

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL



Evaluación de extractos *Azadirachta indica* (Neem) y *Tessaria integrifolia* (palo bobo) como una alternativa para el control de *Staphylococcus aureus* principal patógeno causante de la mastitis bovina.

Por:

JOSÉ ROBERTO RICO LÓPEZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO ZOOTECNISTA

Saltillo, Coahuila, México

Diciembre 2019

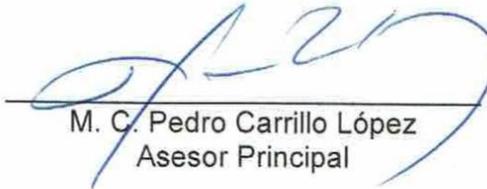
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL**

Evaluación de extractos *Azadirachta indica* (Neem) y *Tessaria integrifolia* (palo bobo) como una alternativa para el control de *Streptococcus agalactiae* principal patógeno causante de la mastitis bovina.

Por:
JOSE ROBERTO RICO LOPEZ

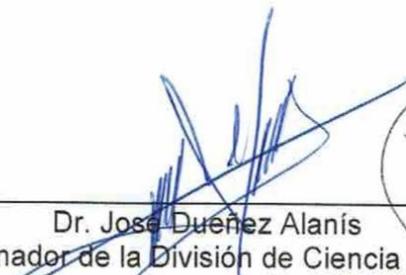
TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:
INGENIERO AGRÓNOMO ZOOTECNISTA
Aprobada por el Comité de Asesoría:


M. C. Pedro Carrillo López
Asesor Principal


Dra. Erika Natalia Ríos Herrera
Coasesor


M. C. Oscar Noé Reboloso Padilla
Coasesor


Dr. José Dueñez Alanís
Coordinador de la División de Ciencia Animal



Saltillo, Coahuila, México
Diciembre 2019

AGRADECIMIENTOS

A Dios nuestro señor por permitir la culminación de una meta más en mi vida.

A mi Alma Mater la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro” por abrirme sus puertas y brindarme una educación de calidad.

Mi más sincero agradecimiento al Dra. Erika Natalia Ríos Herrera por su apoyo, consejos, paciencia y sus valiosas sugerencias para la formación de este trabajo.

Al MC. Pedro Carrillo López y al MC. Oscar Noé Reboloso Padilla por su colaboración, disposición y sugerencias para la revisión de este trabajo.

Al M. C. Jesús Matín Fuantos Mendoza y al Dr. Margarito García Munguía por brindarme los medios para poder realizar este trabajo.

A todos mis amigos y compañeros sinceramente gracias.

DEDICATORIAS

A mi Madre y Padre:

Por darme el regalo máspreciado que es la vida, por nunca perder la fe en mí y apoyándome en todo momento.

A mis Hermanos:

Con quienes he pasado momentos de alegría y tristeza; por todo su cariño, confianza y apoyo incondicional.

A mi novia:

Gracias a ella que es la felicidad en persona, que siempre me apoyo incondicionalmente, por la cual estoy dispuesto a enfrentarme a todo en cualquier momento.

ÍNDICE DE CONTENIDO

| | |
|-----------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| AGRADECIMIENTOS | iii |
| DEDICATORIAS | iv |
| ÍNDICE DE CONTENIDO | v |
| ÍNDICE DE FIGURAS | vii |
| ÍNDICE DE CUADROS | viii |
| RESUMEN | 1 |
| Objetivo | 4 |
| Justificación | 4 |
| Hipótesis | 4 |
| REVISIÓN DE LITERATURA | 5 |
| La Leche importante como base de la alimentación | 5 |
| Enfermedades que afectan la calidad de la leche..... | 9 |
| Mastitis bovina bacteriana (MBB)..... | 11 |
| Prueba de California (CMT: California Mastitis Test) | 12 |
| Diagnóstico de laboratorio de Mastitis | 15 |
| Diagnostico Microbiológico. | 16 |
| Morfología bacteriana | 17 |
| Medios de cultivos..... | 19 |
| Variante de la composición de la leche durante la Mastitis..... | 22 |
| Tratamiento Antibiótico de la Mastitis..... | 23 |
| Que son los extractos vegetales y como se componen | 24 |
| Infusiones de plantas | 24 |
| <i>Azardacta indica</i> | 25 |
| <i>Tessaria integrifolia</i> | 25 |
| Localización experimental..... | ¡Error! Marcador no definido. |
| Extractos vegetales..... | 26 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Protocolo de desinfección de las mamas..... | 28 |
| Muestreo de los agentes patógenos | 29 |
| Aislamiento e identificación de los organismos Patógenos..... | 30 |
| Morfología Colonial y Bacteriana. | 31 |
| Actividad inhibitoria de los extractos de <i>Azadirachta indica</i> (Neem) | 31 |
| Tratamientos establecidos | 32 |
| Evaluación de efecto inhibitorio por medio del Antibiograma | 33 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 34 |
| Aislamiento e identificación de los organismos Patógenos..... | 34 |
| Morfología Colonial y Bacteriana. | 35 |
| Tinción de Gram..... | 36 |
| Efecto inhibitorio por medio del Antibiograma de <i>Azadirachta indica</i> (Neem) y <i>Tessaria integrifolia</i> (Palo bobo) | 36 |
| CONCLUSIONES | 41 |
| BIBLIOGRAFÍA | 42 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. A) Colecta de material vegetal; B) Fraccionado de hojas; C) Secado en parrillas envueltas en papel estraza; D) Pulverizado en molino; E) Etanol y Metanol como base para la extracción; F) Maceración e infusión en plancha de agitación..... | 27 |
| Figura 2. Figura 2. A) Filtrado; B) Rotaevaporador; C) secado en estufa a 38°C; D) Etiquetado de los crudos..... | 28 |
| Figura 3. Lavado de las mamas con agua estéril y jabón neutro..... | 29 |
| Figura 4. A) Prueba de california; B) Muestras de leche..... | 30 |
| Figura 5 Purificación bacteriana en agar Baird-Parker y Sal Manitol..... | 30 |
| Figura 6. Cristal Violeta para tinción de Gram y bacteria vista desde el microscopio..... | 31 |
| Figura 7. A) Inoculación de patógeno y B) Discos colocados con el tratamiento | 32 |
| Figura 8. A) Tratamientos en concentraciones alta, mediana y baja; B) Testigo comercial Secacef ® del laboratorio Lapisa | 33 |
| Figura 9. Medición del halo de inhibición de los extractos..... | 33 |
| Figura 10. A) Aislamiento bacteriano en Sal Manitol; B) Aislamiento bacteriano en Baird-Parker; C) Purificación de la bacteria en Sal Manitol; D) Purificación de la bacteria en Baird-Parker..... | 34 |
| Figura 11. Vista en estereoscopio MOtic modelo SMZ-161, 4.0 x..... | 35 |
| Figura 12. Vista desde el microscopio de los racimos de <i>Staphylococcus aureus</i> | 36 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Cuadro 1. California mastitis test (CMT)..... | 13 |
| Cuadro 2. WMT interpretación de resultados células/ml..... | 14 |
| Cuadro 3. Ensayo de extractos de <i>Azadirachta indica</i> contra <i>Staphylococcus aureus</i> Agrupación sobre la comparación de medias de Tukey con una significancia del 0.05%, sobre los datos del efecto inhibitorio del extracto vegetal <i>Azadirachta indica</i> | 37 |
| Cuadro 4. Ensayo de extractos de <i>Tessaria integrifolia</i> contra <i>Staphylococcus aureus</i> Agrupación sobre la comparación de medias de Tukey con una significancia del 0.05%, sobre los datos del efecto inhibitorio del extracto vegetal <i>Tessaria integrifolia</i> | 39 |

RESUMEN

La leche forma parte esencial de la alimentación humana y de los mamíferos en general. Particularmente en México es uno de los productos de la canasta básica en la alimentación de la población. Pero la calidad y producción de este alimento básico se ve afecta por factores abióticos y bióticos, tales como enfermedades en el ganado. De las cuales la Mastitis Bovina Bacteriana (MBB) es uno de los factores más comunes que se presentan en más del 80% de los establos lecheros y afecta tanto la calidad como el rendimiento, representando hasta un 70% de gastos totales a los productores lecheros. Por lo cual la presente investigación se enfoca en el estudio de la producción de extracto vegetales, como un tratamiento alternativo y natural, que, en comparación a los antibióticos químicos tradicionalmente usados, no producen resistencia bacteriana a los mismos. En el estudio se produjeron extractos etanolicos, metanolicos e infusiones de *Azadirachta indica* y *Tessaria integrifolia*, probando el efecto inhibitorio de sus metabolitos sobre el crecimiento bacteriano de *Staphylococcus aureus* mediante la prueba de antibiograma. Se establecieron 14 tratamientos para cada una de las plantas en estudio incluyendo un testigo absoluto y un testigo comercial (Antibiotico Secacef ®), de los cuales se evaluaron tres repeticiones con cinco discos impregnados con cada tratamiento. Para ambos bioensayos el antibiótico comercial Secacef ® mostró mayor diámetro de inhibición ante la bacteria patógena. Sin embargo, las alternativas naturales estudiadas mostraron actividad antibiótica, por medio de los metabolitos producidos por las plantas y presentes en los extractos. Siendo los tratamientos de infusión a base de agua para *Azadirachta indica* los que presentaron mayor actividad inhibitoria, particularmente en la concentración de 100 mg/ml y de forma cercana las concentraciones de 300 y 50 mg/ml. Mientras que para *Tessaria interifolia* los tratamientos extraídos a base de etanol crudo y etanol de 50 mg/ml mostraron la mayor actividad antibiótica. Por lo cual es demostrada su efectividad inhibitoria, como un tratamiento natural alternativo en casos de MBB no severos.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, Mastitis bovina y Extractos vegetales.

INTRODUCCIÓN

La mastitis es una enfermedad que ataca directamente a la glándula mamaria del animal, la cual inflama el canal del pezón como respuesta de la invasión bacteriana. Los agentes patógenos causantes de dicha enfermedad son de diferentes tipos de bacterias, micoplasmas, hongos, levaduras y algunos virus. Las bacterias son responsables del 90% de los casos clínicos y subclínicos (Zhao y lacasse, 2008).

La leche producida por la glándula infectada presenta decoloración, aspecto grumos y el número de células inflamatorias aumenta. (Avellán *et. al.*, 2019). Se han buscado formas de controlar este problema usando una terapia de antibióticos contra la bacteria que provoca este padecimiento en la ubre de la vaca, no obstante, su uso frecuente del tratamiento genera una resistencia bacteriana. Por ello, la Mastitis bovina bacteriana constituyendo un serio problema para la salud pública, ya que el producto lácteo está contaminados debido a la contaminación de la leche con patógenos resistentes a los antibióticos (Jiménez *et. al.*, 2017).

La mastitis bovina bacteriana (MBB) es causada por microorganismos como *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*, y se encuentran en la glándula mamaria y la leche de vacas con los agentes patógenos. Se transmiten por medio del ordeño como al usar toallas compartidas para lavar las ubres o por manos contaminadas y al no desinfectar las pezoneras de la ordeñadora. En el caso de *Staphylococcus aureus* no necesariamente se encuentra en la mama de la vaca, se puede localizar en lesiones de la piel de los pezones (Calderón, 2008).

La mastitis presenta un porcentaje mayor al 70% de los gastos totales para los productores lecheros. La ausencia de higiene el ordeño, el mal funcionamiento del equipo, deficientemente manejo de los desinfectantes y selladores, la no identificación del agente infeccioso, la efectividad de las medidas de control y los tratamientos, son algunos de los principales factores que influyen en la calidad de la leche, cuando se presenta la enfermedad (Mera *et.al.*, 2017).

De manera general se registran pérdidas económicas, en la compra de medicamentos, tratamientos, leche de baja calidad o no apta para la comercialización. Esta patología es una de las comunes, manifestando una tasa de infección del 20 a 65% sobre los rebaños a nivel mundial (Quevedo, 2018).

En el norte de México, donde se encuentran las regiones templadas y semiáridas, está la lechería especializada, con mayor volumen de producción nacional. Con sistemas de producción de alto grado en tecnificación, ordeño y manejo de la leche en procesos mecanizados (Manjarrez *et. al.*, 2012).

En Aguascalientes, la mayoría de sus establos lecheros no tiene conocimiento de técnicas y métodos de prevención de esta enfermedad relacionada con la glándula mamaria. En estudios realizados previamente se demuestra el uso de antibióticos ante la sospecha de animales infectados con mastitis, en hatos ganaderos. No se demuestra encontrar evidencia de disminución de la distribución de la enfermedad entre animales o hatos (Farray *et. al.*, 2015).

La relevancia del presente trabajo radica en estudio de una alternativa natural, utilizando un producto orgánico a base de extractos vegetales con Neem, como tratamiento de la mastitis bovina, su reducción, severidad y prevalencia en hatos ganaderos especializados en la producción de leche.

Objetivo

Probar la efectividad de extractos vegetales, como una alternativa natural en el tratamiento de la Mastitis bovina bacteriana, causada por *Staphylococcus aureus*. Definiendo el tratamientos y concentración que presentes los resultados más eficientes en el control del agente patógeno y la enfermedad.

Justificación

La Mastitis bovina es una enfermedad ampliamente distribuida a nivel global y nacional. Con una rápida dispersión entre el ganado una vez que existe un foco de infección. Siendo los antibióticos el tratamiento comúnmente utilizado, es común que se genere resistencia de los patógenos. Por lo que la utilización de productos orgánicos como los extractos vegetales representan una alternativa viable para el control de la enfermedad, disminuyendo costos ya que son más baratos que los antibióticos, y reduciendo la prevalencia de bacterias resistentes.

Hipótesis

Por lo menos uno de los tratamientos presentará actividad bactericida, en una o más de las concentraciones establecidas. Demostrando un control efectivo con el patógeno *S. agalactiae* causante de la mastitis bovina bacteriana. Teniendo la capacidad de ser usado como un tratamiento orgánico alternativo en el manejo de la enfermedad.

REVISIÓN DE LITERATURA

La Leche importante como base de la alimentación

La leche de vaca es básica en la alimentación humana por que está constituida por diferentes sustancias o compuestos necesarios para la nutrición en cualquier etapa de vida, ayudando a su desarrollo (Agudelo *et. al.*, 2005). Por su composición es un alimento completo, ya que es una fuente de calcio, magnesio, selenio, riboflavina y vitamina B12 (FAO, 2019). El consumo diario de leche proporciona el 75% del calcio disponible, provocando una mejora en la salud ósea. Contrario a los mitos que relacionan a la leche con enfermedades cardiovasculares por contener colesterol y grasas saturadas, a través estudios se han encontrado que, en los elementos como el calcio, vitamina D, los péptidos bioactivos y el ácido linoleico conjugado, proporcionan un efecto de protección contra lípidos en la sangre (Hernández *et. al.*, 2011).

Composición de la Leche

La leche de vaca está compuesta por líquidos y sólidos; en el primer grupo encontramos el agua que es un 83 a 90%; en el segundo grupo encontramos las grasas con un 3 a 4% de su contenido, proteínas con 3.5%, vitaminas y minerales 9%, y la lactosa con 5%, pero variando la composición química bruta según la raza. El contenido de grasa en *Bos indicus* puede llegar hasta 5.5% que en el *Bos taurus* (Agudelo *et. al.*, 2005; FAO, 2019). El color, sabor y su constitución va de la mano con la especie animal, raza, edad y alimentación, ligado con el estado fisiológico, el número de pariciones, sistema productivo, el ambiente y

la época del año (FAO, 2019).

Calidad de la leche

Para tener una buena calidad en la leche bronca se debe de tener higiene al momento de la ordeña para evitar residuos o sedimentos en contenido; el color y olor deben ser característicos; libre de sustancias químicas como antibióticos y detergentes; su contenido bacteriano debe ser bajo. Las pruebas a las que se somete la leche: cantidad, medida en volumen o peso; características organolépticas, aspecto, sabor y olor; características de composición, grasas, sólidos y proteína; características físicas y químicas; características higiénicas; adulteración con agua, conservantes, solidos añadidos, entre otros; residuos de medicamento (FAO, 2019).

Prueba de calidad sensorial

Para los pequeños productores la prueba de características organoléptica (olor, sabor y observación) es la más utilizada para evaluar la leche; con el densímetro o lactómetro para las pruebas de densidad; si la leche es agria o anormal, se utiliza la prueba de cuajo por ebullición; para determinar el ácido láctico, la prueba de acidez, y para determinar el contenido de grasas, la prueba de Gerber (SENASICA, 2011; FAO, 2019).

Prueba de calidad fisicoquímica

Las pruebas de este tipo permiten encontrar adulteraciones por separación de grasas o agregar agua (la densidad de la leche disminuye al agregar agua). Se realiza con un lacto densímetro que Quevenne, calibrado a 15°C, en una escala de 15 y 40, un valor dado a milésimas de densidad, por ejemplo, el 32 de lacto densímetro señala una densidad de 1.032. Es importante hacer un ajuste cuando la temperatura no sea 15°C (SENASICA, 2011).

Prueba de calidad higiénico-sanitarias

Las condiciones de higiene y sanitarias tienen consecuencias importantes en la calidad microbiológica de la leche, por eso es indispensable en las unidades de producción. Las pruebas de calidad de higiénico-sanitarias son las siguientes:

- Acidez titulable. El ácido láctico de la leche se encuentra en un rango de 1.3 a 1.6 gr/L. la acidez se determina con la suma de la caseína, sustancias minerales, ácidos orgánicos y fosfatos y a partir de la lactosa se genera ácidos orgánicos por crecimiento microbiano (acidez desarrollada). Cuando alcanza un valor de 2.2 gr/L de acidez, está indicando que la carga microbiana es muy alta, lo que puede provocar que las proteínas de la leche se precipiten con el calor (pasteurización). En base a una titulación con hidróxido de sodio 0.1 N utilizando fenolftaleína como indicador de acidez.
- Prueba de alcohol. Se determina la estabilidad térmica de la leche cruda; esto es, si la leche tiene la facultad de tolerar temperaturas elevadas de procesamiento sin presentar coagulación visible. Si hay coagulación, indica que no es apta para ser procesada. Cuando indica un elevado grado de acidez, son resultados positivos de la prueba de alcohol. Para la resolución de la prueba se combina la leche con igual volumen de etanol al 72%, el alcohol a esa concentración produce coagulación de la leche cuando la acidez es mayor o igual a 2.25 mL NaOH 0,1 N/100 mL.
- Prueba de reductasa. Es un indicador indirecto del crecimiento de la población bacteriana. Utilizando azul de metileno en muestras de leche; dependiendo de la calidad sanitaria de la leche hay una reacción de oxidación poniéndola azul y cuando

no hay cambio (incolora) es reducida. Hay que tener presente que esta prueba no es exacta con la cantidad de microorganismo. También hay que tomar en cuenta el tipo de microorganismos, el número de leucocitos y la predisposición de la leche a elevar a la superficie los microorganismos al paso que se va separando la crema en el tubo de ensayo. Esta prueba no es la adecuada para evaluar leche refrigerada, puesto que es concerniente al recuento de bacterias mesófilas (a temperatura de 25 a 40°C) pero no con las psicófilas (a temperatura 10 a 20°C) ni con las bacterias termodúricas (resisten la pasteurización). Los resultados pueden ser alterados con la presencia de antibióticos. Lo ideal es teñir con colorante azul de metileno a 37°C. Si tiene un gran contenido de microorganismo la muestra se decolorará regresando a su color blanco; antes bien, si hay una baja presencia de microorganismos, el colorante azul se pierde paulatinamente. En periodo de tiempo no mayor a 4 horas de la toma de la muestra se debe realizar esta prueba; en campo no mayor de 8 horas. para los dos casos se recomienda mantener la muestra a una temperatura de 0-5°C antes del inicio de la prueba.

- Cuenta total de bacterias (CTB). Esta es el principal indicador de la calidad de higiénica de la leche. la limpieza de utensilios, el acopio de la leche y su recolección están ligados a la carga microbiana inicial. Un conteo mayor 400,000 UFC/mL revela una higiene deficiente con todo lo que tiene contacto la leche (ordeñadores, baldes, equipo de ordeño, acopio, etc.). para este método se utilizan cultivos en placa, pero también hay métodos de microscopía directa y de métodos indirectos con compuestos fluorescentes.
- Conteo de células somáticas (CCS). Es una prueba de rutina

utilizada como indicador de la calidad de la leche y el bienestar de las ubres. Sobrepasando el conteo a 400.000 CCS/mL da positivo a mastitis subclínica. Las consecuencias derivadas del CCS en aumento es la disminución en rendimiento quesero hasta de 4%, tarda más en el cuajado, merma de la proteína del suero, sabor rancio en el queso y mantequilla. La citometría de flujo y espectroscopia de infrarrojo, son métodos rápidos para la evaluación de CS, arrojando resultados en minutos.

- Inhibidores. Nos indica la presencia de antibióticos, derivados de clorados, sales cuaternarias, oxidantes, formaldehído, el exceso de detergentes y desinfectantes (SENASICA, 2011; INIFAP, 2011).

Enfermedades que afectan la calidad de la leche

Por sus características nutricionales de la leche es un medio favorable para el crecimiento de distintos tipos de microorganismos patógenos, transformándose en un vehículo de enfermedades para la salud pública (Aguilera-Becerra *et. al.*, 2014).

En el ganado vacuno lechero existen diversas enfermedades que afectan la calidad de la leche e incluso pueden llegar afectar la salud de animal y humana. Algunas de estas enfermedades es la brucelosis causando la fiebre Malta; tuberculosis, esta enfermedad infecciosa causada por bacterias del género *Mycobacterium*, su principal forma de transmitirse es por fómites; leptospirosis, que disminuye la producción de leche por ocasionar problemas reproductivos; mastitis bovina, algunas bacterias patógenas que causan esta enfermedad son transmitidas al humano por medio de la ingesta de leche (INIFAP, 2010).

Mastitis bovina

Comúnmente esta enfermedad se reconoce por sus signos clínicos, por las características anormales de la leche y de la ubre. La disminución de la producción de leche, elevado número de leucocitos, consistencia y grumos, también presenta fiebre, cuartos mamarios enrojecidos e hinchados. En el caso de animales con mastitis subclínica frecuentemente puede no ser identificada por el ordenaño. (Fernández *et. al.*, 2012).

Mastitis clínica

Es la inflamación de la glándula mamaria, se pueden observar anomalías en la ubre de la vaca. Las características que se observan en la ubre es enrojecimiento, cambios en la coloración de la leche y su composición. Se puede presentar con temperaturas por encima de lo normal, dolor al ordeño, letargo, pérdida del apetito e incluso la muerte (Quevedo, 2018). Es difícil erradicar esta enfermedad por que dependerá de las cualidades del animal, como la raza y el ambiente, el cual favorece la continua propagación de la enfermedad. A su vez, se pueden encontrar bacterias en la leche, lo que ocasiona pérdida de rendimiento y de calidad de manera considerable (Mera *et. al.*, 2017; Fernández *et. al.*, 2012). En forma clínica se divide a su vez, dependiendo de la prevalencia o duración de los síntomas en aguda caracterizada por una aparición súbita, o manera crónica presentando una infección de larga duración, seguida por cambios en el tejido de la ubre (Quevedo, 2018).

Mastitis subclínica

La mastitis subclínica tiene la característica de tener la presencia de microorganismos y el conteo de células somáticas es elevado en la leche, puede desarrollarse inflamación y no tener tratamiento.

Causando elevadas pérdidas económicas por reducir la producción de leche. En esta clasificación de mastitis no presenta cambios visibles en la leche. El bajo rendimiento en la producción de leche es poco notorio. Para tener la certeza de esta mastitis es necesario contar con técnicas de laboratorio por medio de conteo de células somáticas y el cultivo de bacteriológico (Quevedo, 2018; Fernández *et. al.*, 2012).

Aspectos Bióticos y Ambientales de la Mastitis

Se clasifican de acuerdo a su reservorio y al modo de transmisión como contagioso y ambiental. Los agentes patógenos contagiosos tienen la característica de sobrevivir en la ubre de la vaca, donde la leche es la principal fuente de infección y acontece durante de la ordeña, incluye; *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma spp.*, *Corynebacterium bovis* y *Staphylococcus coagulasa* negativos. Los patógenos ambientales se localizan principalmente en los corrales y bebederos; la combinación de humedad y heces aumentan la exposición de la ubre a patógenos ambientales. Las especies más identificadas que provocan esta condición son *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* y *Streptococcus spp.*, entre otras (Brisuela *et. al.*, 2018).

Mastitis bovina bacteriana (MBB)

La MBB se da como resultado de la infección que produce una bacteria en la glándula mamaria que resulta en casos clínicos y subclínicos. Los principales agentes contagiosos de importancia son principalmente *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*. La bacteria *Staphylococcus aureus* son cocos Gram-positivo que forman pequeños racimos, principal causante de la enfermedad, aunque puede haber otros patógenos bacterianos de MBB, sigue siendo este el de mayor prevalencia a nivel mundial. Este patógeno tiene como

principal característica la adherencia a diferentes superficies inertes que le facilita la transmisión de la infección colonizando los tejidos del organismo principalmente durante la ordeña (Pastor; Bedolla, 2008).

Prueba de California (CMT: California Mastitis Test)

La mayoría de las veces se desconoce que gran parte del hato está siendo afectado con este patógeno, y para poder hacer una evaluación clínica más precisa se debe de realizar pruebas de laboratorio para poder diagnosticar, mientras que en condiciones de campo se utiliza el California mastitis test (CMT). Este método es el más utilizado, por su practicidad, resultados inmediatos y costos accesibles (Gómez *et. al.*, 2015). Los valores del CMT están relacionados con el número resultante del recuento de células somáticas (RCS) en la leche de vacas con cuartos mamarios afectados. En el caso de mastitis subclínicas, las células somáticas (CS) migran de la sangre hacia la leche como respuesta a la infección, aumentando con la severidad del proceso (Gómez *et. al.*, 2015).

La prueba se realiza en una paleta de plástico que a su vez está dividida en cuatro compartimentos. Se recolecta una muestra de leche por cuarto mamario, con la finalidad de tener 2 a 3 ml por cámara. Agregando el reactivo de la prueba y se homogeniza la mezcla realizando movimientos circulares aproximadamente en un lapso de 10 segundo. Los resultados se interpretan como los valores: N, para muestras negativas; T, la reacción es reversible y la viscosidad tiende a desaparecer; 1, para muestras con reacción débil; 2, para muestras de reacción distinguible; y 3, con reacción fuertemente positiva (Ruiz-García *et. al.*, 2017). Como se muestra a continuación en el cuadro 1.

Cuadro 1. California mastitis test (CMT)

| SCORE | SINGIFICADO | DESCRIPCION DE LA REACCION | INTERPRETACIÓN (RCS/ml) |
|----------|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| N | NEGATIVO | La mezcla permanece en estado líquido y homogéneo. Puede gotear de la paleta. | 0-200.000 |
| T | TRAZAS | Hay algo de engrosamiento. La reacción es reversible y la viscosidad observada por primera vez tiende a desaparecer. | 150.000-500.000 |
| 1 | LIGERAMENTE POSITIVO | La mezcla espesa, pero no hay formación de gel en el medio de la paleta y la viscosidad observada tiende a persistir. La mezcla cae poco a poco. | 400.000-1.500.000 |
| 2 | POSITIVO | Gel se formará en el centro de la paleta durante el movimiento giratorio. El gel se acumula en la parte inferior de la paleta cuando el movimiento giratorio se interrumpe. Cuando se vierte la mezcla la masa gelatinosa cae y puede dejar un poco de líquido en el pocillo. | 800.000-5.000.000 |
| 3 | MUY POSITIVO | Gel se formará en el centro de la paleta y se pega en el fondo del pocillo, pero no a un lado. Cuando se vierte la mezcla, se cae sin dejar líquido detrás. | <5.000.000 |

Prueba de Wisconsin (WMT)

Es una prueba para uso de laboratorio utilizando muestras frescas de leche en tanques y para muestras individuales por vaca. Se utiliza la misma solución que en la prueba de California, pero a diferencia de

está la prueba de Wisconsin para mastitis (WMT) los resultados se miden cuantitativamente dependiendo de la viscosidad (Fernández *et. al.*, 2012).

En los métodos de cuantificación de células somáticas en la leche se encuentra el Wisconsin mastitis test (WMT), considerado en un programa para detección de mastitis subclínica. La realización de la prueba requiere colocar 3 ml de leche en los tubos de ensayo, agregando por debajo de la superficie de la leche 3 ml de reactivo y tapar los tubos. Usando la gradilla, mover 10 veces hasta casi llegar a posición horizontal, por 15 segundo. Una vez teniendo la mezcla se deja reposa durante 15 segundos. Invertiendo la gradilla y posicionándola en vertical se deja que el correr la mezcla durante 15 segundo y se regresa la gradilla su posición original. Se mide la mezcla se separa y el resultante se mide según el cuadro 2 (INIFAP, 2019).

Cuadro 2. WMT interpretación de resultados células/ml.

| Milímetros | Células (x1000)/ml |
|------------|--------------------|
| 0 - 1 | 0 – 1 |
| 0 - 100 | 0 – 100 |
| 1 - 1.5 | 1 - 1.5 |
| 100 – 500 | 100 – 500 |
| 1.5 – 1.8 | 1.5 – 1.8 |
| 500 -700 | 500 -700 |
| 1.8 – 2.0 | 1.8 – 2.0 |

Diagnóstico de laboratorio de Mastitis

Para diagnosticar una enfermedad infecciosa el método debe ser rápido, exacto, simple y accesible. La celeridad procesal del diagnóstico es fundamental en la pronta recuperación del animal infectado, puesto que posibilita la aplicación de un tratamiento dirigido (Vila *et. al.*, 2017). El productor puede detectar la mastitis clínica, observando los signos característicos de la enfermedad y por las irregularidades en la leche; no obstante, la mastitis subclínica solo puede diagnosticarse a través de pruebas donde muestren agentes patógenos. Por lo cual se requiere de un diagnóstico más especializado, basado muchas veces en la detección de patógenos bacterianos, por lo cual se puede apoyar con los métodos generales a continuación descritos (Pérez-Ruano *et. al.*, 2017).

Polymerase Chain Reaction (PCR)

La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por si siglas en inglés) es utilizada para la síntesis *in vitro* de secuencias específicas de ADN. De forma simple y dinámica se multiplica el ADN presente en diferentes muestras biológicas, consiguiendo millones de copias de una determinada secuencia. No solo en el área de la genética molecular se utilizan, en un corto periodo de tiempo la técnica ha conseguido ser aplicada en otras ciencias (Mas *et. al.*, 2001).

El PCR para la detección de *S. agalactiae*, se emplea la subunidad ribosomal 16S rRNA (16S) del GenBank, en muestras clínicas, este método fue utilizado en el 2018 por Duque y colaboradores.

ELISA (Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay)

El ELISA (por si siglas en inglés) es el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas es utilizado para la detección de anticuerpos específicos contra un organismo patógeno, aislando el antígeno obtenido en muestras que se requieren analizar, la cual deberá ser evaluada; fijado una muestra de suero expuesta al antígeno en pozos de microplacas en concentraciones diluidas en solución amortiguadora específica, simultáneamente adicionando de un anticuerpo específico (Martínez *et. al.*, 2012; D'Pool *et. al.*, 2004). El diagnóstico de la prueba dependerá de los criterios previamente establecidos, teniendo muestras positivas un porcentaje de inhibición mayor y negativas cuando el mismo fuera en un rango menor (D'Pool *et. al.*, 2004).

ELISA estandarizado a *Streptococcus agalactiae* (Estreptococo grupo B) esta técnica dura de 16 a 20 minutos. Los anticuerpos anti-EGB (anticuerpo estreptococo grupo B) están adheridos a las paredes de un tubo de plástico. En la primera parte del proceso, en el mismo tubo, se coloca la muestra con el antígeno de EGB. Posteriormente añadiendo un anticuerpo anti-EGB al que se fija una peroxidasa. Se lava y se añade peróxido de hidrogeno y cromogen Si la muestra contenía EGB, activara una reacción apareciendo una tinción azul (Andreu *et. al.* 1997)

Diagnostico Microbiológico.

Métodos Microbiológicos

Los métodos microbiológicos se utilizan en un laboratorio clínico con el fin de identificar el agente causante de la infección, a fin de conocer las repercusiones patogénicas/patológicas, el desarrollo clínico, y emplear una terapia antibiótica competente, el aislamiento microbiano es una práctica esencial en la microbiología clínica (Bou *et. al.*, 2011).

Morfología bacteriana

La morfología de una bacteria la determina su pared celular. Existen dos principales tipos de formas que se muestran: esférica y de bastón. La forma de esfera denominada *cocos*; de bastón alargado denominada *bacilos* y de bastón curvado se denominan *espirilos*; los *vibrios*, cuya imagen arroja en forma de coma. Otras formas en que también se presentan las bacterias son en filamentos (ramificada o no), anillos y estructuras con prolongaciones. Los microorganismos unicelulares pueden presentar cambios y se les llama *pleomorficas*. El pleomorfismo se origina cuando no hay pared celular (micosplasmas). Las *formas L* son aquellas que perdieron la pared celular irregularidades en la temperatura, presión osmótica, etc. Pero con capaces de resintentizarla cuando el estrés desaparece. Para evitar falsas identificaciones es importante identificar el fenómeno de pleomorfismo en condiciones de cultivo. Las células microbianas pueden aparecer como células aisladas o agrupadas. Un grupo de dos células con forma cocoides se llama *diplococcus*. Los planos en el que se lleva a cabo la división celular, determinan las características de la especie; si exististe un solo plano de división originando cadenas tiene el nombre de *Streptococcus*. Cuando la bipartición se sitúa en dos planos perpendiculares, suscitan estradas, por ej. *Pedicoccus*. La división en tres o más dando paquetes de 8 o más células, por ej. *Sarcina*. Si se observa racimos irregulares por una fisión binaria en planos no perpendiculares, por ej. *Staphylococcus*. Por otra parte, los bacilos presentan: en *empalizada* (por giros de 180°), en forma de letra V o L (posición angular) y bacilos que forman *letras chinas* (Apella; Araujo. 2005).

Tinción de Gram

La tinción de Gram es considerada esencial en la evaluación de muestras para análisis bacteriológicos. Para el diagnóstico de la enfermedad las tinciones son herramientas primordiales en la identificación del origen microbiano en el laboratorio. Esta técnica tintórea se desarrolló para sobresaltar las características morfológicas de los microorganismos; los colores tienen la función de permitir hacer visible los objetos microscópicos y transparentes, revelar su forma y tamaño, señalan la presencia de estructuras internas y externas, sus reacciones químicas específicas y se caracteriza por diferenciar en dos grandes grupos de acuerdo a la composición de la pared bacteriana ya que utiliza dos colorantes: Gram negativas y Gram positivas (López-Jácome *et. al.*, 2014).

Nutrición bacteriana

Las distintas especies bacterianas requieren nutrientes y condiciones abióticas que les permiten permanecer vivos. Los macronutrientes son aquellos que se requieren grandes cantidades y los de menor cantidad se denominan micronutrientes. Algunos organismos necesitan, a parte de los minerales, nutrientes orgánicos nombrados *factores de crecimiento*, que son: aminoácidos, purinas, pirimidinas y vitaminas. Estas bacterias que tienen la necesidad de estos requerimientos son *auxótrofos* diferentes a los *protótrofos* que son libres de estos factores. Estos nutrientes se requieren con fines de reacciones de mantenimiento y biosintéticos (Apella; Araujo. 2005).

La clasificación según su aprovechamiento de la energía como requerimiento nutricional, se divide en dos: *fotótrofas* cuando utilizan la luz solar como fuente de energía (algas y cianobacterias) y *quimiótrofas* utilizando compuestos químicos como fuente energética. Encontrando ahí mismo las *quimiolitótrofas* que solo requieren

sustancias inorgánicas como H₂O, S, NH₃, NO₂⁻, Fe²⁺, etc. (*Nitrosoma*, *Nitrobacter*, *Gallionella*) y *quimiorganótrofas* que utilizan compuestos orgánicos como hidratos de carbono, hidrocarburos, lípidos, proteínas, alcoholes, etc. (Apella; Araujo. 2005).

Las bacterias se dividen en *autótrofas* y *heterótrofas*, según su función biocintético. Las primeras llevan a cabo su crecimiento sintetizando sustancias a partir de materiales sencillos; CO₂ como fuente de carbón (*clorofitas*, *cianofitas*, *Thiobacillus denitrificans*, *Nitrobacter*, *Nitrosomona*). Por el otro lado se encuentran las *heterótrofas* de la cual su fuente de carbón es orgánica (*Lactobacillus*, *Serratia*, etc) (Apella; Araujo. 2005).

Las bacterias se pueden dividir en cuatro grupos en base al oxígeno como requerimiento nutricional, que son: las *aerobias* que requieren O₂ desarrollarse; las *microaerófilas* que necesitan una presión de oxígeno 2 a 10% a la atmosférica; las *anaerobias facultativas* son las que pueden realizar su metabolismo en condiciones aeróbicas o anaeróbicas, según la disponibilidad de oxígeno y de nutrientes (por ej. las enterobacterias como *E. coli*); *anaerobias estrictas*, para estas bacterias el oxígeno es tóxico (por ejemplo *Clostridium*); al igual que las anteriores, las *anaerobias aerotolerantes*, llevan un metabolismo energético anaerobio (fermentación), pero toleran el oxígeno, ya que poseen enzimas detoxificantes (por ej. *Streptococcus*) (Apella; Araujo. 2005).

Medios de cultivos

Entendiendo la nutrición microbiana nos permite diseñar medios de cultivo que son ambientes artificiales que proporcionan sustancias necesarias para el desarrollo de la bacteria. Estos se clasifican en:

- 1) Sintéticos o definidos: lleva concentraciones químicas puras, de naturaleza orgánica y/o inorgánica.
- 2) Complejos o indefinidos: se crean por ingredientes con un alto grado de calidad nutricional, pero se desconoce su composición química puesto que son el resultado de infusiones y extractos naturales complejas: usándose digeridos crudos de caseína, hígado, levadura, carne, soya, sangre, etc. Con ello no se lleva un control nutricional preciso (Apella; Araujo. 2005).

Los medios de cultivo según su finalidad para cual fueron realizados:

- 1) Enriquecidos: se le adiciona sustancias para favorecer el crecimiento bacteriano tales como azúcar, sangre, suero, extractos de tejidos animales y plantas.
- 2) Selectivos: los que por su diseño favorecen el crecimiento de un determinado grupo de microorganismos. Estos medios de cultivo son utilizados para aislar microorganismos a partir de poblaciones microbianas mixtas. Se utiliza una mezcla de sustancias para permitir la selectividad de algunos microorganismos y el impedimento de desarrollo de otros.
- 3) Diferenciación: permite visualizar el crecimiento de dos o más bacterias por efecto al consumir los diferentes nutrientes del medio. Tienen en su mezcla reactivos que al combinarse con el metabolismo dan origen a una coloración específica.
- 4) Selectivos-Diferenciales: es una combinación de los anteriores. Se desarrolla un tipo de bacteria y con una coloración característica del microorganismo.
- 5) Electivos: motiva al desarrollo de una especie y las otras crecen poco y lentamente (Apella y Araujo. 2005).

Medio de cultivo Baird-Parker

Este es un medio selectivo y diferencial de identificación para las bacterias *S. aureus* y *Streptococcus agalactiae* que son los patógenos encontrados con mayor frecuencia en las glándulas mamarias de ganado bovino. Contiene como ingredientes medio base 95 ml, solución de telurito de potasio 1 ml y emulsión de yema de huevo 5 ml. Su preparación (Mesquita *et. al.*, 2019; NOM-115-SSA1-1994).

Medio base

El medio base contiene triptona 10g, extracto de levadura 1g, extracto de carne 5g, glicina 12g, cloruro de litio 5g, piruvato de sodio 10g, agar 20g, agua 1l. Para su preparación se disgregan los ingredientes y calentar con agitación continua dejando que hierva por 1 minuto. Se pone a esterilizar a $121^{\circ}\text{C} \pm 1$ por 15 minutos y se deja enfriar manteniendo el medio a una temperatura de 45°C (NOM-115-SSA1-1994).

Solución de telurito

Lleva como ingredientes telurio de potasio 1g y disuelto en 100ml de H_2O . Esta solución debe ser almacenada a temperatura de 0 a 5°C para que pueda conservarse por varios meses (NOM-115-SSA1-1994).

Emulsión de yema de huevo

El proceso para obtener esta emulsión requiera empezar por lavar con jabón y agua los huevos y limpiar con una solución de tintura de yodo (solución de alcoholica al 2%) u anegarlos en cloruro de mercurio (1:1000). Utilizar H_2O para enjuagar y secar con gasas estériles. Para vaciar los huevos es recomendable hacerlo en una campana de flujo o en condiciones asépticas y utilizar un separador de claras. Colocar las yemas en una probeta hasta obtener 60 ml y agregar solución

isotónica llegando a un volumen de 90 ml. Vertiendo la emulsión en matraz Erlenmeyer con perlas de vidrio, previamente esterilizadas, para agitar formando la emulsión. Finalmente se filtra con gasas, las placas obtenidas se deben utilizar dentro de un periodo de 48 horas después de su preparación (NOM-115-SSA1-1994).

Medio de cultivo Sal Manitol.

Este medio de cultivo es recomendable para la identificación de *S. aureus* por su gran contenido de sal que detiene el crecimiento en gran parte de las bacterias Gram negativas. Nos permite tener una identificación clara del patógeno,

Este medio permite realizar la identificación presuntiva de *S. aureus* por la pigmentación amarilla característica de *S. aureus*. Debido a que esta bacteria fermenta el manitol se genera un cambio de color en el medio que vira de rojo pálido a amarillo. Los *Staphylococcus* coagulasa negativos no fermentan el manitol y crecen en el medio formando colonias pequeñas de color que varía de blanco a rosado (Cervantes-Garcia *et. al.*; 2014)

Variante de la composición de la leche durante la Mastitis

La leche extraída de cuartos mamarios con presencia de matitas presenta un porcentaje bajo de sólidos totales, proteínas, grasa y calcio; el recuento total de bacterias, así como encontrar residuos de medicamentos se incrementa. La leche con estas características puede considerarse riesgo potencial para la salud del consumidor (Velásquez; Vega, 2012).

Tratamiento Antibiótico de la Mastitis

Se debe considerar que el tratamiento para combatir la MBB es el adecuado basándose en los resultados de los exámenes para identificar la bacteria, así el fármaco, como las concentraciones de este, el periodo de tiempo en que se administra se elegirá adecuadamente (Gasque, 2015; Mera *et. al.* 2017).

Antibióticos

- Bencilpenicilina G. antibiótico ideal contra estreptococos que no han desarrollado resistencia contra la penicilina G.
- Cloxacilina. Antibiótico semisintético con la ventaja de no ser inactivado por la enzima lactamasa, producida por los estafilococos penicilino-resistentes.
- Ampicilina. Es eficaz contra gérmenes grampositivos y gramnegativos, sin embargo, es ineficaz contra *Staphylococcus* resistentes a penicilina.
- Cefalosporina. Su función es parecida a la de la ampicilina, porque pertenece al grupo de las penicilinas semisintéticas.
- Neomicina. De amplio espectro, tiene menos efectos contra *Streptococcus* y *Staphylococcus* que las penicilinas.
- Gentamicina. Activo contra agentes patógenos gramnegativos (Gasque, 2015).

Resistencia bacteriana a los antibióticos

La resistencia a los antibióticos está ligada a la inadecuada utilización de dichos compuestos en el tratamiento (Sánchez *et. al.*, 2018). Es decir, provocando una manifestación gradual respectiva por una

modificación en el mecanismo de defensa al efecto del antibiótico; es decir, en la enzima, bomba de salida, variación en la permeabilidad de la membrana externa, cambio en el sitio de acción (Villanueva y Morales, 2017).

Por la falta de un programa de monitoreo a la resistencia a los antibióticos *Staphylococcus aureus* presenta una importante resistencia ante la penicilina en un 65.62%, tetraciclina 34.37% y cefalexina 37.50%. *Streptococcus agalactiae* tiene una resistencia de 56.19% a la cefalexina, 56.19% a penicilina, cefalotina 52.19% (Villanueva y Morales, 2017).

Que son los extractos vegetales y como se componen

Los extractos vegetales contienen metabolitos secundarios que se encuentran en las plantas de las cuales se extrajeron (Flores-Villegas *et. al.*, 2019).

Estos extractos representan una alternativa natural, utilizando los metabolitos secundarios de las plantas que ellas mismas usan como mecanismo de defensa contra microorganismos, plagas y predadores. Se pueden encontrar casos donde se identifican componentes antimicrobianos como terpenoides, aceites esenciales, alcaloides, poliacetilos, lecitinas, polipéptidos, flavonoides, quinonas, flavonas, coumarinas y taninos, evitando el efecto de resistencia bacteriana que se genera con el tiempo con un producto farmacéutico convencional (Toribio *et. al.*, 2007).

Infusiones de plantas

Las infusiones son una forma tradicional de consumo de plantas, ya que se extraen las sustancias solubles de algunas especies vegetales.

El método para realizar una infusión por lo general en es recipientes donde coloca agua destilada junto con parte de la planta, ya sea seca o fresca, poniendo la mezcla a una temperatura que alcance el punto de ebullición para que permita la liberación de los compuestos bioactivos en solución acuosa (Reyes *et. al.*, 2017).

Azadirachta indica

El neem (*Azadirachta indica*) es un árbol de la familia *Meliaceae* y su principal distribución se encuentra en Asia, África y en partes tropicales en el mundo. Su uso viene desde épocas antiguas por tener propiedades medicinales de amplio espectro se ha utilizado en la medicina, no obstante, solo en los últimos años se han realizado investigaciones con métodos científicos sobre sus propiedades como tratamiento (Fong *et. al.*, 2014). Está entre las plantas con potencial actividad biológica y con casos reportados de actividad antibacteriana inhibiendo el crecimiento de patógenos, esta actividad se le atribuye a la presencia de una gran cantidad de metabolitos secundarios (Reyes *et. al.*, 2017).

Tessaria integrifolia

Tessaria integrifolia conocido como “palo bobo”, “pájaro bobo”, “aliso de río” es un árbol originario de Perú, Brasil, Argentina y Paraguay. Utilizado como popularmente como cicatrizante y astringente, para controlar el colesterol, como antitusígeno, y para infecciones urinarias, preparando una infusión de hojas y tallos (Romio y Gurni, 2007).

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización experimental

El proyecto de investigación, así como el desarrollo experimental in vitro se llevó a cabo durante el 2019, en el laboratorio de parasitología Agrícola del Centro de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma Aguascalientes (UAA), en colaboración con la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN).

Extractos vegetales

Se recolectaron hojas de *Azadirachta indica* (Neem) y *Tessaria integrifolia* en Aguascalientes, Ags (figura 1, A). Las muestras obtenidas fueron transportadas al laboratorio de Parasitología Agrícola del Centro de Ciencias Agropecuarias de la UAA. Las hojas fueron fraccionadas con tijeras en trozos entre 1 a 2 cm (figura 1, B), los cuales se colocaron en charolas enrejadas metálicas con papel de estraza, y secadas a temperatura ambiente durante 72 hrs hasta que el material vegetal se deshidrató (figura 1, C). El material seco se pulverizó en el molino para alimentos, eléctrico COSUAI® modelo CS-700, para obtener el polvo de menor partícula (figura 1, D). Se utilizó Etanol y Metanol como base de extracción para la maceración (figura 1, E), los cuales estuvieron en la parrilla de agitación durante 72 hrs en una proporción de 14 gr de material vegetal seco por cada 200 ml de solvente de extracción. Simultáneamente se elaboraron infusiones con agua de los materiales secos y molidos, con las mismas proporciones descritas para la maceración, colocando en una plancha de agitación y calentamiento el matraz con el contenido, se contaron cinco minutos después de que alcanzado el punto de ebullición y se retiró del calor (figura 1, F).



Figura 1. A) Colecta de material vegetal; B) Fraccionado de hojas; C) Secado en parrillas envueltas en papel estraza; D) Pulverizado en molino; E) Etanol y Metanol como base para la extracción; F) Maceración e infusión en plancha de agitación.

El producto de maceración y de las infusiones fueron filtrados a través de papel whatman (Figura 2, A). Los filtros se separaron en dos partes proporcionales de las cuales una será utilizada como extracto crudo y conservada en matraz cubierto para protegerlo de la luz y a 4 °C. Una segunda porción de los extractos de Etanol y Metanol, se corrieron en el Rotavapor Heidolph Laborota 4002® a 75 °C, 126 rpm (figura 2, B). Secando los últimos de 10 a 15 ml en la placa de Petri, dentro de una estufa a 38°C, al igual que los macerados alcohólicos, las infusiones a base de agua obtenidas, fueron secadas en las mismas condiciones de temperatura, formando una capa de costra seca (figura 2, C). Los sólidos o costras resultantes, fueron etiquetados como extractos concentrados y almacenados en ausencia de luz y a 4°C.

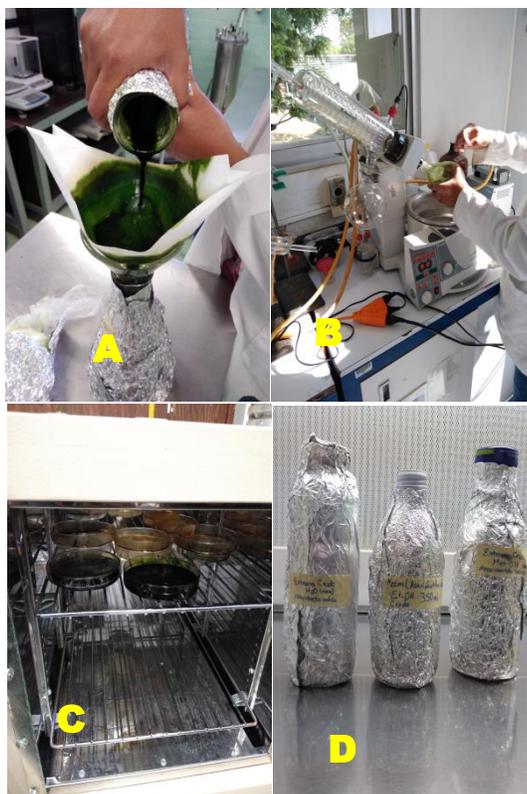


Figura 2. A) Filtrado; B) Rotaevaporador; C) secado en estufa a 38°C; D) Etiquetado de los crudos.

Protocolo de desinfección de las mamas.

Se inmovilizo el ganado en corrales individuales, para evitar movimiento y estrés del animal. Se utilizó jabón potásico o neutro para el lavado de las mamas y agua limpia contenida en garrafas cerradas. Se realizaron tres lavados manuales utilizando guantes de látex descartables por cada individuo, uno horizontal durante 1 min para después enjuagar con agua limpia, un segundo lavado en forma vertical a la cabeza del animal durante 1 min, seguido de un enjuague y finalmente un tercer lavado en forma circular y descendente a las mamas durante 1 min para enjuagar finalmente con abundante agua (figura 3).



Figura 3. Lavado de las mamas con agua estéril y jabón neutro.

Muestreo de los agentes patógenos

Los organismos patógenos *Staphylococcus aureus* fueron aislados de leche de vacas estabuladas en corrales establecidos en Pabellón de Arteaga, Aguascalientes. El muestreo fue dirigido a ganado previamente diagnosticado con Mastitis Bovina, de acuerdo a los con síntomas característicos de la enfermedad, y se verifico por medio de una prueba de California de acuerdo a las indicaciones del fabricante (California Mastitis Test: CMT) (Figura 4. A). Las muestras se trasladadas en tubos de ensaye de 13 x 100 estériles y en hielera equipada para mantener frías las muestras, hasta llegar al laboratorio de Parasitología Agrícola, del Centro de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, para su procesamiento (Figura 4, B).



Figura 4. A) Prueba de California; B) Muestras de leche.

Aislamiento e identificación de los organismos Patógenos

Las muestras de leche de vacas infectadas por MBB, se trasladaron al laboratorio de Diagnostico, donde se sembraron en forma directa 100 μ L por dispersión con espátula de Digralski, en placas de Petri con Agar Sal Manitol y Baird-Parker (BP). Y se realizaron otras dos siembras de 100 μ L, de diluciones seriadas de la leche en 10^{-2} , y 10^{-4} , en los mismos agares. Las placas fueron incubadas a 37° C de 24 a 48 horas. La purificación de las colonias aislada en las placas iniciales, se realizó tomando una colonia individual y sembrando por medio de la técnica de estría cruzada, en Agar Sal Manitol y BP incubando en las condiciones antes descritas (Figura 5).

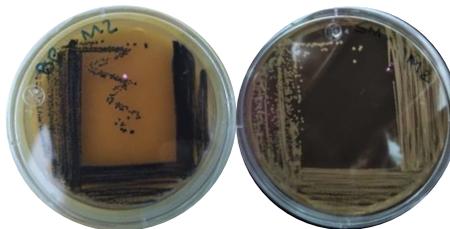


Figura 5 Purificación bacteriana en agar Baird-Parker y Sal Manitol

Morfología Colonial y Bacteriana.

La observación de la morfología colonial se llevó a cabo utilizando *cultivos* puros, y observando bajo microscopio estereoscópico los aislados y características de las colonias para su descripción.

La descripción de la morfología bacteriana se realizó utilizando una colonia aislada de un cultivo axénico, mediante una extensión y fijación bajo calor seco de la muestra. Para ser teñida por la técnica de Gram, utilizando Cristal violeta por un minuto, yodo-lugol un minuto, alcohol cetona durante 30 segundos y safranina por un minuto. Todo esto con decantado y lavados con agua para desechar los residuos del proceso anterior. Finalmente, la laminilla teñida, se secó a temperatura ambiente y se observó en microscopio óptico con aceite de inmersión (figura 6).



Figura 6. Cristal Violeta para tinción de Gram y bacteria vista desde el microscopio

Actividad inhibitoria de los extractos de *Azadirachta indica* (Neem)

El confrontamiento de los extractos y el patógeno, se realizó mediante la técnica de Antibiograma. Donde se prepararon placas de Petri con el medio de cultivo Müller-Hinton, donde se extendió por medio de hisopos estériles 100µL de una suspensión bacteriana del patógeno en

caldo de soya tipticaseína (figura 7. A), con 24 hrs de desarrollo. Las placas inoculadas con la suspensión de bacterias se dejaron secar cerrada y bajo campana de extracción durante 60 segundos. Transcurrido el tiempo de secado se colocaron con pinzas estériles, disco de papel filtro whatman de 0.6 cm impregnados previamente con los distintos extractos durante 5 minutos, y se colocaron en cuatro puntos cardinales de la caja y el centro, para un total de cinco discos, contando esto como una unidad experimental (figura 7. B). Las cajas se incubaron a 37° C y se registró el halo de inhibición por acción de los extractos cada 24 hrs durante siete días.

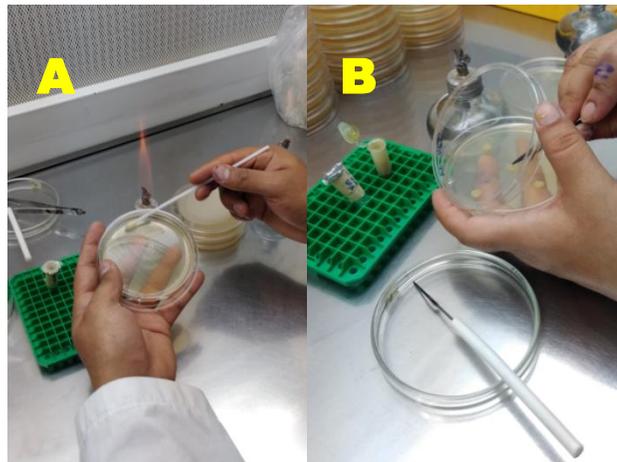


Figura 7. A) Inoculación de patógeno y B) Discos colocados con el tratamiento

Tratamientos establecidos

Se realizaron 14 tratamientos. De los cuales tres tratamientos utilizaron extractos crudos de Etanol y Metanol y una infusión base de Agua. Mientras que de los extractos y la infusión concentrados se prepararon tres concentraciones, alta, media y baja; correspondientes a 300 mg/ml, 100 mg/ml y 50 mg/ml respectivamente (figura 8. A). En ensayo se complementó con un testigo absoluto, en el cual se colocaron los discos con agua estériles sin ningún componente adicional, y un testigo comercial, antibiótico de uso veterinario, de nombre Secacef ®

del laboratorio Lapisa, con 10 ml totales por jeringa en concentración de Cefapirina Benzatínica de 300 mg, como comparativo en la efectividad de la inhibición bacteriana. Contando con tres repeticiones, cada uno de estos 14 tratamientos, para verificar su reproducibilidad (figura. 8).



Figura 8. A) Tratamientos en concentraciones alta, mediana y baja; B) Testigo comercial Secacef® del laboratorio Lapisa

Evaluación de efecto inhibitorio por medio del Antibiograma

El efecto inhibitorio de los extractos sobre las bacterias patógenas, se analizó midiendo los halos producidos por el tratamiento evaluado, utilizando una regla graduada en centímetros, colocada al centro de cada disco y recabando los cinco puntos de medición que serán los discos de cada unidad experimental (figura 9.). Los datos serán recabados en bitácoras diarias y se analizaron por medio del programa SAS versión 9.1 para Windows, utilizando la separación de las medias mediante la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).



Figura 9. Medición del halo de inhibición de los extractos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El aislamiento y purificación de los patógenos se realizó utilizando medios selectivos como Sal manitol y Baird-Parker. Donde se evidencian las colonias de *Staphylococcus aureus*. Oblitas-Vasquez y colaboradores en el 2015 utilizaron el agar Sal manitol para identificar al patógeno y poder obtener las colonias con halo amarillo en cajas Petri.

Aislamiento e identificación de los organismos Patógenos

Las muestras de leche de vacas infectadas por MBB, fueron procesadas y después de una incubación de 24 hrs en las condiciones antes descritas, mostraron de acuerdo a su morfología colonial en los medios selectivos, Agar Sal Manitol y BP las colonias características descritas para la presencia de *Staphylococcus aureus* (Figura 10).

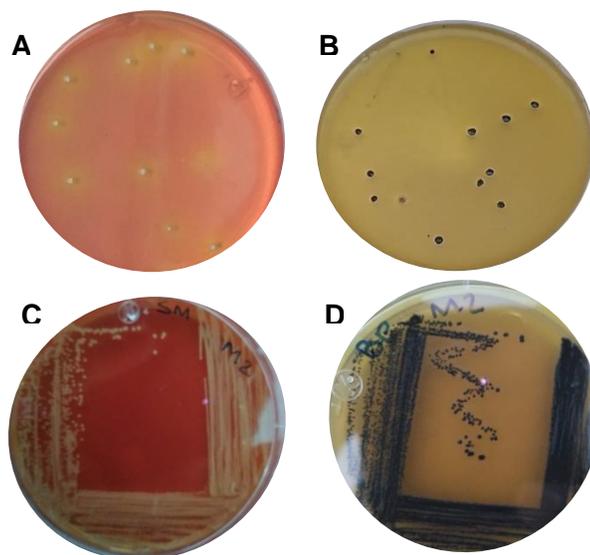


Figura 10. A) Aislamiento bacteriano en Sal Manitol; B) Aislamiento bacteriano en Baird-Parker; C) Purificación de la bacteria en Sal Manitol; D) Purificación de la bacteria en Baird-Parker.

Morfología Colonial y Bacteriana.

Las cepas axénicas obtenidas del muestreo en medios selectivos para *Staphylococcus aureus* fueron analizadas y de acuerdo a su morfología colonial mostraron colonias de forma circular de 1 a 3 mm de diámetro, color de blanca a crema claras, con bordes enteros, convexa y superficie lisa, brillante y cremosa en Agar Sal Manitol. Aunado al crecimiento bacteriano presenta un cambio de color en el medio circundante a las colonias, debido al indicador de rojo fenol contenido en la formulación, que va del rojo claro al amarillo. Mientras que en agar BP se obtuvieron colonias de forma puntiforme de 1 a 1.5 mm de diámetro, color negras grisáceas, con bordes ondulados, convexa y superficie lisa, brillante y cremosa, presentando un aclaramiento o un estrecho borde blanco en los límites del crecimiento bacteriano que aparece entre las 48 y 36 hrs de la incubación. Lo que corrobora la presencia de estafilococos positivos a la coagulasa (por ejemplo, *Staphylococcus aureus*), (Figura11).

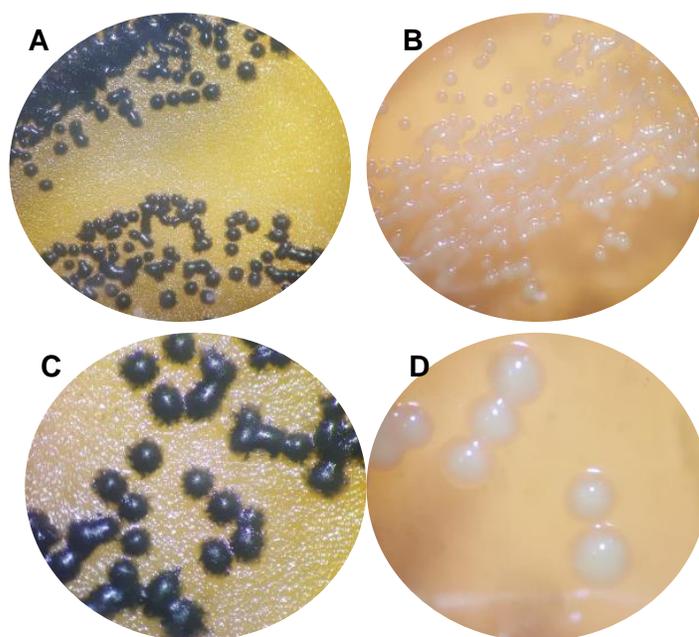


Figura 11. Vista en estereoscopio Motic modelo SMZ-161, 4.0 x

Tinción de Gram

Para confirmar la presencia de *Staphylococcus aureus*, se realizaron extensiones bacterianas de las cepas axénicas, teñidas por la técnica de Gram. Confirmando la presencia de cocos morados, Gram positivos en agrupaciones de racimos como se muestran en la figura 12.

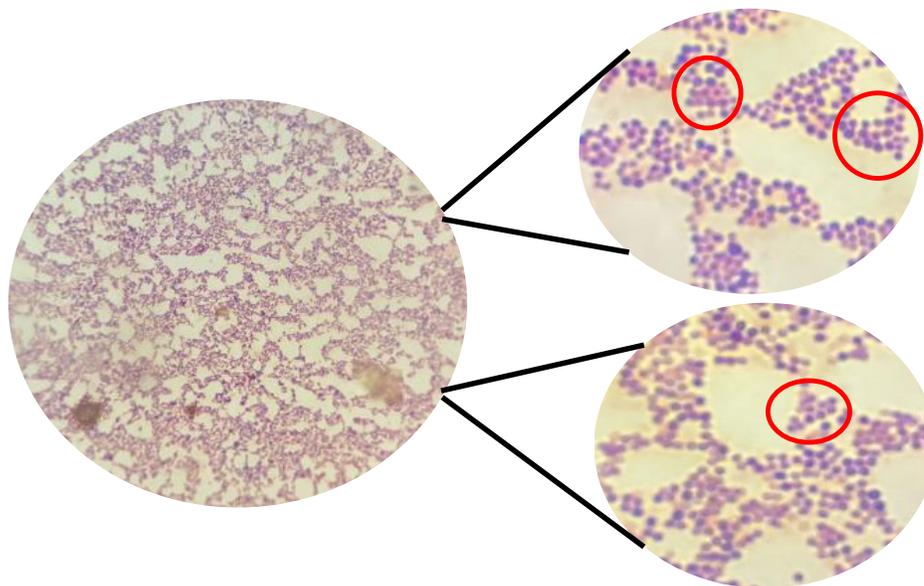


Figura 12 Vista desde el microscopio de los racimos de *Staphylococcus aureus*

Efecto inhibitorio por medio del Antibiograma de *Azadirachta indica* (Neem) y *Tessaria integrifolia* (Palo bobo)

El confrontamiento de los extractos y el patógeno, se observó la producción de halos inhibitorios causados por el efecto de los metabolitos contenidos en los extractos de *Azadirachta indica*, los cuales fueron registrados en mm con una regla graduada. De acuerdo con el análisis estadístico arrojado por el programa SAS. Se agruparon las medias en 6 grupos de acuerdo a las letras asignadas en el cuadro

3. Colocando en forma sobresaliente al testigo comercial Secacef ® del laboratorio Lapisa, como el tratamiento con mayor efecto inhibitorio, mostrando la media más alta para este efecto, seguido de los tratamientos de infusión en Agua en concentraciones de 100 y 300 mg/ml como las alternativas más competitivas. Mientras que para este caso los extractos producidos por Metanol, mostraron el valor de medias más bajo, igualmente en la agrupación de las mismas.

Medias del efecto inhibitorio del extracto de *Azadirachta indica* sobre *Staphylococcus aureus* del valor observado, columnas seguidas por la misma letra no son estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de separación de medias de Tukey al 0.05 % de significancia.

Cuadro 3. Ensayo de extractos de Azaridacta indica contra Staphylococcus aureus Agrupación sobre la comparación de medias de Tukey con una significancia del 0.05%, sobre los datos del efecto inhibitorio del extracto vegetal Azaridacta indica.

| <i>Azadirachta indica</i> vs <i>Staphylococcus aureus</i> | | | | | | |
|-----------------------------------------------------------|---|---|-----|--------|---|----------------------------|
| Tukey Agrupamiento | | | | Media | N | Tratamiento |
| | | | A | 21.600 | 3 | Testigo C. Antibiotico |
| | | | B | 6.133 | 3 | H ₂ O 100 mg/ml |
| | C | | B | 5.733 | 3 | H ₂ O 300 mg/ml |
| | C | | B D | 5.467 | 3 | H ₂ O 50 mg/ml |
| | C | E | B D | 4.333 | 3 | Et-OH 50 mg/ml |
| F | C | E | B D | 2.800 | 3 | Et-OH 100 mg/ml |
| F | C | E | B D | 2.733 | 3 | Et-OH 300 mg/ml |
| F | C | E | B D | 2.467 | 3 | H ₂ O crudo |
| F | C | E | B D | 1.933 | 3 | Et-OH crudo |
| F | C | E | D | 1.733 | 3 | Met-OH 300 mg/ml |
| F | C | E | D | 1.533 | 3 | Met-OH 50 mg/ml |
| F | | E | D | 1.333 | 3 | Met-OH crudo |
| F | | E | | 0.600 | 3 | Met-OH 100 mg/ml |
| F | | | | 0.000 | 3 | Testigo Absoluto |

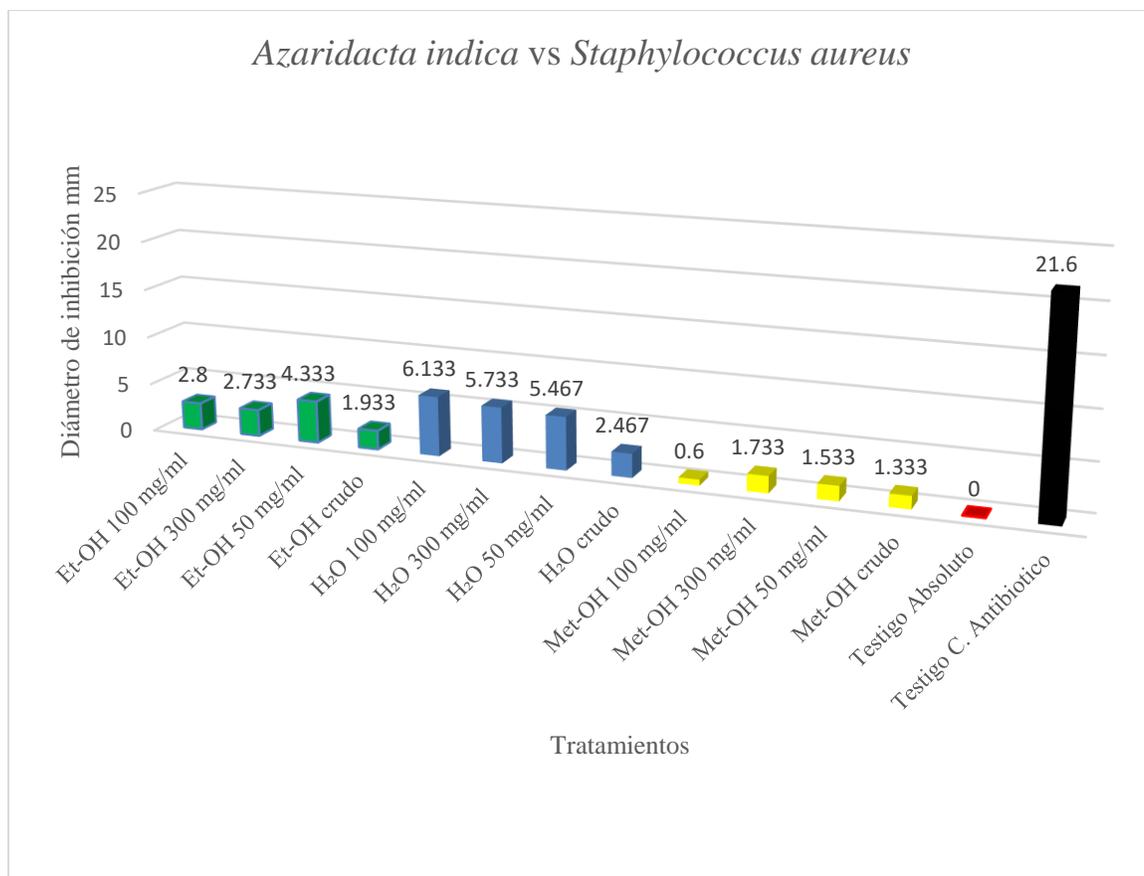


Figura 13. Gráfica del diámetro de inhibición de extracto de *Azaridachta indica*

Se puede notar que las infusiones de hojas deshidratadas de *Azaridachta indica* presentan mayor liberación de compuestos activos como en el estudio realizado por Reyes y colaboradores en el 2017 en donde se evaluaron infusiones de *A. indica* y demostraron que el material seco presenta mayores propiedades inhibitorias. Mientras que los extractos metanolitos no presentaron inhibición contra el patógeno como en estudios realizados por Toribio y colaboradores en el 2009.

El bioensayo establecido para los extractos de *Tessaria integrifolia* contra el patógeno *Staphylococcus aureus*, mostró nuevamente superioridad marcada en el testigo comercial referente al antibiótico Secacef ® del laboratorio Lapisa. El análisis estadístico arrojado del programa SAS mostro 5 grupos de acuerdo a las letras en que se

conformaron los tratamientos descritos en el cuadro 4. De los tratamientos naturales conformados por los extractos, el tratamiento de Etanol crudo y el de Etanol de 50 mg/ml, fueron los que mostraron el efecto inhibitorio mayor en comparación al resto, pero sigue estando por debajo del efecto mostrado por el tratamiento comercial del antibiótico químico. Mientras que para este caso los extractos producidos a base de agua, como lo fue la infusión, fueron los de menor efecto inhibitorio, a diferencia del bioensayo con extractos de *Azardachta indica* (Neem).

Medias del efecto inhibitorio del extracto de *Tessaria integrifolia* sobre *Staphylococcus aureus* del valor observado, columnas seguidas por la misma letra no son estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de separación de medias de Tukey al 0.05 % de significancia.

Cuadro 4. Ensayo de extractos de *Tessaria integrifolia* contra *Staphylococcus aureus* Agrupación sobre la comparación de medias de Tukey con una significancia del 0.05%, sobre los datos del efecto inhibitorio del extracto vegetal *Tessaria integrifolia*.

| Tessaria integrifolia vs Staphylococcus aureus | | | | | |
|-------------------------------------------------------|---|--------------|----------|------------------------|----------------------------|
| Tukey Agrupamiento | | Media | N | Tratamiento | |
| | A | 22.0667 | 3 | Testigo C. Antibiotico | |
| | B | 3.1333 | 3 | Et-OH crudo | |
| C | B | 2.8667 | 3 | Et-OH 50 mg/ml | |
| C | B | D | 1.9333 | 3 | Met-OH 100 mg/ml |
| C | B | D | 1.8000 | 3 | Met-OH 50 mg/ml |
| C | B | D | 1.7333 | 3 | Et-OH 300 mg/ml |
| C | | D | 1.5333 | 3 | Met-OH crudo |
| | E | D | 1.2667 | 3 | Et-OH 100 mg/ml |
| | E | | 0.0000 | 3 | Met-OH 300 mg/ml |
| | E | | 0.0000 | 3 | H ₂ O 300 mg/ml |
| | E | | 0.0000 | 3 | H ₂ O 50 mg/ml |
| | E | | 0.0000 | 3 | H ₂ O 100 mg/ml |
| | E | | 0.0000 | 3 | Testigo Absoluto |
| | E | | 0.0000 | 3 | H ₂ O crudo |

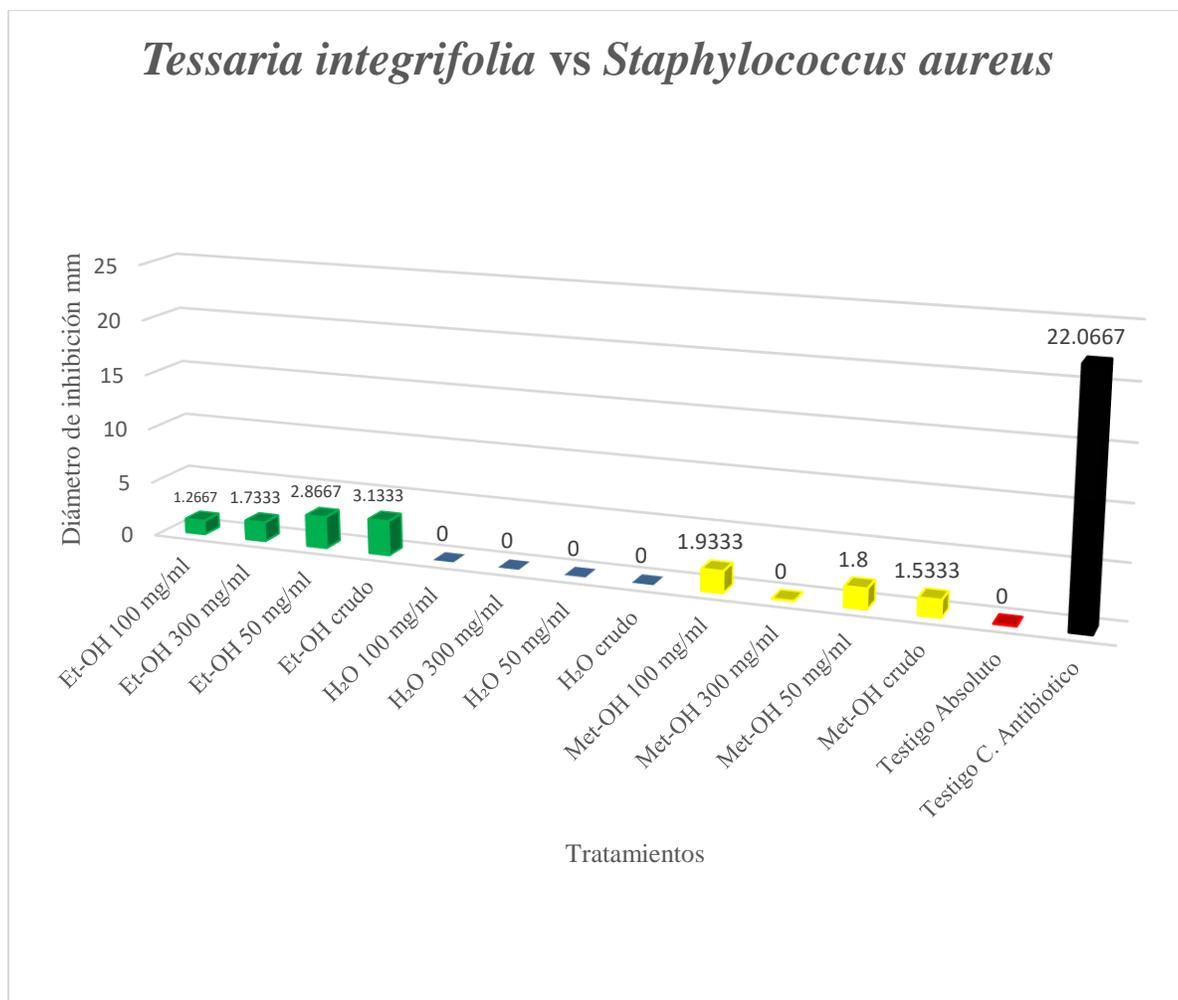


Figura 14. Gráfica del diámetro de inhibición de extracto de *Tessaria integrifolia*

En los tratamientos de 50 mg/ ml y extracto crudo, donde mostraron en mayor efecto inhibitorio. Por lo cual, en seguimiento al trabajo de investigación es recomendable establece la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para determinar a partir de que concentraciones el compuesto empieza a tener actividad antibacteriana, ya que las diluciones pueden afectar su actividad, como lo demostró Pimentel y colaboradores en su trabajo (2015). Los halos de inhibición es la confirmación de la presencia de metabolitos secundarios de la planta que siguen activos en el extracto y tienen una acción bactericida, como el trabajo de Silva y colaboradores (2019).

CONCLUSIONES

El trabajo de investigación respecto a la producción de extractos vegetales, obtuvo 12 extractos de los cuales seis fueron crudos y seis concentrados. Obtenido de dos árboles de la región, *Azadirachta indica* y *Tessaria interifolia*. Estos extractos evaluados en conjunto a los testigos mostraron actividad inhibitoria y antibiótica en la evaluación de antibiograma, produciendo halos de inhibición en el crecimiento bacteriano de *Staphylococcus aureus*. Donde el antibiótico comercial Secacef® (Cefapirina Benzatídica de 300 mg) fue el tratamiento que mostro mayor diámetro de inhibición ante la bacteria patógena. Por su parte los tratamientos naturales alternativos como los extractos vegetales, mostraron control, al producir el efecto inhibitorio a través del halo testado ante la misma bacteria patógena. Para *Azadirachta indica* los tratamientos con mayor efectividad fueron los extraídos a base de agua, en el caso de la infusión, particularmente en la concentración de 100 mg/ml y de forma cercana las concentraciones de 300 y 50 mg/ml. Mientras que para *Tessaria interifolia* de la misma manera presentaron actividad antibiótica los tratamientos extraídos a base de etanol crudo y la concentración de 50 mg/ml.

No obstante a este resultado y sabiendo la resistencia bacteriana que generan los antibióticos al prologar su uso, y dejando de ser efectivos al inducir bacterias más resistentes y prevalentes en las enfermedades como la MBB (Mastitis Bacteriana Bobina). Es recomendado y una opción viable la alternativa del uso de tratamientos de origen vegetal como los extractos, los cuales, en comparación a los antibióticos comerciales químicos, no generan resistencia bacteriana y pueden ser utilizados por largos periodos de tiempo, además de no ser residual en el ganado o en ambiente.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta** Moreno, Alejandro; Mira Hernández, Juliana; Posada Arias; Silvia. 2017. Tópicos en mastitis bovina: desde la etiología hasta algunas terapias alternativas
- Agudelo** Gómez, Divier Antonio; Bedoya Mejía, Oswaldo. 2005. Composición nutricional de la leche de ganado vacuno. Revista Lasallista de Investigación, vol. 2. núm. 1. pp. 38-42.
- Aguilera-Becerra**, Astrid Maribel; Urbano-Cáceres, Eliana Ximena; Jaimes-Bernal, Claudia Patricia. 2014. Bacterias patógenas en leche cruda: problema de salud pública e inocuidad alimentaria Ciencia y Agricultura, vol. 11, núm. 2, julio-diciembre, 2014, pp. 83-93.
- Andreu** Domingo, A.; Salcedo Abizanda, S.; Heredia Prim, F.; González Morlans, J.; Bartolomé Comas, R.M.; Cabero Roura, LI.1997. Evaluación de tres técnicas rápidas para la detección intraparto del estreptococo del grupo B. Anales españoles de pediatría.
- Apella**, Maria C.; Araujo, Paula Z. 2005. Microbiología del agua conceptos básicos. Solorsefewater.
- Avellán** Velez, Roque Heriberto; Zambrano Aguyo, Marina Dalila; De La Cruz Veliz, Laura Monserrate; Cedeño Palacios, Carlos Alfredo; Delgado Demera, Maria Hipatia; Rezabala Zambrano, Patricio Fabián; Macías Moreira, Yandri Andrés. 2019. Prevalencia de mastitis subclínica en el ganado bovino, mediante la prueba California Mastitis Test, en el cantón Rocafuerte de la provincia Manabí, Ecuador. Revista Amazónica y Ciencia y Tecnología. Volumen 8 (1): 62-70.

- Bou**, Germán; Fernández-Olmos, Ana; García, Celia; Sáez-Nieto, Juan Antonio; Valdezate, Sylvia. 2011. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enferm Infecc Microbiol Clin*.
- Brizuela** Raygosa, Jennifer Brisuela; Palacios Torres, Javier; López Valencia, Gilberto; Hori-Oshima, Sawako; Herrera Ramírez, José Carlomán; Pujol Manríquez, Lourdes Carolina; Angulo Valadez, Carlos Eliud; Rentería Evangelista, Tomás Benjamín; Medina Basulto, Gerardo Enrique. 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**, Alfonso. 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*. 21:582-589.
- Cervantes-García**, Estrella; García-González, Rafael; Salazar-Schettino, Paz Maria. 2014. Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Rev Mex Patol Clin Med Lab*; 61 (1).
- D'Pool**, Gerardo; Rivera Pirela, Sergio; Torres, Teresita; Pérez, Mario; García, Arelis; Castejón, Osiris; Rojas, Nelda. 2004. Prevalencia de brucelosis bovina mediante ELISA competitivo en el Municipio la Cañada de Urdaneta, estado Zulia, Venezuela. *Revista Científica*, vol. XIV, núm. 2.

- FAO**, 2019. Calidad y evaluación. Organización de las Naciones Unidad para la Alimentación y la Agricultura. Sitio web: <http://www.fao.org/dairy-production-products/products/calidad-y-evaluacion/es/>
- FAO**, 2019. Tipos y características. Organización de las Naciones Unidad para la Alimentación y la Agricultura. Sitio web: <http://www.fao.org/dairy-production-products/products/es/>
- FAO**. 2019. Composición de la leche. Organización de las Naciones Unidad para la Alimentación y la Agricultura. Sitio web: <http://www.fao.org/dairy-production-products/products/composicion-de-la-leche/es/>
- Farray González**, Jesús Francisco; Rubio García, Juan Luís; Rodríguez, Yolexis Fabré; Alonso Rodríguez, Julio César; Suárez Fernández, Yolanda E. 2015. Reducción de la mastitis subclínica con el empleo de implante de catgut en el punto de acupuntura Estómago 29. Rev. Salud Anim. Vol. 37 No. 2
- Fernández-Bolaños**, O. F.; Trujillo Graffe, José Eduardo; Peña Cabrera, John Jaiver; Cerquera Gallego; Jefferson; Granja Salcedo, Yury Tatiana. 2012. Mastitis bovina: generalidades y métodos diagnósticos. Revista Veterinaria REDVET 13(11).
- Flores-Villegas**, Mónica Yazmín; González-Laredo, Rubén Francisco; Prieto-Ruíz, José Ángel; Pompa-García, Marín; Ordaz-Díaz, Luis Alberto; Domínguez-Calleros, Pedro Antonio. 2019. Eficiencia del extracto vegetal de *Datura stramonium* L. como insecticida para el control de la mosca sierra. Madera y bosques, 25(1), e2511642.

- Fong** Lores, Onel; Berenguer Rivas, Clara; de la Vega Acosta, Jorge; Wawoe Díaz, Nioslaymy; Puente Zapata, Edgar. 2014. Potencial antioxidante de un extracto acuoso de hojas del NIM (Azadirachta Indica A. Juss). Revista Cubana de Plantas Medicinales, 19(2), 205-207.
- Gasque** Gómez, Ramón. 2015. MASTITIS BOVINA. de Enciclopedia Bovina, BM Editores. Sitio web: http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_leche/107-Mastitis_bovina.pdf.
- Hernández** Cabria, Marta; Echevarría Gutiérrez, Francisco; Iglesias Barcia, José Ramón. 2011. La leche como alimento funcional. Guía de buenas prácticas clínicas en Alimentos Funcionales. Corporación Alimentaria Peñasanta, S. A. (CAPSA). 93-105.
- INIFAP**. 2011. Mejora continua de la calidad higiénico-sanitaria de la leche de vaca Manual de capacitación. Instituto nacional de investigaciones forestales, agrícolas y pecuarias. Sitio web: http://utep.inifap.gob.mx/pdf_s/MANUAL%20LECHE.pdf
- INIFAP**. 2019. USO DE LA PRUEBA DE WISCONSIN MODIFICADA PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA MASTITIS SUBCLINICA. INIFAP-SAGAR.
- INIFAP**. 2010. Manual de Buenas Prácticas Pecuarias en Unidades de Producción de Leche Bovina. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/316615/MANUAL_DE_BUENAS_PRCTICAS_PECUARIAS_EN_UNIDADES_DE_PRODUCION_DE_LECHE....pdf

Jiménez Mejía, Rafael; Gudiño Sosa, Luis Fernando; Aguilar López, José Antonio; Loeza Lara, Pedro Damián. 2017 .Caracterización molecular de Escherichia coli resistente a antibióticos aislada de mastitis bovina en Michoacán, México. Rev Mex Cienc Pecu. 8(4):387-396.

López-Jácome, L.; Hernández-Duran, M.; Colín-Castro, C.; Ortega-Peña, S.; Cerón-González, G.; Franco-Cendejas, R. 2014. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. Investigación en discapacidad medica medigraphic. 3(1). 10-18.

Manjarrez-López, Ana María; Díaz Zarco, Soledad; Salazar García, Félix; Valladares Carranza, Benjamín; Gutiérrez Castillo, Adriana del Carme; Barbabosa Plliego, Alberto; Talavera Rojas, Martín; Alonso Fresán, María Uxúa; Velázquez Ordoñez; Valente. 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. Revista mexicana de ciencias pecuarias, 3(2), 265-274.

Martínez Covarrubias, Adriana Guadalupe; Santillán Flores, Marco Antonio; Guzmán Ruiz, Claudia Celic; Favila Humara, Lucía del Carmen; Córdova López, Dionicio; Díaz Aparicio, Efrén; Hernández Andrade, Laura; Blanco Ochoa, Miguel Ángel. 2012. Desarrollo de un inmuno-ensayo enzimático (ELISA) para el diagnóstico de paratuberculosis en bovinos. Rev. mex. de cienc. Pecuarias.

Mas, Eva; Poza, Julo; Ciriza, Jesus; Zaragoza, Pilar; Osta, Rosario; Rodellar, Clementina. 2001. Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Rev. AquaTIC. No. 15.

- Mera Andrade**, R.; Muñoz Espinoza, M.; Artieda Rojas, J. R.; Ortíz Tirado, P.; González Salas, R.; Vega Falcón, V. 2017. Mastitis bovina y su repercusión en la calidad de la leche REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria, vol. 18, núm. 11.
- Mesquita**, Alan A., Rocha, Christiane MBM, Bruhn, Fabio RP, Custódio, Dircéia AC, Braz, Mirian S., Pinto, Sandra M., Silva, Délcio B., y Costa, Geraldo M .. 2019. Staphylococcus aureus y Streptococcus agalactiae: prevalencia, resistencia a los antimicrobianos y su relación con la calidad de la leche de los rebaños de ganado lechero en el estado de Minas Gerais, Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 39 (5), 308-316.
- Pastor Guízar** Figueroa, Juan Ignacio; Bedolla Cedeño, José Luís Carlos. 2008. Determinación de la prevalencia de mastitis bovina en el municipio de Tarímbaro, Michoacán, mediante la prueba de California. REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria, vol. IX, núm. 10, octubre, 2008, pp. 1-34.
- Pérez-Ruano**, M.; Tarafa-Zambrana, L. 2017. Evaluación del equipo Mas-D-Tec en el diagnóstico de campo de mastitis subclínica en el ganado bovino. Revista de Salud Animal, 39(3), 00.
- Quevedo**, W. 2018. Recuento de células somáticas (rsc), como indicador en la resistencia de la mastitis bovina. Revista Ciencia, Tecnología e Innovación. volumen 16, número 17.

- Ramírez**, Nicolás; Gaviria, Gerardo; Arroyave, Ofelia; Sierra, Blanca; Benjumea, Jaime. 2001. Prevalencia de mastitis en vacas lecheras lactantes en el municipio de San Pedro de los Milagros, Antioquia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 14(1), 76–87.
- Reyes** Munguía, Abigail; Reyes Martínez, Antonio; Aguilar González, Cristóbal Noé; Carrillo Inungaray, María Luisa. 2017. Propiedades antioxidantes de infusiones de neem (*Azadirachta indica*) encapsuladas con proteína de soya. *Nova scientia*, 9(18), 167-185.
- Romio**, Elisa; Gurni, Alberto A. 2007. Estudio micrográfico preliminar de las estructuras foliares de dos especies palustres americanas con potencial actividad antiviral. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, vol. 6, núm. 5, pp. 219-220.
- Ruiz-García**, Luis Felipe; Sandoval-Monzón, Rocío Silvia. 2018. Diagnóstico de mastitis subclínica de vacunos lecheros mediante el conteo de células somáticas empleando dos métodos diagnósticos. *Revista Científica*, vol. XXVIII, núm. 2, pp. 129-135.
- Sánchez-Ceja**, Mónica, Arceo-Martínez, Ma. Teresa, Sandoval-Flores, Ma. Guadalupe, Alva-Murillo, Patricia Nayeli, Jiménez-Mejía, Rafael, & Loeza-Lara, Pedro Damián. 2018. Uso de nisina y quitosano para la inhibición de *Staphylococcus aureus* resistente a antibióticos y asociado a mastitis bovina. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 9(4), 792-810.

- SENASICA.** 2011. Manual de Buenas Prácticas Pecuarias en Unidades de Producción de Leche Bovina. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Sitio web: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/316615/MANUAL_DE_BUENAS_PR_CTICAS_PECUARIAS_EN_UNIDADES_DE_PRODUCCI_N_DE_LECHE_....pdf
- Toribio,** S. Mirta; Oriani, D. Susana; Toso, Ricardo E.; Tortone, A. Claudia; Fernández, G. Jésica. 2007. Suceptibilidad de *staphylococcus aureus* a extractos vegetales obtenidos de plantas nativas y naturalizadas de la provincia de la pampa, argentina. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, vol. 6, núm. 6. pp. 367-368.
- Velásquez V,** Carlomagno; Vega V, Jaime. 2012. Calidad de la leche y mastitis subclínica en establos de la provincia de Huaura, Lima. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 23(1), 65-71.
- Vila,** Jordi; Dolores Gómez, María; Salavert, Miguel; Bosch, Jordi. 2017. Métodos de diagnóstico rápido en microbiología clínica: necesidades clínicas. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Pages 41-46
- Villanueva T.,** Gonzalo; Morales C., Siever. 2017. Resistencia antibiótica de patógenos bacterianos aislados de mastitis clínica en bovinos de crianza intensiva REDVET. *Revista Electrónica de Veterinaria*, vol. 18, núm. pp. 1-12.

- Oblitas-Vasquez**, Harlein Jeancarlo; Pena-Sanchezub, Eric Ricardo; Diaz-Velez, Cristian. 2015. Efecto "in vitro" del extracto crudo de *Weinmannia pubescens* Kunth "chichir" sobre cultivos de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* aislados de pacientes procedentes del Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo. Chiclayo, Perú. *Revista Hispanoamericana De Ciencias De La Salud*, 2(3), 200-209.
- Silva**, Wladimir Padilha da; Destro, Maria Teresa; Landgraf, Mariza y Franco, Bernadette DGM. 2000 Características bioquímicas de *Staphylococcus aureus* típico y atípico en leche mastitic y muestras ambientales de granjas lecheras brasileñas. *Revista Brasileña de Microbiología*, 31 (2), 103-106.
- Pimentel** Ramírez, Erika; Castillo Andamayo, Diana; Quintana Del Solar, Maurtua Torres, Dora; Villegas Vílchez, León; Díaz Santisteban, Camilo. Antibacterial effect of ethanolic extracts from plants utilized in the Andes culinary traditions against microorganisms of the oral cavity. *Rev. Estomatol. Herediana* . 25(4): 268-277.