Epidemiology of *Streptococcus uberis* Clinical Mastitis in Dairy Herds: Strain Heterogeneity and Transmission” señala 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 (p. 68).

El aislamiento 1C fue identificada como *Sphingomonas* sp. con una identidad baja del 89 %, por esta razón esta secuencia se alineó con una secuencia externas en árbol filogenético, según Nam *et al.*, (2009), cerca del 40 % de los casos de mastitis clínica son originados por bacterias Gram (-) vinculadas con la mastitis, el no coliforme más comúnmente asociado con las infecciones intramamarias es *Sphingomonas* (p. 2020).

Se presentaron casos especiales de 3 especies bacterianas que no tuvieron una clasificación taxonómica en las bases de datos, 2C y D2r identificadas como *Bacterium strain* con una identidad del 91 % y 99 % respectivamente como también y 798 identificadas como *Uncultured bacterium clone* con una identidad del 98 % respectivamente.

Tabla 7

Análisis de secuencias en el software BLAST de agentes etiológicos aislados.

<b>Código</b>	<b>Nombre</b>	<b>Query cover (%)</b>	<b>Identidad (%)</b>	<b>Acceso</b>
835	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	99	97	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/gi 388894673 JQ726643.1">gi 388894673 JQ726643.1</a>
A2r	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	100	99	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/gi 762210140 LN623633.1">gi 762210140 LN623633.1</a>
D2r	<i>Bacterium strain 2BL_4</i>	98	99	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/gi 1193828147 MF112182.1">gi 1193828147 MF112182.1</a>
I2r	<i>Staphylococcus warneri</i>	99	99	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/gi 1409189597 MF662223.1">gi 1409189597 MF662223.1</a>
A3r	<i>Staphylococcus sp. strain CLC-F26</i>	100	99	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/gi 1408623646 MH518208.1">gi 1408623646 MH518208.1</a>
809	<i>Staphylococcus epidermidis strain TWSL_20</i>	96	99	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/gi 846351151 KT184900.1">gi 846351151 KT184900.1</a>
798	<i>Uncultured bacterium clone ncd2254e01c2</i>	91	98	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/gi 322180115 JF194710.1">gi 322180115 JF194710.1</a>
799c1	<i>Staphylococcus saprophyticus strain WWi167</i>	99	99	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/gi 1393269660 MH396756.1">gi 1393269660 MH396756.1</a>

1C	<i>Sphingomonas</i> sp. strain Ap02E	78	89	<a href="#">gi 1080032407 KX990222.1</a>
2C	<i>Bacterium</i> strain 4BL_5	97	91	<a href="#">gi 1193828182 MF112217.1</a>
1B	<i>Streptococcus</i> <i>dysgalactiae</i> strain JZ R-75	34	99	<a href="#">MH119693.1</a>
E1	<i>Streptococcus</i> sp. XJ150-1212-NJ1	95	90	<a href="#">gi 564983989 KF828882.1</a>
28ATM	<i>Streptococcus uberis</i> strain NCTC4674	99	97	<a href="#">gi 1403452574 LS483408.1</a>
99	<i>Streptococcus uberis</i> strain NCTC4674	99	99	<a href="#">gi 1403452574 LS483408.1</a>
799	<i>Streptococcus uberis</i> strain NCTC3858	99	97	<a href="#">gi 1403426722 LS483397.1</a>

Elaborado por: Los autores, 2018. Fuente: (NCBI, 2018)

### 3.6 Filogenia de los agentes etiológicos de la Mastitis.

Las secuencias obtenidas en este trabajo de investigación fueron comparadas con secuencias de la base de datos Gene Bank, las cuales se identificaron como agentes etiológicos causantes de la mastitis bovina en el ganado bovino lechero, para elaborar un árbol filogenético y en base a esto poder clasificar hasta nivel de género. Este árbol filogenético está construido en base a 15 secuencias obtenidas de las especies aisladas y 4 secuencias externas usadas de referencia procedentes de la base de datos Gene Bank. (Anexo 9).

### Árbol filogenético del agente etiológico de la Mastitis.

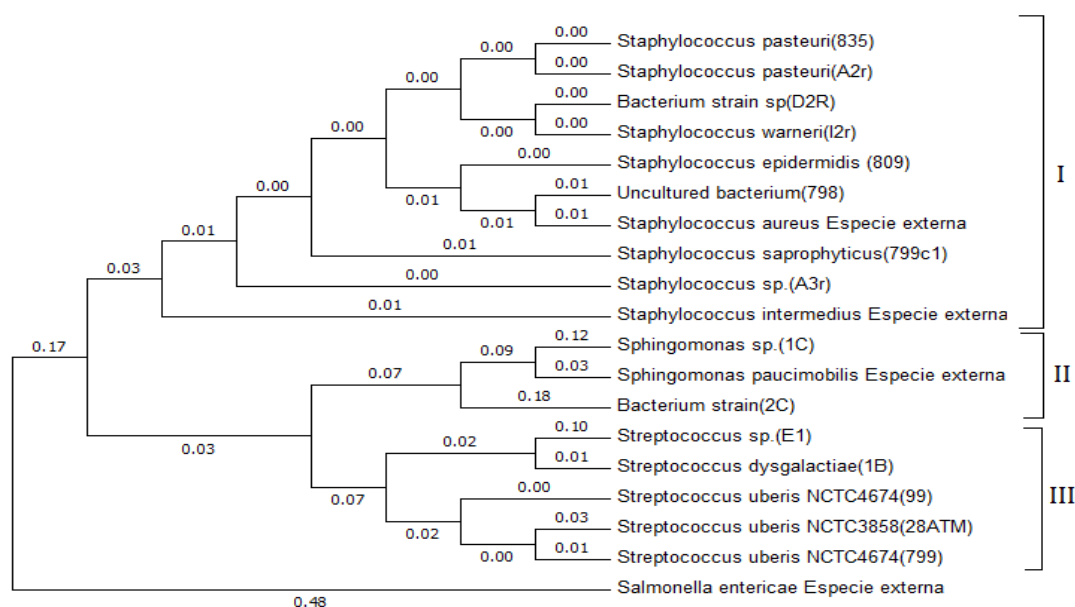


Figura 2. Árbol filogenético elaborado a partir de la secuenciación de la región 16S de las especies aisladas.

Elaborado por: Los autores, 2018.

Es evidente al analizar el árbol filogenético tres grupos principales, todos del dominio Bacteria incluyendo las especies de referencia perteneciente al grupo externo. Basados en esta información fueron establecidos 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* (Cepa bacteriana) (D2r) la cual se alineó con *S. warneri* y *Uncultured bacterium* clone ncd2254e01c2 (Bacteria no cultivada) (798), especies que se agruparon a la secuencia de referencia de *staphylococcus aureus*, usada como especie externa determinando, que esta pueden pertenecer a la misma género pero de diferente cepa.

- **Clado (II):** Incluyen a *Sphingomonas* sp. (C1) y Bacterium strain 4BL\_5 (C2) agrupadas estrechamente con la cepa de referencia tipo de ATCC *Sphingomonas paucimobilis*, esta relación la confirma Clavijo *et al.*, (2012), ya que existen géneros que se encuentran dentro en un mismo grupo, comparten características y coinciden también con la identificación molecular (p.93).
- **Clado (III):** Todos los aislamientos en el clado III coincide al ser del mismo género *Streptococcus* al agruparse en las siguientes especies *S. uberis* (99, 28ATM, 799), *S. dysgalactiae* (B1) el cual se agrupó con *Streptococcus* sp. (E1).

### 3.7 Cepas Bacterianas Resistentes a Antibióticos

#### 3.7.1 Betalactámicos

La amplificación del gen de resistencia *blaTEM*, dio como resultado bandas de aproximadamente 300 pb, según Tao *et al.*, (2014), el gen de resistencia para la familia de antibióticos betalactámicos posee un tamaño de 300 pb. (p.118) 7 bacterias poseen este gen de resistencia *Staphylococcus pasteurii*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus uberis*, *Sphingomonas* sp. y *Staphylococcus aureus* identificada en base al árbol filogenético, pues forma un mismo grupo con una especie externa *Staphylococcus aureus* (Figura 3).

Bonetto (2014), en su estudio “Mastitis bovina causada por *Staphylococcus coagulasa negativos*” han encontrado que las especies *Staphylococcus warneri*, y *Streptococcus uberis* son resistentes a betalactámicos (p. 141), de igual manera Fariña *et al.*, (2013), estudiando la prevalencia de bacterias en mastitis mencionan



como especie resistente a betalactámicos a *Staphylococcus epidermidis* (p. 484); según Ramírez Vásquez *et al.*, (2017), en su estudio “Resistencia bacteriana en cepas patógenas aisladas de mastitis en vacas lecheras de la V Región, Región Metropolitana y Xª Región, Chile” afirma que las bacterias *Staphylococcus saprophyticus*, *Sphingomonas* sp. y *S. aureus* esta última Gram (+) mostraron resistencia a las penicilinas Betalactamasas. (p. 84), al igual que Arrepia (2008), afirma que *Staphylococcus pasteurii* presenta resistencia a betalactámicos pues mostraron un fenotipo intermedio (p.51), corroborando los resultados obtenidos en nuestro estudio.

Gel de electroforesis con amplificación de gen de resistencia para antibióticos blaTEM.

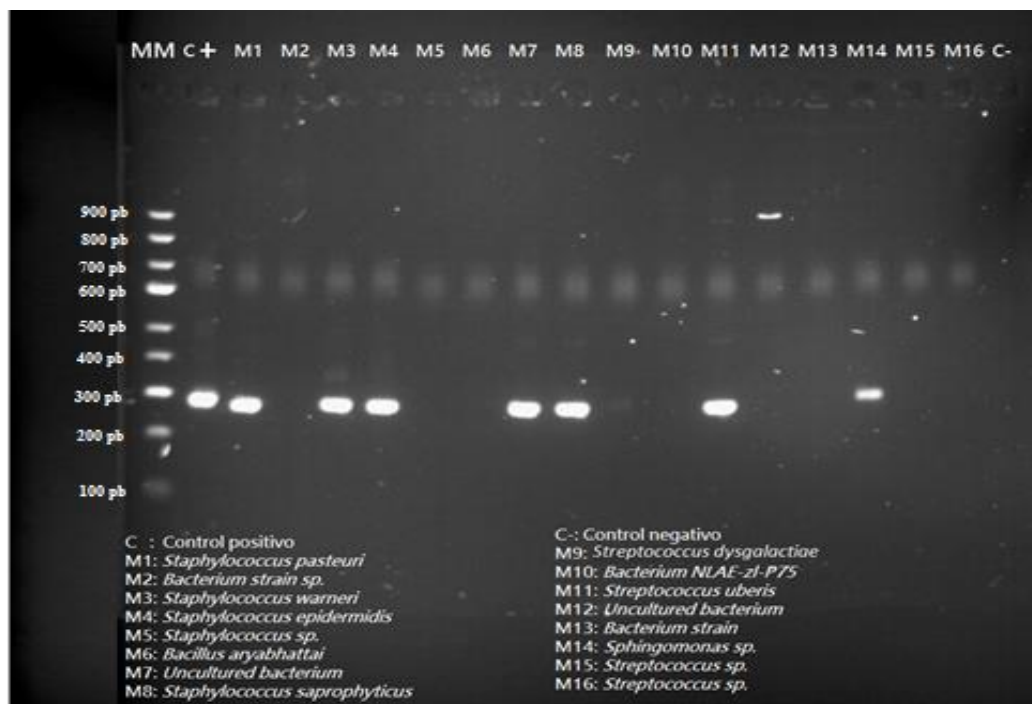


Figura 3. Gel de electroforesis que demuestra presencia/ausencia de gen de resistencia para antibióticos blaTEM.

Elaborado por: Los autores, 2018.

### 3.7.2 Tetraciclinas

La amplificación del gen de resistencia tetA, dio como resultado bandas de aproximadamente 250 pb, según Belding & Boopathy (2018), el gen de resistencia para la familia de antibióticos tetraciclinas posee un tamaño de entre 210 a 300 pb. (p.5), 6 bacterias poseen este gen de resistencia según este estudio *Staphylococcus pasteurii*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus* sp., el cual según el árbol filogenético pertenece a la misma especie de *Streptococcus dysgalactiae*, y dos bacterias que no fueron identificadas, estas fueron reconocida como *Staphylococcus aureus* y *Sphingomonas* sp., por medio del árbol filogenético pues forma grupo con cada una de su especie externa (Figura 4).

Según lo reportado por Villanueva & Morales (2017), en su estudio ” Resistencia antibiótica de patógenos bacterianos aislados de mastitis clínica en bovinos de crianza intensiva” el *Staphylococcus aureus* presenta una resistencia a la tetraciclina de 34.37 % (p. 8).

Ramírez *et al.*, (2017), determina que en el grupo de las bacterias coagulasa negativa como *S. epidermidis* tienen un alto porcentaje de sensibilidad para los antibióticos de la familia de las tetraciclinas (p. 82).

Aponte (2007), en el estudio “Perfil de resistencia in vitro a antimicrobianos de cepas causantes de mastitis aisladas de leche cruda bovina en establecimientos de pequeña y mediana producción” presenta resultados semejantes a los de esta investigación donde *Streptococcus uberis* evidencia el 75 % de resistencia al antibiótico tetraciclina al igual que *Streptococcus dysgalactiae* 100 % y *Streptococcus* sp. un 44 % (p. 9).

Savini, *et al.*, (2009), en su estudio “Epidemiology, pathogenicity and emerging resistances in *Staphylococcus pasteurii*: from mammals and lampreys, to man.”,

asevera que, a pesar de la insuficiencia de aislamientos recuperados, *Staphylococcus pasteurii* ha manifestado últimamente resistencia a numerosas clases de compuestos antibióticos, como meticilina/ oxacilina, macrólidos, lincosamidas, estreptograminas, tetraciclinas (p.123).

Gel de electroforesis con amplificación de gen de resistencia para antibióticos tetA

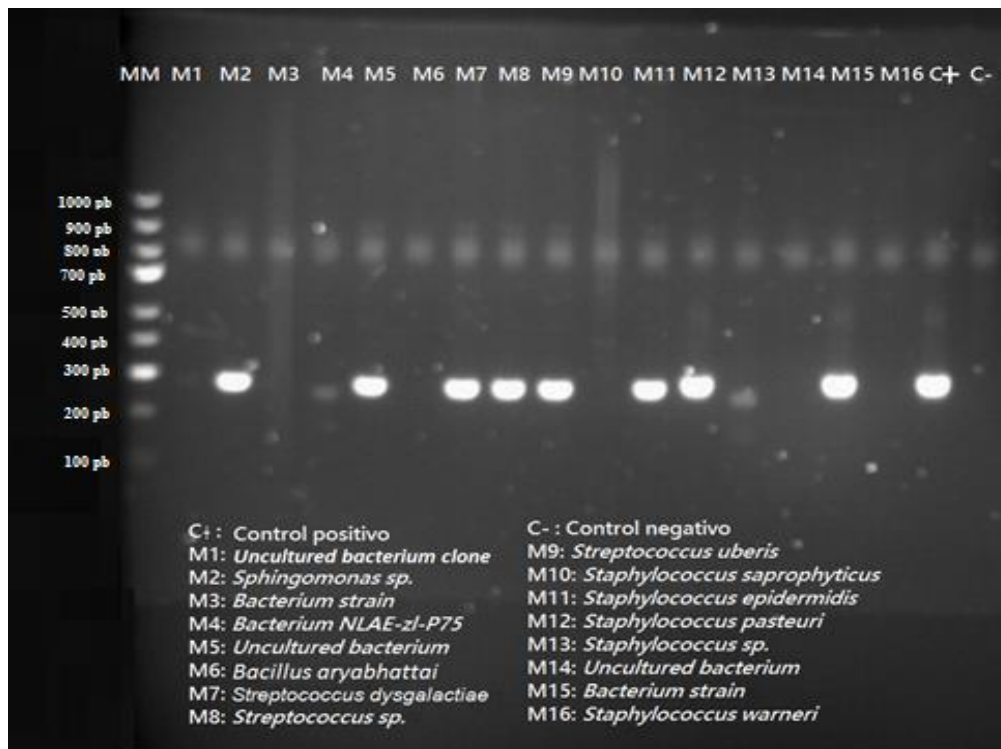


Figura 4. Gel de electroforesis que demuestra presencia/ausencia de gen de resistencia para antibióticos tetA.

Elaborado por: Los autores, 2018.

Tabla 8

Especies resistentes a betalactámicos y tetraciclinas.

<b>Especies con gen de resistencia blateM</b>	<b>Especies con gen de resistencia tetA</b>
<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>	

Elaborado por: Los autores, 2018.

El resultado de especies bacterianas que poseen multiresistencia a antibióticos, como el caso de *Staphylococcus aureus*, Villanueva & Morales (2017), mencionan esta posibilidad en el estudio “Resistencia antibiótica de patógenos bacterianos aislados de mastitis clínica en bovinos de crianza intensiva”, donde encontraron resistencia antibiótica de *Staphylococcus aureus* frente a betalactámicos del 65.62 % y tetraciclinas 34.37 % (p. 9 ), por otro lado Voigt Mota *et al.*, (2013), corrobora que dichas bacterias que coinciden con este estudio pueden generar resistencia a más de un solo antibiótico según la estructura química que posea, debido a que estos medicamentos han sido utilizados por más de una década en las terapias contra mastitis bovina (p. 495 -501).

*Sphingomonas* sp. también presenta ambos genes de resistencia siendo inherentemente resistente a la mayoría de las penicilinas y cefalosporinas, tetraciclina y, cloranfenicol, sulfonamidas, según Delucci *et al.*, (2014), la resistencia adquirida es muy habitual ya que los microorganismos tienen la capacidad de intercambiar

resistencia por los plásmidos con otros Bacilos Gram (-) mientras coloniza al mamífero (p. 11).

Almeida *et al.*, (2015), afirma que la adherencia e internalización en las células epiteliales mamarias son mecanismos centrales en la patogénesis de la mastitis causada por *Streptococcus uberis.*, por medio de estas tácticas patogénicas, logra un entorno intracelular donde las defensas del huésped humoral y los antibióticos son ineficaces, lo que permite multiresistencia y la subsistencia de esta bacteria en la glándula mamaria (p. 332).

Según García *et al.*, (2003), entre las bacterias que más ha prevalecido el aspecto de la resistencia sobresale, la bacteria multiresistente *Staphylococcus epidermidis*, la cual al ser un antibiótico de amplio espectro, con el transcurrir del tiempo, han aumentado los niveles de resistencia bacteriana disminuyendo su espectro; Ramírez *et al.*, (2017), en su estudio “Tasa de incidencia de mastitis clínica y susceptibilidad antibiótica de patógenos productores de mastitis en ganado lechero del norte de Antioquia, Colombia” encontró un 55.4 % de resistencia del *S. epidermidis* cuando se estudió el antibiótico penicilina (p.82).

## Conclusiones

Se procesaron en total 18 muestras de las cuales en el caso de la tinción Gram dio como resultado 16 especies Gram (+) y 2 especies Gram (-), la aplicación de pruebas bioquímicas de catalasa y coagulasa, resultó en 11 especies catalasa positivo y 7 especies catalasa negativo, a su vez, 1 especie coagulasa (+) y 17 especies coagulasa (-), en el caso de la Prueba Agar Manitol Sal se obtuvo como resultado la presencia de 4 especies (+), 9 especies (-) y 5 especies bacterianas que no dieron un resultado preciso.

Mediante técnicas moleculares se identificó a nivel de especie 9 agentes etiológicos causantes de la mastitis bovina estos son *Staphylococcus pasteurii*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus* sp., *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Sphingomonas* sp., *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* todas aislados de muestras provenientes de unidades productoras de los cantones Cayambe y Pedro Moncayo.

Se identificó un total de 15 especies correspondientes al dominio Bacteria *Staphylococcus pasteurii*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus* sp., *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Sphingomonas* sp., *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus* sp., *Streptococcus uberis* y 3 especies bacterianas que no tuvieron una clasificación taxonómica en las bases de datos del NCBI, estas fueron identificadas a través del secuenciamiento de la región ribosomal RNA16S y alineadas con secuencias pertenecientes a la mencionada base de datos, para elaborar un árbol filogenético donde fueron identificadas como *Staphylococcus*

*warneri*, *Staphylococcus aureus*, y *Sphingomonas* sp. pues formaron grupo con su especie externa.

La amplificación por PCR del gen de resistencia blaTEM de la familia betalactámicos en las especies aisladas evidenció como resultado 7 especies resistentes a este tipo de antibióticos. Las bacterias determinadas como positivas fueron: *Staphylococcus pasteurii*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus uberis*, *Sphingomonas* sp., *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus saprophyticus*.

El gen de resistencia tetA de la familia de las tetraciclinas amplificado por PCR evidenció como resultado 6 especies resistentes a este tipo de antibióticos. Las bacterias determinadas como positivas fueron: *Staphylococcus pasteurii*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus uberis*, *Sphingomonas* sp., *Streptococcus dysgalactiae*.

Las especies bacterianas que poseen multiresistencia a la familia de antibióticos betalactámicos y tetraciclinas son 5: *Staphylococcus pasteurii*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus uberis*, *Sphingomonas* sp.

## **Recomendaciones**

Aplicar una correcta técnica de conservación de las cepas bacterianas para evitar contaminación cruzada y así impedir complicaciones al reactivar los microorganismos, permitiendo realizar futuras investigaciones.

Utilizar la técnica de PCR para la amplificación de la región 16S con una temperatura annealing de 55 °C, los resultados obtenidos con dicha temperatura fueron los óptimos para la secuenciación.

Continuar con el estudio de la determinación de los genes de resistencia para más familia de antibióticos con importancia para el sector lechero. Según un estudio realizado por Bonifaz & Conlago (2016), mencionan que la mayoría de los patógenos de la mastitis son resistentes a las Estreptomicina, Amoxicilina, Cefalexina, tetraciclina, Ciprofloxacina y Gentamicina (p.48).

Comunicar a todos los ganaderos los resultados de esta investigación e impartir talleres de buenas prácticas agropecuarias enfocadas en controlar y prevenir la enfermedad mastitis.



## Referencias

- Almeida, R. A., Dego, O. K., Headrick, S. I., Lewis, M. J., & Oliver, S. P. (2015). Role of *Streptococcus uberis* adhesion molecule in the pathogenesis of *Streptococcus uberis* mastitis. *Veterinary Microbiology*, 179(3–4), 332–335. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2015.07.005>
- Aponte, C. F. (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. *Memorias Del Instituto de Investigaciones En Ciencias de La Salud*, 5(1). Retrieved from <http://revistascientificas.una.py/index.php/RIIC/article/view/329>
- Arrepiá, E. (2008). Prevalência da resistência a antibióticos, metais e desinfetantes em isolados de *Staphylococcus* provenientes de uma etar municipal. *Universidade Do Porto*. Retrieved from <https://repositorio-aberto.up.pt/handle/10216/11594?locale=en>
- Ballesteros, G., & Valdivieso, A. (2018). *ESTUDIO DE LA PROBLEMÁTICA EPIDEMIOLÓGICA DE LA MASTITIS BOVINA EN EL CANTÓN CAYAMBE*. Universidad Politecnica Salesiana. <https://doi.org/10.20868/UPM.thesis.39079>
- Belding, C., & Boopathy, R. (2018). Presence of antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes in coastal recreational waters of southeast Louisiana, USA. *Journal of Water Supply: Research and Technology-Aqua*. <https://doi.org/10.2166/aqua.2018.076>
- Bhattarai, D., Worku, T., Dad, R., Rehman, Z. U., Gong, X., & Zhang, S. (2018). Mechanism of pattern recognition receptors (PRRs) and host pathogen interplay

in bovine mastitis. *Microbial Pathogenesis*, 120, 64–70.  
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.04.010>

Bonetto, C. C. (2014). Mastitis bovina causada por *Staphylococcus* coagulasa negativos. Retrieved from <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/40427>

Bonifaz, N., & Colango, F. (2016). Prevalencia e incidencia de mastitis bovina mediante la prueba decaliforniamastitis test con identificación del agente etiológico, en paquiestancia, Ecuador. *La Granja*, 24(2).  
<https://doi.org/10.17163/lgr.n24.2016.03>

Braga, P. A. C., Gonçalves, J. L., Barreiro, J. R., Ferreira, C. R., Tomazi, T., Eberlin, M. N., & Santos, M. V. (2018). Rapid identification of bovine mastitis pathogens by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 38(4), 586–594. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-4821>

Breser, M. L., Felipe, V., Bohl, L. P., Orellano, M. S., Isaac, P., Conesa, A., ... Porporatto, C. (2018). Chitosan and cloxacillin combination improve antibiotic efficacy against different lifestyle of coagulase-negative *Staphylococcus isolates* from chronic bovine mastitis. *Scientific Reports*, 8(1).  
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-23521-0>

Britania. Tripteína Soya Agar (2015).

Brunstein, J. (2017). Back to Basics: Sanger sequencing and its applications - MLO. Retrieved June 20, 2018, from <https://www.mlo-online.com/back-basics-sanger-sequencing-applications>

Cerón, M., Agudelo, E., & Maldonado, J. (n.d.). Relación entre el recuento de células somáticas individual o en tanque de leche y la prueba CMT en dos fincas

lecheras del departamento de Antioquia (Colombia) | Cerón-Muñoz | Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias.

Céspedes, A., & Pachacama, I. (2012). *SITUACIÓN SOCIO ECONÓMICA DE LA PARROQUIA LA ESPERANZA DEL CANTÓN PEDRO MONCAYO, PROVINCIA DE PICHINCHA SOBRE LA BASE DE CADENA CORTA*. Retrieved from <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/937/1/T-UCE-0005-175.pdf>

Chaneton, L. (2010). *Nuevos enfoques en el diagnóstico , prevención y tratamiento de la mastitis bovina a través del uso de moléculas con acción antimicrobiana*. Buenos Aires: “Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. <http://digital.bl.fcen.uba.ar>.” Retrieved from [https://digital.bl.fcen.uba.ar/download/tesis/tesis\\_n4760\\_Chaneton.pdf#page=2&zoom=auto,-107,275](https://digital.bl.fcen.uba.ar/download/tesis/tesis_n4760_Chaneton.pdf#page=2&zoom=auto,-107,275)

Clavijo, C., Chipana, V., Centeno, J., & Zúñiga, D. (2012). Aislamiento , caracterización e identificación de bacterias diazotróficas de la rizósfera del cultivo de *Olea europea* “ OLIVO” en Tacna Perú. *Ecología Aplicada*, 11(2), 88–102. Retrieved from [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1726-22162012000200006](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-22162012000200006)

Cornejo, A., Serrato, A., Rendón, B., & Rocha Martha. (2014). *Herramientas Moleculares aplicadas en Ecología: Aspectos teóricos y prácticos*. (SEMARNAT, INECC, & UAM-I, Eds.), *Igarss 2014* (Primera edición). México. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>

Costa, P. M. (2018). Chapter 4 - Staining Protocols. In P. M. Costa (Ed.), *The*

*Handbook of Histopathological Practices in Aquatic Environments* (pp. 83–117). Academic Press.

Davies, P. L., Leigh, J. A., Bradley, A. J., Archer, S. C., Emes, R. D., & Green, M. J. (2016). Molecular Epidemiology of *Streptococcus uberis* Clinical Mastitis in Dairy Herds: Strain Heterogeneity and Transmission. *Journal of Clinical Microbiology*, *54*(1), 68–74. <https://doi.org/10.1128/JCM.01583-15>

Del Coco, V. F. (2015). Microorganisms conferring beneficial health effects. *Revista Argentina De Microbiologia*, *47*(3), 171–173. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.08.001>

Delucci, I., Gil, J., Salvarrey, L., & Rivero, R. (2014). Mastitis bovina, reconocimiento de los patógenos y su resistencia antimicrobiana en la Cuenca Lechera del Sur de Uruguay. *MSVU*, *32*. Retrieved from <http://www.revistasmvu.com.uy/component/content/article/74-cientificos/266-cientifico-mastitis-bovina-reconocimiento-de-los-patogenos-y-su-resistencia-antimicrobiana-en-la-cuenca-lechera-del-sur-de-uruguay.html>

Detilleux, J. (2018). Tolerance to bovine clinical mastitis: Total, direct, and indirect milk losses. *Journal of Dairy Science*, *101*(4), 3334–3343. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13976>

Ebili, H. O., Hassall, J. C., Fadhil, W., Ham-Karim, H., Asiri, A., Raposo, T. P., ... Ilyas, M. (2017). Primer-Based PCR Assay for Direct and Targeted Sanger Sequencing of Short Genomic Segments. *Journal of Biomolecular Techniques : JBT*, *28*(3), 97–110. <https://doi.org/10.7171/jbt.17-2803-001>

Fariña, N., Carpinelli, L., Samudio, M., Guillén, R., Laspina, F., Sanabria, R., ... de

- Kaspar, H. M. (2013). [Clinically significant coagulase-negative staphylococci: most frequent species and virulence factors]. *Revista Chilena de Infectología : Órgano Oficial de La Sociedad Chilena de Infectología*, 30(5), 480–488. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182013000500003>
- Ferronato, J. A., Ferronato, T. C., Schneider, M., Pessoa, L. F., Blagitz, M. G., Heinemann, M. B., Souza, F. N. (2018). Diagnosing mastitis in early lactation: use of Somaticell®, California mastitis test and somatic cell count. *Italian Journal of Animal Science*, 17(3), 723–729. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2018.1426394>
- García. (2004). Tratamientos bovinos. Chile: Ministerio de Ganadería.
- García, L. R., & Monzón, R. S. (2018). Diagnosis of subclinic mastitis in dairy cattle through somatic cell counts using two diagnostic methods. *Revista Científica de La Facultad de Ciencias Veterinarias de La Universidad Del Zulia*, 28(2), 129–135.
- García, M. M., Salup, R., & Cué, M. (2003). Actualización en tetraciclinas. *Revista Cubana de Farmacia*, 37, 1–5. Retrieved from [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0034-751520030003000008&script=sci\\_arttext&tlng=pt](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0034-751520030003000008&script=sci_arttext&tlng=pt)
- Geyer, C. N., & Hanson, N. D. (2013). Rapid PCR amplification protocols decrease the turn-around time for detection of antibiotic resistance genes in Gram-negative pathogens. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 77(2), 113–117. <https://doi.org/10.1016/J.DIAGMICROBIO.2013.06.015>
- Gil Ruiz, A., Peña Rodríguez, J., & Remón Díaz, D. (2016). Mastitis bovina en

Cuba. Artículo de revisión. *Revista de Producción Animal*, 28(2–3), 39–50.

Gonçalves, J. L., Kamphuis, C., Martins, C. M. M. R., Barreiro, J. R., Tomazi, T., Gameiro, A. H., ... dos, S. (2018). Bovine subclinical mastitis reduces milk yield and economic return. *Livestock Science*, 210, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2018.01.016>

González de Buitrago, J. M. (2010). 15 - Electroforesis. In J. M. González de Buitrago (Ed.), *Técnicas y Métodos de Laboratorio Clínico (Tercera Edición)* (pp. 211–217). Elsevier España.

Hernández, J. M. (2008). Importancia del conteo de células somáticas en la calidad de la leche. *Nº 8, IX*.

Hiiñö, H., Pyörälä, S., Taponen, S., Rajala-Schultz, P., & Simojoki, H. (2018). Elimination of experimentally induced bovine intramammary infection assessed by multiplex real-time PCR and bacterial culture. *Journal of Dairy Science*, 101(6), 5267–5276. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13939>

INEC, & ESPAC. (2016). Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua ESPAC 2016. Retrieved from [http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas\\_agropecuarias/espac/espac-2016/Informe\\_ejecutivo\\_ESPAC\\_2016.pdf](http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac-2016/Informe_ejecutivo_ESPAC_2016.pdf)

Jong, de, Garch, F. E., Simjee, S., Moyaert, H., Rose, M., Youala, M., & Siegwart, E. (2018). Monitoring of antimicrobial susceptibility of udder pathogens recovered from cases of clinical mastitis in dairy cows across Europe: VetPath results. *Veterinary Microbiology*, 213, 73–81.

<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.11.021>

- Kang, J.-H., Noh, E.-S., Park, J.-Y., An, C.-M., Choi, J.-H., & Kim, J.-K. (2015). Rapid Origin Determination of the Northern Mauxia Shrimp (*Acetes chinensis*) Based on Allele Specific Polymerase Chain Reaction of Partial Mitochondrial 16S rRNA Gene. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 28(4), 568–572. <https://doi.org/10.5713/ajas.14.0613>
- Köchler, S., Niederstätter, H., & Parson, W. (2005). DNA Extraction and Quantitation of Forensic Samples Using the Phenol–Chloroform Method and Real-Time PCR. In *Forensic DNA Typing Protocols* (pp. 013–030). New Jersey: Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-867-6:013>
- Lange, C. C., Brito, M. A. V. P., Reis, D. R. L., Machado, M. A., Guimarães, A. S., Azevedo, A. L. S., ... Meurer, I. R. (2015). Species-level identification of *Staphylococci* isolated from bovine mastitis in Brazil using partial 16S rRNA sequencing. *Veterinary Microbiology*, 176(3–4), 382–388. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2015.01.024>
- Lozada, M. (2009). *Detail paTécnica de reacción en cadena de la Polimerasage*. (El Cid Editor, Ed.). Santa Fe, Argentina. Retrieved from [https://bibliotecavirtual.ups.edu.ec:2708/lib/bibliotecaupssp/detail.action?docID=3180621&query=Reacción en Cadena de la Polimerasa](https://bibliotecavirtual.ups.edu.ec:2708/lib/bibliotecaupssp/detail.action?docID=3180621&query=Reacción+en+Cadena+de+la+Polimerasa)
- Marchesi, J. R., Sato, T., Weightman, A. J., Martin, T. A., Fry, J. C., Hiom, S. J., & Wade, W. G. (1998). Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(2), 795–799. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9464425>

- Martí, S., Fernández-Cuenca, F., Pascual, Á., Ribera, A., Rodríguez-Baño, J., Bou, G. Infección Hospitalaria (GEIH)\*, G. de E. de. (2006). Prevalencia de los genes tetA y tetB como mecanismo de resistencia a tetraciclina y minociclina en aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 24(2), 77-80. <https://doi.org/10.1157/13085012>
- 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* (Thesis).
- Méndez-Vilas, A. (2016). *Microbes in the Spotlight: Recent Progress in the Understanding of Beneficial and Harmful Microorganisms*. Universal-Publishers.
- Mendoza, J. A., Vera, Y., & Peña, L. C. (2017). Prevalencia de mastitis subclínica, microorganismos asociados y factores de riesgo identificados en hatos de la provincia de Pamplona, Norte de Santander. *Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 64(2), 11–24. <https://doi.org/10.15446/rfmvz.v64n2.67209>
- Morales, R. V., Menéndez, C. C., Pasos, F. L., Quiñones, R. N., & Cosío, E. C. (2005). Efecto de la aplicación del reylac sobre la calidad de la leche en rebaños con mastitis subclínica bovina. *REDVET*.
- Muñoz, D. A. (2011). *Detección Del Gen De Resistencia BlaTEM En Bacterias Descrietas Como Nosocomiales*. Santiago: Universidad De Chile.
- Nam, H. M., Lim, S. K., Kang, H. M., Kim, J. M., Moon, J. S., Jang, K. C., ... Jung, S. C. (2009). Prevalence and antimicrobial susceptibility of gram-negative



bacteria isolated from bovine mastitis between 2003 and 2008 in Korea. *Journal of Dairy Science*, 92(5), 2020–2026. <https://doi.org/10.3168/JDS.2008-1739>

NHGRI. (2015). National Human Genome Research Institute. Secuenciación del ADN - National Human Genome Research Institute (NHGRI). Retrieved June 19, 2018, from <https://www.genome.gov/27563183/secuenciacion-del-adn/#al-1>

O ’Connell, K. (2018). The Promise of Ubiquitous DNA Sequencing: Sequencers as Sensors, 1–11. Retrieved from [https://www.bnext.org/wp-content/uploads/2018/03/The-Promise-of-Ubiquitous-DNA-Sequencing\\_March-2018.pdf](https://www.bnext.org/wp-content/uploads/2018/03/The-Promise-of-Ubiquitous-DNA-Sequencing_March-2018.pdf)

Owens, W. E., & Nickerson, S. C. (2011). Mastitis Therapy and Control | Medical Therapy Options. In *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 435–439). Elsevier.

Patel, A., Harris, K. A., & Fitzgerald, F. (2017). What is broad-range 16S rDNA PCR? *Archives of Disease in Childhood. Education and Practice Edition*, 102(5), 261–264. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2016-312049>

Perez, L. R. R., & Dias, C. A. G. (2013). Evaluation of the Gram stain of sputa from cystic fibrosis patients to predict the presence of *Staphylococcus aureus*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 77(2), 99–100. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.06.022>

Rahman, M. M., Hunter, H. N., Prova, S., Verma, V., Qamar, A., & Golemi-Kotra, D. (2016). The *Staphylococcus aureus* Methicillin Resistance Factor FmtA Is a d-Amino Esterase That Acts on Teichoic Acids. *MBio*, 7(1), e02070-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.02070-15>

Ramírez, N., Palacio, J., & Guillermo, L. (2017). Tasa de incidencia de mastitis

clínica y susceptibilidad antibiótica de patógenos productores de mastitis en ganado lechero del norte de Antioquia, Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria*, (36), 75–87. <https://doi.org/10.19052/mv.5173>

Rodicio, M., & Mendoza, M. del C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación de l ARNr 16S : fundamento , metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*, 22(4), 238–245. [https://doi.org/2004;22\(4\):238-45](https://doi.org/2004;22(4):238-45)

Ruiz, A. K., Ponce, P., Gomes, G., Mota, R. A., Sampaio, E., Lucena, E. R., & Benone, S. (2011). Prevalencia de Mastitis Bovina Subclínica y Microorganismos Asociados: Comparación entre Ordeño Manual y Mecánico, en Pernambuco, Brasil. *Revista de Salud Animal*, 33(1), 57–64. Retrieved from [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0253-570X2011000100009](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2011000100009)

Sah, S., Bordoloi, P., Vijaya, D., Amarnath, S. K., Sheela Devi, C., Indumathi, V. A., & Prashanth, K. (2018). Simple and economical method for identification and speciation of *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase negative Staphylococci and its validation by molecular methods. *Journal of Microbiological Methods*, 149, 106–119. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.05.002>

Salazar, A., Sandoval, A., & Armendáriz, J. (2013). *Biología Molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. (S. A. de C. V. McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, Ed.) (primera ed). Retrieved from <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1473&sectionid=1>

- Sánchez, P., Murillo, N. P. G., & Almanza, I. J. P. (2018). Prevalence of bovine mastitis in the anaime canyon, a colombian dairy region, including etiology and antimicrobial resistance. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 29(1), 226–239. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i1.14084>
- Sanschagrín, S., & Yergeau, E. (2014). Next-generation Sequencing of 16S Ribosomal RNA Gene Amplicons. *Journal of Visualized Experiments*, (90). <https://doi.org/10.3791/51709>
- Savini, V., Catavittello, C., Bianco, A., Balbinot, A., & D'Antonio, D. (2009). Epidemiology, pathogenicity and emerging resistances in *Staphylococcus pasteurii*: from mammals and lampreys, to man. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, 4(2), 123–129. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19519547>
- Silva, D., Dias, R. S., Kropinski, A. M., Campanaro, S., Treu, L., Siqueira, C., ... De, P. (2018). Genomic analysis and immune response in a murine mastitis model of vB-EcoM-UFV13, a potential biocontrol agent for use in dairy cows. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24896-w>
- Sol - Church, K., & Frenck, J. (2014). *Sequencing Guidelines. Biomolecular Core Facility*.
- Sumathi, B. R., Veeregowda, B. M., & Gomes, A. R. (2008). Prevalence and antibiogram profile of bacterial Isolates from clinical bovine mastitis. *Veterinary World*, 1(8), 237–238. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=DJ2012059716>

- Tamay, D., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación En Discapacidad*, 2(2), 70–78. Retrieved from [http://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=44427&IDPUBLICACION=4592&IDREVISTA=279&NOMBRE=Investigaci%F3n en Discapacidad](http://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=44427&IDPUBLICACION=4592&IDREVISTA=279&NOMBRE=Investigaci%F3n%20en%20Discapacidad)
- Tan, S. C., & Yiap, B. C. (2009). DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2009, 574398. <https://doi.org/10.1155/2009/574398>
- Tao, C.-W., Hsu, B.-M., Ji, W.-T., Hsu, T.-K., Kao, P.-M., Hsu, C.-P., ... Huang, Y.-L. (2014). Evaluation of five antibiotic resistance genes in wastewater treatment systems of swine farms by real-time PCR. *The Science of the Total Environment*, 496, 116–121. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.07.024>
- Torres, X. (2018). *Estudio de la producción de la industria láctea del cantón Cayambe en el período 2009-2015*. Retrieved from <http://repositorio.uasb.edu.ec/bitstream/10644/6052/1/T2544-MAE-Torres-Estudio.pdf>
- Vila, A. D., Zhurbenko, R., Oramas, V., & R, D. (2004). Propuesta de una modificación en la formulación del medio agar manitol salado utilizado en el aislamiento de estafilococos de importancia clínica. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 56(3), 172-177
- Villanueva, G., & Morales, S. (2017a). Resistencia antibiótica de patógenos bacterianos aislados de mastitis clínica en bovinos de crianza intensiva. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 18(12), 1–12.

- Vissio, C., Agüero, D. A., Raspanti, C. G., Odierno, L. M., & Larriestra, A. J. (2015). Productive and economic daily losses due to mastitis and its control expenditures in dairy farms in Córdoba, Argentina. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 47(1), 7–14.
- Voigt Mota, F., Dame Schuch, L. F., Lambrecht Goncalves, C., Faccin, Angela, Almeida Schiavon, D. B., Conrad Bohm, B., & Ferreira Lessa, L. (2013). Actividad antibacteriana de los extractos de *Syzygium cumini* (L.) Skeels (jambolan) frente a los microorganismos asociados a la mastitis bovina. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(3), 495–501. Retrieved from [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-47962013000300016](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962013000300016)
- Wall, S. K., Wellnitz, O., Bruckmaier, R. M., & Schwarz, D. (2018). Differential somatic cell count in milk before, during, and after lipopolysaccharide- and lipoteichoic-acid-induced mastitis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 101(6), 5362–5373. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14152>
- Wanger, A., Chavez, V., Huang, R. S. P., Wahed, A., Actor, J. K., & Dasgupta, A. (2017). Chapter 5 - Biochemical Tests and Staining Techniques for Microbial Identification. In A. Wanger, V. Chavez, R. S. P. Huang, A. Wahed, J. K. Actor, & A. Dasgupta (Eds.), *Microbiology and Molecular Diagnosis in Pathology* (pp. 61–73). Elsevier.
- Xavier, A. R. E. O., Almeida, A. C., Souza, C. N., Silva, L. M. ., Ruas, A. X. A., Sanglard, D. A., ... Xavier, M. A. S. (2017). Phenotypic and genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* isolates in milk from flocks diagnosed with subclinical mastitis. *Genetics and Molecular Research*, 16(2).

<https://doi.org/10.4238/gmr16029709>

Zhang, S., Piepers, S., Shan, R., Cai, L., Mao, S., Zou, J., ... Han, B. (2018). Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance profiles in *Streptococcus dysgalactiae* isolated from bovine clinical mastitis in 5 provinces of China. *Journal of Dairy Science*, *101*(4), 3344–3355. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14031>

## Anexos

### Anexo 1. Siembra de cepas reactivadas.



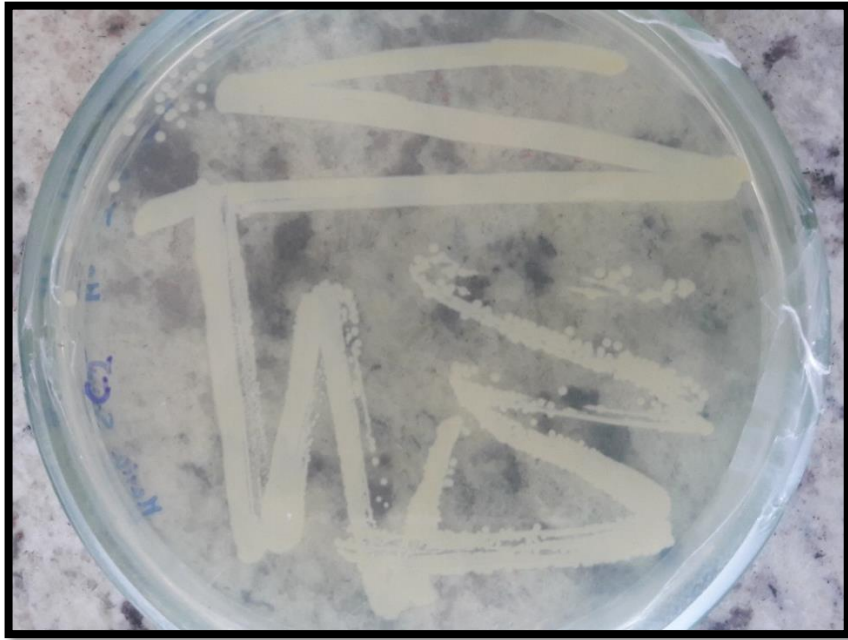
Elaborado por: Los autores, 2018.

### Anexo 2. Protocolo LCL 001 del Laboratorio de calidad de la leche en Cayambe.

- Lavar, enjuagar y secar la ubre.
- Con una solución de alcohol al 70% desinfectarse las manos.
- Con la misma solución y utilizando algodón desinfectar los pezones.
- Dejar secar por dos minutos.
- Eliminar los primeros dos chorros de leche antes de tomar la muestra.
- Extraer de cada cuarto dos ml de leche aproximadamente, depositándola en cada una de las copas de la paleta.
- Anadir igual volumen de CMT a cada una de las copas.
- Mezclar durante 20 segundos mediante una ligera rotación circular de la paleta manteniendo una posición horizontal.

Fuente: Laboratorio de Calidad de Leche, 2018.

Anexo 3. Resiembras por estriado compuesto.



Elaborado por: Los autores, 2018.

Anexo 4. Siembra En Agar Manitol Sal.



Elaborado por: Los autores, 2018.

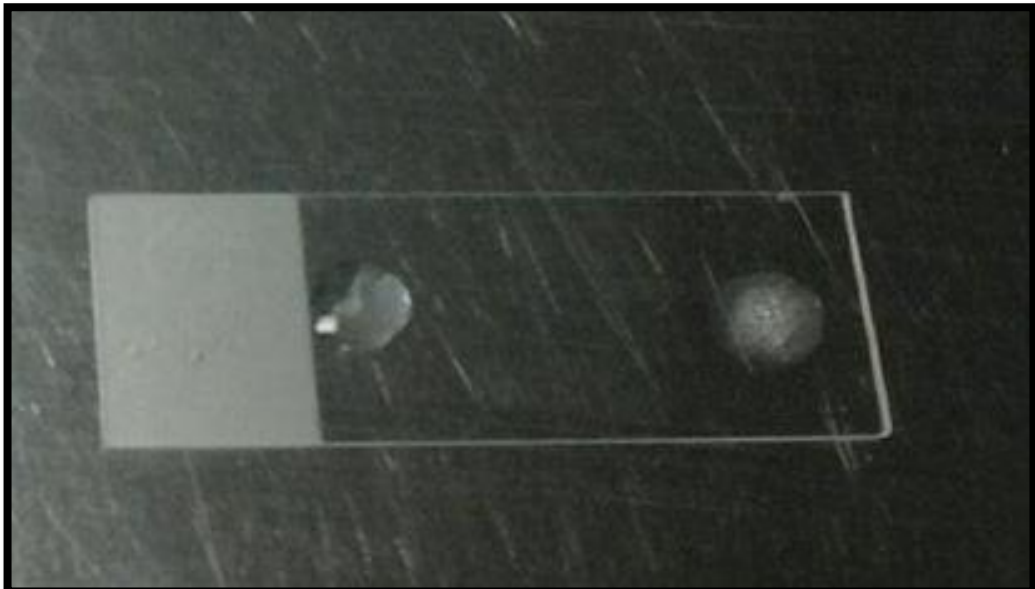


Anexo 5. Observación en microscopio en lente de 100X.



Elaborado por: Los autores, 2018.

Anexo 6. Prueba Catalasa Negativa y Positiva.



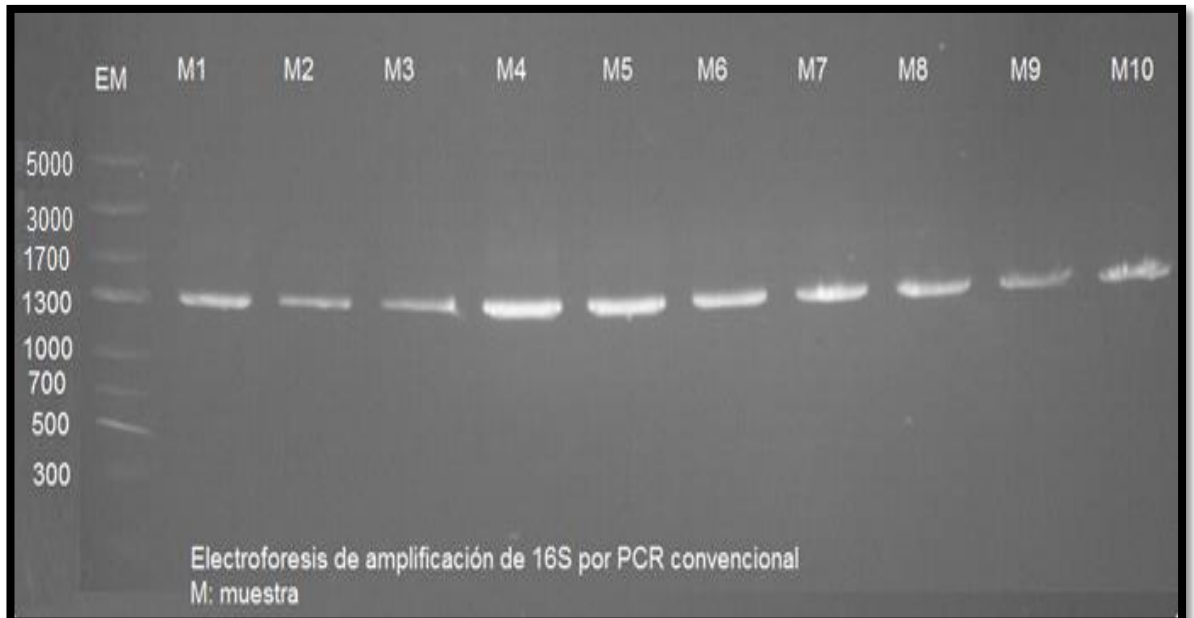
Elaborado por: Los autores, 2018.

Anexo 7. Prueba de Coagulasa Positiva.

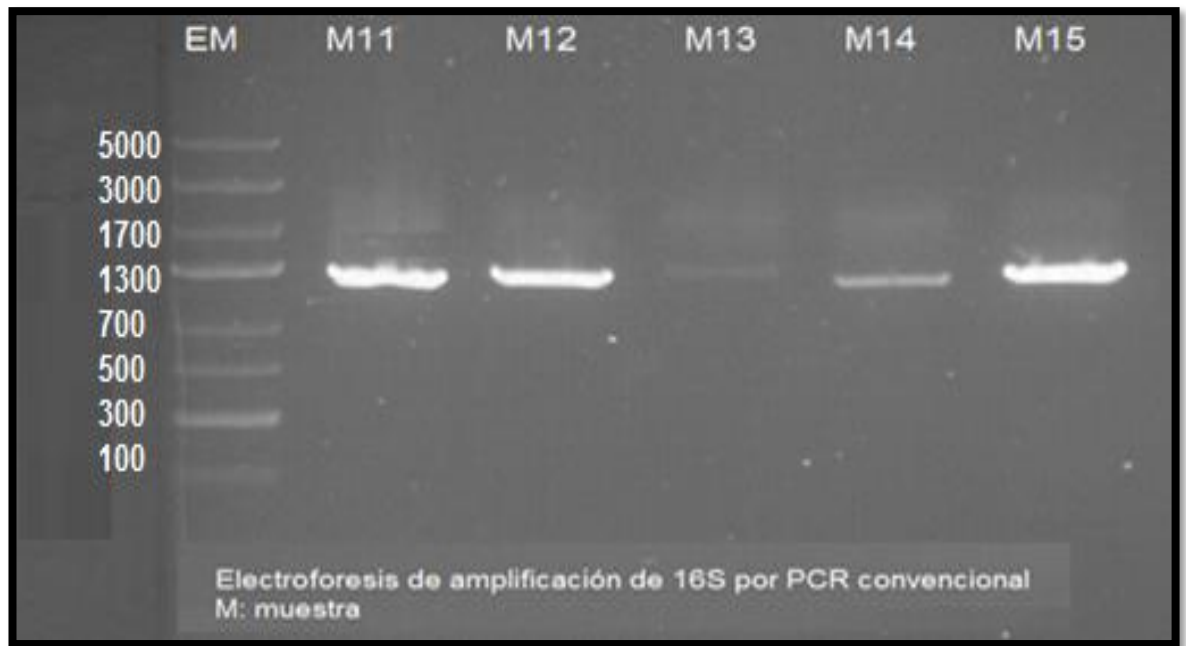


Elaborado por: Los autores, 2018.

Anexo 8. Amplificación de la región 16S.



Elaborado por: Los autores, 2018.



Elaborado por: Los autores, 2018.

Anexo 9. Análisis de secuencias en el software BLAST.

Código	Especie	Query cover (%)	Identidad (%)	Secuencia
835	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	99	97	GCTATACATGCAGTCGAGCGAACAGATAAGGAGC TTGCTCCTTTGACGTTAGCGGGACGGGTGAGTA ACACGTGGATAACCTACCTATAAGACTGGGATAAC TTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACATATT GAACCGCATGGTTCAATAGTGAAAGGCGGCTTTGC TGCTACTTATAGATGGATCCGCGCCGTATTAGCTA GTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATA CGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTG GAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGC AGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAAGCC TGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCT TCGGATCGTAAAACTCTGTTATCAGGGAAGAACA ATGTGTAAGTAACTGTGCACATCTTGACGGTACCT GATCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAG CCGCGGTAATACGTAAGTGGGAAGCGTTATCCGG AATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGTTTTT TAAGTCTGATGTGAAAACCCACGGCTCAACCGTGG AGGGTCATTGAAAACCTGGAAAACCTTGAGTGCAGA AGAGGAAAAGTGGAAATTCATGTGTAGCCGGTGAA ATGCGCAGAGATATTGGAGGAACACCAGTGGGCG AAAGCGACCTTTCTGGGCTGTAACCTGACGCTGATG TGCGAAAACGTGGGGGATCAAACAGGATTAATA CCCCGGGAGTCCCCCCCCCTAAACAATAAATGCTA AATGTTAAGGGGGTTTTCCCCCCCCCT
A2r	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	100	99	TGCCTAAACATGCAGTCGAGCGAACAGATAAGGA GCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGGACGGGTGAG TAACACGTGGATAACCTACCTATAAGACTGGGATA ACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACAT ATTGAACCGCATGGTTCAATAGTGAAAGGCGGCTT TGCTGCTACTTATAGATGGATCCGCGCCGTATTAG CTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACG ATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACA CTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGA GGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAA GCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGG

				TCTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTATCAGGGAAGAA CAAATGTGTAAGTAACTGTGCACATCTTGACGGTA CCTGATCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC AGCCGCGGTAATACGTAAGTGGGAAGCGTTATCC GGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGTTT TTAAGTCTGATGTGAAAAACCCACGGCTCAACCGT GGAGGGTCATTGAAAACGGAAAACTTGAGTGCA GAAGAAGAAAAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGA AATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGA AAGCGACTTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGATGTG CGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATAACC TGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAGTGCTAAGTG TTAAGGGGGGTTTCCCCCCTTAATGCTGCAGCTA ACGCATTAAGCACTCCGCCCGGGGGAGTACGACC GCACAGGTTGAAACTCAAAGGAAT
D2r	<i>Bacterium strain</i> 2BL_4	98	99	GTGCTATACATGCAGTCGAGCGAACAGATAAGGA GCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAG TAACACGTGGATAACCTACCTATAAGACTGGGATA ACTTCGGGAAAACCGGAGCTAATACCGGATAACAT ATTGAACCGCATGGTTCAATAGTGAAAGGCGGCTT TGCTGTCACTTATAGATGGATCCGCGCGTATTAG CTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACG ATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACA CTGGAACGTAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGA GGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAA GCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGG TCTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTATCAGGGAAGAA CAAATGTGTAAGTAACTGTGCACATCTTGACGGTA CCTGATCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC AGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCG GAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGTTTT TTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTG GAGGGTCATTGAAAACGGAAAACTTGAGTGCAG AAGAGGAAAAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAA ATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAA AGCGACTTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGATGTGC GAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATAACCCT GGTAGTCCACGCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGT TAGGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAAC GCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGGAGTACGACCGC AAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCG CACAAGCGGTGGAGCATGTGGGTTTAATTCGAAGC AACCGGGAGAACCTTACCAAATCTTGACATCCTTT GACCGCTCTAG
I2r	<i>Staphylococcus</i> <i>warneri</i>	99	99	GTGCTATACATGCAGTCGAGCGAACAGATAAGGA GCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAG TAACACGTGGATAACCTACCTATAAGACTGGGATA ACTTCGGGAAAACCGGAGCTAATACCGGATAACAT ATTGAACCGCATGGTTCAATAGTGAAAGGCGGCTT TGCTGTCACTTATAGATGGATCCGCGCGTATTAG CTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACG ATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACA CTGGAACGTAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGA GGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAA GCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGG TCTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTATCAGGGAAGAA CAAATGTGTAAGTAACTGTGCACATCTTGACGGTA CCTGATCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC AGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCG GAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGTTTT TTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTG GAGGGTCATTGAAAACGGAAAACTTGAGTGCAG AAGAGGAAAAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAA ATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAA AGCGACTTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGATGTGC GAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATAACCCT GGTAGTCCACGCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGT GTTAAGGGGGGTTTCCCCCCTTAATGCTGCCAG CTAACGCATTAAGCACTCCGCCCGGGGGA
A3r	<i>Staphylococcus</i> sp. strain CLC- F26	100	99	TGCTATACATGCAGTCGAGCGAACAGATAAGGAG CTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGT AACACGTGGGTAACCTACCTATAAGACTGGGATA ACTTCGGGAAAACCGGAGCTAATACCGGATAATATT TCGAACCGCATGGTTGATAGTGAAAGATGGTTTT GCTATCACTTATAGATGGACCCGCGCGTATTAGC

				<p>TAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGAT  ACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACT  GGAAC TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGG  CAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGC  CTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTC  TTCGGATCGTAAAACCTGTGTTATTAGGGAAGAACA  TACGTGTAAGTAACATGCACGTCTTGACGGTACC  TAATCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCA  GCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGG  AATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGTTTTT  TAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGG  AGGGTCATTGGAAACTGGAAAACCTTGAGTGCAGA  AGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAA  TGCGCAGAGATATGGAGGAACACCACTGGCGAAA  GCGACTTTCTGGTCTGTAAC TGACGCTGATGTGCG  AAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTG  GTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTT  AGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGC  ATTAAGCACTCCGCTGGGGGAGTACGACCGCAA  AGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGC  ACAAGCGGTGGAGC</p>
809	<i>Staphylococcus epidermidis</i> strain TWSL_20	96	99	<p>CTAAACCTGCAGTCGAGCGAACAGACGAGGAGCT  TGCTCCTCTGACGTTAGCGGGCGACGGGTGAGTAA  CACGTGGATAACCTACCTATAAGACTGGGATAACT  TCGGGAAAACCGGAGCTAATACCGGATAATATATTG  AACCGCATGGTTCAATAGTGAAAGACGGTTTTGCT  GTCACTTATAGATGGATCCGCGCCGCATTAGCTAG  TTGGTAAAGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATGC  GTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGG  AACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCA  GCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAAGCCT  GACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTT  CGGATCGTAAAACCTGTATTAGGGAAGAACA  ATGTGTAAGTAACATGCACGTCTTGACGGTACCT  AATCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAG  CCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGA  ATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGTTTTTT  AAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGG  AGGGTCATTGGAAACTGGAAAACCTTGAGTGCAGA  AGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAA  TGCGCAGAGATATGGAGGAACACCACTGGCGAAA  GCGACTTTCTGGTCTGTAAC TGACGCTGATGTGCG  AAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTG  GGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGT  TAAGGGGGGTTTTCCCCCCTTAATGCTGCCACCT  AAACGCCCTTAA</p>
798	<i>Uncultured bacterium clone</i> ncd2254e01c2	91	98	<p>GCTATACATGCAGTCGAGCGAACCGGACGAGAAGC  TTGCTTCTCTGATGTTAGCGGGCGACGGGTGAGTA  ACACGTGGATAACCTACCTATAAGACTGGGATAAC  TTCGGGAAAACCGGAGCTAATACCGGATAATATTTT  GAACCGCATGGTTCAAAAAGTGAAAGACGGTCTTG  CTGTACTTATAGATGGATCCGCGCTGCATTAGCT  AGTTGGTAAAGTAACGGCTTACCAAGGCAACGAT  GCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACT  GGAAC TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGG  CAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGC  CTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTC  TTCGGATCGTAAAACCTGTGTTATTAGGGAAGAACA  TATGTGTAAGTAAC TGTCACATCTTGACGGGACC  TAATCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGGCAGCA  GCCGCGTAATACGTAAGTGGGAAGCGTTATCCG  GAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGTTTTT  TTAAGTCTGATGTGAAAACCCACGGCTCAACCGTG  GAGGGTCATTGGAAACTGGGAAAACCTTGAGTGCAG  AAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGGTGA  AATGCGCAGAGATATGGGAGGAACACCACTGGGC  GAAAGCGACTTTTCTGGTCTGTAAC TGACGCTG  ATGTGCGAAAAGCGTGGGGGATCAAACAGGGATT  AGATACCCTGGGTAGTCCCCCCCCCTAAACCAAT  GAGTGGCTAAATGTTTAGGGGGGGTTTTCCCCC  CCT</p>
799c1	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> strain WWi167	99	99	<p>CCTATACATGCAGTCGAGCGAACAGATAAGGAGC  TTGCTCCTTTGACGTTAGCGGGCGACGGGTGAGTA  ACACGTGGGTAACCTACCTATAAGACTGGGATAAC  TTCGGGAAAACCGAAGCTAATACCGGATAACATTTG</p>

				GAACCGCATGGTCTAAAGTGAAAGATGGTTTTGC TATCACTTATAGATGGACCCGCGCCGTATTAGCTA GTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGCGACGATA CGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTG GAACTGAGACACGGTCCAGACTCTACGGGAGGC AGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAAGCC TGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGGTT TCGGCTCGTAAAACCTGTTATTAGGGAAGAACAA ACGTGTAAGTAACTGTGCACGTCTTGACGGTACCT AATCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAG CCGCGGTAATACGTAAGTGGGAAGCGTTATCCGG AATTATTGGGCGTAAAGCGCGGTAGGCGGTTTCT TAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGG AGGGTCATTGGAAGCTGGGAACTTGAGTGCAGA AGAGGAAAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAAT GCCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAAG CGACTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGATGTGCGA AAGCGTGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGG GTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGTAAAGTGT AAGGGGGTTTCCCCCTTAATGCTGCAGCTAAA G
1C	<i>Sphingomonas</i> sp. strain Ap02E	78	89	TGCAGTCGACGAGACCTTCGGGTCTAGTGGCGCAC GGGTGCGTAACCGGTGGGAATCTGCCCTTGGGTTC GGAATAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGGA TGATGACGTAAGTCCAAAAGATTTATCGCCACGGGA TGAGCCCGCTAGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAA AGGCCTACCAAGGCGACGATCCTTAGCTGGTCTGA GAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGG CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA TTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGC CGCGTGAGTGATGAAGGCCCTTAGGGTTGTAAAGCT CTTTTACCCGGGATGATAATGACAGTACCCGGGGGA ATAAACCCCGGCTAACTCCTGGCAGCAGCCGCGG GAATACCGAAGGGGCTAGCGTTGTTTCGAAATACT GGGGGGTAAACGCACCTAAGCGGCTTTTTTAAATA AAAGGGGAAACCTGGGGGTTTATTCCCAAATGGC CTTTTAAACTGGCTCCCTTTTATCTGGAGAAGTGA GTGGAATTCACAGTGGTGAGGGGGAAATTTTTTTA TATTTTGAACAAAAACAGAGGGGGAAGGGGTCA CTGGACTGGGATTTACCCTTAGTGGGGAAAAACTG GGGGGCAAAAAGATTTATACCCTGGGGGTCCCCC CCCAACAGATAAACAACTGTCCGGGGCTTGGGATT TGGGGGGGGCGCTACGCCTTAGTTTTCCCTGGGG GGAAGGGGGCCGAATTAATCCAAGGAATGACGG GGGCTCCCCAACGGGGAACATTTGTTTTATTTTAA AACCCCAAACCTT
2C	<i>Bacterium strain</i> 4BL_5	97	91	GCTTACCATGCAGTCGAACGCTGAAGCTTGGTGCT TGCATGGGTGGATGAGTGGCGAACGGGTGAGTA ATACGTGAGTAACCTGCCCTTGACTCTGGGATAAG CCTTGGAACTGGGTCTAATACTGGATACGACATG TCACTGCATGGTGGTGTGTGAAAGGGTTTTACTG GTTTTGGATGGGCTCACGGCCTATCAGCTTGTGG TGGGGTAAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAG CCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACT GAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG TGGGGAATATTGCACAATGGGCGGAAGCCTGATG CAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGG TTGTAACCTCTTTCAGCACGGAAGAAACGAGAGT GACGGTACGTGCAGAAAAAAACCCGCTAACTTC GTGGCAGCAGCCGCGGGAATACCTAAGGCGCAAG CCTTGTCCGAAATATTGGGGGGTAAAAACTCGTA AGCCGGTTTGTCCGCTCTGCTGTGAAAAACCCCGG GGCTTAACCCCGGGTGTGACAGTGGGGTACGGGC AGACTTGAGTGCAGTAGGGGGAGACTGGGAATTC CTGGTGGTAGCGGGTGGAAATGCGCCAGATATCA GGGAAGAAAAACCGATTGGCGAAAGGCAAGGTCT CTTGGGGCTGTTTACTTGACGCCTTAAGGAGCCAA AAGCAATGGGGGGAGCGAAACAGGGATTAGAATA CCCCTGGGGTAGTCCCATGCCCGCTAAAACGTTT GGGCACCTAAGGTGGTGGGGGGGGAACAATTTCC ACCCGTTTTTT
1B	<i>Streptococcus</i> <i>dysgalactiae</i> strain JZ R-75	34	99	ATACATGCAGTAGAACGCTGAGGACTGGTGCTTGC ACCGGTTCAAGGAGTTGCGAACGGGTGAGTAACG CGTAGGTAACCTACCTCATAGCGGGGGATAACTAT TGAAACGATAGCTAATACCGCATGACAATGGAG

				GACCCATGTCTTTCATTTAAAAGGTGCAACTGCAT CACTATGAGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTAGTT GGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATACAT AGCCGACCTGAGAGGGTGAACGGCCACTGGGA CTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC AGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGGAAAGTCTGA CCGAACAACGCCCCCAGTGAAAAAAGTTTTT TCATCCTTAAAACCTCTTTTTTTTTAAAAA AGAGTGGGGGGGGGAAACACACACCCGGGGG GGGGGAAAAACCCAAAAGGGGGGGGGATAATT TTTTACAAACCCGGGGTAAAAATTTGTCCC CCAGTTTGCCCAATTTTTTTTGGTTAAAAA AAAAGGGGGGTTTTTAAAAATAAAAAAAGG GGGGGGGGCCCCCCCCCCTTTTTAAAAGGA AAAATTTTTTTTTAAAGGGGGGGGAGTTCCTT CTTTTTTGGGGGAAAAGCCCGAATTTTTTGG GAAACCCCGGGGAAAGGACCTCCCTGGCGG GGAATAAAACCTTAAAGGTTTTAAAAACTGGGG GGAACCGGGTTTTATAACCTGGGGGGTCCCCC CCAACAAAAGGGCCCCCGGGTTAGGGCCCTT TTCCGGGGTGGGTTGGCCGGGATAAACAAATA AAAAACCCCGGGGAAAAAACCACCCAG GGGGTAAATCAAAAAAATTAACGGGGCCCC CCACCCGGGGGAAAAAAGGGGGTTTTATT TTTTAAAGCCGGGAAACCTCCACCGGGGTT TAAACCCCTCCCAAGGGCCCTTTTTTAA
E1	<i>Streptococcus</i> sp. XJ150-1212- NJR1	95	90	GCTATACATGCAGTAGAACGCTGAGGACTGGTGC TGCACCGTTCAAGGAGTTGCGAACGGGTGAGTA ACGCGTAGGTAACCTACCTCATAGCGGGGATAA CTATTGAAACGATAGCTAATACCGCATGACAATG GAGGACCCATGTCTTTCATTTAAAAGGTGCAACTG CATCACTATGAGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTA GTTGGTAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATA CATAGCCGACCTGAGAGGGTGAACGGCCACTG GGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGC AGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGGAAGT TGACCGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGTTT TCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGAGAAGATGA TGGTGGGAGTGAAAAATCCACCATGTGAAGGGGA CTAACCGAAAAGGGGGGCTTAATTACTTGCCACA ACCCCGTAATACCTTAGTCCCCAACGTGTTCCGG ATTAATGGGCGTAAAAGAGCGCAGCCGTTCTTAA ATCTGAAATTAAGGGGGGGGTCACCCCTGTAC GCTTTGAACTGGGAAATTTAGTGCAGAAAGGGA GAGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTGT ATATGGAAGAAAACCGTTGGGGAAAAGGTCTCT GGGCGTAAATGACCCTAGGCTCCCAAACCTGGG GAGCAAAAGGATTAATACCCTGGTATCCCCCT AACAATAATGCTAGGTGGTAGCCCCTTCCGGGGC TAATGGCCGACCTACCCCTAACCATCGCCCGG GGGATCA
28ATM	<i>Streptococcus</i> <i>uberis</i> strain NCTC4674	99	97	CTGCAGTAGAACGCTGAGGACTGGTGTCTGCTG GTCTAAGGAGTTGCGAACGGGTGAGTAACGCGTA GGTAACCTACCTCATAGCGGGGATAACTATTGGA AACGATAGCTAATACCGCATGACAATAGGGTACA CATGTACCCTATTTAAAAGGGGCAATTGCTTCACT ATAAGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTA AGGTAACGGCTTACCAAGGGGACCATAACATAGCC CACCTGAAAAGGTGATCGGCCCACTGGGACTGA AACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA GGGAATCTTCCGCAATGGGGGAAACCCTGACCGA ACAACGCCCCGTGAGTGAAGAAAGTTTTCCGGATCG TAAAGCTCTGTTGTTAGAGAAAAACGGTAATGGG AGTGGAAAAATCCATTACGTGACGGTAACCA GAAAGGGACGGTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG GTAATACGTAGGTCCCCAGCGTTGTCCGGATTTAT TGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTGATAAGT CTGAAGTAAAAAGCTGTGGCTTAACCATAGATCGC TTTGGAACTGTCAAACCTTAATGCAGAAAGAGAG AGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCCTAGA TATATGGAAGAACACCCGTGGCGAAAGCGGCTCT CTGGTCTGTAACCTGACGCTTAAGCTCGAAAGCGTG GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA CGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGCCCTT TCCGGCCTTAATGCCGAGCTAACGCATTAAGCA

				CTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACT CAAAGGAATTGACGGGGGCCCAAGCGGTGGA GCAT
99	<i>Streptococcus uberis strain NCTC4674</i>	99	99	GCTATACATGCAGTAGAACGCTGAGGACTGGTGC TGCAC TGGTCTAAGGAGTTGCGAACGGGTGAGTA ACGCGTAGGTAACCTACCTCATAGCGGGGATAA CTATTGAAAACGATAGCTAATACCGCATGACAATA GGGTACACATGTACCCTATTTAAAAGGGGCAAATG CTTCACTATGAGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTA GTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATA CATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTG GGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGC AGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGGGGAACCC TGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTT TCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGAGAAGAACGG TAATGGGAGTGGAATAATCCATTACGTGACGGTAC CTAACAGAAAAGGACGGCTAACTACGTGCCAGC AGCCGCGTAATACGTAAGTCCCGAGCGTTGTCCG GATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTG ATAAGTCTGAAGTAAAAGCTGTGGCTTAACCA GTTTCGCTTTGGAACTGTCAAACCTGAGTGCAGAA GGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAAT GCGTAGATATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAA CGGCTCTTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGA AAGCGTGGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTG GTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAGGTGTT AGGCCCTTTCGGGGCTTAGTGCCGGAGCTAACGC ATTAAGCACTCCGCCTGGGGGAGTACGACCCGAA GGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGG
799	<i>Streptococcus uberis strain NCTC3858</i>	99	97	GCTATACATGCAGTAGAACGCTGAGGACTGGTGC TGCAC TGGTCTAAGGAGTTGCGAACGGGTGAGTA ACGCGTAGGTAACCTACCTCATAGCGGGGATAA CTATTGAAAACGATAGCTAATACCGCATGACAATA GGGTACACATGTACCCTATTTAAAAGGGGCAAATG CTTCACTATGAGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTA GTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATA CATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTG GGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGC AGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGGGGAACCC TGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTT TCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGAGAAGAACGG TAATGGGAGTGGAATAATCCATTACGTGACGGTAC TAACCAGAAAAGGACGGCTAACTACCTGCCAACA GCCGCGTAATACGTAAGTCCCGAGCGTTGTCCGG ATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAAGCGGTTTGA TAAGTCTGAAGTAAAAGTGTGGCTTAACCATAG TTCGCTTTGGAACTGTCAAACCTGAGTGCAGAA GGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATG CGTAGATATATGGGAGGAACACCGGTGGCGAAA GCGGCTCTTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCC AAAGCGTGGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC CGGGTAGTCCCCCCCCCTAAACAATGAGTGCTAAG GTGTTAGCCCCCTTTCGGGGGCT

Elaborado por: Los autores, 2018.