



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

“EFECTO INHIBITORIO DE EXTRACTO DE
Caléndula officinalis EN BACTERIAS AISLADAS DE
CASOS DE MASTITIS BOVINA DE LA CUENCA
LECHERA DE TIZAYUCA, HIDALGO”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

LAURA KATARINA MONTALVO PAREDES

ASESORES: M.V.Z. GERARDO CRUZ JIMENEZ

M.V.Z. JOSE ANTONIO LICEA VEGA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Efecto inhibitorio de extracto de Caléndula officinalis en bacterias aisladas de casos de Mastitis bovina de la cuenca lechera de Tizayuca, Hidalgo.

que presenta la pasante: Laura Katarina Montalvo Paredes

con número de cuenta: 9460022-7 para obtener el título de :

Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán-Izcalli, Méx. a 30 de Marzo de 2005

PRESIDENTE

MVZ. Gerardo Cruz Jiménez

VOCAL

QFI. Andrea A. Becerril Osnaya

SECRETARIO

Q. Mario A. Morales Delgado

PRIMER SUPLENTE

MFC. Cecilia Hernández Barba

SEGUNDO SUPLENTE

QFB. Ana Laura Vázquez Martínez

Ana Laura Vázquez Martínez

DEDICATORIAS

A Dios por darme su bendición en todo momento para llegar a concluir esta meta, pero sobre todo por haber permitido que Josué llegara a mi vida.

A mi madre por todo su esfuerzo, sacrificio, dedicación, apoyo y amor que me ha dado durante todo este tiempo, sin ti esta meta no la habría podido concluir. Te Quiero Mucho.

A Edgar por haber llegado a mi vida y permanecer a mi lado desde entonces brindándome su apoyo y comprensión por darme ánimo para salir adelante, por los rato agradables y difíciles, pero sobre todo por tu paciencia y amor. Te Amo.

A Josué porque desde que llegaste a este mundo le has dado un luz mas a mi vida, eres mi maspreciado tesoro.

A mi abuela que me cuido y corrigió, por sus consejos sabio y por haber estado incondicionalmente a mi lado. Te Adoro.

A mis hermanos por su apoyo y confianza por todos esos momento agradables y desagradables que son los que le han dado sabor a mi vida.

A mis mejores amigas Jeannette y Alhelí por brindarme su amistad y apoyo incondicional, por sus consejos, por todos esos momentos buenos y malos, pero sobre todo por haber estado conmigo en el momento que más las necesite.

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan por la formación profesional y a todos los profesores que contribuyeron a ella.

A mis Asesores MVZ Gerardo Cruz Jiménez y MVZ José Antonio Licea Vega por todo el apoyo para la realización de este trabajo, por los conocimientos transmitidos pero sobre todo por la confianza y amistad.

A mis amigos Gaby, Toño que con su amistad hicieron que las cosas fueran más fáciles en este camino.

A mis tías Lucha (Q.E.P.D.) Elia y Rosa Cansigno por su amor y cariño, porque de alguna manera contribuyeron a mi formación personal y profesional. Que Dios las Bendiga.

A mis tíos Adolfinia y Manuel por ese gran amor que hace que uno pueda seguir adelante y que es recíproco, por todos esos momentos divertidos en el Astro-Dome y por los que no, también!

A mi tía Beny por haberme dado esa orientación que en algún momento de mi vida necesite, por sus consejos y conocimientos.

A mis tíos Manuel, Elvira y Luis Alberto por ser parte de mi vida y porque en el transcurso de ella han participado de alguna manera en mi formación integral.

A todos mis primos Claudia, Carmina, Santiago, Juliana, Alberto, Lucy y Luis por que son mi familia y por todos esos ratos divertidos.

A mis tíos Ruben Cansigno y Luz del Carmen Vinales por ser parte de mi vida y porque los quiero mucho.

A la familia González Riego porque son los mejores amigos que uno puede tener y porque los quiero mucho y ya...

Este trabajo se realizo en el laboratorio No. 10 de Microbiología en el edificio de posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan.

INDICE

1. Resumen	1
2 Objetivos	3
2.1. Objetivo General	3
2.2. Objetivos Particulares	3
3. Hipótesis	4
4. Introducción	5
4.1. <i>Caléndula officinalis</i>	5
4.1.1. Generalidades	5
4.1.2. Propiedades	5
4.1.3. Composición	6
4.2. Mastitis	8
4.2.1. Etiología	8
4.2.2. Epidemiología	8
4.2.3. Patogenia	10
4.2.4. Manifestaciones clínicas	11
4.2.5. Tratamiento	11
4.2.6. Alternativa para el tratamiento de mastitis	12
4.3. <i>Staphylococcus</i>	13
4.3.1. Hábitat	13
4.3.2. Morfología	13
4.3.3. Nutrición y crecimiento	14
4.3.4. Factores de virulencia	14
4.3.5. Detección e identificación	15
4.3.6. Manifestaciones clínicas	15
4.3.7. Tratamiento	16
4.4. <i>Streptococcus</i>	17
4.4.1. Propiedades del género	17
4.4.2. Nutrición y crecimiento	17
4.4.3. Factores de virulencia	18
4.4.4. Detección e identificación	18
4.4.5. Manifestaciones clínicas	19
4.4.6. Tratamiento	19
4.5. <i>Escherichia coli</i>	20
4.5.1. Hábitat	20
4.5.2. Propiedades del género	20
4.5.3. Nutrición y crecimiento	20
4.5.4. Detección e identificación	21
4.5.5. Factores de virulencia	21
4.5.6. Manifestaciones clínicas	22
4.5.7. Tratamiento	22

4.6. <i>Pseudomonas spp</i>	23
4.6.1. Hábitat	23
4.6.2. Propiedades del género	23
4.6.3. Morfología	23
4.6.4. Nutrición y crecimiento	24
4.6.5. Factores de virulencia	24
4.6.6. Detección e identificación	25
4.6.7. Manifestaciones clínicas	25
4.6.8. Tratamiento	26
5. Diagrama de trabajo	27
6. Material y Métodos	28
6.1. Obtención del extracto de <i>Calendula officinalis</i>	28
6.2. Esterilización	28
6.3. Liofilización	28
6.4. Obtención de la cepas bacterianas	28
6.5. Identificación y purificación de las cepas	29
6.6. Estandarización de las cepas	29
6.7. Enfrentamiento bacteriano	29
7. Resultados	30
8. Discusión de resultados	39
9. Conclusiones	41
10. Apéndice	42
11. Abreviaturas	48
12. Referencias	49

INDICE DE TABLAS

Tabla I. Identificación de la cepas del género <i>Streptococcus</i> .	30
Tabla II. Identificación de la cepas del género <i>Staphylococcus</i>	31
Tabla III. Identificación de la cepas del género <i>Enterobacteriaceae</i>	32
TablaIV. Identificación de la cepas del género <i>Pseudomonas</i>	33
Tabla 1. Lecturas de absorbancia y porcentajes de crecimiento e inhibición de <i>Streptococcus agalactiae</i>	35
Tabla 2. Lecturas de absorbancia y porcentajes de crecimiento e inhibición de <i>Staphylococcus aureus</i>	36
Tabla 3. Lecturas de absorbancia y porcentajes de crecimiento e inhibición de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37
Tabla 4. Lecturas de absorbancia y porcentajes de crecimiento e inhibición de <i>Escherichia coli</i>	38

INDICE DE GRAFICAS

Gráfica I. Porcentaje de cepas identificadas	34
Gráfica 1. Porcentaje de crecimiento e inhibición de la cepa <i>Streptococcus agalactiae</i> .	35
Gráfica 2. Porcentaje de crecimiento e inhibición de la cepa <i>Staphylococcus aureus</i> .	36
Gráfica 3. Porcentaje de crecimiento e inhibición de la cepa <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37
Gráfica 4. Porcentaje de crecimiento e inhibición de la cepa <i>Escherichia coli</i>	38

1. RESUMEN

Caléndula officinalis es un buen antiséptico, se ha demostrado experimentalmente que el aceite esencial obtenido de las flores presenta actividad antibiótica contra bacterias, hongos y virus patógenos del hombre, en infecciones respiratorias y de la piel, además ejerce una acción antiinflamatoria.

La mastitis es la inflamación de la glándula mamaria sea cual sea su causa, se caracteriza por alteraciones físicas, químicas y casi siempre bacteriológicas de la leche, y por modificaciones patológicas del tejido glandular. Muchos agentes infecciosos han sido enumerados como productores de mastitis, y cada uno de ellos se estudia como entidad específica. En términos de pérdida económica, es sin duda la enfermedad más importante a la que tiene que enfrentarse la industria lechera.

La finalidad de esta investigación es el de demostrar que la *Caléndula officinalis* presenta actividad bactericida y que puede ser una buena alternativa para el tratamiento de mastitis. En el pasado utilizaron diferentes tipos de antibióticos sin embargo estos logran alcanzar altas concentraciones en la leche después de su inyección parenteral y esto puede ocasionar un problema de salud.

De varias muestras tomadas de vacas con mastitis se identificaron 4 bacterias importantes (*Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*) las cuales fueron enfrentadas al extracto de *Caléndula officinalis*, para evidenciar si el extracto inhibe el crecimiento bacteriano, se utilizó la técnica del MTT.

El trabajo demostró que la *Calendula officinalis* tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de las bacterias aisladas con una mínima concentración y a continuación se indican:

CEPA BACTERINA	CMI
<i>Staphylococcus aureus</i>	180 µg/mL
<i>Escherichia coli</i>	180 µg/mL
<i>Streptococcus agalactiae</i>	45 µg/mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22.5 µg/mL

De acuerdo a los resultados obtenidos se tienen 2 opciones como tratamiento alternativo:

- ❖ La elaboración de una presentación farmacéutica que sea utilizado como sellador, esto es: un tapón elaborado a base de un producto antiséptico que evita la penetración de gérmenes a la glándula, en forma preventiva.
- ❖ Un gel intramamario como tratamiento.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General.

- ❖ Determinar la sensibilidad de las bacterias más comunes que causan mastitis bovina al extracto de *Caléndula officinalis*.

2.2. Objetivos Particulares.

- ❖ Realizar la extracción etanólica de *Caléndula officinalis*.
- ❖ Aislar e identificar las bacterias más comunes de la mastitis bovina.
- ❖ Evidenciar el efecto inhibitorio de las bacterias por medio de la técnica de MTT.
- ❖ Establecer la concentración mínima inhibitoria de *Caléndula officinalis* en dichas bacterias.

3. HIPOTESIS

Si el extracto de Caléndula inhibe el desarrollo de bacterias causantes de Mastitis bovina, entonces se podrá usar como una alternativa de tratamiento.

4. INTRODUCCIÓN

4.1. *Caléndula officinalis*

Nombre común.

Caléndula, Maravilla, Alta reina, Mercadela.(3)

4.1.1. GENERALIDADES

Planta anual o perenne mide entre 30 y 70 cm de altura, con hojas alargadas sin soporte de unión con el tallo, desde donde salen las flores con pétalos largos de color amarillo. Tiene su origen en el sur de Europa, en México es cultivada como planta de ornato y medicina, en lugares con climas semiseco y templado. Crece en huertos familiares y está asociada a la selva tropical caducifolia, matorral xerófilo, y bosques de encino y pino. (1)

Esta planta se usa con mayor frecuencia para tratar problemas de anginas o amigdalitis, principalmente en Hidalgo, Distrito Federal, Estado de México y Veracruz. Para su tratamiento, la parte empleada de la Mercadela es la flor. Es utilizada contra la infección y dolor de garganta. Otras afecciones para las que se ocupa la Alta Reyna son: paperas, tos, tosferina, garganta seca, torceduras, dolores de estómago, espalda, muelas o de los pies, y es considerada desinfectante y desinflamante de heridas.(1)

4.1.2. PROPIEDADES

Esta planta ha sido empleada durante mucho tiempo en la medicina tradicional y se le han atribuido más de 35 propiedades a las infusiones y tinturas de las flores, por ejemplo antiinflamatorio, analgésico, antitumoral, diurético, bactericida, favorece la aparición de la menstruación en mujeres que padecen amenorrea, favorece la cicatrización de úlceras en el estómago y alivia la gastritis.(7)

En Europa su uso ha sido para el tratamiento de úlceras. Parte de sus propiedades curativas derivan de la presencia de terpenos. Un glucósido triterpeno llamado calendulozido B ejerce una notable acción sedante y anti-ulceroso. Se ha comprobado físicamente que no tiene efecto negativo sobre el sistema cardiovascular, tono intestinal, funcionamiento renal o funcionamiento hepático. Algunas investigaciones demuestran que *Caléndula officinalis* está desprovista de propiedades irritativas y tóxicas.(8)

4.1.3. COMPOSICIÓN

No se ha encontrado una correlación entre los principios activos que posee con las propiedades medicinales que presenta.

Destacan sustancias mucilaginosas, esencia, materia amarga, calendulina y carotenos en las flores. Los flavonoides encontrados en altas cantidades en *Caléndula*, explican mucha de su actividad antiinflamatoria. Contiene aceites esenciales y ácidos orgánicos que le confieren una actividad antiespasmódica, sudorífica y colerética, el ácido salicílico le hace ser un antiagregante plaquetario, los polienos y carotenoides le proporcionan una acción antiinflamatoria, alcoholes triterpénicos y un principio amargo (calendina) le confiere una acción antibiótica, antifúngica, antiviral y estrogénica. (1, 8)

Esta planta también tiene efectos sobre el sistema inmunológico porque estimula la proliferación de linfocitos T pero inhibe la inducción mitógena de la proliferación de linfocitos. Aunque los mecanismos no son claros, al parecer los constituyentes del extracto y la superficie celular son los factores involucrados en esta inhibición. (2)

Tuxqui y colaboradores han comprobado su actividad antiséptica contra algunas bacterias, así como su capacidad antiviral y antiinflamatoria (Della-Loggia y cols. 1994) y en 1980 Dumenil y Cols determinaron sus propiedades bactericidas contra *E. Coli*, *Streptococcus fecalis*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* no presenta actividad genotóxica ni citotóxica.(5, 23, 25)

4.2. MASTITIS

El término mastitis se refiere a la inflamación de la glándula mamaria sea cual sea su causa. Se caracteriza por alteraciones físicas, químicas y casi siempre bacteriológicas de la leche, y por modificaciones patológicas del tejido glandular. Una definición más exacta que incluya el tipo de mastitis depende del agente causal, ya sea éste físico o infeccioso.⁽¹⁵⁾

4.2.1. Etiología.

Se han incriminado muchos agentes infecciosos como productores de mastitis, y cada uno de ellos se estudia como entidad específica. Las causas frecuentes en bovinos son *Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli* se está convirtiendo en una causa significativa para los bovinos albergados o confinados.^(15, 16, 18)

4.2.2. Epidemiología.

Diseminación de la infección:

La infección de cada glándula mamaria ocurre a través del conducto de la teta; se origina en dos fuentes principales, la ubre infectada y el medio. En bovinos lecheros y cabras de ordeño, las infecciones importantes son aquellas que persisten con facilidad en la ubre, en especial *Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus aureus*. Las bacterias que viven normalmente en el medio, como *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, causan mastitis con mucho menor frecuencia, pero cuando lo hacen la enfermedad es mucho más rebelde a medidas higiénicas de control. La contaminación de las manos de los ordeñadores, paños para lavado y copas de aparatos de ordeño por leche de cuartos infectados puede conducir con rapidez a la extensión de la infección a las tetas de otros animales.

Característica bacterianas:

- La capacidad del microorganismo de sobrevivir en el medio inmediato de la vaca; esto es, su resistencia a influencias ambientales, incluyendo procedimientos de limpieza y desinfección.
- Su capacidad de colonizar el conducto de la teta.
- Su capacidad de adherirse al epitelio mamario y establecer una reacción mastítica.
- Su resistencia al tratamiento antibiótico.

Mecanismos de transmisión: Dependen de los siguiente.

- Grado de infección en el medio, incluyendo cuartos infectados.
- Eficiencia en el personal y aparatos de ordeño.
- Susceptibilidad de la vaca, que guardan relación con: fases de lactancia, edad de la vaca, nivel de resistencia hereditaria, lesiones de la piel de la teta, factores inmunitarios.

Pérdidas económicas:

Si bien la mastitis ocurre en forma esporádica en todas las especies, asume gran importancia económica sólo en bovinos lecheros. En términos de pérdida económica, es sin duda la enfermedad más importante a la que tiene que enfrentarse la industria lechera. Esta pérdida se debe mucho menos a muertes que a la reducción de la producción de la leche en los cuartos afectados.

La mayor parte de las estimaciones ponen de manifiesto que en promedio un cuarto glandular afectado experimenta un 30 % de disminución en su productividad, y que una vaca afectada pierde un 15 % de su producción.⁽¹⁶⁾

En los Estados Unidos el costo a los productores por el tratamiento de casos de mastitis ronda los \$1.7-2.0 billones de dólares anuales, o el 11% del valor total de la producción de leche. La mayor parte de este costo es atribuido a la pérdida en la producción de leche, leche contaminada que es descartada, y vacas de reposición cuyo monto en pérdida ha sido estimado en \$102, \$24, y \$33 dólares por vaca anualmente, respectivamente. Los costos obvios por el tratamiento, labor, y servicios veterinarios son bajos, y estimados en \$13 dólares por vaca anualmente. Hay que ser sinceros y darse cuenta que la mastitis no puede ser totalmente eliminada de una granja. Sin embargo, el costo total por el tratamiento de mastitis en cualquier granja que pertenece a un programa de DHIA (Asociación Para el Mejoramiento del Ganado Lechero) es aproximadamente de \$171 dólares por vaca, que termina costándole a la industria lechera de Virginia \$18.6 millones de dólares anualmente. Si el objetivo de cada productor lechero es de mantener un promedio en el valor de RCS calculados por la DHIA de 2.0 y no más de 3 casos de mastitis clínica por cada 100 vacas por mes, una granja que posee un promedio de 128 vacas podría llegar a incrementar su ganancia neta anual en \$57 por vaca o \$7,296 dólares en total. El concepto principal de un plan de control contra la mastitis es que la infección puede ser controlada ya sea, reduciendo la posibilidad de que patógenos lleguen a entrar por el esfínter del pezón o aumentando el poder de resistencia contra infecciones de cada vaca.⁽¹⁸⁾

4.2.3. Patogenia.

Los mecanismos por los cuales los patógenos de la mastitis producen las lesiones de la enfermedad se tratan bajo los encabezados de las mastitis individuales.

La infección de la glándula mamaria ocurre siempre siguiendo la vía del conducto glandular, y a primera vista el desarrollo de inflamación después de la infección se antoja un fenómeno natural.

Sin embargo, la aparición de mastitis es más compleja de lo que este concepto parece indicar, y quizá resulte más satisfactorio explicarla en términos de tres etapas: invasión, infección e inflamación.

La invasión es la etapa en que los microorganismos pasan del exterior de la ubre a la leche que se encuentra en el conducto glandular. La infección es la etapa en que los gérmenes se multiplican rápidamente e invaden el tejido mamario. Después de la invasión puede establecerse una población bacteriana en el conducto glandular y, utilizando esta residencia como base, puede ocurrir una serie de multiplicaciones y diseminaciones en el tejido mamario, dependiendo la infección del mismo tejido y de la susceptibilidad del animal. Esta a su vez produce inflamación, etapa en la cual aparece la mastitis clínica u en que aumenta notablemente la cuenta de leucocitos en la leche ordeñada.

De las tres fases, la de prevención de la invasión brinda las mejores perspectivas para disminuir la frecuencia de mastitis por tratamiento adecuado, sobre todo mediante el uso de métodos higiénicos convenientes.⁽¹⁵⁾

4.2.4. Manifestaciones clínicas.

- Anomalías en la leche.
- Anomalías en la ubre.

4.2.5. Tratamiento.

El tratamiento de la mastitis puede ser muy eficaz si se elimina la infección del cuarto glandular y se restablece la composición normal de la leche. El grado de respuesta obtenido depende fundamentalmente del tipo de agente causal, de la rapidez de iniciación del tratamiento y de otros factores.

Aquellos antibióticos que tienen mayores probabilidades de difundirse bien son eritromicina, tilosina, penetemato, cloranfenicol y trimetropim.⁽¹⁶⁾

4.2.6. Alternativas para el tratamiento de mastitis.

Es de gran importancia el efecto de los antibióticos en la leche, en cuanto se refiere a la elaboración de productos lácteos y al desarrollo de síndrome de sensibilidad en el hombre. En algunos países se han promulgado leyes que limitan la dosis máxima intramamaria de antibióticos, y la presencia de cantidades identificables de los mismos en la leche constituye adulteración. El grado de excreción de antibiótico en la leche varía notablemente entre los diversos especímenes y en el mismo animal en diferentes momentos del periodo de lactancia, y difiere de un antibiótico a otro.

Dada la necesidad de producir leche de calidad y en óptimas condiciones es necesario buscar alternativa para el tratamiento de la mastitis, una de esas alternativas podría ser la herbolaria.^(16, 17)

4.3. *Staphylococcus*.

4.3.1. HABITAT

Se encuentra disperso en la naturaleza, piel, mucosas de mamíferos y aves. En algunas ocasiones puede encontrarse en boca, sangre, glándulas mamarias, en el intestino, aparato genitourinario y tracto respiratorio alto.⁽⁹⁾

La más patógena de las especies de *Staphylococcus* encontrada en el hombre es el *S. aureus*, un microorganismo capaz de causar infección en cualquier sitio del organismo. ⁽⁹⁾

4.3.2. MORFOLOGÍA

Cocos Gram positivos de 0.5 a 1.5 μm de diámetro, microscópicamente se observan solós, en pares, tétradas, cadenas cortas. La pared celular contiene peptidoglicano y ácido teicoico. El ácido diamino presente en el péptido glicano es L-lisina. Las colonias de *Staphylococcus* no son difíciles de reconocer. La mayoría de las especies forman colonias relativamente grandes, de 2-3 mm, después de 24 horas de incubación a 35°C, o hasta de 7 mm después de 48 a 72 horas de incubación. La mayor parte de las colonias estafilocócicas son opacas y convexas, tiene consistencia cremosa y son blancas o muestran una variada gama de tonos amarillos, en particular después de una incubación prolongada. ^(9,10)

4.3.3. NUTRICION Y CRECIMIENTO

Crece bien en cualquier medio nutritivo que contenga peptona tanto en condiciones aerobias como anaerobias y pueden producir hemólisis de la sangre de varias especies de animales y una pigmentación amarilla o anaranjada en agar.. El crecimiento de los estafilococos se puede registrar rápidamente en las placas de agar-sangre y en varios tipos de caldos de cultivo. Un medio selectivo para el aislamiento del *Staphylococcus aureus* es uno que contiene de 7.5 a 10 % de NaCl con manitol. (11)

4.3.4. FACTORES DE VIRULENCIA

El *Staphylococcus aureus* elabora una variedad de toxinas extracelulares, incluyendo α -, β -, y δ -hemolisinas, coagulasa, hialuronidasas, exfoliatina, leucocidina y lipasa. Las hemolisinas usan los eritrocitos humanos y animales.(10)

- La α -hemolisina es la responsable de las zonas de hemólisis alrededor de las colonias que crecen en agar-sangre.
- La coagulasa puede proteger a las células bacterianas de la fagocitosis cubriendo los neutrófilos con fibrina.
- La proteína A, un componente de la pared celular, puede unirse a la región Fc de las inmunoglobulinas e interferir con la opsonización y fagocitosis.
- Las hialuronidasas son enzimas que hidrolizan el cemento intracelular de los tejidos, facilitando la diseminación de los microorganismos.
- Las exfoliatinas también tiene esta capacidad, pero su acción esta limitada al estrato granuloso de la piel, produciendo ampollas y escaras en la epidermis.
- Las leucocidinas son exotoxinas que ejercen efectos tóxicos directos sobre los neutrófilos, granulación de los lisosomas celulares y muerte celular.(10)

4.3.5. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

Los *Staphylococcus* aerobios y anaerobios pueden ser recuperados de casi todas las muestras clínicas que contengan una población mixta de bacterias. Estos microorganismos crecen bien en medios de aislamiento no selectivos convencionales, especialmente en agar-sangre.

Características para la identificación de *Staphylococcus aureus*:

- Morfología microscópica, morfología colonial y pigmentación si existe.
- Gram (+)
- Coagulasa (+)
- Crecimiento a 35°C después de 24-40 horas de incubación.
- Catalasa (+)
- Oxidasa (-)
- Resistencia a ciertos antibióticos.
- Actividad enzimática.⁽¹⁰⁾

4.3.6. MANIFESTACIONES CLINICAS

El rasgo característico de una infección estafilocócica es la formación de abscesos. Esto puede ocurrir en cualquier parte del cuerpo, pero en cada área la lesión básica consiste en inflamación, infiltrado leucocitario y necrosis hística. Es una lesión totalmente desarrollada, hay un centro de necrosis lleno de leucocitos y bacterias muertas, separado del tejido circundante por una pared fibroblástica relativamente vascular. La infección estafilocócica de la piel es la más común de todas las infecciones bacterianas en el hombre. El impétigo estafilocócico también es común en niños pequeños. Se caracteriza por la formación de pústulas encontradas en las capas superficiales de la piel.⁽¹²⁾

El síndrome de piel escaldada abarca un espectro de enfermedades dermatológicas con una etiología común, la toxina exfoliativa estafilocócica. La neumonía estafilocócica es un enfermedad muy importante debido a su alta tasa de mortalidad, los niños menores de 1 año de edad parecen ser los más susceptibles y constituyen aproximadamente el 75 % de los casos El *S. aureus* es la causa de muchos casos de osteomielitis primaria: la enfermedad ocurre primariamente en niños varones menores de 12 años y, en muchos casos, se produce luego de la diseminación hematógena a partir de un foco primario, habitualmente una herida o un forúnculo. Otras infecciones estafilocócicas son piodartritis bacteriemia y endocarditis.

4.3.7. TRATAMIENTO

En el manejo de las infecciones estafilocócicas localizadas, el principio básico del tratamiento es el drenaje adecuado. Deben extraerse los cuerpos extraños del sitio de infección. Las pruebas de sensibilidad a los antibióticos son importantes en la selección del antibiótico apropiado y en la evaluación de su efectividad durante el curso de la infección. A menos que el paciente sea alérgico, se aconsejan análogos bactericidas de la penicilina. La elección inicial debe limitarse a drogas resistentes a penicilinas, ya que muchos aislamientos de infecciones hospitalarias y comunitarias son resistentes a penicilina G, penicilina V y ampicilina. En enfermedades estafilocócicas sistémicas serias, se aconseja la administración parenteral de nafcilina, metilina, oxacilina o una cefalosporina.(12)

4.4. Streptococcus

Los Streptococcus comprenden muchas especies patógenas para el hombre. Entre las enfermedades de mayor importancia causada por estos organismos se halla la faringitis estreptocócica, escarlatina, impétigo, sepsis neonatal y endocarditis. Es el único en la familia Streptococcaceae que contiene organismos patógenos para el hombre. Los más importantes de estos patógenos son los siguientes grupos: *Streptococcus pyogenes* (grupo A), *S. agalactiae* (grupo B), *S. fecalis* (grupo D), *S. pneumoniae* y el grupo viridans.⁽¹²⁾

4.4.1. PROPIEDADES DEL GÉNERO

Los estreptococos son microorganismos esféricos de menos de 2 μm de diámetro con una disposición característica en forma de cadenas, producen una variedad de sustancias y enzimas extracelulares.⁽¹²⁾

Algunos estreptococos elaboran como sustancia capsular un polisacárido comparable al que se encuentra en los neumococos. La mayoría de las cepas de los grupos A, B, y C poseen cápsulas compuestas de ácido hialurónico. La pared celular de los estreptococos contiene proteínas, carbohidratos y peptidoglicano.⁽¹³⁾

4.4.2. NUTRICION Y CRECIMIENTO

La mayoría de los estreptococos crecen en medios sólidos formando colonias discoideas generalmente de 1 a 2 milímetros de diámetro. La energía es obtenida fundamentalmente de la utilización de azúcares, el crecimiento tiende a ser pobre tanto en medio sólidos como en caldo, a menos que se le enriquezca con sangre o líquidos tisulares diversos.⁽¹³⁾

4.4.3. FACTORES DE VIRULENCIA

Los estreptococos del grupo A elaboran más de 20 toxinas distintas, incluyendo las estreptolisinas O y S, son hemolíticas; la toxina eritrogénica, produce el exantema en la escarlatina; estreptocinasa, es fibrinolítica; hialuronidasa, factor de difusión, y difosfopirín-nucleotidasa, es cardiotoxica. La proteína M inhibe la fagocitosis, la cápsula neumocócica inhibe o evita la fagocitosis.⁽¹²⁾

4.4.4. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

Las muestras a tomar dependen de la naturaleza de la infección estreptocócica. Se obtiene un frotis de garganta, pus o sangre para cultivo. El suero sirve para la determinación de anticuerpos, en particular el título de antiestreptolisinas O.

Los frotis teñidos hechos a partir de exudados purulentos, frecuentemente muestran cocos aislados, o en pares más que cadenas definidas. Para su rápida identificación, todos los productos en los que se sospecha la presencia de estreptococos deben ser cultivado en placa de agar sangre; cuando se cree que existe la presencia de anaerobios, deben inocularse en tubos de caldo y de medio de tioglicolato apropiado para el crecimiento de estreptococos.⁽¹³⁾

Los hemocultivos dan crecimiento de estreptococos hemolíticos del grupo A en horas o a los pocos días. La incubación en CO₂ a 10% frecuentemente acelera la hemólisis.

La elevación en el título incluyendo la antiestreptolisina O (particularmente en enfermedades respiratorias), antihialuronidasa (en infecciones cutáneas), antiestreptocinasa, antidesoxirribonucleasa, anticuerpos anti-M "bactericidas". Los anticuerpos a diversos antígenos estreptocócicos y a las enzima, se mide mediante la prueba de estreptozima.⁽¹³⁾

4.4.5. MANIFESTACIONES CLINICAS

La faringitis es una de las principales enfermedades por estreptococos, la enfermedad puede ser asintomática o puede asociarse con todos los grados del síndrome de dolor de garganta, fiebre, escalofríos, cefalea, malestar, náuseas y vómitos. Ocasionalmente se observa dolor abdominal en niños y puede confundirse con apendicitis. La faringe puede presentarse levemente eritematosa o francamente enrojecida con exudados amarillogrisáceo.

La fiebre reumática es la secuela más grave de las infecciones por estreptococos hemolíticos debido a que da por resultado lesiones en válvulas y músculo cardiaco. Los síntomas y signos característicos de la fiebre reumática comprenden fiebre, malestar, poliartritis migratoria no supurativa, y evidencia de inflamación de todas las partes del corazón. La fiebre reumática presenta una marcada tendencia a ser reactivada por infecciones estreptocócicas recurrentes.

Otras enfermedades atribuibles a la invasión por estreptococos son: erisipela, fiebre puerperal, infección generalizada, endocarditis y glomerulonefritis.

4.4.6. TRATAMIENTO

Todos los estreptococos β -hemolíticos del grupo A son sensibles a la penicilina G y más a la eritromicina. Algunos son resistentes a las tetraciclinas. Los medicamentos antimicrobianos carecen de efecto sobre la glomerulonefritis y la fiebre reumática ya establecidas; sin embargo, en las infecciones estreptocócicas agudas se debe hacer todo el esfuerzo para erradicar rápidamente los estreptococos del paciente y luego eliminar el estímulo antigénico persistente y de esta manera prevenir la enfermedad postestreptocócica.(12, 13)

4.5. *Escherichia coli*

4.5.1. HABITAT

Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de flora normal, pero hay serotipos que pueden ser patógenos y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea. *E. coli* es la especie más comúnmente recuperada en laboratorios clínicos y se ha incrementado en enfermedades infecciosas en virtualmente todos los tejidos y órganos humanos.^(13,14)

4.5.2. PROPIEDADES DEL GÉNERO

Es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae, tribu *Escherichia*.

4.5.3. NUTRICION Y CRECIMIENTO

E. coli crece bien en muchos medios comúnmente utilizados, algunas cepas producen beta hemólisis en agar-sangre. En medios de asilamiento entéricos como MacConkey o EMB las bacterias aparecen como colonias fermentadoras de lactosa. Muchas cepas son no pigmentadas, móviles, producen lisina descarboxilasa y utilizan acetato como única fuente de carbono.

4.5.4. DETECCIÓN E IDENTIFICACION

El método tradicional es el aislamiento de las bacterias, después se siembra en un placa de agar MacConkey u otro medio selectivo y con una asa redonda se continua el aislamiento, sembrando por estría cruzada, después se incuba a 37°C durante 18 horas.

La identificación se hace mediante pruebas bioquímicas en tubo como TSI, LIA, MIO, citrato, sorbitol, urea, rojo de metilo, Voges Proskauer, malonato y caldo manitol-rojo de fenol.

4.5.5. FACTORES DE VIRULENCIA

E. coli produce por lo menos dos tipos diferentes de fimbrias y se ha demostrado que ambos tipos son importantes para la colonización de tejidos. Con frecuencia se encuentra antígeno capsular K₁ en *E. coli*, su papel puede consistir en interferir con la fagocitosis de los microorganismos por leucocitos. No se conoce el papel preciso de otros antígenos de superficie. Sin embargo, es evidente que aunque cualquier serotipo de *E. coli* puede ser inducido para producir enterotoxinas por adquisición de los plásmidos necesarios, ciertos serotipos tiene una mayor probabilidad de adquirir y retener los plásmidos de enterotoxinas. Se han aislado 2 enterotoxinas, una termolábil y otra termoestable. La capacidad para producir estas enterotoxinas se asocia con dos plásmidos transferibles, uno que codifica ambas toxinas y otro sólo la toxina termoestable. La toxina termolábil es similar en muchos aspectos a la enterotoxina de *Vibrio cholerae*. Tanto la toxina termolábil como la enterotoxina del cólera estimulan la adenilatociclase en la células epiteliales de la mucosa del intestino delgado, esta estimulación de actividad enzimática incrementa la permeabilidad del revestimiento intestinal, posterior pérdida de líquido con la resultante diarrea.

La toxina termoestable parece activar la guanilciclase para producir monofosfato de guanosina cíclico, alterando la absorción neta de cloro y sodio, así también parece reducir la motilidad del intestino delgado.⁽¹²⁾

4.5.6. MANIFESTACIONES CLINICAS

E. coli es la causa más común de infección de la vías urinarias en el hombre. La enfermedad puede variar de cistitis a pielonefritis. La exposición a maniobras instrumentales, diabetes, obstrucción y embarazo son factores adicionales que predisponen a las personas a infecciones urinarias por *E. coli* y otros microorganismos. También puede causar neumonía, es causa mayor de meningitis neonatal, puede aislarse de heridas infectadas, particularmente en el abdomen. Es la causa más frecuente de sepsis por Gram-negativos. Es la principal causa de diarrea en niños.⁽²²⁾

4.5.7. TRATAMIENTO

El mejor tratamiento para la diarrea es el equilibrio líquido y electrolítico, aunque la diarrea infantil ha podido ser controlada por medio de un cierto número de antibióticos. Las *E. coli* aisladas de infecciones adquiridas en la comunidad habitualmente son sensibles a la mayoría de los antimicrobianos utilizados en el tratamiento de infecciones por microorganismos Gram-negativos.

4.6. *Pseudomonas* spp.

4.6.1. HABITAT

El género *Pseudomonas* se compone de gran número de bacilos que habitan en el suelo y agua.

4.6.2. PROPIEDADES DEL GÉNERO

En su hábitat natural, estos microorganismos, ampliamente distribuidos, desempeñan un papel importante en la descomposición de materia orgánica. Diversas especies son importantes patógenos vegetales, mientras que otras pueden infectar animales. Unas pocas son patógenas para animales y plantas. Aunque muchas especies de *Pseudomonas* no infectan al hombre, algunas son importantes patógenos oportunistas que infectan a individuos con defensas alteradas. Habitualmente tales infecciones humanas son severas, difíciles de tratar y suelen ser infecciones hospitalarias.

La especie de *Pseudomonas* más frecuentemente asociada con enfermedad humana es la *Pseudomonas aeruginosa*. Ha reemplazado al *Staphylococcus aureus* como el principal patógeno en pacientes con fibrosis quística y con frecuencia se aísla de individuos con enfermedad neoplásica o quemaduras severas.

4.6.3. MORFOLOGÍA

La *P. aeruginosa* es un bacilo Gram negativo de 0.5 a 1 por 3 a 4 μm . Habitualmente posee un único flagelo polar, pero ocasionalmente pueden constatarse dos o tres flagelos. Producen una capa de polisacárido extracelular, similar a una cápsula

4.6.4. NUTRICIÓN Y CRECIMIENTO

La *P. aeruginosa* es un microorganismo extremadamente adaptable y puede utilizar más de 80 compuestos orgánicos diferentes para su crecimiento. Puede crecer en los medios utilizados para el aislamiento de enterobacterias, y su capacidad para tolerar condiciones alcalinas también le permite crecer en medios para el aislamiento de vibrios. Aunque se trata de un organismo aerobio, la *P. aeruginosa* puede utilizar nitrato y arginina como aceptores de electrones y crecer en forma anaerobia. La temperatura óptima para el crecimiento es de 35° C, pero puede crecer a 42° C. El empleo de medios especializados incrementa la producción de pigmentos. Además de la piocianina, también puede producir otros pigmentos fluorescentes. Estos pigmentos pueden detectarse en los tejidos de los pacientes, así como en cultivos, pocas cepas producen un pigmento rojo.(12)

4.6.5. FACTORES DE VIRULENCIA

La especie que causa actualmente mayor morbilidad y mortalidad es *P. aeruginosa* casi omnipresente en el ambiente hospitalario y en todas partes donde hay humedad. El organismo es más resistente que la mayoría de las bacterias vegetativas a muchos desinfectantes y agentes antimicrobianos. Produce una diversidad de enzimas y toxinas, además de un polisacárido mucoso, una endotoxina y proteasas que inactivan los componentes del complemento, y, por tanto, inhibe hasta cierto punto la opsonización y la respuesta inflamatoria, posiblemente contribuyendo con ello a su capacidad invasiva.

La exotoxina A, favorece la lesión celular y la invasión hística y es tóxica para los macrófagos. El organismo produce infecciones a pacientes con quemaduras y lesiones traumáticas y operatorias, tras la manipulación del tracto urinario; en pacientes con afecciones de los sistemas hemopoyéticos, reticuloendotelial y linfoide, y en individuos con defensas humorales o celulares disminuidas.(10, 11, 13)

4.6.6. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

Más del 95 % de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* recuperadas de muestras clínicas pueden identificarse observando la presencia de las siguientes características primarias:

- Pigmento piocianina
- Pigmento fluoresceína
- Actividad de Citocromooxidasa
- Crecimiento a 42° C
- Alcalinización de acetamida
- Denitrificación de nitratos y nitritos
- Móvil por medio de un flagelo monotrico polar
- Morfología flagelar

La mayor parte de las cepas producen piocianina, un pigmento de fenacina e hidrosoluble que imparte un color verdoso al medio de cultivo. De hecho, es probable que la presencia de piocianina sea la única característica necesaria para identificar una *P. aeruginosa* porque ningún otro fermentador sintetiza este pigmento. La detección de olor como de uvas también es un indicio útil cuando se examina el crecimiento en placas de agar. Las colonias son grandes, pueden ser mucoides o secas y a menudo se dispersan. Pocas cepas de esta especie pueden producir pigmentos de otros colores: piorribina (rojo), piomelanina (marrón a negro) y pioverdina (amarillo).(10)

4.6.7. MANIFESTACIONES CLINICAS

La *P. aeruginosa* puede infectar casi cualquier tejido o sitio del cuerpo. Las lesiones localizadas se producen en el sitio de quemaduras o heridas, en el tejido corneal, vías urinarias o pulmones. Puede causar endocarditis bacteriana y gastroenteritis. La infección del tejido corneal puede dar como resultado la pérdida del ojo.

Desde una infección localizada, los microorganismos pueden diseminarse por vía hematológica, produciendo una sepsis y lesiones focales en otros tejidos. En la neumonía por *Pseudomonas*, los pacientes presentan signos de toxicidad, confusión y cianosis progresiva. La principal defensa corporal contra este microorganismo parece ser un sistema fagocítico funcionante. En individuos con leucemia la mortalidad es más elevada cuando se presenta una leucopenia severa.⁽¹²⁾

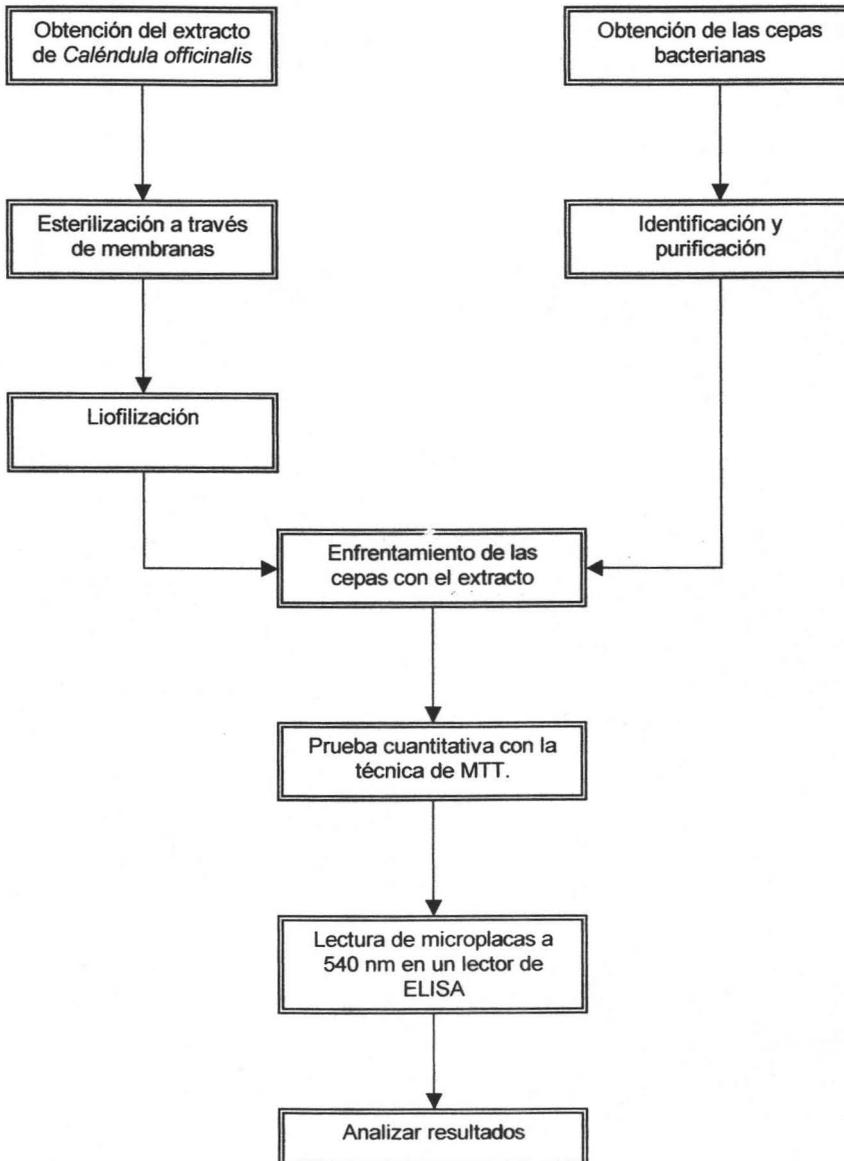
4.6.8. TRATAMIENTO

Muchos antimicrobianos son inefectivos para el tratamiento de infecciones por *P. aeruginosa*. La mayoría de las cepas son susceptibles a amikacina, gentamicina, tobramicina y colistina, pero se desarrollan formas resistentes, especialmente en terapias prolongadas. Los aminoglucósidos y la carbenicilina parecen actuar en forma sinérgica in vivo, y se aconseja se apliquen combinados en casos de que la enfermedad del paciente este en peligro.

Otro enfoque en el tratamiento de las infecciones por *P. aeruginosa* ha sido el uso de vacunas. Una de éstas, la vacuna heptavalente, reduce la mortalidad del 15 al 3% en pacientes quemados.

La gammaglobulina también puede ser útil en el tratamiento de pacientes con enfermedad neoplásica e infecciones por *P. aeruginosa*. También se ha utilizado transfusión de granulocitos con cierto éxito en estos pacientes.

5. DIAGRAMA DE TRABAJO



6. MATERIAL Y METODOS

6.1. Obtención del extracto de *Calendula officinalis*

Los pétalos de las flores de *Calendula officinalis* se secaron en estufa a 56°C por una semana. Se colocaron 5 g de la flor de *Caléndula officinalis*, previamente deshidratados, en un matraz con 500 mL de alcohol al 76%, se dejó reposar por una semana en un lugar oscuro y se agitó 2 minutos por día.

6.2. Esterilización

El extracto se hace pasar a través de membranas de celulosa de 0.8 y 0.22 μm previamente esterilizadas en autoclave. Estas membranas se colocan sobre plataformas soportes que se cierran herméticamente entre embudos, superior e inferior. La filtración se obtiene aplicando presión positiva en la entrada o negativa en la salida, y de esta manera obtenemos un producto estéril.

6.3. Liofilización

Se colocaron 5mL del extracto filtrado en viales color ámbar previamente esterilizados y se procedió al proceso de congelación y secado al alto vacío.

6.4. Obtención de las cepas bacterianas

Fueron facilitadas por el MVZ Gerardo Cruz J. y el MVZ José A. Licea Vega, las muestras fueron tomadas de vacas lecheras raza Holstein Friesan con diagnóstico clínica de mastitis, en la cuenca lechera de Tizayuca Hidalgo, ubicada en el Km. 57 de la carretera federal No. 85 México, Pachuca.

6.5. Identificación y Purificación de las cepas bacterianas:

La identificación se realizó por medio de crecimiento en agar Muller Hinton y agar sangre, realizando pruebas bioquímicas primarias y secundarias para determinar género y especies de las cepas reportadas.

6.6. Estandarización de las cepas

Una pequeña cantidad de cepa se colocó en 10 mL de caldo BHI y se ajustó cada una de las muestras al 0.5 del nefelómetro de Mac Farland.

6.7. Enfrentamiento bacteriano

Para este punto las bacterias con el extracto de *Caléndula officinalis*, se resuspendió el liofilizado en 5 mL de solución salina estéril.

En una placa de 96 pozos se colocaron 50 μ L de solución salina estéril en la fila A y del pozo 1 al 9, en el 10 se colocaron 150 μ L (blanco).

Del extracto de *Caléndula officinalis* concentrado se colocaron 50 μ L en el pozo No. 1 y se realizaron diluciones dobles hasta el pozo No. 9.

De la solución de bacterias estandarizadas se colocaron 50 μ L en los pozos del 1 al 9 y en el pozo No. 11 se colocaron 100 μ L (control positivo).

En el pozo No.12 se colocaron 100 μ L de caldo BHI (control negativo). Haciendo todo por duplicado.

Posteriormente a cada pozo se agregaron 10 μ L de *MTT y se incubó por 3 horas a 37 °C y una vez transcurridas las 3 horas se utilizó un lector de ELISA el cual produjo lecturas de absorbancia a 540 nm con una agitación de 60 rpm.

*MTT (3-[4,5-dietiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazoliobromida; azul de tiazolil) ayuda a evidenciar la presencia de bacterias viables, debido a que estas producen una hidrogenasa capaz de reducir el MTT a formazan cambiando el color amarillo a violeta detectando este cambio por medio del espectrofotómetro.(21)

7. RESULTADOS

Para identificar las cepas bacterianas obtenidas de los exudados de mastitis bovina en el ganado Holstein Friesan en la cuenca lechera de Tizayuca, Hgo., se realizaron pruebas bioquímicas primarias, y secundarias.

Tabla I. Identificación de las cepas del género *Streptococcus*.

PRUEBAS	
Forma	Cocos
Gram	+
Catalasa	-
Bilis Esculina	-
CAMP	+
NaCl al 6.5%	-
Crecimiento en A SM	-
Hemólisis	β
Coagulasa	-
Bacteria Identificada	<i>Streptococcus</i> <i>agalactiae</i>
No. de cepas	6

Tabla II. Identificación de las cepas del género *Staphylococcus*.

PRUEBAS	
Forma	Cocos
Gram	+
Catalasa	+
Oxidasa	-
Crecimiento en A SM	+
Crecimiento en AS	+
Hemólisis	β
Coagulasa	+
Bacteria Identificada	<i>Staphylococcus aureus</i>
No. de cepas	2

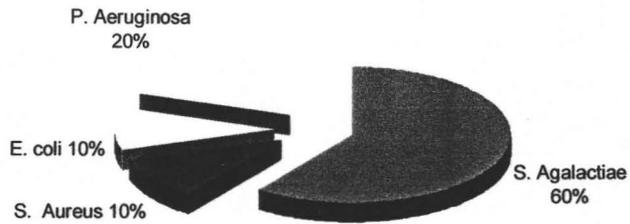
Tabla III. Identificación de las cepas del género *Enterobacteriaceae*.

PRUEBAS	
Forma	Bacilos
Gram	-
Catalasa	+
Oxidasa	-
Crecimiento en A SM	+
OF	+(O/F)
MR	+
VP	-
Citratos	-
Motilidad	+
H ₂ S	-
Malonatos	-
Urea	-
KIA	Ácido / ácido
Lactosa	+
Manitol	+
NO ₃	+
Lisina	+
Arginina	-
Ornitina	-
Bacteria identificada	<i>Escherichia coli</i>
No. de cepas	1

Tabla IV. Identificación de las cepas del género *Pseudomonas*.

PRUEBAS	
Forma	Bacilos
Gram	-
Catalasa	+
Oxidasa	+
Crecimiento en A SM	+
OF	Oxidativo
MR	-
VP	-
Citratos	Dudoso
Motilidad	+
H ₂ S	-
Malonatos	(+/-)
Urea	-
TSI	Alcalino / alcalino
NO ₃	+
Lisina	+
Ornitina	+
Bacteria identificada	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
No. de cepas	1

CEPAS IDENTIFICADAS

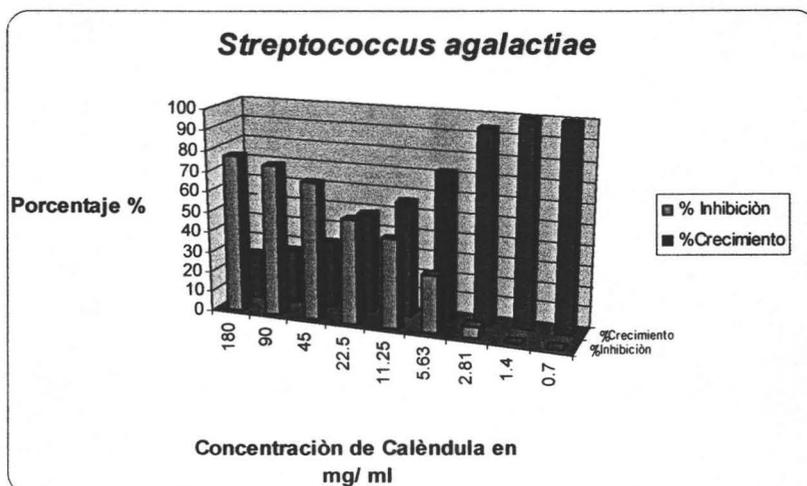


Gráfica I. Porcentajes de las diferentes bacterias aisladas de los casos de mastitis bovina. Obsérvese que la cepa que mas afectas a este tipo de infecciones corresponde a *Streptococcus agalactiae*.

A continuación se muestran los resultados cuantitativos de las cepas bacterianas, a cada tabla corresponde una gráfica. Método de MTT.

CARRIL	CONC. $\mu\text{g/mL}$	PROM. ABS	% DE CRECIMIENTO	% DE INHIBICIÓN
1	180	0.492	22.85	77.15
2	90	0.562	26.12	73.88
3	45	0.707	32.83	67.17
4	22.5	1.049	48.73	51.27
5	11.25	1.212	56.3	43.7
6	5.63	1.553	72.11	27.89
7	2.81	2.033	94.4	5.6
8	1.40	2.162	100	0
9	0.70	2.967	100	0
11 C (+)	180	2.1535	100	0
12 C (-)	0	0	0	0

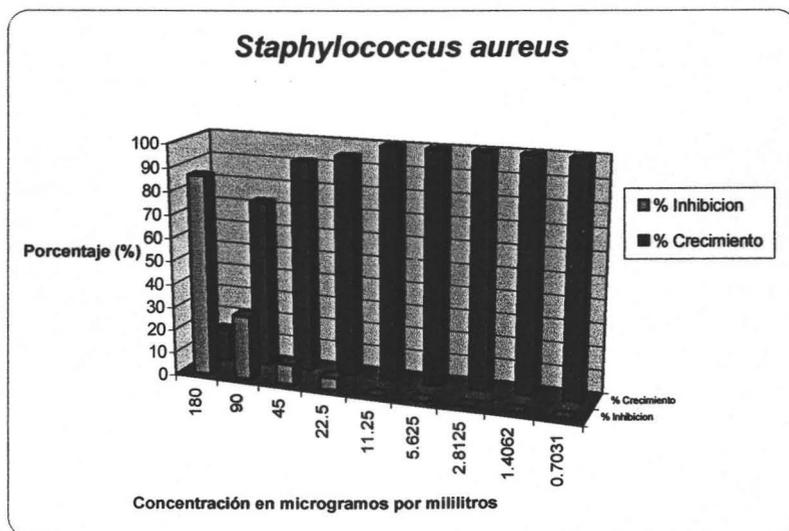
Tabla 1. Lecturas de absorbancia a 540 nm de longitud de onda del efecto inhibitorio cuantitativo del extracto de *Calendula officinalis* contra *Streptococcus agalactiae*. Se pueden observar los porcentajes de crecimiento (células viables) e inhibición (citotoxicidad bacteriana). Método de MTT.



Gráfica 1. Porcentajes de crecimiento e inhibición de la cepa *Streptococcus agalactiae* en el enfrentamiento con el extracto de *Calendula officinalis* a diferentes concentraciones.

CARRIL	CONC. $\mu\text{g/mL}$	PROM. ABS	% DE CRECIMIENTO	% DE INHIBICIÓN
1	180	0.659	13.55	86.44
2	90	3.525	72.50	27.49
3	45	4.44	91.30	8.69
4	22.5	4.608	94.75	5.24
5	11.25	5.263	100	0
6	5.63	5.3	100	0
7	2.81	5.489	100	0
8	1.40	5.819	100	0
9	0.70	6	100	0
11 C (+)	180	4.863	100	0
12 C (-)	0	1.313	0	0

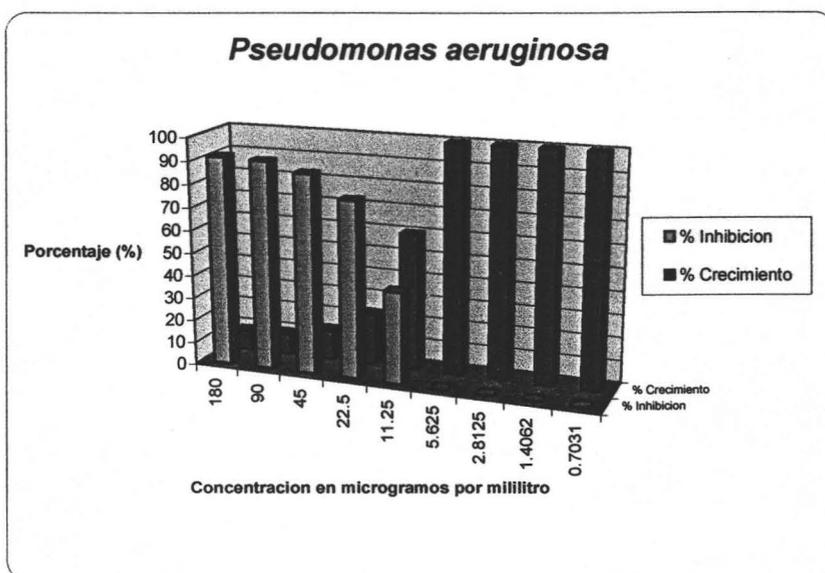
Tabla 2. Lecturas de absorbancia a 540 nm de longitud de onda del efecto inhibitorio cuantitativo del extracto de *Caléndula officinalis* contra *Staphylococcus aureus*. Se pueden observar los porcentajes de crecimiento (células viables) e inhibición (citotoxicidad bacteriana). Método de MTT.



Gráfica 2. Porcentajes de crecimiento e inhibición de la cepa *Staphylococcus aureus* en el enfrentamiento con el extracto de *Caléndula officinalis* a diferentes concentraciones.

CARRIL	CONC. $\mu\text{g/mL}$	PROM. ABS	% DE CRECIMIENTO	% DE INHIBICIÓN
1	180	0.353	8.432	91.56
2	90	0.378	9.029	90.97
3	45	0.546	13.04	86.95
4	22.5	0.952	22.74	77.26
5	11.25	2.51	59.95	40.04
6	5.63	4.21	100	0
7	2.81	4.372	100	0
8	1.40	4.46	100	0
9	0.70	5.063	100	0
11 C (+)	180	4.1865	100	0
12 C (-)	0	0	0	0

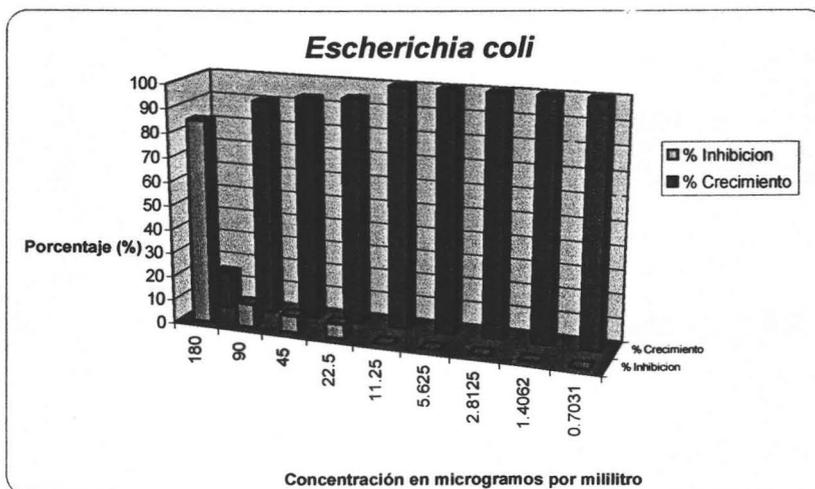
Tabla 3. Lecturas de absorbancia a 540 nm de longitud de onda del efecto inhibitorio cuantitativo del extracto de *Caléndula officinalis* contra *Pseudomonas aeruginosa*. Se pueden observar los porcentajes de crecimiento (células viables) e inhibición (citotoxicidad bacteriana). Método de MTT.



Gráfica 3. Porcentajes de crecimiento e inhibición de la cepa *Pseudomonas aeruginosa* en el enfrentamiento con el extracto de *Caléndula officinalis* a diferentes concentraciones.

CARRIL	CONC. µg/mL	PROM. ABS	% DE CRECIMIENTO	% DE INHIBICIÓN
1	180	0.718	15.12	84.87
2	90	4.283	90.21	9.78
3	45	4.416	93.01	6.98
4	22.5	4.462	93.98	6.01
5	11.25	4.774	100	0
6	5.63	6	100	0
7	2.81	6	100	0
8	1.40	6	100	0
9	0.70	6	100	0
11 C (+)	180	4.7475	100	0
12 C (-)	0	1.001	0	0

Tabla 3. Lecturas de absorbancia a 540 nm de longitud de onda del efecto inhibitorio cuantitativo del extracto de *Caléndula officinalis* contra *Escherichia coli*. Se pueden observar los porcentajes de crecimiento (células viables) e inhibición (citotoxicidad bacteriana). Método de MTT.



Gráfica 3. Porcentajes de crecimiento e inhibición de la cepa *Escherichia coli* en el enfrentamiento con el extracto de *Caléndula officinalis* a diferentes concentraciones.

8. DISCUSIÓN

Las bacterias estudiadas en este proyecto generan infecciones en el ganado lechero y por lo tanto genera pérdidas económicas para el ganadero por el gasto de antibióticos. La multiresistencia bacteriana complica más este problema, la medicina alternativa trata de ser una herramienta más para resolver estos problemas de salud animal, que al final son también problemas de salud pública por la ingesta de residuos en la leche que generan alergias y apoyan la multiresistencia bacteriana. por lo tanto el efecto inhibitorio que causa el extracto de caléndula officinalis en ellas podría proponerse como una alternativa de tratamiento local de heridas infectadas en animales para los cuales fue realizado este trabajo.

Se analizaron diferentes bacterias aisladas de casos de mastitis bovina, la cepa más representativa de las 10 identificadas como se puede ver en los resultados (ver gráfica No. 1) es *Streptococcus agalactiae* correspondiente al 60%, seguida de *Staphylococcus aureus* con un 20% y *Pseudomonas aeruginosa* así como de *Escherichia coli* que equivalen a un 10%., observando que la mitad de las cepas identificadas son Gram negativas y la otra mitad positivas.

Después de haber aplicado la técnica del MTT, los resultados obtenidos de la lectura del Elisómetro en nanómetros se trataron estadísticamente, se determinaron los promedio de todas las lecturas así como de los controles positivos y negativos con el propósito de tener un solo resultado representativo de cada una de las cepas, se determinaron las desviación estándar promedio, método útil para saber si existe variación de los datos y por ende la precisión en la experimentación así como la reproducibilidad (23). Con ayuda de este análisis se pudo determinar el efecto inhibitorio del extracto de *Caléndula officinalis* sobre las bacterias problema.

Los resultados del método de MTT son corroborados por medio de gráficos los cuales nos demuestran las bacterias tratadas con el extracto a diferentes concentraciones así como su porcentaje de inhibición y crecimiento.

La cepa de *Streptococcus agalactiae* muestra una inhibición del 67.16% que corresponde a la concentración de 45 $\mu\text{g/mL}$, esto nos indica que la bacteria es sensible al extracto y se consideró la CMI (concentración mínima inhibitoria) en base al análisis estadístico.

Con respecto a la inhibición de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, se da en un 86.44% y 84.87% respectivamente siendo la CMI 180 $\mu\text{g/mL}$.

El porcentaje de inhibición para *Pseudomonas aeruginosa* fue de 71.26% con una CMI de 22.5 $\mu\text{g/mL}$.

En el análisis estadístico se determinó intervalos de confianza con dos desviaciones estándar obtenidos de las lecturas espectrofotométricas y esto nos ponen de manifiesto que no hay valores de la media promedio que se encuentren fuera de este intervalo, indicándonos un procedimiento confiable y reproducible.

9. CONCLUSIONES

- ❖ Se obtuvo un extracto etanólico de *Caléndula officinalis*.
- ❖ Se logró aislar las bacterias más importantes causantes de Mastitis bovina como son: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus agalactiae*.
- ❖ El método de MTT evidenció la inhibición producida por el extracto de *Caléndula officinalis* en bacterias causantes de mastitis bovina.
- ❖ Se estableció la concentración mínima inhibitoria para cada cepa bacteriana aislada.

10. APENDICE

MATERIAL Y EQUIPO

Autoclave Presto.

Parrilla con agitador.

Termómetro.

Agitadores magnéticos.

Gradilla.

Mecheros Bunsen.

Microscopio óptico Westover.

Portaobjetos y cubreobjetos.

Tubo estándar 0.5 de McFarland.

Embudo de vidrio.

Balanza granataria.

Bomba de vacío.

Filtro millipore con membrana.

Centrifuga

Tubos de ensaye 100x 5, 85x13 mm.

Estufa bacteriológica Riossa.

Frascos pequeños con tapa.

Parafilm.

Etiquetas

Micropipetas de 50 y 100 μ L.

Vasos de pp de 100, 500, y 1000 mL.

Papel filtro

Refrigerador G. E.

Propipetas

Placas con 96 pozos fondo plano.

Elisometro.

Liofilizadora (Labonco mod. 79480,

Labonco mod. 77520, Rotary Vacuum

Probetas de 100 y 500 mL.

Cajas petri.

Pumps E2M5).

Matraz Erlenmeyer de 250 y 500 mL.

REACTIVOS

Reactivos para tinción de Gram.

Etanol absoluto al 75%.

Agua destilada.

Agar Muller-Hinton

Caldo BHI

Solución Salina Fisiológica (SSF).

Agar Sangre.

MTT

Fenol

MATERIAL BIOLÓGICO

Cepas aisladas de casos de Mastitis

Bovina.

Pétalos de *Caléndula officinalis*.

GRAM:

1. Se hace un frotis de la bacteria y se deja secar al aire libre.
2. Se fija la bacteria al portaobjetos pasándolo a través de la flama del mechero.
3. Se cubre la superficie con solución Cristal violeta por un minuto y lavar con agua destilada.
4. Cubrir con solución de yodo durante 1 min. y se lava.
5. Se cubre la superficie con alcohol-cetona hasta que no desprenda más color violeta.
6. Se lava con agua corriente y se cubre con contratinción de safranina durante 1 min. y se lava.
7. Dejar secar y se observa el frotis al microscopio.⁽¹¹⁾

CATALASA:

1. Colocar una pequeña porción de cultivo de la bacteria a estudiar sobre un portaobjetos.
2. Añadir unas gotas de H₂O₂.
3. Observar si hay producción de burbujas (si se producen la prueba es positiva).

OXIDASA:

Utilizando discos comerciales impregnados de tetrametil de p-fenilendiamina (que sustituye al oxígeno como aceptor de electrones) se dispersa una asa de la colonia en la zona con reactivo del papel filtro.

En estado reducido el colorante es incoloro: sin embargo, en presencia de cotoxomooxidasa y oxígeno atmosférico, la p-fenilendiamina es oxidada y forma azul de indofenol, por lo que si el cambio se presenta en 10 seg. Es positivo, pero debe tenerse cuidado de no usarse asas o alambres de acero inoxidable para esta prueba porque productos de oxidación superficial formados al esterilizar el asa o alambre con la llama de un mechero puede dar como resultado reacciones falsopositivas.⁽¹⁰⁾

REDUCCION DE NITRATOS A NITRITOS.

Se inocula el medio de nitrato (caldo o agar, extracto de carne, peatona y nitrato de potasio) con un asada de bacteria aislada en cultivo puro en agar y se incuba a 35° C durante 24 hrs. Al terminar la incubación, se agrega 1 mL de cada uno de los reactivos: A (alfa-naftilamina, ácido acético 5N al 30%) y B (ácido sulfanilico, ácido acético 5N al 30%) al medio de prueba en ese orden.

La aparición de color rojo en los 30 segundos posteriores al agregado de los reactivos indica la presencia de nitritos.⁽¹⁰⁾

UREASA.

El caldo de urea de Stuart y el agar urea de Christensen son los medios utilizados con más frecuencia en los laboratorios clínicos para la detección de actividad de ureasa.

Se inocula el caldo con una asa del cultivo bacteriano y se siembra la superficie en pico de flauta de agar con la bacteria. Ambos medios se incuban a 35 ° C durante 24 hrs.

Los microorganismos que hidrolizan urea pueden dar reacciones positivas rápidas en 1 o 2 hrs.

Caldo Stuar Color rojo en todo el medio indica alcalinización e hidrólisis de urea.

Agar de Christensen Hidrolizadotes rápidos de urea color rojo en todo el medio.

Hidrolizadotes lentos de urea color rojo en un principio en pico de flauta que de forma gradual se extiende a todo el medio. No hidrólisis de urea, el medio conserva su color amarillo.⁽¹⁰⁾

DESCARBOXILACION DE LISINA

A partir de una colonia bien aislada de la bacteria recuperada previamente en agar de aislamiento primario, se inoculan 2 tubos con medio de Moeller, uno con el aminoácido a evaluar (lisina) y el otro control sin el aminoácido, se cubren los tubos con aceite mineral estéril hasta 1 cm. por encima de la superficie y se incuban

A 35° C durante 24 hrs.

La aparición de color amarillo en el tubo control indica que el microorganismo es viable y que el pH del medio ha disminuido en forma suficiente como para activar la descarboxilacion. La reaparición de un color azul-púrpura en el tubo que contiene al aminoácido indica una prueba positiva debido a la liberación de aminas por la reacción de descarboxilacion.⁽¹⁰⁾

ACIDIFICACION DE CARBOHIDRATOS (OXIDACIO-FERMANTACION)

Se requiere de dos tubos, cada uno inoculado con la bacteria, usando una aguja recta punzando el medio 1 o 2 veces hasta el fondo del tubo. Un tubo de cada par se cubre con una capa de 1 cm. de aceite mineral estéril, dejando el otro tubo abierto al aire.

La producción de ácidos se detecta por la aparición de un color amarillo. En el caso de microorganismo oxidativos, la producción de color puede verse primero cerca de la superficie del medio. Los siguientes son los patrones⁽¹⁰⁾

Tubo abierto	Tubo cerrado	Reacción
Ácido (amarillo)	Alcalino (verde)	oxidativo
Ácido (amarillo)	ácido (amarillo)	fermentativo
Alcalino (azul o verde)	alcalino (púrpura)	no fermentativo

LIOFILIZACION:

1. Colocar 1 mL del extracto (estéril por filtración) en un vial de 5 mL.
2. Congelar para posteriormente liofilizada los siguientes segmentos:
Segmento 1 -34° C durante 3 hrs.
Segmento 2 10° C durante 10.1 hrs.
Segmento 3 30° C durante 7 hrs.
3. Terminada la corrida se sacan los viales y se encasquillan.

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVOS Y REACTIVOS.

Agar BHI (Bioxon de México, S. A. De C. V.)

1. Disolver 37 gr. De material deshidratado en 1 lt. De agua destilada.
2. Esterilizar en autoclave a 121° C y 15 libras de presión de vapor durante 15 min.
3. Distribuir en cajas petri.

Agar Sangre (Bioxon de México, S. A. De C. V.)

1. Suspender 40 g. De polvo en 1 lt. De agua destilada.
2. dejar reposar durante 5 min. y mezclar bien hasta obtener una suspensión uniforme.
3. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante 1 min.
4. Agregar sangre de carnero al 5%.
5. Esteriliza a 121° C a 15 libras de presión, (en porciones de 100 ml) durante 20 min. y distribuir en placas.

Caldo BHI (Bioxon de México, S. A. De C. V.)

1. Disolver 37 g. De material deshidratado en 1 lt de agua destilada.
2. Distribuir en tubos.
3. Esterilizar en autoclave a 121° C, 15 libras de presión de vapor durante 15 min.

MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difenitetrazoliobromida: Tiazolil azul).

1. Disolver 5mg/ml de MTT en RPMI-1640 rojo de fenol
2. Filtrar con membrana de 0.2 μ m.
3. Guardar a una temperatura de 4° C.

SSF estéril.

1. Por cada 100 ml de solución agregar 850 mg. De NaCl.
2. Esterilizar en autoclave a 121° C, 15 libras de presión durante 15 min.

11. ABREVIATURAS

alk: alcalino

mL: mililitros

μm: manómetros

rpm: revoluciones por minuto

mg: miligramos

spp: cualquier genero

B. E. Bilis Esculina

μl: microlitos

NaCl: Cloruro de Sodio

CMI: Concentración mínima inhibitoria

MTT: (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazoliobromida: Tiazolil azul)g

g: gramos

mm: milímetros

Fam: familia

cm: centímetros

°C: grados centígrados

lt: litro

LIA: Agar Lisina Hierro

MIO: Motilidad, Indol, Ornitina

SIM: Ácido Sulfúrico, Indol, Motilidad

MVZ: Médico Veterinario Zootecnista

EMB: Eosina-Azul de Metileno

OF: Oxidación-Fermentación

12. REFERENCIAS

1. <http://www.mexicodesconocido.com.mx/hiervas>
2. Zahra, Amirghofran, Azadbakht, Moohammed y Kaarimi, H. Mohammed. "Evaluation the inmunomodulatory effects of five herbal plants" Journal of Ethnopharmacology. 2000; **72**: 167-172.
3. "Farmacopea Homeopática de los Estados Unidos Mexicanos". 3ª edición. México 1988. 75.
4. Morales Sánchez M. "Efecto de *Caléndula officinalis* en *Pseudomonas aeruginosa* evidenciado por microscopia electrónica". Tesis licenciatura F. E. S. Cuautitlan UNAM 2002.
5. Tuxqui, T. Elizabeth., Cabrera, S. Enedina y Fonseca, S. Edgar. "Actividad antiséptica de *Caléndula officinalis* en cepas de *Staphylococcus aureus*, *E. Coli* y *Candida albicans* in vitro". La homeopatía en México. 1996, **2**, 35-46.
6. Popoca, Jovita, Aguilar, Abigail y Alonso, Daniel. "Citotoxic activity of selected plans used as antitumorals in Mexican traditional medicine". Journal of Ethnopharmacology. 1998; **59**, 173-177.
7. Ramos, A., Edreira, E., Vizoso, A., Betancourt, J. Y López, M. "Genotoxicity of extrac of *Calendula officinalis*". Journal of Ethnopharmacology. 1998; **61**, 49-55.
8. www.healthy.net/asp/templates/article.asp?PageType=article&ID=163
9. Balows Albert. "Manual de Microbiología Clínica" 5ª ed. Estados unidos de América 1991.
10. Koneman, W. Elmer., Stephen, D. Allen y Dowell, V.R. "Diagnostico microbiológico" 2ª reimpresión Medica Panamericana. México. 1998. 158-169, 533.
11. Henry, John Bernard. "Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio" 9ª ed. México 1993.
12. Zinsser (et. al) "Microbiología" 18ava ed. Edit. Panamericana. 1986. Buenos Aires Argentina

13. Jawetz Ernest, **"Microbiología Médica"** 10^{ma} ed. Edit. El Manual Moderno México, D. F. 1983.
14. Rodríguez-Angeles G., **"Principales característica y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*"** Salud Publica México 2002; 44: 464-475.
15. D. C. Blood., O M. Radostits., J. A. Henders., J. H. Arundel., C. C. Gay. **"Medicina veterinaria"** 6^a ed. Nueva editorial interamericana. México, D. F. 1988.
16. Memorias. 3^{er} Congreso Nacional de Control de Mastitis y Calidad de la Leche 2001. León, Guanajuato. México. Consejo Nacional de Mastitis, A. C. Asociación Iberoamericana de Médicos Veterinarios Especialistas en Producción Animal.
17. Espejel del Moral Maria del Carmen. **"Tratamiento de retención placentaria con bolos e infusión intrauterinos de *Caléndula officinalis* versus bolos e infusión intrauterinos de oxitetraciclina en ganado Holstein Friesian en la cuenca lechera de Tizayuca Hidalgo"** 2001 Tesis, FES-C UNAM.
18. www.ordemex.com.mx/mastitis.html
19. Fernández, F. B. A. **"Liofilización de Productos Farmacéuticos"** 1^a ed. Edit. Limusa, México, D. F. 1998.
20. Biochemicals Organic Compounds for Research and Diagnostic Reagents. Sigma. 1994.
21. Satnam K. Kairo, Joanne Bedwell, Paul C. Tyler, Anne Carter, Michael J. Corbel. **"Development of tetrazolium salt assay for rapid determination of viability of BCG vaccines"** Vaccine 17 (1999) 2423-2428.
22. Wayne, W. Daniel. **"Bioestadística"** 35^a edición. Limusa Noriega. México 1990.
23. Dumenil, G., Chemil, R. y Balansard, G. **"Evaluation of antibacterial properties of *calendula officinalis* flowers and mother homeopathic tinctures of *Calendula officinalis*"**, en: Anales Pharmaceutiques Francaises. 1980; 38 (6), 493-499.

24. Rodríguez Arroyo J. **“Elaboración de una forma farmacéutica sólida (bolos) con extracto de *Caléndula officinalis* para el tratamiento de las vacas con retención placentaria”** Tesis licenciatura F. E. S. Cuautitlán UNAM 2002.
25. Della, R. Tubazo, A., Sosa, S., Becker, H. Y Saar. **“The role of triterpenoids in the tropical anti-inflammatory activity of calendula officinalis flowers”**, en: *Planta Medica*. 1992; 60 (6) 516-520.
26. MacFaddin Jean F. **“Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica”** 3ra ed. Edit. Medica Panamericana. Buenos Aires, Argentina, 2003. p. 683, 359.