



**UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**TESIS**

Previo a la obtención del título de:

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**TEMA**

**“PRESENCIA DE *Pseudomona aeruginosa* EN INFECCIONES  
INTRAMAMARIAS SUBCLÍNICAS EN VACAS PRIMÍPARAS”**

**AUTOR**

LIMA CARREÑO WENDY ROCIO

**TUTOR**

MVZ. ARCOS ALCÍVAR FABRIZIO JAVIER. MSc

**GUAYAQUIL – ECUADOR**

**2020**



**UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**  
**CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**APROBACIÓN DEL TUTOR**

Yo, Fabrizio Javier Arcos Alcívar, Docente de la Universidad Agraria del Ecuador, en mi calidad de Tutor, Certifico que el presente trabajo de titulación: **“PRESENCIA DE *Pseudomona aeruginosa* EN INFECCIONES INTRAMAMARIAS SUBCLÍNICAS EN VACAS PRIMÍPARAS”**, realizado por la Egresada **LIMA CARREÑO ENDY ROCIO**; con cedula de identidad N° **0929322519** de la Carrera de **MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**, Unidad Académica Guayaquil, ha sido orientado y revisado durante su ejecución; y cumple con los requisitos técnicos exigidos por la Universidad Agraria del Ecuador ; por lo tanto se aprueba la presentación del mismo.  
Atentamente.

Mvz. Fabrizio Arcos Alcívar. MS.c

Guayaquil, Junio 29 del 2020



## UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR

### FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

#### CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

#### APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN

Los abajo firmantes, docentes designados por el H. Consejo Directivo como miembros del tribunal de Sustentación, aprobamos la defensa del trabajo de titulación: **“PRESENCIA DE *Pseudomonas aeruginosa* EN INFECCIONES INTRAMAMARIAS SUBCLÍNICAS EN VACAS PRIMÍPARAS”**, realizado por la estudiante **LIMA CARREÑO WENDY ROCIO**, el mismo que cumple con los requisitos exigidos por la Universidad Agraria del Ecuador.

Atentamente,

-----  
MVZ.Nahim Jorgge Barquet, MS.c  
PRESIDENTE

-----  
Dra. Ivonne España García, MS.c

-----  
Mvz.Washington Yoong Kuffo, MSc

-----  
Mvz. Fabrizio Arcos Alcívar, MSc  
EXAMINADOR SUPLENTE

## **Dedicatoria**

Dedico esta tesis principalmente a Dios, por ser el inspirador y darme toda fuerza para haber podido continuar en este proceso de obtener uno de los anhelos más deseados en mi vida.

A mis esposo e hijo Ronnie y Jackson quienes con su amor, paciencia y esfuerzo me han permitido llegar a cumplir un sueño más, gracias por inspirar en mí el esfuerzo y valentía.

A mis suegros María y Leoncio que sin su ayuda no hubiera podido culminar mi sueño, quedo eternamente agradecida por todo el apoyo brindado.

A mi Padre que desde el cielo ha guiado mis pasos a mi Madre y hermanas Rosalba, María y Pahola por su cariño y apoyo, durante todo este proceso. A toda mi familia porque con sus oraciones, consejos y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona y de una u otra forma me acompañaron en todos mis sueños y metas.

Finalmente quiero dedicar esta tesis a mis amigos Lucia, Karla, Daniel, Luis, por apoyarme cuando más los necesite, por extender su mano en momentos difíciles y por el amor brindado, mil gracias siempre los llevare en mi corazón.

## **Agradecimiento**

Quiero expresar mi gratitud a Dios, quien con su bendición llena siempre mi vida y a toda mi familia por estar siempre presentes.

De la misma forma, agradezco enormemente a la Universidad Agraria del Ecuador, por brindarme la oportunidad de ser parte de esta noble institución y poder cursar mis estudios de formación profesional. A los docentes de la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia por su responsabilidad y alto nivel académico desarrollado en los años de estudio.

A mi Tutor Dr. Fabrizio Arcos que gracias a su conocimiento y pude culminar mi trabajo de titulación.

## **Autorización de Autoría Intelectual**

Yo **LIMA CARREÑO WENDY ROCIO**, en calidad de autor del proyecto realizado, sobre **“PRESENCIA DE *Pseudomona aeruginosa* EN INFECCIONES INTRAMAMARIAS SUBCLÍNICAS EN VACAS PRIMÍPARAS”**, para optar el título de **MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**, por la presente autorizo a la **UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR**, hacer uso de todos los contenidos que me pertenecen o parte de los que contienen esta obra, con fines estrictamente académicos o de investigación.

Los derechos que como autor(a) me correspondan, con excepción de la presente autorización, seguirán vigentes a mi favor, de conformidad con lo establecido en los artículos 5, 6, 8; 19 y demás pertinentes de la Ley de Propiedad Intelectual y su Reglamento.

Guayaquil, Junio 29 del 2020

---

**LIMA CARREÑO WENDY ROCIO**  
**C.I. 0929322519**

## Índice general

PORTADA.....	1
APROBACIÓN DEL TUTOR .....	2
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN .....	3
Dedicatoria.....	4
Agradecimiento.....	5
Autorización de Autoría Intelectual.....	6
Resumen.....	11
Abstrac .....	12
1. Introducción .....	13
1.1 Antecedentes del problema.....	16
1.2 Planteamiento y formulación del problema .....	16
1.3 Formulación del problema .....	16
1.4 Justificación de la investigación .....	17
1.5 Delimitación de la investigación .....	17
1.6 Objetivo general .....	17
1.7 Objetivos específicos .....	17
2. Marco teórico.....	18
2.1 Estado del arte .....	18
2.2 Bases teóricas.....	19
2.2.3 Clasificación de la mastitis .....	20

2.2.4 Prueba química .....	22
3.1.1 2.2.4.1 California Mastitis Test (CMT).....	22
2.2.5 Agentes infeccioso que causa mastitis .....	24
3. Materiales y métodos .....	27
3.2 Enfoque de la investigación .....	27
3.3 Metodología .....	27
3.3.1 Variables de estudio.....	27
3.3.2 Variable dependiente .....	27
3.2.4.1Recursos bibliográficos .....	29
3.3 Métodos y técnicas .....	29
3.2.5.3 Prueba Maldi-tof Espectrometría de masas .....	31
4 Resultados.....	34
4.1 Identificación de los animales reactivos a prueba California Mastitis test.....	34
4.2 Características fenotípicas de colonias de enterobacterias.....	36
4.3 Presencia de <i>Pseudomona aeruginosa</i> mediante la técnica de Maldi-tof.....	38
6. Conclusión .....	44
8. Bibliografía.....	45
9 Anexos .....	52

## Índice de Anexos

Anexo 1 Identificación de vacas primerizas de la Hacienda “Pilar” que van a ser sujeto de estudio ingresando a la sala de ordeño. ....	52
Anexo 2 Área de ordeño mecánico sala número 1. ....	52
Anexo 3 Sala de ordeño número 2. ....	53
Anexo 4 Sala de ordeño número 3. ....	53
Anexo 5 Toma de muestra para su posterior análisis.....	54
Anexo 6 Identificación de todas las muestras para su traslado hacia el laboratorio. ....	54
Anexo 7 Análisis de CMT.....	55
Anexo 8 Aplicación de reactivo CMT para el análisis de muestras de campo.....	55
Anexo 9 Adecuación de todas las muestras para su traslado hacia el laboratorio. ....	56
Anexo 10 Muestras en caja de Petri para su crecimiento .....	56
Anexo 11 resultados de Chí cuadrado mediante la plataforma Infostat.....	60
Anexo 12 Análisis de CMT y muestras de laboratorio mediante prueba Chi Cuadrado.....	40

## Índice de tablas

Tabla 1 Casos positivos a infecciones intramamarias subclínicas concluyentes por prueba de CMT.....	34
Tabla 2 Infección intramamaria según los días post parto.....	35
Tabla 3 Descripción fenotípicas de colonias de enterobacterias.....	36
Tabla 4 Descripción de la asociación fenotípica de bacterias y positividad de las bacterias.....	37
Tabla 5 Presencia de <i>Pseudomona aeruginosa</i> en las muestras analizadas mediante la prueba de laboratorio Maldi-tof.....	38
Tabla 6 Porcentaje de microorganismos frecuentes aislados en resultados de laboratorio.....	39

## Resumen

El estudio fue realizado en la “Hacienda Pilar ubicada en el km 88 vía Triunfo - Bucay”, tomando como objeto de estudio en vacas primerizas, teniendo como objetivo determinar la presencia de mastitis, mediante California Mastitis Test y prueba de laboratorio Maldi-tof, se tomaron 20 muestras de leche mediante CMT las mismas que nos ayudan a la medición cualitativa del recuento de células somáticas en la leche, las muestras fueron interpretadas mediante trazas siendo considerada desde Traza 1 – 2 como mastitis subclínica y es así como se pudo identificar a los animales afectados dando como resultado 15 (75%) positiva y 5 (25%) negativas. En cuanto a las muestras que se envió al laboratorio mediante la prueba de Maldi – tof, se obtuvo resultados como es la presencia de bacterias que circulan en el hato como son: *Escherichia Coli* - *Klebsiella Pneumoniae* - *Staphylococcus Epidermidis* - *Pseudomona Aeruginosa*- *Enterococcus Hirae*- *Staphylococcus Aureus*- *Enterococcus Faecalis*- *Staphylococcus Haemolyticus*- *Proteus Mirabilis*.

**Palabras Claves:** Subclínica, Primerizas, Test CMT, Sintomatología, Microorganismos, Fenotípicas.

## Abstrac

The study was carried out at the “Hacienda Pilar located at km 88 vía Triunfo – Bucay”, taking as object of study in first-time cows, with the objective of determining the presence of mastitis, using the California Mastitis Test and the Maldi-tof laboratory test. 20 milk samples by CMT, the same ones that help us to qualitatively measure the somatic cell count in milk, the samples were interpreted using traces, being considered from Trace 1 - 2 as subclinical mastitis and this is how the animals could be identified affected resulting in 15 (75%) positive and 5 (25%) negative. Regarding the samples that were sent to the laboratory by means of the Maldofof test, results were obtained such as the presence of bacteria that circulate in the herd such as: *Escherichia Coli* - *Klebsiella Pneumoniae* - *Staphylococcus Epidermidis* - *Pseudomona Aeruginosa*- *Enterococcus Hiraе*- *Staphylococcus Aureus*- *Enterococcus Faecalis*- *Staphylococcus Haemolyticus*- *Proteus Mirabilis*.

**Keywords:** Subclinical, Girly, CMT Test, Symptomatology, Microorganisms, Phenotypic.

## 1. Introducción

La producción de leche, desde los últimos años, ha presentado una dinámica social y económica para el Ecuador y la gran mayoría de sus provincias andinas, lo que hace que represente un alto nivel económico. El sector ganadero representa el 33.1% de producto bruto agropecuario, en la región Sierra se produce el 73% de leche, en la Costa el 19% y en la Amazonía 8% (Zambrano et al., 2017).

Según Loayza y Mundo el avance de una explotación lechera depende en gran medida de la adopción de un sin número de prácticas; los métodos de ordeño utilizados en el país son ordeño manual y mecanizado, siendo estos unos de los principales factores que se deben de tomar en cuenta el momento de la extracción de la leche (Loayza R, 1992);(Mundo, 2014).

Así mismo indican García y colaboradores y Manjarrez con su grupo de trabajo como aspectos principales dentro de manejo de ganado comprende: calidad higiénica, reproducción, alimentación, alojamiento, cuidados del recién nacido, registros, producción, sanidad; así como también tomar en cuenta al personal que realiza el ordeño los mismos que deben de efectuar lo siguiente: limpieza del ordeñador, limpieza y sellado de los pezones con una solución desinfectante después del ordeño, descarte de los primeros chorros o despunte, lavado de recipientes de ordeño, en caso de observar algún animal decaído o con alguna sintomatología de enfermedad no se debe de ordeñar dicho animal o si se lo realiza tomar las medidas respectivas al momento de realizar el ordeño. (García & Requelme, 2011),(Manjarrez et al., 2011)

Cuando no tiene las condiciones sanitarias adecuadas se convierte en un medio excelente para el crecimiento incontrolado de una gran cantidad de microorganismos promotores de diversas enfermedades para los animales (Apaza & Condemayta, 2013).

Las infecciones intramamarias son una reacción inflamatoria de la glándula mamaria y que pueden producir alteraciones físicas y químicas de la leche, su origen puede ser por lesiones traumática, infeccioso, los mismos que pueden afectar a un solo cuarto como también a todos los cuartos. (Rangel et al., 2010)

Como expresa Contreras y colaboradores los agente infecciosos productores de mastitis pueden colonizar la glándula mamaria de novillas tanto en los períodos de prepartos como en el postparto, ya que esto es un factor que afecta a los animales desde la lactancia por el consumo de leche contaminada con patógenos (Contreras, 2009). Otro factor de incrementar el riesgo de contraer mastitis en vacas de producción lechera, y que va a depender del grado de afectación para que se puedan presentar manifestaciones clínicas, para valorar las mismas se pueden realizar pruebas biológicas, como son la prueba de laboratorio, pruebas de California Mastitis Test (CMT) (Alcaraz et al., 2008).

A nivel de las ganaderías lecheras el cmt es una prueba muy utilizada no solo por su bajo costo, sino también por la obtención de resultado muy rápido, permite identificar las vacas con mastitis subclínicas y refleja de manera subjetiva el grado de infección de los cuartos lecheros de cada vaca (Bedolla et al., 2007),(Gómez et al., 2015).

La toma de la muestras de leche es de (2 ml aprox.) de cada cuarto, se toma en cada uno de los pozos de la paleta para la prueba de CMT; luego se adiciona un volumen similar del reactivo de CMT (detergente alquil-aril sulfonato de sodio) y se procede a homogenizar durante 10 a 20 segundos, para luego interpretar los resultados visualmente dependiendo de la densidad del contenido, ya que si algún cuarto se encuentra afectado se observará una forma más espesa de la leche. La

prueba de CMT muestra una sensibilidad (S) del 68% y una especificidad (E) del 80% (Cerón et al., 2007)

Como es de esperarse las novillas de primer parto deberían estar libre de infecciones intramamarias a la hora del parto, ya que no han experimentado los rigores de los múltiples ordeños diarios, y no han sido sometidos a la succión de las máquinas de ordeño, asociadas con el daño que ocasiona a la estructura de la teta o el pezón y por lo tanto, han tenido menor exposición a patógenos contagiosos ; pero en los últimos años se ha reportado infecciones intramamarias clínicas y subclínicas en primerizas, asociados a errores en la crianza de terneras al darles leche de descarte para abaratar costos, también en el secado y la rutina de ordeño (Vlieghe et al., 2010).

Los agentes causales de mastitis subclínica son: patógenos mamarios y patógenos ambientales los más frecuente, *Staphylococcus aureus* con porcentajes de 32 y 42%, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus* coagulasa negativo, *Corynebacterium* sp, *Escherichia coli*, *Pseudomona Aeruginosa* (Carillo et al., 2007).

Como afirma paz y Colaboradores la *Pseudomona aeruginosa* es una bacteria capaz de causar mastitis en vacas lecheras, esta bacteria presenta un desafío difícil para su control, prevención y tratamiento, ya que tiende a ser resistente a los antibióticos, es oportunista y bastante persistente en el ambiente, si bien es cierto se debe de tomar en cuenta los factores multifactoriales que pueden afectar a los animales como son: raza, manejo, factores medioambientales, etc (Paz-Zarza et al., 2019).

## **1.1 Antecedentes del problema.**

Es una realidad que las infecciones intramamarias provocados por agentes de diferentes grados de patogenicidad, agentes ambientales, causan problemas en la salud de la ubre del rebaño y la calidad del producto final, provocando pérdidas económicas por productividad y por el castigo de precio por no cumplir con el mínimo requerimiento de calidad.

Hay muchos factores que incrementan el porcentaje de estas infecciones, como el caso de alimentar con leche de descarte con antibiótico para las terneras, el ambiente de crianza poco higiénico, mal calostrado, mala calidad de calostro, errores en la rutina de ordeño, casos clínicos muy frecuentes y vacas crónicas o que repiten las infecciones clínicas en ubre, el estrés de la primeriza previo al parto, maternidad colectiva sucias, distocias, mal balance de la suplementación mineral, energética y proteica, un bajo consumo de alimento en el post parto y todo lo que afecte al confort y bienestar animal etc (Atzel Candido Acosta et al., 2016).

## **1.2 Planteamiento y formulación del problema**

### **1.2.1 Planteamiento del problema**

En la hacienda en la cual se investigó los casos subclínicos de mastitis, hay casos clínicos frecuentes por semana, uso de antibióticos sin previo análisis de laboratorio, y afectación intermitente de la calidad para hacer subproductos lácteos, se propuso aislar *Pseudomona Auruginosa*.

### **1.3 Formulación del problema**

¿De qué manera las infecciones intramamarias subclínicas provocadas por *Pseudomona Aeruginosa* están afectando a las vacas primíparas?

#### **1.4 Justificación de la investigación**

Este estudio se realizará con el fin de determinar la incidencia de infecciones intramamarias subclínicas causada por *Pseudomona Aeruginosa* en vacas primíparas, dando una valoración higiénica-sanitaria de dicho predio. Conocer el tipo de patógeno circulante en el predio ganadero es de mucha ayuda para la toma de decisiones sanitarias en el mismo.

#### **1.5 Delimitación de la investigación**

- **Espacio:** Hacienda Pilar Km 88 vía el Triunfo - Bucay
- **Tiempo:** Muestreo durante 2 meses para su respectivo aislamiento
- **Población de estudio:** Vacas de primer parto

#### **1.6 Objetivo general**

- Identificar la presencia de *Pseudomona aeruginosa* en infecciones intramamarias subclínicas en vacas primíparas en la "Hcda. Pilar" - Bucay.

#### **1.7 Objetivos específicos**

- Identificar animales primíparas reactivos a prueba California Mastitis test.
- Asociar según sus características fenotípicas de las colonias de enterobacterias.
- Confirmar la presencia de *Pseudomona aeruginosa* mediante la técnica de Maldi-tof.

#### **1.8 Hipótesis**

- Existen una alta frecuencia de infecciones intramamarias subclínica por *Pseudomona aeruginosa* en vacas primerizas.

## 2. Marco teórico

### 2.1 Estado del arte

De acuerdo con Mendoza mediante un estudio que fue realizado en Cundiboyacense, el 34,4% de los animales fueron sospechosos de sufrir de mastitis, el 31,3% fueron casos positivos a mastitis subclínica es causada principalmente por microorganismo que generalmente se encuentran en el medioambiente *Pseudomonas aeruginosa* (Mendoza et al., 2017).

*En un estudio realizado en Argentina menciona que el Streptococcus agalactiae* es uno de los principales agentes etiológicos promotor tanto de la mastitis clínica y subclínica en las ganaderías. Es un patógeno dependiente de la ubre y susceptible a una amplia variedad de antibióticos. Sin embargo, su prevalencia en rebaños lecheros afectados con mastitis varía de menos de 10 % en Canadá y países del norte de Europa, más de 90 % en China y aproximadamente 50 % en América del Sur. Así como también menciona que existen un sinnúmero de bacterias ambientales altamente contagiosa que pueden ocasionar daños muy severos, las mismas que se pueden diseminar durante el ordeño, ya que es unos de los principales factores a tomar en cuenta al momento de realizarlo.

Se ha reportado que las vacas más viejas tienden a presentar mayores conteo de células somáticas en la leche, mientras que las novillas de primer parto tienden a presentar células somáticas entre 20 000 y 100 000. En lo que concierne a la etapa de la lactancia, se ha encontrado que durante el periodo seco existe mayor susceptibilidad a la mastitis clínica, principalmente 2 semanas después del secado y 2 semanas antes del parto.

Según un estudio realizado en Perú menciona que las vacas lecheras siempre están expuestas a contraer mastitis, ya que el estudio realizado en un establo lechero del

20 % al 40 % de las vacas en ordeño presentan de uno a más cuartos mamarios con mastitis subclínica y hasta el 8 % pueden tener mastitis clínica; aun cuando existan otros factores, esta depende del manejo y control de la salud en la unidad productiva y las condiciones que se le brinde a los animales durante todos los procesos como son: edad, raza, partos, periodo de lactancia, así como de la producción de leche y condiciones del equipo de ordeño. La mastitis ocurre cuando factores medioambientales y de manejo interactúan aumentando la exposición de la ubre a los microorganismos, ayudando así a los patógenos a atravesar el canal del pezón. Así como también la mastitis procede de tres factores esenciales: el hospedador, el agente infeccioso y el medio ambiente.

Estudios han determinado que las infecciones intramamarias están presentes en el 33% de los cuartos de las novillas. La prevalencia específica de infecciones intramamarias del patógeno no difirió entre novillas y vacas multíparas, pero se observaron diferencias regionales y diferencias entre las categorías de conteo de células somáticas en la prevalencia de la infección intramamarias específica del patógeno. La prevalencia de mastitis subclínica en novillas fue del 13.6%. En todas las regiones, la prevalencia de mastitis subclínica fue mayor en vacas multíparas que en novillas (Naqvi et al., 2018).

## **2.2 Bases teóricas**

### **2.2.1 Anatomía de la glándula mamaria**

La ubre de una vaca está formada por 2 mitades, cada mitad tiene 2 glándulas. A cada glándula por separado se le llama "cuarto". Los cuartos están divididos por tejido conectivo y cada uno tiene un sistema colector de leche por separado. Su función principal es aportar protección y nutrientes (calostro/leche) al recién nacido. El sector secretor está compuesto por los alvéolos y por el epitelio de las paredes de los

conductillos. El 60% de la leche almacenada en la glándula mamaria se encuentra en los alvéolos y conductillos alveolares (Riera 2005; Calvinho, 2015).

Aguilar y Fauteux argumentan que la ubre es la escudo de protección ante un ataque de mastitis, así como también el pezón mantiene un lazo de conexión con la parte interna del cuarto mamario, sin no de dejar de mencionar que el que impide el ingreso de los microorganismos hacia el interior de la ubre es su esfínter; por lo tanto uno de factores principales para la contaminación de los cuartos mamarios es mediante el ordeño, las bacterias que se encuentran de forma constante en la parte externa del pezón pueden ingresar al pezón, los mismos que van a replicarse rápidamente, causando la inflamación e infección de la glándula mamaria (Aguilar et al., 2018 ) (Fauteux et al., 2014).

### **2.2.2 Mastitis Bovina**

Se define como mastitis a una reacción inflamatoria de la glándula mamaria. La misma que produce cambios en el tejido glandular y una serie de variaciones en la composición bioquímica de la leche. La misma que puede desencadenarse por varios factores y esta puede volverse crónica e incluso provocar un deterioro del estado del animal (Calderón & Rodríguez, 2008).

### **2.2.3 Clasificación de la mastitis**

#### **2.2.3.1 Mastitis clínica**

Es una enfermedad muy compleja y por ello muy costosa, la misma que afectan en su mayoría a las industrias lácteas, su complejidad se debe a los numerosos y variados agentes patógenos que pueden causarla, la variedad y magnitud de la respuesta que puede producirse en el animal infectado, los múltiples factores que influyen. Los casos de mastitis clínica resultan fáciles de reconocer debido a las evidentes alteraciones que ocurren en la glándula mamaria y su secreción. Uno de

los cambios más precoces es el aumento en el número de células somáticas que normalmente es menor a 200.000 cél/ml y que durante el proceso inflamatorio supera las 500.000 cél/ml Este incremento es la base de muchos métodos de diagnóstico entre los cuales se encuentran el Recuento de Células Somáticas (Scaramelli & González, 2005).

### **2.2.3.2 Mastitis subclínica**

Esta se determina por el aumento de células somáticas y cambios físico-químicos que no son visibles; solamente se descubre mediante pruebas como la prueba de California Mastitis Test. Las mastitis Subclínica pueden convertirse en mastitis clínicas (agudas o crónicas), en ello consiste su importancia junto al peligro que representa para la vaca que va a provoca una baja producción de leche y aumento en el conteo de las células somáticas. Este tipo de mastitis no presenta signos en la ubre debido a que no se presentan cambios físicos en la leche generalmente pasa desapercibidos en ese tipo de mastitis (Mayberry, 2002).

### **2.2.3.3 Mastitis subclínica en vacas primerizas**

La afección de mastitis en novillas ha alcanzado altos niveles de pérdidas económicas y a su vez la reducción notoria de la producción de leche a medida que la ganadería se va extendiendo, al mismo tiempo que los bovinos son muy susceptibles a contraer infecciones intramamarias, desde novillas cuando se piensa que éstas están libres de infecciones intramamarias hasta vacas en etapa de producción que están más propensas a contraer la enfermedad, al mismo tiempo esto dependerá del grado de afección de los cuartos; así mismo para poder diagnosticar dicha afección, podemos realizar pruebas microbiológicas para poder determinar microorganismo que está causando la patología y poder ejecutar la toma de

decisiones correcta para su posterior tratamiento (Heikkila 2018); (Contreras, 2009); (Magandi Álvarez & Verónica Elizabeth, 2008).

Fox considera que el incremento del número de las células somáticas, puede estar ligadas con un evento de estrés; asimismo indica que por lo general toda vaca primeriza debe de estar libre a infecciones intramamarias, por lo que estos animales no han sido expuestos a ordeños múltiple, más no obstante cuando se hace referencia a la contaminación cruzada, la misma que puede darse mediante el proceso del ordeño; el mismo que está relacionado con el manejo que se realiza a los animales y su procedimiento durante el proceso, el mismo que puede ser causado por una mala higiene por parte del personal de trabajo, como también el desconocimiento del manejo de las máquinas de ordeño (Fox , 2009).

La mastitis subclínica en vaquillas tiene efecto significativo en las ganadería ya que provoca una baja en la secreción láctea y el deterioro de la misma; siendo así éste el punto de suma importancia debido a que la mayoría de la causas de la presencia de mastitis subclínica en vacas primerizas no son diagnosticadas apropiadamente (Calvinho & Tirante, 2005).

#### **2.2.4 Prueba química**

##### **3.1.1 2.2.4.1 California Mastitis Test (CMT)**

La prueba de mastitis de California (CMT), una medición cualitativa del recuento de células somáticas en la leche, es un método diagnóstico llevado a cabo ya sea en campo o laboratorio y la misma que se ha determinado como prueba rápida de campo detectando así los casos de mastitis subclínica, esta prueba nos da un estimado de células somáticas que contiene la leche, la prueba radica en un método indirecto el cual realiza la identificación de mastitis en cada cuartos mamarios; el mismo que se

realizar con toma de leche de cada cuarto mamario el mismo que se le agrega una cantidad Bromocresol al 0.5% y saponina (Nyman et al., 2007),(Arturo et al., 2014).

Una vez colocada la solución de CMT en cada división de la paleta se mueve con suavidad realizando movimientos circulatorios, esto se convierte en una solución viscosa en el caso de la presencia de células somáticas en gran cantidad; luego que se realiza el procedimiento se verifica mediante la tabla de CMT ( Velásquez & Jaime Vega, 2012).

<b>Grado de CMT</b>	<b>Rango de Células Somáticas</b>	<b>Interpretación</b>	<b>Tipo de reacción</b>
N (Negativo)	0 – 200,000	Cuarto Sano	Mezcla permanece líquida
T (Trazas)	200,000 – 400,000	Mastitis Subclínica	
1	400,000– 1,200,000	Mastitis Subclínica	Ligeramente viscosa
2	1,200,000-5,000,000	Infeción Seria	Mezcla viscosa
3	Más de 5,000,000	Infeción Seria	Viscosidad

Fuente: (Armenteros et al., 2002)

#### **2.2.4.2 Cultivos Microbiológicos**

Con respecto a los cultivos microbiológico se pueden sembrar las muestras de leche con varios los agares que se pueden utilizar como son: agar sangre, agar MacConkey y agar Orgy, los mismos que para su respectivo crecimiento deben de tener un tiempo adecuado para su multiplicación en el cual se incubara durante un tiempo de 18 a 24 horas (Calderón et al., 2011).

Los agares antes mencionados tienen una característica especial, la cual es la detección de bacterias Gram Positivas y Gram Negativas como por ejemplo los *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium* y

*Streptococcus*; de manera que la *Pseudomonas aeruginosa* ha causado pérdidas económicas por causa de infecciones intramamarias subclínicas en bovinos (Colorado et al., 2018)

Así mismo el agar MacConkey es un medio selectivo y diferencial para el aislamiento de bacterias Gram-Negativas y entéricas, este cultivo aporta nutrientes necesarios para el crecimiento bacteriano (Dickinson, 2014).

El agar MacConkey sirve como un indicador visual de pH, distinguiendo así las bacterias gram negativas que pueden fermentar la lactosa Lac+ *Escherichia coli*, *Enterobacter* y *Klebsiella* producen acidez, lo cual hace que baje el pH de 7,1 Lac- *Salmonella* (Neogen , 2017).

Las especies de *Pseudomonas aeruginosa* crecen en un medio de cultivo de MacConkey, por lo que también pueden crecer en otros medios de cultivos, como Factor y TKT Modificado (Universidad de Minnessota , 2013)

## **2.2.5 Agentes infeccioso que causa mastitis**

### **2.2.4.1 Pseudomona Aeruginosa**

Son microorganismos ambientales, las mismas que se caracterizan por ser bacterias oportunistas ocasionando elevadas pérdidas económicas. Es un bacilo móvil gram-negativo que pertenece a la familia de las *Pseudomonadaceae*, estas bacterias se caracterizan por tener forma de bastones delgados, rectos, con los extremos redondeados, con presencia de uno o más flagelos polares, no presentan cápsulas ni esporas, son aerobias, crecen de forma óptima a 37 °C e incluso pueden crecer a temperaturas de 4 - 42 °C. El tamaño de Pseudomona está entre 0.5 µm y 0.8 µm de espesor por 1.5 µm y 3.8 µm de largo. Está ampliamente distribuida en la naturaleza y se ha aislado a partir de diversas muestras biológicas y diferentes

superficies inorgánicas, son naturalmente resistentes a un gran número de antibióticos, lo cual ha permitido que cause un problema significativo (Fernandes et al., 2009),(Escobar, 2015).

#### **2.2.5.2 Otros microorganismos causales**

Existen varios microorganismos que pueden afectar al bienestar de los animales, especialmente a las vacas que se encuentran en los periodos de lactancias, los patógenos son: *Streptococcus agalactiae* , *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium bovis*, *Mycoplasma bovis* (Corbellini, 2011),(Ruiz Gil et al., 2016).

## 2.3 Marco legal

A principios de este siglo 21, la protección del bienestar de los animales es un tema nuevo y candente en la escena internacional. Debido a una creciente preocupación en la sociedad internacional, ahora es conveniente llegar a una base universalmente aceptada para regular las relaciones internacionales en la materia y abordar las cuestiones internacionales que aún no están resueltos, sobre todo en el marco de la Organización Mundial del Comercio (OMC)<sup>12</sup>. Con el fin de remediar a esta insostenible inseguridad en el derecho internacional, un instrumento global sería esencial para proporcionar la debida orientación para la protección del bienestar animal sobre una base uniforme y armonizada.

El proyecto de Ley Orgánica Bienestar Animal (LOBA), busca garantizar la convivencia en sociedades armónicas y funcionales, donde se respete el ejercicio de los derechos ciudadanos, de la naturaleza y los animales que la componen:

“Art. 3. Fines.- Son fines de la presente Ley:

- a. Promover el bienestar de los animales y su cuidado.
- b. Prevenir y reducir la violencia interpersonal, así como entre los seres humanos y los animales.
- c. Fomentar la protección, respeto y consideración hacia la vida animal.
- d. Implementar medidas preventivas y de reparación, y fortalecer el control de las acciones y omisiones que provoquen sufrimiento a los animales.
- e. Detener el incremento de la población de animales callejeros o abandonados y de los animales silvestres mantenidos en cautiverio.
- f. Erradicar y sancionar el maltrato, actos de crueldad, negligencia y degradación a los que son sometidos los animales (Bustos & Terán, 2018).

### 3. Materiales y métodos

#### 3.2 Enfoque de la investigación

- **Tipo de investigación**

Investigación de campo y laboratorio

La presente investigación fue de tipo descriptivo no experimental.

#### 3.3 Metodología

##### 3.3.1 Variables de estudio

Presencia de *Pseudomona Aeruginosa* en vacas primerizas.

##### 3.3.2 Variable dependiente

Vacas primerizas positivas a infección intramamaria subclínica por **Pseudomona Aeruginosa**

##### 3.2.1.2 Variable independiente

Raza, edad, alimentación, medidas de seguridad en el ordeño.

##### 3.2.1.3 Operacionalidad de las variables

Objetivos Específicos		Actividades Metodológicas	Denominación de la variable	Definición de la variable	Dimensión de la variable	Escala de la variable	Resultados Esperados
1	Identificar animales reactivos a prueba California Mastitis test.	Prueba de California mastitis test	Dependiente / cuantitativa	Prueba indirecta para establecer la respuesta inmunitaria de la glándula mamaria	Vacas primerizas	Trazas 1 2	Reacción positiva del CMT
2	Asociar según sus características fenotípicas de las colonias de enterobacterias.	Siembra de colonias	Dependiente / cuantitativa	Medio de cultivo de Agar – sangre - macconkey	# colonias / muestras leche	Numero de colonias	Colonias circundantes
3	Confirmar la presencia de <b><i>Pseudomona aeruginosa</i></b> mediante la técnica de Maldi-tof.	Aislamiento de <i>Pseudomona Aeruginosa</i>	Dependiente / cuantitativa	Maldi Tof para el aislamiento de <b><i>Pseudomona Aeruginosa</i></b>	Numero <b><i>Pseudomona Aeruginosa</i></b>	# de bacteria	Colonias de <i>Pseudomona Aeruginosa</i>

### 3.2.2 Tratamientos

#### 3.2.2.1 Población y Muestra

La población de estudio correspondió aproximadamente de 250 animales en ordeño, 135 estuvieron en el último tercio de lactancia, es decir fueron retiradas del ordeño, 95 estuvieron en el segundo tercio de lactancia y fueron multíparas, siendo así que las muestras fueron tomadas a 20 animales, ya que estas correspondieron a primer parto, el cual se aplicó un muestreo no probabilístico, dicho estudio fue realizado en la “Hcda. Pilar” ubicada en el Km 88 vía el Triunfo – Bucay.

#### 3.2.3 Criterios de Inclusión

Se eligieron solo novillas, en cualquier día de lactación, de 20 a 34 meses de edad, de cualquier raza, sanas al examen clínico, con presencia o ausencia de mastitis subclínica mediante CMT.

### **3.2.4 Recursos**

#### **3.2.4.1 Recursos bibliográficos**

Para la elaboración del marco teórico del presente trabajo de tesis se realizó la recopilación de contenidos de distintos medios bibliográficos como: Sitios web oficiales, libros, investigaciones científicas, revistas referentes al tema en estudio, tesis, revistas on line.

#### **3.2.4.2 Materiales y Equipos**

Se utilizó: Alcohol, mascarilla, esfero, cofia, lápiz, guantes, hielera, hielo, tablero, formato de encuestas, paletas para CMT, reactiva para CMT, agua limpia, toallas limpias.

### **3.2.5 Recursos Humanos**

- **DIRECTOR DE TESIS:**

Dr. Fabrizio Arcos Alcívar

- **INVESTIGADOR:**

Egda. Wendy Rocio Lima Carreño

- **DOCENTE ESTADÍSTICO:**

Ing. Rugel González David Octavio

### **3.3 Métodos y técnicas**

#### **Test de California Mastitis Test o CMT**

Se instaló la paleta de CMT a unos 7 cm de la ubre para posterior colocar una pequeña cantidad de leche de aproximadamente 2ml, posterior se vertió la misma cantidad de solución de CMT y se realizó movimientos circulares hasta mezclar totalmente el contenido, este procedimiento no duro más de 10 segundos, ya que si

nos pasamos del tiempo mencionado se pasa el efecto del aditivo. (Dingwell et al., 2003).

Se identificó cada pezón mediante la siguiente técnica:

- A. Cuarto derecho anterior
- B. Cuarto derecho posterior
- C. Cuarto izquierdo anterior
- D. Cuarto izquierdo posterior

Posterior se realizó la interpretación de manera rápida ya que su reacción visible desaparecerá en unos 20 segundos.

### **Siembra de colonias**

Calvinho y Rodríguez manifiestan que se debe de realizar la toma de muestras utilizando las medidas asépticas posibles que eviten contaminación que podría interferir con el diagnóstico de IIM. Los pezones sucios deben lavarse con agua y una toalla que contenga solución antiséptica. Luego deben ser secados con otra toalla descartable (Calvinho & Rafaela, 2005), (Rodríguez Pérez & Muñoz Ganoza, 2017).

Los materiales que se utilizaron para la toma de muestra fueron los siguientes: recipientes con tapa a rosca estéril, guantes, mascarilla, cofia, botas, alcohol, cooler, hielo, cinta, marcador, cuaderno, bolígrafo.

Las tomas de muestras fueron tomadas en el primero ordeño que fue realizado a las dos de la madrugada se procedió a la eliminación de los primeros chorros de dos a tres chorros de leche y se colocaron en el recipiente en posición firme. El pezón se llevó igualmente a una posición oblicua y se envió el chorro de leche dentro del recipiente, la recolección de la misma se hizo en cantidades de 3 a 4 ml de leche, todas las muestras una vez recolectadas se identificaron y pasaron al cooler donde se las conservo a una temperatura aproximada de 5°C hasta su análisis, una vez

llegadas las muestras al laboratorio se procedió a la siembra y aislamiento de bacterias en sus respectivas cajas de Petri con todas las medidas específicas para evitar que las muestras tenga márgenes de error, se colecto la muestra solida con la ayuda de asa bacteriológica la misma que se coloca en la caja Petri, la misma que ya contiene su respectivo agar, se utilizó el tipo de rallado en la placa llamado estría continua, posterior a este procedimiento se realizó el cerrado y la identificación de las cajas; todas las muestras permanecieron en un ambiente adecuado de 37 grados centígrados y perduraron por el lapso de 18 a 24 horas para su crecimiento (Vilchez, 2010),

### **3.2.5.3 Prueba Maldi-tof Espectrometría de masas**

En cuanto se refiere a la identificación de microorganismo patógenos se han realizado tradicionalmente por métodos basados en tinciones que permiten la clasificación de la morfología microscópica con el fin de tomar medidas diagnósticas y terapéuticas lo más rápido posible sin embargo, estos métodos fenotípicos tienen limitaciones con su procesos metabólicos de los microorganismos, ya que los mismos necesidad de un cultivo con crecimiento adecuado y tiempos exactos de incubación para alcanzar un resultado adecuado, reconociendo que en la actualidad se han implementado pruebas alternativas que han ayudado de una manera rápida y eficaz a facilitar el diagnóstico clínico; la prueba con mayor confiabilidad Maldi-Tof MS (matrix assisted laser desortion ionization – time of flight – mass spectrometry) (Maldonado et al., 2011).

La espectrofotometría de masas consta de tres componentes prácticos los cuales son:

- El espectrómetro fue capaz de vaporizar sustancia volatilidades y originar iones a partir de las moléculas neutras en fase gaseosa.

- El espectrómetro separó los iones con relación masa/carga.
- Finalmente una vez que ya fueron separados los iones, el espectrómetro fue capaz de detectar los iones formados y posterior registrados de forma adecuada, para esta dicha prueba se utilizaron cultivos del microorganismos, las mismas que fueron depositadas directamente en una placa conductoras metálica, se puso una solución saturada de compuestos orgánicos, lo que hizo que cuando se secó realizo un efecto de cristalización, posteriormente se colocaron dentro de la matriz y se ubicaron en el espectrómetro de masas; interiormente de la matriz las colonias se esparcieron con pulsos cortos de rayos laser (Unidad de Espectrometría de Masas, 2014) (Barcelona, 2019)

El desarrollo interactivo entre fotones y moléculas laser causaron una reacción desencadenante en una sublimación de la matriz en una fase gaseosa, seguida por la ionización de la muestra del microorganismo con mínima fragmentación lo que al ionizarse las proteínas son aceleradas a través de un campo electrostático y luego fueron expulsadas en un tubo de vuelo al vacío donde se separaron en función de su velocidad o tiempo de vuelo, llegando finalmente al detector de masas que genero la información adecuada de la composición del microorganismo mediante un espectro de picos, frente a su relación masa/carga, una vez generado, el perfil espectral del microorganismo de prueba fue comparado automáticamente mediante un programa informático con una base de datos de espectros que fue construida a partir de cepas de referencia, permitiendo así la identificación del microorganismo (García et al., 2012).

#### **3.2.4 Análisis estadístico**

Los datos serán analizados mediante estadística descriptiva, donde se expresa de manera porcentual del análisis correspondiente. La información fue plasmada en tablas. Se utilizó prueba de Chí cuadrado para relacionar las variables de estudio.

## 4 Resultados

### 4.1 Identificación de los animales reactivos a prueba California Mastitis test.

**Tabla 1 Casos positivos a infecciones intramamarias subclínicas concluyentes por prueba de CMT.**

	IIM/CMT	Porcentajes	Cruza	Sistema de manejo	Tipo de Ordeño	Alimentación
Positivo	15	75	Girolando	Semiintensivo	Mecánico	Mixta
Negativo	5	25	Jersey			
TOTAL	20	100%				

(**Autor:** Egda. Wendy Rocio Lima Carreño; **Fuente:** Investigación de Campo)

En la tabla 1 se describe a la población de estudio, 20 vacas primíparas en la cual se describe su cruzamiento Girolando en la mayoría y Jersey en la cual no hubieron casos positivos en ese grupo, el manejo se basa en pastoreo y suplementación balanceado en el momento del ordeño, la infección intramamaria en grado 2 fue detectado en primerizas como se había mencionado distribuido en 15 positivos (75%) y 5 casos negativos (25%).

**Tabla 2 Infección intramamaria según los días post parto**

Días Post – Parto	IIM	
	Negativo	Positivo
20		2
35		1
40	1	
44		1
45	2	
50		1
55		2
60		1
62	2	
70		2
75		2
90		1
96		2
	<b>5</b>	<b>15</b>

(**Autor:** Egda. Wendy Rocio Lima Carreño; **Fuente:** Investigación de Campo)

La tabla 2 muestra las infecciones intramamarias de grado 2 en primerizas en los primeros 100 días en lactancia, la distribución de los casos positivos en los primeros 50 días con 5 primerizas y en los otros días posteriores con 10 vacas.

## 4.2 Características fenotípicas de colonias de enterobacterias.

**Tabla 3 Descripción fenotípicas de colonias de enterobacterias.**

Bacterias	Forma	Color	Borde	Elevación
Escherichia Coli	Puntiforme circular	Blanco transparente	Entero	Convexa
Klebsiella Pneumoniae	Cocobacilar u ovoide	Rosa intenso	Rugoso	Convexa
Staphylococcus Epidermidis	Esférica	Gris o blanco grisáceo	Liso	Convexa
Pseudomona Aeruginosa	Elíptica	Brillante metálico	Irregulares	Convexa
Enterococcus Hirae	Cocobacilar u ovoide	Opacas	Irregulares	Convexa
Staphylococcus Aureus	Ameboide	Amarillo opaco	Ondulado	Convexa
Enterococcus Faecalis	Cocobacilar u ovoide	Opacas y blancas	Irregulares	Convexa
Staphylococcus Haemolyticus	Coco	Blanco crema	Liso	Convexa
Proteus Mirabilis	Ubicuos	Beige	Irregular	Convexa

(**Autor:** Egda. Wendy Rocio Lima Carreño; **Fuente:** Investigación de Campo)

En la presente tabla se muestra la descripción fenotípica de las bacterias que circulan en el hato, describiendo así su forma, color, borde y elevación los mismos que pudieron ser descritos por medio del tipo de agar (sangre – macconkey) que se utilizaron para su estudio mediante la técnica de MALDI-TOF.

**Tabla 4 Descripción de la asociación fenotípica de las colonias bacterianas**

<b>Bacterias</b>	<b>Forma</b>	<b>Color</b>	<b>Borde</b>	<b>Elevación</b>	<b>Maldi tof</b>
Escherichia Coli	Puntiforme circular	Blanco transpa	Entero	Convexa	Positiva
Klebsiella Pneumoniae	Cocobacilar u ovoide	Rosa intenso	Rugoso	Convexa	Positiva
Staphy Epidermidis	Esférica	Gris o blanco	Liso	Convexa	Positiva
Pseudomona Aeruginosa	Elíptica	Brillante metálico	Irregulares	Convexa	Positiva
Enterococcus Hirae	Cocobacilar u ovoide	Opacas	Irregulares	Convexa	Positiva
Staphylococcus Aureus	Ameboide	Amarillo opaco	Ondulado	Convexa	Positiva
Enterococcus Faecalis	Cocobacilar u ovoide	Opacas y blancas	Irregulares	Convexa	Positiva
Staphylococcus Haemolyticus	Coco	Blanco crema	Liso	Convexa	Positiva
Proteus Mirabilis	Ubicuos	Beige	Irregular	Convexa	Positiva

(**Autor:** Egda. Wendy Rocio Lima Carreño; **Fuente:** Investigación de laboratorio)

Se realizó la asociación fenotípica mediante metodología Chi Cuadrado de todas las bacterias con los resultados obtenidos mediante las muestras de laboratorio Maldi Tof, este proceso se lo realizó en el software estadístico Infostat, el cual determino que las variables fenotípicas de las bacterias no estas asociadas con los resultados en las pruebas Maldi Tof, es decir existe independencia entre las formas de las bacterias y sus resultados en el laboratorio.

Como se evidencia en los resultados el valor de  $P = 0.23 > 0.05$  se deduce que no hay suficiente evidencia para concluir que las variables están asociadas.

#### 4.3 Presencia de *Pseudomona aeruginosa* mediante la técnica de Maldi-tof.

**Tabla 5 Presencia de *Pseudomona aeruginosa* en las muestras analizadas mediante la prueba de laboratorio Maldi-tof.**

Diagnóstico	CMT	Maldi -Tof <i>Pseudomona aeruginosa</i>	%
Positivo	15	3	15%
Negativo	5	17	85%
<b>TOTAL</b>	20	20	100%

(**Autor:** Egda. Wendy Rocío Lima Carreño; **Fuente:** Investigación de laboratorio)

En la tabla 5 muestra la infección intramamaria grado 2 en vacas primerizas (15/20) comparando con los resultados del Maldi tof para *Pseudomona aureginosa*. (3/15)

Se realizó el análisis Chi Cuadrado mediante las muestras de CMT y pruebas de laboratorio Maldit Tof, este proceso se lo ejecutó analíticamente, el cual determinó que el valor de  $P = 27.2726 > 7.879$  es decir no existe asociación en las variables y no se puede rechazar la hipótesis.

**Tabla 6 Microorganismos aislados en muestras de vacas primíparas.**

<b>Microorganismo</b>	<b>Porcentajes por vacas</b>
Staphylococcus Aureus	50% (10/20)
Staphylococcus epidermidis	45% (9/20)
Escherichia Coli	40% (8/20)
Enterococcus Hirae	35% (7/20)
Klebsiella Pneumoniae	15% (3/20)
Pseudomona Aeruginosa	15% (3/20)
Enterococcus Faecalis	10% (2/20)
Staphylococcus Haemolyticus	5% (1/20)
Proteus Mirabilis	5% (1/20)

(**Autor:** Egda. Wendy Rocio Lima Carreño; **Fuente:** Investigación de Laboratorio)

En la tabla 6 se muestra los microorganismos de muestras de vacas primíparas positivas a infección intramamaria grado 2 en los primeros 100 días en lactancia, en la mayoría asociados, enteropatógenos y estafilococos coagulasa negativa, pero la proporción mayoritaria fue distribuida **Staphylococcus Aureus Staphylococcus Epidermidis, Escherichia Coli, Enterococcus Hirae** con 50%, 45% 40% y 35% respectivamente.

## 5. Discusión

Este trabajo de investigación pretendió identificar los microorganismos que circulan en el predio con énfasis en *Pseudomonas aeruginosa*, por los factores ambientales y de manejo que se da en la hacienda, la infección intramamaria durante el ordeño en el momento de reutilizar las toallas en varias vacas y después del ordeño en la cual las vacas contaminan sus ubres como factores relevantes observados durante el estudio, y además se quería conocer el status microbiológico de la ubre en las vacas primíparas utilizando la prueba estándar CMT, tomando como caso positivo de Traza, el mismo que se obtuvo como resultado 15 animales positivos de 20 muestreados, representado el 75% de positivas. No se realizó el CMT a todo el rebaño por no interrumpir con la rutina de ordeño y no era parte de los objetivos establecer la prevalencia del mismo pero a continuación se proporciona el dato de un trabajo realizado en Caimito Provincia Artemisa, Cuba se realizó un análisis de infecciones intramamaria subclínicas mediante la prueba de California Mastitis test, se encontró un elevado porcentaje de vacas positivas en el rebaño 60 %. Asimismo coincide con Arturo que una de la principal ventaja de realizar la prueba de CMT, que es fácil, económica y que en estados subclínicos de la enfermedad la anormalidad en la leche solo puede ser identificada por medio de esta prueba (Arturo et al., 2014) comparando con este trabajo la aplicación del CMT no es tan fácil como indica la literatura por que interrumpe la rutina de ordeño e incrementa el estrés por manejo, pero si es una técnica económica y ayuda a evaluar tratamientos o para seleccionar vacas para realizar un cultivo microbiano y antibiograma.

Todos los animales muestreados presentaban su estado de salud normal, ninguna se evidencia con inflamación de la ubre, enrojecimiento ni dolor y al momento de la

recolección de las muestras la leche aparentemente se presentaba en estado normal, comparado con otros trabajos se presenta porcentajes muy variables, realizado en la Habana Cuba en el cual el objeto de estudio fueron vacas Holstein de primer parto, el mismo que dio como resultado un 53 %, esto nos indica que aun en ganaderías con mayor tecnología se puede diseminar la enfermedad, si no se realiza un manejo adecuado de todos los animales, es por ello la importancia de una buena rutina de ordeño y de manejo preventivo. Por otra parte un estudio realizado en Colombia, Municipio de Sincé presentó resultados similares a los de Calderón, donde se encontró el 56 % de mastitis subclínica. (Calderón et al., 2011). Del mismo modo según los resultados encontrados en la Hacienda Pilar mediante la prueba de CMT son muy parecidos con los obtenidos por Corbellini el cual realizó un estudio de mastitis subclínica en vacas sometidas a ordeño mecánico, en la localidad de Pernambuco Brasil, cuyo resultado fue 69%, comparable con nuestro estudio por lo que las vacas evaluadas en esta investigación son de ordeño mecánico, por posible error en la rutina de ordeño según el operario, falta de mantenimiento de la línea de ordeño o por infecciones ambientales entre ordeño. Así mismo lo reportado por Neogen es mucho mayor en una lechería especializada de Mérida, Venezuela el cual reportó el 77% mastitis subclínica (Neogen, 2017) & (Corbellini, 2011).

Si bien es cierto que la mastitis bovina es causada por una variedad de agentes patógenos, incluidos los grampositivos y bacterias gramnegativas, Micoplasma, hongos y algas; aunque la mastitis subclínica debido a ***Pseudomonas aeruginosa*** es infrecuente, pero muy peligrosa ya que es generalmente resistente a muchos antibióticos, y esta representa al menos del 1% de las infecciones por mastitis en vacas lecheras, la mastitis clínica en rebaños lecheros es a menudo grave, ya que causa gangrena y mortalidades elevadas (Kawai, 2017) va en concordancia con dicho

estudio por el porcentaje obtenido en la hacienda Pilar es muy bajo en lo que respecta a *P. aeruginosa*.

En la hacienda pilar existen casos clínicos muy frecuentes por semana (2-3), así como también el uso de antibiótico sin previo análisis de laboratorio posiblemente sea otro factor de transmisión al mantener esas vacas recurrentes o con infección crónica. Así como muestra el estudio realizado en Cuba donde mencionan que la reinfección en los animales generalmente requiere sacrificio ya que la patología se vuelve crónica.

Mediante el análisis de las muestras de laboratorio se pudo identificar los agentes causales que están afectando en la ganadería los cuales fueron *Staphylococcus Epidermidis* (50%), *Escherichia coli* (45%), *Staphylococcus aureus* (35%), *Klebsiella Pneumoniae* (15%), *Pseudomona aeruginosa* (15%), *Enterococcus Hirae* (15%), *Enterococcus faecalis* (10%), *Staphylococcus Haemolyticus* (5%), *Proteus Mirabilis* (5%). De igual manera en un estudio realizado en Colombia arrojo resultados parecidos a los cuales fueron *Escherichia coli* 40%, *Staphylococcus intermedius* 20%, *Streptococcus dysgalactiae* 20%, *Staphylococcus aureus* 10%, *Pseudomonas sp* 5% y *Klebsiella pneumoniae* 5%, al mismo tiempo que los factores asociados como fallas en las buenas prácticas de Ordeño, el desconocimiento de la enfermedad y el mal uso de Antibióticos para prevenir o curar la infección (Gómez et al., 2015).

Mediante el estudio realizado, el incremento de mastitis debido a muchos microorganismos que circulan en el ambiente y el peligro que estos causan están asociados a las grandes pérdidas económicas en la hacienda, las mismas que han aumentado significativamente, es por eso que mediante el cultivo agar sangre y McConkey se realizó el aislamiento de las bacterias en el laboratorio y confirmados por Maldi tof esas colonias, los microorganismos más frecuentes fueron:

*Staphylococcus Epidermidis* (50%), *Escherichia coli* (45%), *Staphylococcus aureus* (35%). Por ello coincido con Escobar ya que obtuvieron similares resultados correspondientes a los siguientes agentes patológicos *Streptococcus agalactiae* (75%), *Streptococcus dysgalactiae* (50%), *Staphylococcus Aureus* (46%), *Streptococcus agalactiae* (30%), *Staphylococcus Epidermidis* (30%) (Escobar, 2015).

En la hacienda Pilar existen 250 animales en ordeño las cuales al examen clínico se encuentran en buenas condiciones de salud, lo cual según los resultados obtenidos mediante el laboratorio podemos mencionar que la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* en las muestras de leche no indica un alto nivel de contagio por esta bacteria, ya que sólo 3 de las 20 muestras recolectadas concordando con el trabajo de Mendoza reportó *Pseudomona aeruginosa* representado por el 1% de la prevalencia del rebaño.

## 6. Conclusión

- Se rechaza la hipótesis de que la mayoría de las infecciones intramamarias son causadas por *Pseudomona aeruginosa*.
- Los factores predisponentes en base a los resultados fueron los ambientales y errores en el protocolo de ordeño.
- La aparición de mastitis subclínica en vacas primíparas es una realidad.

## 7. Recomendaciones

Una vez realizado este estudio en la “Hacienda Pilar” y presentado las conclusiones pertinentes acerca del comportamiento de la mastitis subclínica, se definieron las siguientes recomendaciones:

- Realizar CMT y cultivos microbianos con sus respectivos antibiogramas para evaluar tratamientos y productos utilizados en el secado.
- Mejorar la higiene de las ubres a través de corrales de descanso limpios para reducir el uso de agua para su respectivo lavado antes del ordeño.
- El mantenimiento de las máquinas de ordeño debería ser continuo.
- Identificar y descartar a las vacas crónicas, recurrentes y positivas a ***Estafilococos aureus*** predisponentes a que otros agentes microbianos infecten como la ***Pseudomona***.

## 8. Bibliografía

- Aguilar, F., Fukoda, Y., Ludeña, I., Ludeña, F., & NAKAI, Y. (2018). Prevalence and etiology of mastitis in dairy cattle in El Oro Province, Ecuador. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 861 - 868.
- Ana Manjarrez López, Soledad Zarco, & Félix Salazar. (2011). Identificación de biotipos de *Staphylococcus aureus* en vacas lecheras de producción familiar con mastitis subclínica en la región centro-este del Estado de México. 2010. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-11242012000200008](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11242012000200008)
- Apaza, J. M., & Condemayta, Z. C. (2013). Contaminación bacteriológica en factores en el proceso de ordeño de leche cip chuquibambilla. *Revista Investigaciones Altoandinas*, 15(2), 233-239.
- Armenteros, M., Peñaltilde, J., Pulido, J. L., & Linares, E. (2002, mayo 1). *Caracterización de la situación de la mastitis bovina en rebaños de lechería especializada en Cuba*. *Revista de Salud Animal*. <https://link.galegroup.com/apps/doc/A146893303/AONE?sid=lms>
- Arturo, A. A., Jacinto, B. P., Eulogio, P. B., Alfonso, A. F., & Pablo, T. M. (2014). Prevalencia de mastitis subclínica en la región ciénega del estado de Jalisco. *Abanico Veterinario*, 4(1), 24-31.
- Atzel Candido Acosta, Silva, L. B. G. da, Elizabeth Sampaio Medeiros, Pinheiro-Júnior, José Wilton, & Rinaldo Aparecido Mota. (2016). Mastites em ruminantes no Brasil. *Google Docs*, 540.
- Barcelona, U. A. de. (2019). *Aplicación de Maldi-Tof para la identificación de patógenos causantes de mastitis en vacas lecheras*. UAB Divulga Barcelona Investigación e Innovación. <http://www.uab.cat/web/detalle-noticia/aplicacion->

de-maldi-tof-para-la-identificacion-de-patogenos-causantes-de-mastitis-en-vacas-lecheras-1345680342040.html?noticiaid=1345786817585

- Bedolla, C. C., Castañeda, V. H., & Wolter, W. (2007). Métodos de detección de la mastitis bovina (Methods of detection of the bovine mastitis). *REDVET*. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=DJ2012036579>
- Bustos, M. B. H., & Terán, V. M. F. (2018). La Ley Orgánica de Bienestar Animal (LOBA) en Ecuador: Análisis jurídico. *Derecho Animal. Forum of Animal Law Studies*, 9(3), 108-126. <https://doi.org/10.5565/rev/da.328>
- Calderón, A., & Rodríguez, V. C. R. (2008). Prevalencia de mastitis bovina y su etiología infecciosa en sistemas especializados en producción de leche en el altiplano cundiboyacense (Colombia). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 21(4), 5.
- Carillo, A. C., Estepa, C., Lizarazo, J. H., & Villate, J. P. S. (2007). Identificación de bacterias causantes de Mastitis bovina y su resistencia ante algunos antibacterianos. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 10(1), 81-91.
- Calvinho, L., & Tirante, L. (2005). Prevalencia de microorganismos patógenos de mastitis bovina y evolución del estado de salud de la glándula mamaria en Argentina en los últimos 25 años. *Revista FAVE - Ciencias Veterinaria*, 34 - 40.
- Carlomagno Velásquez, & Jaime Vega. (2012). Calidad de la leche y mastitis subclínica en establos de la provincia de Huaura, Lima. 2011, *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 65-71.
- Cerón Muñoz, M. F., Agudelo Gómez, E. J., & Maldonado Estrada, J. G. (2007). 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). *instname: Universidad de Antioquia.*  
<http://bibliotecadigital.udea.edu.co/dspace/handle/10495/8326>
- Contreras, G. A. (2009). Alternativas en el manejo de la mastitis en novillas. *Revista MVZ Córdoba.* <https://doi.org/10.21897/rmvz.373>
- Colorado , J., Echeverria , J., Oliveira , M., & Lopez , A. (2018). *Microorganisms isolated in bacteriological culture from milk samples from clinically healthy holstein cows.* Obtenido de Redalyc:  
<https://www.redalyc.org/jatsRepo/3214/321457137004/html/index.html>
- Corbellini, C. (2011). LA MASTITIS BOVINA Y SU IMPACTO SOBRE LA CALIDAD DE LA LECHE. *Instituto nacional de tecnologia agropecuaria*, 1-2.
- Dickinson, B. (2014). *BD MacConkey II Agrar " Instrucciones de uso medios en placa listo para usar.* Heidelberg - Alemania: Becton Dickinson GmbH.
- Dingwell, R. T., Leslie, K. E., Schukken, Y. H., Sargeant, J. M., & Timms, L. L. (2003). Evaluation of the California mastitis test to detect an intramammary infection with a major pathogen in early lactation dairy cows. *The Canadian Veterinary Journal*, 44(5), 413-416.
- Escobar, N. (2015). Mecanismos evolutivos que generan resistencia bacteriana en los sistemas de producción ganaderos. *Ciencias agropecuarias*, 1(2).  
<https://doi.org/10.36436/24223484.236>
- Fernandes, M. C., Ribeiro, M. G., Siqueira, A. K., Salerno, T., Lara, G. H. B., & Listoni, F. J. P. (2009). Surto de mastite bovina causada por linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes aos antimicrobianos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 61(3), 745-748.  
<https://doi.org/10.1590/S0102-09352009000300031>

- Fox , L. (2009). *Prevalence, incidence and risk factor of heifer mastitis* . Obtenido de Pubmed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/189330610>
- García, N. B., & Requelme, N. de J. (2011). Buenas prácticas de ordeño y la calidad higiénica de la leche en el Ecuador. *La Granja*, 14(2), 45-57. <https://doi.org/10.17163/lgr.n14.2011.04>
- Gómez-Quispe, O. E., Santivañez-Ballón, C. S., Arauco-Villar, F., Espezua-Flores, O. H., & Manrique-Meza, J. (2015). Criterios de interpretación para California Mastitis Test en el diagnóstico de mastitis subclínica en bovinos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 26(1), 86-95. <https://doi.org/10.15381/rivep.v26i1.10912>
- Heikkila, A. M., Liski, E., Pyorala, S., & Taponen, S. (2018). Pathogen-specific production losses in bovine mastitis. *American Dairy Science Association*, 1-12.
- Magandi Álvarez, & Verónica Elizabeth. (2008). *Determinación de mastitis subclínica en vacas lecheras por medio del recuento de células somáticas en el tanque*. [Bachelor, Universidad de El Salvador]. <http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/1645>.
- Manjarrez López, A. M. (2012). Identificación de biotipos de *Staphylococcus aureus* en vacas lecheras de producción familiar con mastitis subclínica en la región centro-este del Estado de México. . *Rev. mex. de cienc. pecuarias vol.3 no.2 Mérida*, 265-274. Obtenido de Identificación de biotipos de *Staphylococcus aureus* en vacas lecheras de producción familiar con mastitis subclínica en la región centro-este del Estado de México.
- Mayberry. (2002). *Coloración Gram*. *East Tennessee State University USA*. [www.microbelibrary.org/ASMOOnly/details.asp?id=1095&lang=Spanish](http://www.microbelibrary.org/ASMOOnly/details.asp?id=1095&lang=Spanish). <http://192.188.49.17/jspui/handle/123456789/5389>.

- 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>
- Mellenberger, R. (2004). Hoja de Información de la Prueba de Mastitis California (CMT). *Depto. de Ciencia Animal*, 4.
- Mera Andrade, M. E. (2017). Bovine mastitis and its impact on milk quality. *Revista electrónica de Veterinaria - ISSN 1695-7504*, 1-16.
- Mitchel, I., & Oliver, S. (1983). Intramammary infections in primigravid heifers near parturition. *Dairy Sci.* 66:1180-1183.
- Mundo, E. T.-N. del E. y del. (2014, octubre 18). *La producción lechera en Ecuador genera \$ 1.600 millones en ventas anuales (Infografía)*. El Telégrafo - Noticias del Ecuador y del mundo. <http://www.eltelegrafo.com.ec/noticias/economia/8/la-produccion-lechera-en-ecuador-genera-1-600-millones-en-ventas-anuales-infografia>
- Naqvi, A., & Dufour, S. (2017). Udder health in Canadian dairy heifers during early lactation. *Journal of Dairy Science Home*, 28.
- Neogen (2017).Obtenido de Agar MacConkey. CS: <https://foodsafety.neogen.com/sp/macconkey-agar-cs>
- Nyman et al. (2007). Risk factors associated with the incidence of veterinary-treated clinical mastitis in Swedish dairy herds with a high milk yield and a low prevalence of subclinical mastitis. *Preventive veterinary medicine*, 142-170.
- Patricia García, Fidel Allende, Paulette Legarraga, Marcos Huilcaman y Sandra Solari. (2012). *Identificación bacteriana basada en el espectro de masas de proteínas:*

*Una nueva mirada a la microbiología del siglo XXI. Rev. chil. infectol. vol.29 no.3 Santiago. [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0716-10182012000300003&script=sci\\_arttext&tlng=e](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0716-10182012000300003&script=sci_arttext&tlng=e)*

Paz-Zarza, V. M., Mangwani-Mordani, S., Martínez-Maldonado, A., Álvarez-Hernández, D., Solano-Gálvez, S. G., Vázquez-López, R., Paz-Zarza, V. M., Mangwani-Mordani, S., Martínez-Maldonado, A., Álvarez-Hernández, D., Solano-Gálvez, S. G., & Vázquez-López, R. (2019). *Pseudomonas aeruginosa: Patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. Revista chilena de infectología, 36(2), 180-189. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182019000200180>*

Rangel, A. C., Rodríguez, V. C. R., Bernate, A., & Velilla, S. M. (2010). *Prevalência de mastite bovina nos sistemas dupla aptidão no município de Montería, (Colômbia): Etiologia infecciosa e susceptibilidade antibacteriana. 11.*

Riera-Nieves, M., Rodríguez-Márquez, J. M., Perozo-Prieto, E., & Rizzi, R. (2005). *Caracterización morfométrica de los pezones en vacas carora. 9.*

Rodríguez Pérez, R., & Muñoz Ganoza, E. (2017). Frecuencia y susceptibilidad antimicrobiana de bacterias causantes de mastitis en bovinos de un establo de Trujillo, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, 28(4), 994-1001. <https://doi.org/10.15381/rivep.v28i4.13874>*

Ruiz Gil, A. K., Peña Rodríguez, J., & Remón Díaz, D. (2016). Mastitis bovina en Cuba. Artículo de revisión. *Revista de Producción Animal, 28(2-3), 39-50.*

Scaramelli, A., & González, Z. (2005). *Prevención y control de la mastitis bovina. 5.*

Universidad de Minnessota . (2013). *Guia de Usuario "El Sistema de Cultivo Facil". Estados Unidos\*: Universidad de Minnesota.*

*Unidad de Espectrometría de Masas. Servicios Técnicos de Investigación.* (2014).

<https://sstti.ua.es/es/instrumentacion-cientifica/unidad-de-espectrometria-de-masas.html>

Véronique Fauteux, Roy, J.-P., Daniel T. Scholl, & Émile Bouchard. (2014).

Benchmarks for evaluation and comparison of udder health status using monthly individual somatic cell count. 2013.

[https://drive.google.com/file/d/1925P3nAScOPRyX4kVzM-XY-tHrYqS0BH/view?usp=drive\\_web&usp=embed\\_facebook](https://drive.google.com/file/d/1925P3nAScOPRyX4kVzM-XY-tHrYqS0BH/view?usp=drive_web&usp=embed_facebook)

Vilchez. (2010). *Manual de prácticas de microbiología aplicada.*

<https://es.slideshare.net/Prymer/gua-micro-aplicada>

Vliegheer, Fox, Pieper, Dougallm, Barkema. (2010). *Invited review: Mastitis in dairy*

*heifers: Nature of the disease, potential impact, prevention, and control—*

*Journal of Dairy Science.* [https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(12)00062-8/fulltext)

[0302\(12\)00062-8/fulltext](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(12)00062-8/fulltext)

## 9 Anexos

**Anexo 1 Identificación de vacas primerizas de la Hacienda “Pilar” que van a ser sujeto de estudio ingresando a la sala de ordeño.**



**Autora:** Lima, 2020.; **Fuente:** Investigación de Campo

**Anexo 2 Área de ordeño mecánico sala número 1.**



**Autora:** Lima, 2020.; **Fuente:** Investigación de Campo

**Anexo 3 Sala de ordeño número 2.**



**Autora:** Lima, 2020.; **Fuente:** Investigación de Campo

**Anexo 4 Sala de ordeño número 3.**



**Autora:** Lima, 2020.; **Fuente:** Investigación de Campo

**Anexo 5 Toma de muestra para su posterior análisis.**



**Autora:** Lima, 2020.; **Fuente:** Investigación de Campo

**Anexo 6 Identificación de todas las muestras para su traslado hacia el laboratorio.**



**Autora:** Lima, 2020.; **Fuente:** Investigación de Campo

## Anexo 7 Análisis de CMT



**Autora:** Lima, 2020.; **Fuente:** Investigación de Campo

## Anexo 8 Aplicación de reactivo CMT para el análisis de nuestras de campo.



**Autora:** Lima, 2020.; **Fuente:** Investigación de Campo

**Anexo 9 Adecuación de todas las muestras para su traslado hacia el laboratorio.**



**Autora:** Lima, 2020.; **Fuente:** Investigación de Campo

**Anexo 10 Muestras en caja de Petri para su crecimiento**



**Autora:** Lima, 2020.; **Fuente:** Investigación de Laboratorio

## Anexo 11 resultados de Chí cuadrado mediante la plataforma Infostat

Frecuencias absolutas															
En columnas: BACTERIA															
FORMA	COLOR	BORDE	ELEVACION	MALDI	TOF	E.Coli	Enterococcus F.	Enterococcus E.	Klebsiella F.	Proteus M.	Pseudomona A.	Staphy E.	Staphylococcus A.	Staphylococcus E.	Total
Elíptica	Brillante metálico	Irregulares	Convexa	3		0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
Esférica	Grís o blanco	Liso	Convexa	10		0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
Ubicuos	Beige	Irregular	Convexa	1		0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
Ameboide	Amarillo opaco	Ondulado	Convexa	7		0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Coco	Blanco crema	Liso	Convexa	1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Cocobacilar u ovoide	Opacas	Irregulares	Convexa	3		0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
Cocobacilar u ovoide	Rosa intenso	Rugoso	Convexa	3		0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
Cocobacilar u ovoide	Opacas y blancas	Irregulares	Convexa	2		0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Puntiforme circular	Blanco transpa	Entero	Convexa	9		1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Total	Total	Total	Total	Total	Total	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9

Frecuencias esperadas bajo independencia															
En columnas: BACTERIA															
FORMA	COLOR	BORDE	ELEVACION	MALDI	TOF	E.Coli	Enterococcus F.	Enterococcus E.	Klebsiella F.	Proteus M.	Pseudomona A.	Staphy E.	Staphylococcus A.	Staphylococcus E.	Total
Elíptica	Brillante metálico	Irregulares	Convexa	3		0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	1.00
Esférica	Grís o blanco	Liso	Convexa	10		0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	1.00
Ubicuos	Beige	Irregular	Convexa	1		0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	1.00
Ameboide	Amarillo opaco	Ondulado	Convexa	7		0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	1.00
Coco	Blanco crema	Liso	Convexa	1		0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	1.00
Cocobacilar u ovoide	Opacas	Irregulares	Convexa	3		0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	1.00
Cocobacilar u ovoide	Rosa intenso	Rugoso	Convexa	3		0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	1.00
Cocobacilar u ovoide	Opacas y blancas	Irregulares	Convexa	2		0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	1.00
Puntiforme circular	Blanco transpa	Entero	Convexa	9		0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	1.00
Total	Total	Total	Total	Total	Total	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	9.00

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	72.00	64	0.2303
Chi Cuadrado MV-G2	39.55	64	0.9930
Coef. Conting. Cramer	0.94		
Kappa (Cohen)	-0.13		
Coef. Conting. Pearson	0.94		

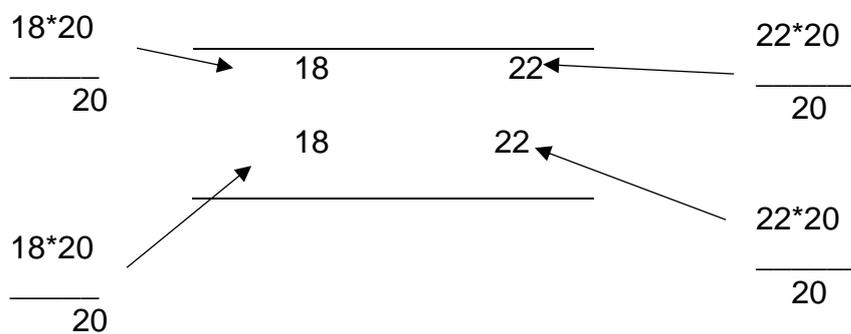
**Autora:** Lima, 2020.; **Fuente:** Investigación de Laboratorio

**Anexo 12 Análisis de CMT y muestras de laboratorio mediante prueba Chi Cuadrado.**

	Positivo	Negativo	Total
Cultivo – Maldi - Tof <i>Pseudomona aeruginosa</i>	3	17	20
IIM/CMT	15	5	20
<b>TOTAL</b>	18	22	20

(Autor: Egda. Wendy Rocio Lima Carreño; Fuente: Investigación

**Resultados Chi Cuadrado**



**Tabla de valores observados**

3	17
15	5

**Tabla de valores esperados**

18	22
18	22

$$X^2 = \sum (f_o - f_e)^2 / f_e$$

$$X^2 = \frac{(3 - 18)^2}{18} + \frac{(17 - 22)^2}{22} + \frac{(15 - 18)^2}{18} + \frac{(5 - 22)^2}{22}$$

$$X^2 = 12.5 + 1.1363 + 0.5 + 13.1363 = \mathbf{27.2726}$$

**Grado de libertad:**

$$V = (\text{cantidad de filas} - 1) (\text{cantidad de columnas} - 1)$$

$$V = (2 - 1) (2 - 1)$$

$$V = 1$$

**Nivel de significancia:**

$$P = 1 - \text{nivel de significancia}$$

$$P = 1 - 0.05 = 0.95$$

$$27.2726 > 7.879$$