



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y  
ZOOTECNIA**

**TESIS DE LICENCIATURA**

**CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS AISLADAS  
DE DOS UNIDADES DE PRODUCCIÓN LÁCTEA  
DE TULANCINGO DE BRAVO, HIDALGO**

**Para obtener el título de Médica Veterinaria Zootecnista**

**PRESENTA**

María Paulina González Morales

**Director**

Dr. Adrian Zaragoza Bastida

**Codirectora**

Dra. Nallely Rivero Pérez

**Tulancingo de Bravo, Hidalgo, México, septiembre 2024**



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y  
ZOOTECNIA**

**TESIS DE LICENCIATURA**

**CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS AISLADAS  
DE DOS UNIDADES DE PRODUCCIÓN LACTEA  
DE TULANCINGO DE BRAVO, HIDALGO**

**Para obtener el título de Médica Veterinaria Zootecnista**

**PRESENTA**

María Paulina González Morales

**Director**

Dr. Adrian Zaragoza Bastida

**Codirectora**

Dra. Nallely Rivero Pérez

**Asesores**

Dr. Benjamín Valladares Carranza

M en C. Ana Lizet Morales Ubaldo

M en C. Jorge Vargas Monter

**Tulancingo de Bravo, Hidalgo, México, septiembre 2024**



Tulancingo de Bravo, Hidalgo., a 02 de julio de 2024  
**Asunto:** Autorización de impresión

**Mtra. Ojuky del Rocío Islas Maldonado**  
Directora de Administración Escolar de la UAEH

Por este conducto y con fundamento en el Título Cuarto, Capítulo I, Artículo 40 del Reglamento de Titulación, le comunico que el jurado que le fue asignado a la pasante de la Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia **María Paulina González Morales**, quien presenta el trabajo de Tesis denominado **“Caracterización de bacterias aisladas de dos unidades de producción láctea de Tulancingo de Bravo, Hidalgo”**, que después de revisarlo en reunión de sinodales, ha decidido autorizar la impresión de este, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación, se anotan las firmas de conformidad de los miembros del jurado:

<b>PRESIDENTE</b>	Dr. Adrian Zaragoza Bastida
<b>SECRETARIO</b>	Dra. Nallely Rivero Perez
<b>VOCAL 1</b>	Dr. Benjamín Valladares Carranza
<b>VOCAL 2</b>	M en C. Ana Lizet Morales Ubaldo
<b>SUPLENTE 1</b>	M en C. Jorge Vargas Monter

Sin otro particular por el momento, me despido de usted.

Atentamente  
“Amor, Orden y Progreso”

**Dra. Maricela Ayala Martínez**  
Coordinadora de Programa  
Educativo de Medicina Veterinaria  
y Zootecnia.

Av. Universidad Km. 1, Exhacienda de  
Aquetzalpa. C.P. 43600. Tulancingo, Hidalgo.  
México  
Teléfono: 7717172000 Ext. 2461  
pelaeza@uaeh.edu.mx



## AGRADECIMIENTOS

Quiero iniciar dirigiendo unas palabras de agradecimiento a la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo en especial a mi institución el Instituto de Ciencias Agropecuarias, quien me ha dado la oportunidad de conocer, explorar e incrementar mis conocimientos, competencias y herramientas para volverme el mejor profesional posible en la rama de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Agradezco de corazón a el Dr. Adrián Zaragoza Bastida y a la Dra. Nallely Rivero Perez así como a los asesores de tesis (Dr. Benjamín Valladares Carranza, M en C. Ana Lizet Morales Ubaldo y M en C. Jorge Vargas Monter) por su guía y apoyo durante todo el proceso de realización de mi tesis. Su experiencia y conocimiento fueron fundamentales para llevar a cabo este trabajo de investigación. Sin su dedicación y paciencia, no hubiera sido posible alcanzar este logro académico tan importante en mi vida.

Asimismo, quisiera expresar mi gratitud a todas las personas que contribuyeron con el desarrollo de mi investigación. Agradezco a todos los que me ayudaron a recopilar datos y a aquellos que dedicaron su tiempo a mi trabajo. Los comentarios de mejora, las sugerencias de bibliografía y análisis son la base de estas páginas. Esta tesis no sería la que es sin sus recomendaciones.

Con todo mi agradecimiento y amor  
González Morales María Paulina

## DEDICATORIAS

### A mis papás Ana y Leonel

A quienes amo profundamente y con su eterna paciencia, amor y esfuerzo me permitieron lograr una de mis grandes metas, gracias por enseñarme el ejemplo de perseverancia y valentía, de no tenerle miedo a las dificultades, Que privilegio tenerlos como padres, Son mi mayor regalo, Admiro su esfuerzo y sacrificio para poder darnos lo mejor a mis hermanos y a mí, gracias por darme tanto de todo y por darme todo de ustedes, Son todo para mí y les viviré eternamente agradecida.

### A mis hermanos Karen, Raúl, Edith y Juan

Gracias por su apoyo y cariño incondicional, durante todo este camino, por estar a mi lado en todo momento y ayudarme a cumplir mis sueños.

### A mis sobrinos Rafael y Mariana

Por ser mi felicidad y mi motor para seguir adelante, Gracias por todo su amor y darme ánimos en todo el proceso, Quiero ser su más grande ejemplo y que sean cada vez los mejores niños, Los amo mis bebés.

### A mis tíos, Padrinos y Abuelita Alicia

Porque con sus consejos, oraciones y palabras me hicieron una mejor persona y de una forma u otra me acompañaron en todas mis metas y sueños. Por ser mi ejemplo a seguir, Porque sin su ayuda y amor esto no hubiera sido posible, Los admiro, amo y respeto, Gracias por todo su apoyo en este camino.

### A mi abuelito Justino

Finalmente, quiero dedicar esta tesis en memoria de mi abuelito Justino, Aunque ya no estés físicamente conmigo, siento tu presencia en cada logro que alcanzo. Tu apoyo incondicional y tus palabras de aliento siempre resonarán en mi mente y en mi corazón. Gracias por creer en mí cuando dudaba de mis propias capacidades y por animarme a seguir adelante cuando los obstáculos parecían insuperables. Tu confianza en mí ha sido el impulso que necesitaba para superar cada dificultad, Te extrañare siempre.

Agradezco a Dios por haberme otorgado una familia maravillosa, quienes han creído en mí siempre, dándome ejemplo de superación, humildad y sacrificio; enseñándome a valorar todo lo que tengo. A todos ellos dedico el presente trabajo, porque han fomentado en mí, el deseo de superación y de triunfo en la vida, Lo que ha contribuido a la consecución de este logro. Esperó contar siempre con su valioso e incondicional apoyo

Con todo mi agradecimiento y amor  
González Morales María Paulina

## INDICE GENERAL

I.	GLOSARIO DE TÉRMINOS .....	viii
II.	INDICE DE FIGURAS .....	ix
III.	ÍNDICE DE TABLAS .....	x
IV.	RESUMEN .....	xi
V.	ABSTRACT .....	xii
1.	INTRODUCCIÓN.....	13
2.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	14
3.	ANTECEDENTES .....	15
3.1	Sector pecuario en México .....	15
3.1.1	Producción láctea.....	15
3.2	Enfermedades que afectan la producción láctea.....	15
3.2.1	Mastitis bovina .....	15
3.2.2	Causas no infecciosas de mastitis bovina .....	16
3.2.3	Causas infecciosas .....	16
3.2.4	Mastitis según las características clínicas.....	18
3.3	Métodos de diagnóstico .....	18
3.4	Tratamiento de la mastitis.....	19
4.	JUSTIFICACIÓN.....	20
5.	OBJETIVOS .....	21
5.1	Objetivo general .....	21
5.2	Objetivos específicos.....	21
6.	HIPÓTESIS .....	22
7.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
7.1	Sitio de estudio .....	23
7.2	Población animal y manejo del hato.....	23
7.3	Obtención de las muestras .....	23
7.4	Aislamiento y caracterización bacteriana .....	24
7.5	Prueba de sensibilidad a antimicrobianos.....	24
7.6	Análisis de los datos .....	25
8.	RESULTADOS .....	26
8.1	Prueba de california para la detección de mastitis.....	26
8.2	Aislamiento y caracterización bacteriana .....	27

8.2.1	Determinación de la carga bacteriana.....	27
8.2.2	Aislamiento y caracterización bacteriana .....	30
8.3	Prueba de sensibilidad a antimicrobianos.....	32
9.	DISCUSIÓN.....	36
10.	CONCLUSIÓN .....	38
11.	REERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	39

## I. GLOSARIO DE TÉRMINOS

<b>Término</b>	<b>Significado</b>
CCS	Conteo de células somáticas
CLSI	Instituto de Estándares de Laboratorio Clínico (por sus siglas en inglés Clinical and Laboratory Standards Institute)
UFCs	Unidades formadoras de colonias

## II. INDICE DE FIGURAS

<b>Imagen 1.</b> Prueba de California para la detección de mastitis .....	26
---	----

### III. ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Determinación de la carga bacteriana de las muestras obtenidas del hato 1 (UFC's).	27
<b>Tabla 2.</b> Determinación carga bacteriana de las muestras obtenidas del hato 2 (UFC's) .....	29
<b>Tabla 3.</b> Cepas bacterianas aisladas de muestras de leche pertenecientes al hato 1 .....	31
<b>Tabla 4.</b> Cepas bacterianas aisladas de muestras de leche pertenecientes al hato 2 .....	32
<b>Tabla 5.</b> Resultados de los halos de inhibición (mm) y la sensibilidad a antimicrobianos de las bacterias evaluadas del hato 1 .....	33
<b>Tabla 6.</b> Resultados de los halos de inhibición (mm) y la sensibilidad a antimicrobianos de las bacterias evaluadas del hato 2 .....	35

## IV. RESUMEN

La mastitis bovina es definida como la inflamación de la glándula mamaria es considerada como la infección más importante en las vacas lecheras, asociada con elevadas pérdidas económicas, dicha enfermedad es de carácter multifactorial, sin embargo, la etiología bacteriana la de mayor frecuencia e importancia, siendo *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* los agentes de mayor prevalencia, aunado a esto el uso inadecuado de antimicrobianos ha propiciado la constante aparición de bacterias resistentes, por lo cual el objetivo del presente estudio fue aislar y caracterizar cepas bacterianas obtenidas de muestras de leche, se obtuvieron 18 muestras de dos hatos lecheros ubicados en el Estado de Hidalgo, por medio de diferentes técnicas bacteriológicas se aislaron y caracterizaron las cepas bacterianas, así mismo por medio de la técnica de difusión en disco se determinó el perfil de resistencia a antimicrobianos de 24 cepas que fueron aisladas. Los resultados obtenidos mostraron que la mayoría de los aislamientos corresponde a bacterias Gram positivas con morfología de cocos, con respecto a la sensibilidad a antimicrobianos se determinó que el 83% de las cepas fueron multirresistentes al mostrar resistencia a al menos 5 antimicrobianos. Los resultados obtenidos ponen en evidencia la necesidad de poner en práctica acciones para reducir el impacto del fenómeno de resistencia a antimicrobianos y limitar su propagación.

**Palabras clave:** Mastitis bovina, bacterias, resistencia a antimicrobianos

## V. ABSTRACT

Bovine mastitis, defined as the inflammation of the mammary gland is considered the most important infection in dairy cows, which is associated with important economic losses, this disease is multifactorial, nevertheless, bacterial etiology is the most frequent and important, being *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* the most prevalent agents, moreover, the inappropriate use of antimicrobials has led to the emergence of multidrug-resistant bacteria, due to this the aim of the present study was to isolate and characterize bacterial strains obtained from milk samples 18 samples were obtained from two dairy herds located in the State of Hidalgo, through different bacteriological techniques the bacterial strains were isolated and characterized, likewise through the disk diffusion technique the antimicrobial resistance profile of 24 strains was determined. Obtained data showed that most of the isolates correspond to Gram positive bacteria with coccus morphology. The results of susceptibility to antimicrobials showed that 83% of the strains were multidrug-resistant, showing resistance to at least 5 antimicrobials. The results obtained show the need to implement actions to reduce the impact of the phenomenon of resistance to antimicrobials and limit its spread.

**Keywords:** Bovine mastitis, bacteria, antimicrobial resistance

## 1. INTRODUCCIÓN

La mastitis bovina es definida como la inflamación de la glándula mamaria, se caracteriza por un aumento de neutrófilos en el tejido glandular de la ubre, manifestándose como secreciones anormales en la leche, decoloración o coágulos (mastitis clínica) o como un aumento en el conteo de células somáticas con apariencia normal de la leche (mastitis subclínica). Es considerada como la infección más importante en las vacas lecheras, asociada con elevadas pérdidas económicas (Nonnemann *et al.*, 2019).

La mastitis bovina es una enfermedad multifactorial, que se desarrolla como resultado de la interacción de varios factores asociados con el huésped, los patógenos específicos, el medio ambiente, la estación y el manejo del hato, dicha patología a menudo es causada por microorganismos patógenos, contagiosos o ambientales, siendo la etiología bacteriana la de mayor frecuencia e importancia (Bianchi *et al.*, 2019).

A la fecha se han identificado más de 135 especies de bacterias causantes de mastitis (Brisuela *et al.*, 2018). Numerosas especies bacterianas han sido aisladas de casos de mastitis bovina, pero históricamente *Staphylococcus* y *Escherichia coli*, se han considerado como los agentes más comunes de mastitis (Klibi *et al.*, 2019).

La mastitis amenaza al sector lechero debido a los problemas relacionados con la calidad de la leche y la salud pública debido al mayor riesgo de residuos en la leche, asociado al uso inadecuado de antimicrobianos y la aparición de bacterias resistentes, la terapia con antimicrobianos es la práctica más común para controlar la mastitis bovina, sin embargo, estudios recientes, reportan que fármacos como el cloranfenicol, la ciprofloxacina, la novobiocina, la vancomicina y la tetraciclina ha disminuido su eficacia frente a los patógenos asociados con mastitis bovina (Locatelli *et al.*, 2019), por lo que el objetivo del presente estudio fue aislar y caracterizar cepas bacterianas obtenidas de muestras de leche de dos unidades de producción láctea de Tulancingo de Bravo, Hidalgo, para verificar la sensibilidad a antimicrobianos.

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La productividad de la ganadería lechera, su relación con la industrialización y comercialización de la leche y los subproductos es un tema de relevancia para la economía nacional. Se ha observado una diferencia importante entre la producción nacional y la demanda de leche en México, este déficit en la producción para cubrir la demanda interna es una de las causas por las cuales México ha ocupado el primer lugar como importador de leche en polvo. Específicamente en el estado de Hidalgo que se encuentra ubicado en la región centro-oriental de México, la producción de leche es una de las de las actividades económicas más importantes, aunque en el año 2010 se reportó que la participación de la entidad en la producción nacional bajo un 3.9%. son varias las razones por las cuales se ha presentado este descenso en la producción siendo la principal causa la mastitis, causante de pérdida económicas dentro de los hatos, tanto por el costo en tratamientos veterinarios, así como por la disminución en la producción láctea, aunado a lo anterior el aumento en la resistencia a antimicrobianos en bacterias asociadas a mastitis debido al uso indiscriminado de dichos fármacos, representa un potencial problema en cuanto a salud pública se refiere, puesto que existe la posibilidad de su transferencia a los humanos y al medio ambiente.

### **3. ANTECEDENTES**

#### **3.1 Sector pecuario en México**

La ganadería mexicana ocupa en onceavo lugar a nivel mundial, como productor pecuario, tales como carne, huevo, grasa, pieles, así como leche y sus derivados, razón por la cual el ganado bovino es el de mayor consumo en México, teniendo un papel importante en la nutrición, seguridad alimentaria y los medios de vida de los seres humanos. sin embargo, en los últimos años las actividades pecuarias han sufrido una serie de cambios debido a factores como el cambio climático, siendo este último un desencadenante para la aparición o diseminación de enfermedades (FAO, 2014; SADER, 2021).

##### *3.1.1 Producción láctea*

De acuerdo con cifras oficiales, al cierre del año 2022 se espera que se produzcan más de 13 mil millones de litros de leche, alcanzando exportaciones por casi 500 millones de leche, lo cual impactará directamente en parámetros económicos (226.3 billones de libras). Respecto a la producción láctea del Estado de Hidalgo, al cierre del año 2020 se obtuvo un total de 413,145 litros de leche, ocupando el octavo lugar como productor a nivel nacional, ubicándose el Valle de Tulancingo en segundo lugar a nivel estatal (SIAP, 2022).

#### **3.2 Enfermedades que afectan la producción láctea**

En los últimos años las actividades pecuarias han sufrido una serie de cambios debido a factores como el cambio climático, siendo este un desencadenante para la aparición o diseminación de enfermedades (FAO, 2014). Debido a las demandas productivas, los bovinos destinados a la producción láctea son más susceptibles a padecer infecciones, ocasionando problemas clínicos, tales como la mastitis, siendo esta última enfermedad una de las más frecuentes e importantes dentro del sector lechero (Vargas *et al.*, 2012).

##### *3.2.1 Mastitis bovina*

Se define como un proceso inflamatorio propio de la glándula mamaria, caracterizada por cambios físicos o químicos, que generalmente se presenta a causa de infecciones bacterianas. Los signos más importantes incluyen disminución en la producción y calidad de la leche, fiebre, cuartos mamarios enrojecidos,

hinchados e hipertérmicos. Dicha enfermedad está asociada con elevadas pérdidas económicas (Fernández-Bolaños et al., 2012).

### 3.2.2 Causas no infecciosas de mastitis bovina

#### 3.2.2.1 Metabólicas

En los últimos años se ha demostrado que la magnitud del estado inmunosupresor se relaciona a síndromes metabólicos complejos tales como lipidosis, cetosis, acidosis hipoglucemia e hiperamonemia, así mismo se ha reportado las elevadas concentraciones de ácidos grasos libres antes del parto y de butirato en el postparto están relacionadas con efectos inmunosupresores que a su vez desencadenan patologías como la mastitis (Bludau *et al.*, 2014).

#### 3.2.2.2 Fisiológicas

Factores como la edad y el número de partos han sido relacionados con casos de mastitis, vacas longevas que han tenido varios partos, presentan conductos galactóforos abiertos, facilitando así el ingreso de agentes bacterianos asociados con mastitis, en este mismo sentido animales con lactancias de menos de 180 días son más propensas a presentar mastitis, así mismo, ejemplares altos productores pueden presentar afecciones en el ligamento, provocando que los pezones estén en contacto con el suelo, causando lesiones que facilitan el ingreso de microorganismos (Aguilar y Álvarez, 2019).

Otra causa importante es el inadecuado manejo higiénico, al no realizar un adecuado despunte o secado de las ubres, o bien equipos de ordeño sucios, así como deficiencias higiénicas por parte de los trabajadores (Ruíz *et al.*, 2016).

### 3.2.3 Causas infecciosas

Se han identificado más de 135 especies bacterianas asociadas con mastitis bovina, las cuales han sido clasificadas en agentes contagiosos, ambientales y oportunistas de acuerdo con su reservorio primario y el modo de transmisión (Brisuela *et al.*, 2018).

### 3.2.3.1 Mastitis por hongos y algas

Hongos tales como *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Candida* spp., *Pichia* spp., y *Trichosporon* spp. se conocen como causantes de mastitis micótica (Motasung *et al.*, 2017). Se ha reportado que el principal medio de propagación es al administrar los tratamientos intramamarios sin procedimientos asépticos (Williamson y di Menna, 2007).

Los miembros del orden del género *Prototheca*, causan mastitis aguda o crónica incurable en vacas lecheras. Se han aislado especies como *Prototheca gopffii* y *Prototheca wickerhamii* (Mostasung *et al.*, 2017).

### 3.2.3.2 Mastitis viral

Los virus se han aislado de vacas afectadas por mastitis bovina a pesar de no ser considerados, agentes etiológicos comunes. Virus como el herpesvirus bovino, virus de la fiebre aftosa y parainfluenza 3, se han asociado con mastitis bovina clínica sin aislamiento de patógenos bacterianos (Mostasung *et al.*, 2017).

### 3.2.3.3 Mastitis bacteriana

La mastitis bacteriana es la más común y significativa, tanto bacterias Gram positivas como Gram negativas pueden causar mastitis. Las bacterias Gram positivas incluyen varias especies de estafilococos y estreptococos y las bacterias Gram negativas más comunes son *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* (Contreras y Rodríguez, 2011).

Los patógenos contagiosos viven en la ubre y se transmiten de los pezones infectados a los no infectados durante el proceso de ordeño, ya sea por el equipo de ordeño (controladores de pulsación y vacío que funcionan mal) o las manos del ordeñador. Incluyen principalmente *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma bovis*, *Corynebacterium bovis*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus* coagulasas negativa. (Brisuela *et al.*, 2018).

Los patógenos ambientales se encuentran en el hábitat de la vaca, como suelo, material vegetal, estiércol, material de la cama o agua contaminada, *E. coli* es la principal causa de mastitis ambiental, en cuanto a los estreptococos que causan mastitis, *S. dysgalactiae* y *S. uberis* son las especies comunes. Otros coliformes ambientales incluyen *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., incluida *E. faecalis* y *E.*

*faecium*, y otras bacterias Gram negativas como *Serratia* spp., *Pseudomonas* spp., y *Proteus* spp. (Brisuela *et al.*, 2018).

Se han clasificado como agentes oportunistas a los estafilococos coagulasa negativos *S. epidermis*, *S. simulans*, *S. saprophyticus* y *S. chromogenes*, los cuales poseen propiedades adhesivas que les permiten invadir el revestimiento interno de la glándula mamaria, (Motaung *et al.*, 2017; Ashraf e Imra, 2019).

### 3.2.4 Mastitis según las características clínicas

La mastitis bovina también puede clasificarse de acuerdo con la signología que los animales presenten.

#### 3.2.4.1 Mastitis clínica

En este tipo de presentación, la leche es visiblemente anormal (Coágulos, escamas, cambios en color), la glándula mamaria suele estar enrojecida, hipertérmica, e inflamada, es común que los animales presenten dolor en la zona, así mismo existen casos en los que se pueden manifestar signos generalizados como aumento en la temperatura corporal, cambios en la rumia, anorexia, y depresión, en casos severos los animales llegan a morir (Adkins y Middleton, 2018).

#### 3.2.4.2 Mastitis subclínica

En casos subclínicos se presenta una apariencia normal tanto de la glándula mamaria como de la leche. El aumento en el recuento de células somáticas es el principal indicador. Otros indicadores incluyen aumento en la población bacteriana en la leche, una menor producción láctea y en algunas ocasiones cambios en la composición y calidad de la leche. La detección de mastitis subclínica es crucial para llevar a cabo estrategias de control y manejo de mastitis (Bian *et al.*, 2014).

## 3.3 Métodos de diagnóstico

Existen diversas pruebas para la detección de mastitis, las cuales incluyen pruebas sencillas como la observación y palpación de la glándula, hasta pruebas más específicas, clasificadas en dos grupos, pruebas químicas y pruebas biológicas (Fernández-Bolaños *et al.*, 2012). Dentro de la primera clasificación se encuentran la conductividad eléctrica de la leche, papel indicador de mastitis y la prueba de Whiteside (Fernández-Bolaños *et al.*, 2012; Adkins y Middleton, 2018).

En tanto que las biológicas comprenden la prueba de California para mastitis, prueba de Catalasa, prueba de Wisconsin, prueba de CAMP y el conteo de células somáticas, también se incluye el diagnóstico bacteriológico, a partir del cual se busca el aislamiento e identificación bacteriana (Gómez-Quispe *et al.*, 2015; Adkins y Middleton, 2018). Existen otras pruebas denominadas secundarias o confirmatorias, tales como MALDI-TOF (espectrometría de masa de tiempo de vuelo de desorción/ionización láser asistida por matriz) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Adkins y Middleton, 2018).

### **3.4 Tratamiento de la mastitis**

Diversos autores señalan que un adecuado tratamiento debe hacerse en función del agente etiológico, con la finalidad de que sea eficaz, en este sentido la terapia con antimicrobianos es una de las prácticas más comunes para controlar la mastitis bovina, aunado a esto es necesario determinar la sensibilidad a antimicrobianos que presentan las bacterias y una vez establecidos dichos aspectos, establecer la duración del tratamiento realizando dosificaciones adecuadas (Acosta-Moreno *et al.*, 2017; Locatelli *et al.*, 2019).

Sin embargo, el uso inadecuado de estos ingredientes activos ha propiciado la constante aparición de cepas resistentes y multiresistentes a antimicrobianos, tales como penicilina, estreptomicina, eritromicina, cloranfenicol, ciprofloxacina, novobiocina, tetraciclina, sulfametoxazol trimetoprima, vancomicina, entre otros (Pellegrino *et al.*, 2011; Locatelli *et al.*, 2019; Morales-Ubaldo *et al.*, 2022).

La resistencia a antimicrobianos actualmente es considerada como una amenaza para la salud pública, por lo que dicho fenómeno debe ser monitoreado con la finalidad de reducir su impacto en el sector lechero, los residuos de antimicrobianos en la leche pueden causar reacciones alérgicas al ser consumidos, en este mismo sentido la propagación de bacterias multiresistentes representa un riesgo zoonótico para los trabajadores y consumidores (McEwen y Collignon 2018; Ashraf e Imra, 2019; Locatelli *et al.*, 2019 Oteo-Iglesias, 2019; Ruiz *et al.*, 2021).

## 4. JUSTIFICACIÓN

El uso de antimicrobianos como estrategia de tratamiento y/o control de mastitis en las unidades de producción láctea por muchos años resultó eficaz, sin embargo, el uso indiscriminado de estos principios activos propició la aparición de cepas bacterianas resistentes e incluso multirresistentes a dichas moléculas, hoy en día la resistencia a antimicrobianos es considerada como una amenaza mundial para la salud humana, animal y medio ambiental.

Aunado a lo antes mencionado, el fenómeno de resistencia está asociado con elevadas pérdidas económicas, puesto que el sector lechero tiene un importante papel como fuente de ingresos y proveedor de alimentos a nivel nacional, por lo que el monitoreo es necesario a fin de frenar sus efectos negativos.

En este sentido la obtención de muestras de hatos lecheros pertenecientes al municipio de Tulancingo, Estado de Hidalgo, con la finalidad de aislar y caracterizar así como para determinar el perfil de resistencia a antimicrobianos de cepas bacterianas asociadas a mastitis bovina, permitirá brindar diagnósticos certeros y en consecuencia tratamientos específicos y eficaces, lo cual impactará directamente en la disminución de la resistencia a antimicrobianos por parte de las diversas poblaciones bacterianas, permitiendo de esta forma la producción inocua cumpliendo con los estándares de calidad y servicio que los nichos de mercado actuales demandan.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo general**

Aislar y caracterizar cepas bacterianas obtenidas de muestras de leche de dos unidades de producción láctea de Tulancingo de Bravo, Hidalgo, para verificar la sensibilidad a antimicrobianos.

### **5.2 Objetivos específicos**

1. Aislar cepas bacterianas a partir de muestras de leche de dos unidades de producción láctea de Tulancingo de Bravo, Hidalgo.
2. Caracterizar por medio de algunas pruebas bioquímicas a las cepas aisladas a partir de muestras de leche de dos unidades de producción láctea de Tulancingo de Bravo, Hidalgo.
3. Determinar el perfil de resistencia a antimicrobianos de las cepas aisladas a partir de muestras de leche de dos unidades de producción láctea de Tulancingo de Bravo, Hidalgo.

## **6. HIPÓTESIS**

Las muestras de leche colectadas en dos unidades de producción de Tulancingo de Bravo, Hidalgo estarán presentes bacterias resistentes o multirresistentes a antimicrobianos.

## **7. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **7.1 Sitio de estudio**

Se realizó un estudio en dos hatos lecheros a baja escala ubicados en el Municipio de Tulancingo, Hidalgo, localizado a 20°04' latitud Norte y 98° 22' latitud Oeste, a 2200 metros sobre el nivel del mar. Con un clima templado-frío, registra una temperatura media anual 14° C y una precipitación pluvial que oscila entre 500 y 553 mm por año.

### **7.2 Población animal y manejo del hato**

El primer hato (H1), cuenta con una población total de 11 vacas en producción de raza Holstein de 3 partos en promedio y lactancias de tres a ocho meses con sistema de ordeño mecánico, la producción de leche promedio al día es de 25 litros por vaca. Las vacas se encuentran en un sistema estabulado, alimentadas con alfalfa achicalada, ensilado de maíz y alimento concentrado.

En el manejo del ordeño se realiza un lavado de la ubre antes del ordeño y sellado post ordeño, el equipo de ordeño es sanitizado con una solución de hipoclorito de sodio, a razón de dos mL de por cada litro de agua.

El segundo hato lechero (H2) fue clasificado como un sistema de traspatio, cuenta con una población de siete vacas en producción de raza Holstein con un promedio de 2 partos y lactancias de cinco a nueve meses con sistema de ordeño mecánico, el promedio de producción de leche por vaca al día es de 18 litros, las vacas se encuentran en un sistema estabulado alimentadas con zacate molido y alfalfa fresca.

En el manejo de ordeño se realiza un lavado de la ubre y sellado post ordeño, no se enjuagan las mamilas entre vaca y vaca a ordeñar, es poco el mantenimiento que se da al sistema de ordeño. El estudio se llevó a cabo sin realizar cambios en la rutina de ordeño y en las condiciones de manejo sanitario o productivo de los hatos.

### **7.3 Obtención de las muestras**

Se realizó la prueba de California para la detección de mastitis, a todas las vacas en línea de producción previó a la colecta de las muestras para el análisis bacteriológico. Las muestras de leche se colectaron en tubos Falcon estériles de 50 mL (Corning®), con previa asepsia de la ubre y del pezón, así como

eliminación de los primeros chorros de leche, una vez obtenidas, las muestras se mantuvieron a 4° C (Mancera-Cuadros *et al.*, 2021).

#### **7.4 Aislamiento y caracterización bacteriana**

Se realizó el aislamiento bacteriano, de acuerdo con lo descrito por Mancera-Cuadros *et al.*, (2021), las muestras de leche se homogenizaron para posteriormente realizar diluciones seriadas ( $10^0 - 10^{-6}$ ), se tomaron 100µL de las diluciones  $10^0$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-4}$  y se inocularon en agar *Salmonella-Shigella*, agar Infusión Cerebro Corazón (BHI por sus siglas en inglés) (BD Bioxon, Heidelberg, Germany), agar MacConkey (BD Bioxon, Heidelberg, Germany) y agar Soya-Trypticaseína (TSA por sus siglas en inglés) (BD Bioxon, Heidelberg, Germany), por medio de la técnica de siembra por extensión superficial con perlas de vidrio, las placas se incubaron a 37° C durante 24 horas, para posteriormente determinar las unidades formadoras de colonias (UFCs).

Las colonias seleccionadas fueron caracterizadas mediante tinción de Gram y pruebas de catalasa, Hidróxido de Potasio (KOH 3%), coagulasa rápida y lenta.

#### **7.5 Prueba de sensibilidad a antimicrobianos**

La prueba de sensibilidad a antimicrobianos se realizó sobre todas las cepas a evaluar, para su determinación se empleó el método de difusión en disco en agar Müller–Hinton (BD Bioxon, Heidelberg, Germany), de acuerdo con la metodología descrita por Morales-Ubaldo y colaboradores (Morales-Ubaldo *et al.*, 2022).

Se agregaron 100 µL de una solución bacteriana previamente ajustada al 0.5 del patrón de turbidez McFarland (Remel, R20421, Lenexa, KS, USA) de cada una de las cepas bacterianas, procurando distribuir de manera uniforme la muestra.

Una vez inoculadas, cada una de las placas Petri se dejó secar por aproximadamente 15 minutos en completa esterilidad, una vez transcurrido el tiempo, se colocaron los multidiscos (PT-35, Ciudad de México, México), para posteriormente incubar a 37 °C por 24 horas. Después de la incubación, fueron medidos los halos de inhibición y comparados con las medidas establecidas por el CLSI (CLSI, 2012) para categorizar a las cepas en resistente, sensible o intermedio.

Los compuestos antimicrobianos activos utilizados fueron: ampicilina (10 µg), cefalotina (30 µg), cefotaxima (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), clindamicina (30 µg), dicloxacilina (1 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), penicilina (10 U), sulfametoxazol/trimetoprima (25 µg), tetraciclina (30 µg) y vancomicina (30 µg).

## **7.6 Análisis de los datos**

Los resultados fueron analizados por estadística descriptiva y representados en cuadros y figuras.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Prueba de california para la detección de mastitis

De acuerdo con los datos obtenidos en el hato número 1, diez de las vacas bajo estudio dieron resultados negativos a la prueba (<100,000 CCS/mL), existiendo solo un ejemplar con resultados positivos al determinarse trazas de entre 200, 000 a 400, 000 CCS/mL. En el segundo sitio de estudio todas las vacas se consideraron como negativas a la prueba de california.



**Imagen 1.** Prueba de California para la detección de mastitis

## 8.2 Aislamiento y caracterización bacteriana

### 8.2.1 Determinación de la carga bacteriana

Los resultados en la tabla 1, muestran que las cargas bacterianas más elevadas corresponden a las muestras identificadas como 28 TSA, 10 TSA, 23 y 11 BHI, esto al determinarse 2470, 1200, 1030 y 1000 UFC's respectivamente.

Se puede observar que ninguna de las muestras presentó crecimiento en el agar específico *Salmonella-Shigella* o MacConkey, con excepción de las muestras 11 y 28 (30 UFCs), lo cual sugiere que los casos de mastitis en la unidad de producción no están asociados con patógenos medioambientales (enterobacterias).

**Tabla 1.** Determinación de la carga bacteriana de las muestras obtenidas del hato 1 (UFC's por mL) en cuatro medios de cultivo diferentes.

ID muestra - Medio de cultivo	UFCS por mL
00 BHI	260
00 MCK	0
00 SS	0
00 TSA	10
03 BHI	670
03 MCK	0
03 SS	0
03 TSA	0
05 BHI	20
05 MCK	0
05 SS	0
05 TSA	0
10 BHI	160
10 MCK	0
10 SS	0
10 TSA	1200
11 BHI	1000
11 MCK	30
11 SS	0
11 TSA	0
15 BHI	530
15 MCK	0
15 SS	0

15 TSA	600
23 BHI	1030
23 MCK	0
23 SS	0
23 TSA	600
24 BHI	250
24 MCK	0
24 SS	0
24 TSA	0
25 BHI	10
25 MCK	0
25 SS	0
25 TSA	160
28 BHI	270
28 MCK	30
28 SS	0
28 TSA	2470
29 BHI	890
29 MCK	0
29 SS	0
29 TSA	310

BHI, Agar Infusión Cerebro-Corazón; MCK, agar MacConkey; SS, agar *Salmonella-Shigella*; TSA, agar Soya-Tripricaseína.

Los resultados obtenidos del muestreo realizado en el hato 2, indican que la muestra con una carga bacteriana más alta fue aquella identificada como 03, esto al determinarse un total de 1320 unidades formadoras de colonias, seguida de las muestras 06 (320 UFC's), 02 y 04 (170 y 140 UFC's, respectivamente), la carga bacteriana más baja fue determinada para la muestra 05 en la cual únicamente se cuantificaron 50 UFCs/mL (Tabla 2).

Cabe mencionar que la muestra 01 estuvo libre de bacterias, así mismo ninguna de las muestras presentó crecimiento en los medios de cultivo específicos para bacterias Gram negativas (Tabla 2).

**Tabla 2.** Determinación de la carga bacteriana de las muestras obtenidas del hato 2 (UFC's), en cuatro medios de cultivo diferentes.

<b>ID muestra - Medio de cultivo</b>	<b>UFCS por mL</b>
01 BHI	0
01 MCK	0
01 SS	0
01 TSA	0
02 BHI	0
02 MCK	0
02 SS	0
02 TSA	170
03 BHI	0
03 MCK	0
03 SS	0
03 TSA	1320
04 BHI	0
04 MCK	0
04 SS	0
04 TSA	140
05 BHI	0
05 MCK	0
05 SS	0
05 TSA	50
06 BHI	0
06 MCK	0
06 SS	0
06 TSA	320
07 BHI	0
07 MCK	0
07 SS	0
07 TSA	40

BHI, Agar Infusión Cerebro-Corazón; MCK, agar MacConkey; SS, agar *Salmonella-Shigella*; TSA, agar Soya-Tripticaseina.

### *8.2.2 Aislamiento y caracterización bacteriana*

A partir de las muestras colectadas (H1) se aislaron 37 cepas bacterianas, 30 de ellas fueron Gram positivas y el resto Gram negativas, se pudieron identificar morfologías bacilares y cocos, a la prueba de catalasa 35 resultaron positivas y dos negativas, la prueba de KOH, confirmó los resultados obtenidos a la tinción de Gram (Tabla 3).

**Tabla 3.** Cepas bacterianas aisladas de muestras de leche pertenecientes al hato 1

Numero de cepa	Tinción Gram	Morfología	Catalasa	KOH
H1-01	+	Cocos	+	-
H1-02	+	Cocos	+	-
H1-03	+	Cocos	+	-
H1-04	-	Cocos	+	+
H1-05	+	Bacilos	+	-
H1-06	-	Cocos	+	+
H1-07	+	Cocos	+	-
H1-08	+	Bacilos	+	-
H1-09	+	Cocos	-	-
H1-10	+	Cocos	+	-
H1-11	-	Bacilos	+	+
H1-12	+	Cocos	+	-
H1-13	-	Bacilos	+	+
H1-14	+	Cocos	+	-
H1-15	+	Bacilos	+	-
H1-16	+	Cocos	+	-
H1-17	+	Cocos	+	-
H1-18	+	Cocos	+	-
H1-19	-	Bacilos	+	+
H1-20	+	Cocos	-	-
H1-21	-	Cocos	+	+
H1-22	+	Cocos	+	-
H1-23	+	Cocos	+	-
H1-24	+	Cocos	+	-
H1-25	+	Cocos	+	-
H1-26	+	Bacilos	+	-
H1-27	+	Coco	+	-
H1-28	+	Cocos	+	-
H1-29	+	Bacilos	+	-
H1-30	+	Cocos	+	-
H1-31	+	Bacilos	+	-
H1-32	+	Cocos	+	-
H1-33	+	Cocos	+	-
H1-34	+	Bacilos	+	-
H1-35	+	Cocos	+	-
H1-36	+	Bacilos	+	-
H1-37	-	Bacilos	+	+

resultado positivo; -, resultado negativo.

Respecto a las muestras colectadas en el hato 2, se aislaron cinco cepas bacterianas, que fueron clasificadas como Gram positivas, cuatro de ellas con morfología de cocos, y una de morfología bacilar y catalasa negativa (H2-01); todas las cepas indicaron resultados negativos a la prueba de KOH (Tabla 4).

**Tabla 4.** Cepas bacterianas aisladas de muestras de leche pertenecientes al hato 2

Número de cepa	Tinción Gram	Morfología	Catalasa	KOH
H2-01	+	Bacilos	-	-
H2-02	+	Cocos	+	-
H2-03	+	Cocos	+	-
H2-04	+	Cocos	+	-
H2-05	+	Cocos	+	-

+, resultado positivo; -, resultado negativo.

El 100% de las cepas sometidas a las pruebas de coagulasa, fueron clasificadas como coagulasa-negativas, estos resultados sugieren que no se determinó presencia de *S. aureus*.

### 8.3 Prueba de sensibilidad a antimicrobianos

Los resultados obtenidos indican que el 84% de las cepas aisladas (H1) fueron resistentes a al menos cinco antimicrobianos pertenecientes a diferentes familias, las cepas presentaron resistencia en mayor medida a antimicrobianos pertenecientes a la familia de los  $\beta$ -lactámicos, tales como ampicilina (16 cepas), cefalotina (17 cepas), cefotaxima (11 cepas) dicloxacilina (17 cepas), penicilina (14 cepas), con respecto a clindamicina 11 cepas presentaron resistencia a dicho ingrediente activo, en tanto que la mayoría de bacterias fue sensible a eritromicina, esto al identificarse únicamente cinco cepas resistentes (Tabla 5).

Por otro lado, de las 19 cepas evaluadas, 18 fueron sensibles a ciprofloxacina, gentamicina y a Sulfametoxazol/trimetoprima, así mismo 15 de las cepas presentaron sensibilidad a tetraciclina y vancomicina (Tabla 5). Cabe mencionar que únicamente la cepa identificada como H1-02, fue susceptible a todos los antimicrobianos evaluados en el presente estudio, lo cual evidencia la exponencial aparición de cepas multiresistentes a antimicrobianos (Tabla 5).

**Tabla 5.** Resultados de los halos de inhibición (mm) y la sensibilidad a antimicrobianos de las bacterias evaluadas del hato 1

Am, ampicilina; CF, cefalotina; CFX, cefotaxima; CPF; ciprofloxacina; CLM, clindamicina; DC, dicloxacilina; E, eritromicina; GE, gentamicina; P,

ID cepa	Am	CF	CFX	CPF	CLM	DC	E	GE	P	SXT	TE	VA
H1-02	18 (S)	35 (S)	32 (S)	32 (S)	25 (S)	35 (S)	28 (S)	18 (S)	30 (S)	18 (S)	28 (S)	19 (S)
H1-03	7 ( <b>R</b> )	13 ( <b>R</b> )	7 ( <b>R</b> )	29 (S)	22 (S)	7 ( <b>R</b> )	22 (I)	15 (S)	8 ( <b>R</b> )	16 (S)	25 (S)	17 (S)
H1-05	7 ( <b>R</b> )	7 ( <b>R</b> )	7 ( <b>R</b> )	33 (S)	7 ( <b>R</b> )	7 ( <b>R</b> )	8 ( <b>R</b> )	21 (S)	16 ( <b>R</b> )	16 (S)	20 (S)	17 (S)
H1-06	7 ( <b>R</b> )	7 ( <b>R</b> )	21 (I)	30 (S)	8 ( <b>R</b> )	7 ( <b>R</b> )	7 ( <b>R</b> )	15 (S)	7 ( <b>R</b> )	16 (S)	21 (S)	7 ( <b>R</b> )
H1-07	7 ( <b>R</b> )	11 ( <b>R</b> )	8 ( <b>R</b> )	21 (S)	23 (S)	7 ( <b>R</b> )	22 (I)	16 (S)	7 ( <b>R</b> )	16 (S)	22 (S)	17 (S)
H1-08	17 (S)	22 ( <b>R</b> )	20 (I)	20 (I)	26 ( <b>R</b> )	7 ( <b>R</b> )	7 ( <b>R</b> )	10 ( <b>R</b> )	30 (S)	16 (S)	19 (S)	17 (S)
H1-12	7 ( <b>R</b> )	14 ( <b>R</b> )	12 ( <b>R</b> )	21 (S)	34 (S)	7 ( <b>R</b> )	24 (S)	22 (S)	18 ( <b>R</b> )	16 (S)	7 ( <b>R</b> )	15 (I)
H1-13	7 ( <b>R</b> )	7 ( <b>R</b> )	7 ( <b>R</b> )	28 (S)	16 (S)	7 ( <b>R</b> )	22 (I)	15 (S)	15 ( <b>R</b> )	16 (S)	30 (S)	17 (S)
H1-14	7 ( <b>R</b> )	18 ( <b>R</b> )	7 ( <b>R</b> )	20 (I)	28 ( <b>R</b> )	7 ( <b>R</b> )	25 (S)	15 (S)	13 ( <b>R</b> )	16 (S)	9 ( <b>R</b> )	17 (S)
H1-16	10 ( <b>R</b> )	19 ( <b>R</b> )	14 ( <b>R</b> )	27 (S)	28 ( <b>R</b> )	7 ( <b>R</b> )	25 (S)	15 (S)	30 (S)	16 (S)	25 (S)	15 (I)
H1-18	7 ( <b>R</b> )	17 ( <b>R</b> )	7 ( <b>R</b> )	22 (S)	31(I)	7 ( <b>R</b> )	25 (S)	15 (S)	30 (S)	16 (S)	19 (S)	17 (S)
H1-23	14 (I)	20 ( <b>R</b> )	13 ( <b>R</b> )	27 (S)	22 ( <b>R</b> )	7 ( <b>R</b> )	10 ( <b>R</b> )	31 (S)	27 ( <b>R</b> )	30 (S)	25 (S)	20 (S)
H1-24	7 ( <b>R</b> )	14 ( <b>R</b> )	16 (I)	26 (S)	26 ( <b>R</b> )	17 ( <b>R</b> )	20 (I)	13 (I)	14 ( <b>R</b> )	16 (S)	10 ( <b>R</b> )	17 (S)
H1-26	7 ( <b>R</b> )	13 ( <b>R</b> )	15 (I)	7 ( <b>R</b> )	7 ( <b>R</b> )	7 ( <b>R</b> )	29 (S)	15 (S)	17 ( <b>R</b> )	16 (S)	25 (S)	18 (S)
H1-27	7 ( <b>R</b> )	9 ( <b>R</b> )	7 ( <b>R</b> )	26 (S)	22 ( <b>R</b> )	7 ( <b>R</b> )	20 (I)	15 (S)	7 ( <b>R</b> )	15 (I)	20 (S)	14 ( <b>R</b> )
H1-32	7 ( <b>R</b> )	15 ( <b>R</b> )	14 ( <b>R</b> )	30 (S)	28 ( <b>R</b> )	7 ( <b>R</b> )	23 (S)	18 (S)	7 ( <b>R</b> )	20 (S)	27 (S)	17 (S)
H1-33	7 ( <b>R</b> )	10 ( <b>R</b> )	7 ( <b>R</b> )	20 (I)	35 (S)	7 ( <b>R</b> )	22 (I)	20 (S)	14 ( <b>R</b> )	16 (S)	8 ( <b>R</b> )	17 (S)
H1-34	13 ( <b>R</b> )	37 (S)	17 (I)	22 (S)	35 (S)	31 (S)	24 (S)	16 (S)	30 (S)	16 (S)	20 (S)	17 (S)
H1-35	7 ( <b>R</b> )	7 ( <b>R</b> )	21 (I)	25 (S)	7 ( <b>R</b> )	7 ( <b>R</b> )	7 ( <b>R</b> )	16 (S)	7 ( <b>R</b> )	20 (S)	18 (I)	7 ( <b>R</b> )

penicilina; SXT, sulfametoxazol/trimetoprima; TE, tetraciclina; VA, vancomicina; R, resistente; I, intermedio; S, sensible; Medidas comparadas con las establecidas por el CLSI.

Respecto a la segunda unidad de producción (H2) se determinó que todas las cepas con excepción de H2-04, fueron resistentes a ampicilina, cefalotina, cefotaxima, clindamicina y penicilina.

Con respecto a otros antimicrobianos, las cepas presentaron diferentes grados de sensibilidad, tal es el caso de ciprofloxacina, tres cepas fueron resistentes, una de ellas presentó resistencia intermedia (H2-02) y la cepa H2-01 fue sensible a dicho antimicrobiano, así mismo en la tabla 6 puede observarse que todas las cepas fueron sensibles a gentamicina, sulfametoxazol trimetoprima, tetraciclina y vancomicina, así mismo solo una cepa presentó resistencia intermedia a eritromicina (H2-04).

**Tabla 6.** Resultados de los halos de inhibición (mm) y la sensibilidad a antimicrobianos de las bacterias evaluadas del hato 2

<b>ID cepa</b>	<b>Am</b>	<b>CF</b>	<b>CFX</b>	<b>CPF</b>	<b>CLM</b>	<b>DC</b>	<b>E</b>	<b>GE</b>	<b>P</b>	<b>SXT</b>	<b>TE</b>	<b>VA</b>
H2-01	7 ( <b>R</b> )	7 ( <b>R</b> )	12 ( <b>R</b> )	25 (S)	25 ( <b>R</b> )	7 ( <b>R</b> )	25 (S)	21(S)	26 ( <b>R</b> )	16 (S)	26 (S)	18 (S)
H2-02	7 ( <b>R</b> )	13 ( <b>R</b> )	14 ( <b>R</b> )	19 (I)	28 ( <b>R</b> )	7 ( <b>R</b> )	27 (S)	24 (S)	12 ( <b>R</b> )	19 (S)	29 (S)	19 (S)
H2-03	7 ( <b>R</b> )	11 ( <b>R</b> )	9 ( <b>R</b> )	12 ( <b>R</b> )	22 ( <b>R</b> )	7 ( <b>R</b> )	27 (S)	21 (S)	11 ( <b>R</b> )	23 (S)	27 (S)	20 (S)
H2-04	29 (S)	37 (S)	26 (S)	15 ( <b>R</b> )	34 (S)	9 ( <b>R</b> )	16 (I)	15 (S)	29 (S)	16 (S)	19 (S)	17 (S)
H2-05	7 ( <b>R</b> )	12 ( <b>R</b> )	10 ( <b>R</b> )	7 ( <b>R</b> )	31 ( <b>R</b> )	7 ( <b>R</b> )	32 (S)	24 (S)	14 ( <b>R</b> )	20 (S)	33 (S)	18 (S)

Am, ampicilina; CF, cefalotina; CFX, cefotaxima; CPF; ciprofloxacina; CLM, clindamicina; DC, dicloxacilina; E, eritromicina; GE, gentamicina; P, penicilina; SXT, sulfametoxazol/trimetoprima; TE, tetraciclina; VA, vancomicina; R, resistente; I, intermedio; S, sensible; Medidas comparadas con las establecidas por el CLSI.

## 9. DISCUSIÓN

Los resultados del análisis microbiológico pueden guiar tanto a productores como a Médicos Veterinarios en la implementación de medidas específicas de control, identificación de agentes causales, descarte de animales que cursan con infecciones crónicas, así como para la evaluación de la eficacia de tratamientos basados en la determinación de la sensibilidad a antimicrobianos (Ruíz *et al.*, 2011).

De acuerdo con los resultados obtenidos, la mayoría de las cepas aisladas son cocos Gram positivos, de manera similar Calderón y Rodríguez (2008), determinaron en su estudio que el 46% de sus aislamientos clínicos correspondieron a cocos Gram positivos de origen contagioso, así mismo dichos autores también determinaron que un mínimo porcentaje (1.2 %) de bacterias aisladas correspondía a bacilos Gram negativos. Los resultados en ambos estudios confirman que la mastitis por microorganismos contagiosos continúa siendo una problemática en unidades de producción láctea.

Con respecto a la prueba de sensibilidad a antimicrobianos, la mayoría de las cepas bajo estudio fueron clasificadas como multiresistentes, Rangel-López *et al.* (2020) explica que las cepas se consideran dentro esta categoría al presentar resistencia a más de un grupo de antimicrobianos.

Las pruebas de sensibilidad a antimicrobianos indicaron que el 75% de las cepas bajo estudio fueron resistentes a penicilina, en el estudio realizado por Villanueva y Morales (2017) se determinó un porcentaje de resistencia a similar al del presente estudio (65%), sin embargo, opuesto a lo determinado por dichos autores en nuestro estudio se determinó que más del 95% de las cepas fue sensible a gentamicina, porcentaje superior al determinado en su estudio (56%), así mismo la sensibilidad a cefalotina en nuestro estudio fue inferior (12.5 %) en comparación con la del estudio antes mencionado (52%).

De manera similar Sánchez-Bonilla *et al.* (2018), determinaron que el 56% de sus cepas presentaron resistencia a penicilina, y el 52% de ellas a eritromicina, resultados comparables con los nuestros, puesto que el 75% de nuestras cepas fue resistente a este  $\beta$ -lactámico, sin embargo, los resultados difieren en cuanto al perfil de resistencia frente a eritromicina ya que únicamente el 20% de las cepas presentó resistencia a dicho ingrediente activo.

Aunado a lo anterior se reportó que el 96% de las cepas evaluadas fueron altamente sensibles a sulfametoxazol/trimetoprima y el 90% a tetraciclina, porcentajes similares a los determinados en nuestro estudio, puesto que el 95% de las cepas fue sensible a sulfametoxazol/trimetoprima y el 83% a

tetraciclina. Los autores reportaron que únicamente el 14% de las cepas fu considerado como multirresistente, porcentaje inferior al reportado en esta investigación (83%).

En el trabajo realizado por Franco-Meza (2020), al igual que en nuestro estudio fueron aislados *Staphylococcus coagulasa* negativos, de los cuales el 44%, 36% y 15% fueron resistentes a penicilina, tetraciclina y cefpodoxima, antimicrobianos a los cuales también las cepas aisladas en el presente estudio fueron resistentes.

Con respecto a la sensibilidad, en las tablas 5 y 6 podemos observar que dentro de los antimicrobianos con mayor efectividad se encuentran ciprofloxacina y gentamicina, de manera similar Ombarak *et al.* (2019) determinaron que las cepas aisladas en su estudio fueron sensibles a gentamicina y ciprofloxacino, por su parte, Ismail y Abutarbush (2020), determinaron que cepas aisladas a partir de vacas con mastitis fueron sensibles a quinolonas, incluida ciprofloxacina, cabe destacar que de acuerdo a la prueba de California únicamente una vaca fue diagnosticada con mastitis subclínica.

Awandkar *et al.* (2022) determinaron en su estudio que antimicrobianos pertenecientes a las quinolonas y aminoglucósidos fueron los más efectivos frente a patógenos asociados con mastitis bovina, resultados que coinciden con los nuestros.

Los resultados muestran que a pesar de que las cargas bacterianas no son tan elevadas, existen patógenos multirresistentes a antimicrobianos que comúnmente son utilizados para el control y tratamiento de la mastitis bovina, lo cual evidencia la necesidad de poner en práctica acciones para reducir el impacto de este fenómeno y limitar su propagación.

## 10. CONCLUSIÓN

Se aislaron 24 cepas bacterianas en total, correspondientes morfológicamente a los géneros *Staphylococcus spp.* y *Escherichia coli*. Los resultados de las pruebas de sensibilidad a antimicrobianos mostraron que el 83 % de las cepas fueron resistentes al menos a cinco antimicrobianos. Ampicilina, cefalotina, cefotaxima, dicloxacilina y penicilina fueron los antimicrobianos a los cuales se presentó la mayor resistencia, en tanto que la mayor sensibilidad se presentó a gentamicina, sulfametoxazol/trimetoprima, tetraciclina y vancomicina.

## 11. REERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta Moreno, A., Mira Hernández, J., & Posada Arias, S. (2017). Tópicos en mastitis bovina: desde la etiología hasta algunas terapias alternativas.
- Adkins, P. R. F., & Middleton, J. R. (2018). Methods for Diagnosing Mastitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 34(3), 479–491. doi:10.1016/j.cvfa.2018.07.003
- Ashraf, A., & Imran, M. (2020). Causes, types, etiological agents, prevalence, diagnosis, treatment, prevention, effects on human health and future aspects of bovine mastitis. *Animal health research reviews*, 21(1), 36–49.
- Awandkar, S. P., Kulkarni, M. B., & Khode, N. V. (2022). Bacteria from bovine clinical mastitis showed multiple drug resistance. *Veterinary research communications*, 46(1), 147–158. <https://doi.org/10.1007/s11259-021-09838-8>
- Bian Y., Lv Y. & Li Q (2014) Identification of diagnostic protein markers of subclinical mastitis in bovine whey using comparative proteomics. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 58, 385–392.
- Bianchi, R. M., Schwertz, C. I., de Cecco, B. S., Panziera, W., De Lorenzo, C., Heck, L. C., Snel, G., Lopes, B. C., da Silva, F. S., Pavarini, S. P., & Driemeier, D. (2019). Pathological and microbiological characterization of mastitis in dairy cows. *Tropical animal health and production*, 51(7), 2057–2066.
- Bludau, M. J., Maeschli, A., Leiber, F., Steiner, A., & Klocke, P. (2014). Mastitis in dairy heifers: Prevalence and risk factors. *The Veterinary Journal*, 202(3), 566–572. doi:10.1016/j.tvjl.2014.09.021
- Brisuela, J., Palacios, J., López, G., Hori-Oshima, S., Herrera, J., Pujol, L., Angulo, C., Rentería, T. & Medina, G. (2018). Identificación molecular y frecuencia de patógenos aislados de mastitis bovina en establos de la Península de Baja California, México. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 9(4), 754-768

- Calderón, A., y Rodríguez, V. C. (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), 582-589.
- Contreras, G. A., & Rodríguez, J. M. (2011). Mastitis: Comparative Etiology and Epidemiology. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 16(4), 339–356. doi:10.1007/s10911-011-9234-0
- Fernández Bolaños, O. F., Trujillo Graffe, J. E., Peña Cabrera, J. J., Cerquera Gallego, J., & Granja Salcedo, Y. T. (2012). Mastitis bovina: generalidades y métodos de diagnóstico. *Revista electrónica de Veterinaria*, 13(11), 1-20.
- Franco Meza, F. C. (2020). *Prevalencia y perfil de resistencia antimicrobiana de bacterias causantes de mastitis aisladas en leche cruda bovina en un establecimiento de la localidad de Shoeweide del Departamento de Presidente Hayes–Paraguay* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).
- Gómez-Quispe, Oscar Elisban, Santivañez-Ballón, Crhis Stefani, Arauco-Villar, Fernando, Espezua-Flores, Oscar Henry, & Manrique-Meza, Jorge. (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://dx.doi.org/10.15381/rivep.v26i1.10912>
- Ismail, Z.B.; Abutarbush, S.M. (2020) Molecular characterization of antimicrobial resistance and virulence genes of *Escherichia coli* isolates from bovine mastitis. *Veterinary World*, 13(8), 1588-1593.
- Klibi, A., Jouini, A., Boubaker El Andolsi, R., Kmiha, S., Ben Hamda, C., Ghedira, K., Hamrouni, S., Ghram, A., & Maaroufi, A. (2019). Epidemiology of  $\beta$ -Lactamase-Producing *Staphylococci* and Gram Negative Bacteria as Cause of Clinical Bovine Mastitis in Tunisia. *BioMed research international*, 2019, 2165316.
- Locatelli, C., Barberio, A., Bonamico, S., Casula, A., Moroni, P., & Bronzo, V. (2019). Identification of Multidrug-Resistant *Escherichia coli* from Bovine Clinical Mastitis Using a Ceftiofur-Supplemented Medium. *Foodborne pathogens and disease*, 16(8), 590–596.

- Mancera-Cuadros, G., Acosta-Dibarrat, J., Zamora-Espinoza, J., Valladares-Carranza, B., Gutiérrez-Castillo, A., Bedolla-Cedeño, J., Arguedas-Cortés, D., Velázquez-Ordoñez, V. Caracterización de fenotipos de *Staphylococcus aureus* productores de biofilm en aislamientos obtenidos de vacas lecheras con mastitis subclínica. *Tropical and Subtropical Agroecosystem*. 24 (2).
- McEwen, S.A.; Collignon, P.J. Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. *Microbiol Spectr*. 2018,6. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017>
- Motaung, T. E., Petrovski, K. R., Petzer, I. M., Thekiso, O., & Tsilo, T. J. (2017). Importance of bovine mastitis in Africa. *Animal health research reviews*, 18(1), 58–69.
- Morales-Ubaldo, A. L., Gonzalez-Cortazar, M., Zaragoza-Bastida, A., Meza-Nieto, M. A., Valladares-Carranza, B., Alsayegh, A., El-Saber Batiha, G., & Rivero-Perez, N. (2022). *nor 3'*-Demethoxyisoguaiacin from *Larrea tridentata* Is a Potential Alternative against Multidrug-Resistant Bacteria Associated with Bovine Mastitis. *Molecules* (Basel, Switzerland), 27(11), 3620. <https://doi.org/10.3390/molecules27113620>
- Nonnemann, B., Lyhs, U., Svennesen, L., Kristensen, K. A., Klaas, I. C., & Pedersen, K. (2019). Bovine mastitis bacteria resolved by MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of dairy science*, 102(3), 2515–2524.
- Omarak, R.A.; Zayda, M.G.; Awasthi, S.P.; Hinenoya, A.; Yamasaki, S. Serotypes, Pathogenic Potential, and Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* Isolated from Subclinical Bovine Mastitis Milk Samples in Egypt. *Japan Journal Infection Disease*. 2019, 72(5), 337-339.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. México: el sector agropecuario ante el desafío del Cambio Climático.2014. Disponible en:<https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjN0NWd5MTIAhUCba0KHbGpBbIQFjAAegQIAhAC&url=http%3A%2F%2Fwww.fao.org%2F3%2Fa-i4093s.pdf&usg=AOvVaw07YIaI-PTHin1zf0D3bY-A>
- Oteo-Iglesias, J. Vigilancia activa de la resistencia a antibióticos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2019, 37, 26-31. DOI: 10.1016/S0213-005X(19)30179-X.

- Pellegrino, M. S., Frola, I. D., Odierno, L. M., & Bogni, C. I. (2011). Mastitis Bovina: Resistencia a antibióticos de cepas de *Staphylococcus aureus* asiladas de leche. REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria, 12(7), 1-14.
- Rangel-López L, Zaragoza-Bastida A, Valladares-Carranza B, Peláez-Acero A, Sosa-Gutiérrez CG, Hetta HF, Batiha GE-S, Alqahtani A, Rivero-Perez N. (2020) *In Vitro* Antibacterial Potential of *Salix babylonica* Extract against Bacteria that Affect *Oncorhynchus mykiss* and *Oreochromis* spp. *Animals*, 10(8):1340.
- Ruiz, A., Peña, J. & Remón, D. (2016). Mastitis bovina en Cuba. Artículo de revisión. *Revista de Producción Animal*, 28(2-3), 39-50
- Ruiz, D.R.F.; Enríquez, M.Q.; Pérez, O.L.C. Los antibióticos y su impacto en la sociedad. *MediSur*. 2021. 19,477-91.
- Sánchez Bonilla, M. D. P., Gutiérrez Murillo, N. P., & Posada Almanza, I. J. (2018). Prevalencia de mastitis bovina en el Cañón de Anaime, región lechera de Colombia, incluyendo etiología y resistencia antimicrobiana. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 29(1), 226-239.
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Sector Pecuario Mexicano. 2021. Disponible en: <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/sector-pecuario-mexicano-277315#:~:text=La%20ganader%C3%ADa%20mexicana%20destaca%20por,y%20exploraci%C3%B3n%20de%20especies%20ganaderas>.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Escenario mensual de productos agroalimentarios. Leche de bovino. 2022. Disponible en: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/732714/Leche\\_de\\_Bovino\\_Abril.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/732714/Leche_de_Bovino_Abril.pdf)
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Anuario Estadístico de la Producción Ganadera. 2021(d). Disponible en: [https://nube.siap.gob.mx/cierre\\_pecuario/](https://nube.siap.gob.mx/cierre_pecuario/)
- Vargas, D. S., Góngora-Orjuela, A., & Correa, J. J. (2012). Enfermedades virales emergentes en ganado de leche de América Latina. *Orinoquia*, 16(2), 88-96.

Villanueva, G., & Morales, S. (2017). Resistencia antibiótica de patógenos bacterianos aislados de mastitis clínica en bovinos de crianza intensiva. REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria, 18(12), 1-12.

Williamson, J. H., y di Menna, M. E. (2007). Fungi isolated from bovine udders, and their possible sources. New Zealand veterinary journal, 55(4), 188–190.  
<https://doi.org/10.1080/00480169.2007.36766>.