



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

“Efecto de Quitosán y extracto de *Caléndula officinalis* en bacterias aisladas de casos de mastitis bovina, para proponerlos como un posible sellador de tetas”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ROSA DEL CARMEN MARTÍNEZ CANALES

ASESORES: M.V.Z. GERARDO CRUZ JIMÉNEZ

M.V.Z. JOSÉ ANTONIO LICEA VEGA

Dra. SUSANA PATRICIA MIRANDA CASTRO

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2008.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
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 de Quitosán y extracto de Caléndula officinalis en bacterias aisladas de casos de mastitis bovina, para proponerlos como posible sellador de tetas.

que presenta la pasante: Rosa del Carmen Martínez Canales
con número de cuenta: 09809727-8 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 10 de Octubre de 2008

PRESIDENTE	MVZ. Gerardo Cruz Jiménez	
VOCAL	Dra. Susana E. Mendoza Elvira	
SECRETARIO	M.C. Sofía González Gallardo	
PRIMER SUPLENTE	QFB Brigida del Carmen Camacho	
SEGUNDO SUPLENTE	QFB. Guadalupe Hernández Torres	

AGRADECIMIENTOS

Mi mami María del Carmen Canales por tu apoyo, consejos y sobre todo por el amor que me brindas. Eres el pilar de nuestra familia. Te Amo Mucho.

Mi papi José Martínez por apoyarme en todas las decisiones que he tomado en mi vida; por los consejos y por tu amor. Te Amo mucho.

Mi esposo José Luis González por estar a mi lado y darme todo tu amor, comprensión y paciencia. Eres el amor de mi vida. Te Amo Mucho.

Mis hermanos José Antonio, Janet Adriana, Eva Marisol y Luis Enrique; gracias por ser mis cómplices en todas las travesuras desde que éramos niños, se que cuento con ustedes siempre, saben son mi equipo favorito... los Amo Mucho.

Mis sobrinitos José Luis "Choche" y Gustavo Adrian "Gusanito", por existir dentro de nuestra familia...los Amo Mucho.

Mi abuelita Rosita Pacheco☞ aunque ya no estés con nosotros te seguimos recordando, por todo el amor con el que nos cuidaste. Siempre estarás en mi corazón. Te extraño y Te Amo Mucho.

Mis suegros Isabel Aguilar y Luis González por todo el apoyo y por el gran cariño que me han ofrecido durante todo este tiempo los Quiero Mucho.

Mi cuñis Dianita y mi sobrino José Luis gracias por su amistad y cariño los Quiero Mucho.

M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez; por compartir su conocimiento y tiempo. Gracias por la confianza, el apoyo y la amistad que me brindo en todo este tiempo.

M.V.Z. José Antonio Licea Vega, por colaborar en el desarrollo de este proyecto.

Dra. Susana Patricia Miranda Castro por todo el apoyo y dedicación a este proyecto.

Erika Castillo gracias por brindarme tu amistad, confianza y apoyo incondicional; también por tus consejos, sabes eres una de mis mejores amigas Te Quiero Mucho.

Mónica Cruz Ramírez gracias por tus consejos, por tu apoyo incondicional y por estar conmigo en esta etapa tan importante de mi vida, eres una de mis mejores amigas y sé que cuento contigo para lo que sea Te Quiero Mucho.

Mis amigos Itzel, Rosita, Iván, Sara, Paola, Alan, Luciano, Luis Alberto, Omar, Evelina, Antonio, Karina, Carlos, Maribel, por compartir conmigo una de las mejores etapas de mi vida.

Mis primos Alejandro, Carlitos, Ernesto, Antonio Gracias por los momentos que hemos compartido, el apoyo y el cariño que me han demostrado, son como mis hermanos los quiero mucho.

Mi abuelito José Martínez por sus consejos y cariño. Lo Quiero Mucho.

Mis tíos y tías: Nicolás, Mercedes, Salvador, Martha, Armando, Inés, Marcela, Yolanda, Margarita, Elisa y Araceli. Gracias por todo su apoyo y cariño.

Al Laboratorio 10 de Microbiología de la Unidad de Posgrado: Alejandro, Yolanda, Sonia, Mara, Ivonne, Ulises, Belem, Gaby, Vero; por su apoyo y por hacer que este tiempo fuera ameno.

A la M. en C. Sofía González Gallardo por la dirección y apoyo en la realización de la parte de Microscopía Electrónica de Transmisión en éste trabajo.

Mis sinodales: Dra. Susana E. Mendoza Elvira, M en C. Sofía González Gallardo, QFB. Brígida del Carmen Camacho Enríquez y Q.F.B. Guadalupe Hernández Torres por sus valiosos consejos para mejorar este trabajo.

*A la UNAM y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán... es un orgullo pertenecer a la máxima casa de estudios... **Por mi raza hablará el espíritu.***



DEDICATORIAS

LOS SERES MÁS IMPORTANTES DE MI VIDA

Mis padres: Carmelita y José; este triunfo es de ustedes y por su amor he llegado hasta donde estoy ahora; Gracias por darme la vida, por estar a mi lado en todo momento, sin su apoyo no lo habría logrado. LOS AMO MUCHO.

Mi esposo: José Luis que solo me has demostrado amor, comprensión y paciencia, por estar a mi lado siempre. TE AMO MUCHO.

Mis hermanos: Zague, Mimi, Eva y Luis; por el apoyo que me brindan siempre este título también es de ustedes, mil gracias por ser mis hermanos. LOS AMO MUCHO.

Mis sobrinitos: Choche y Gusanito, espero ser uno de los ejemplos en su vida y que siempre luchen para que sus sueños se hagan realidad. LOS AMO MUCHO.

Mi abuelita: Rosita☩ siempre estará conmigo, también es de usted este título, espero que me acompañe el día de mi examen. LA AMO MUCHO.

LO LOGRÉ!!!!!!

INDICE DE GENERAL

Índice General	I
Índice de Figuras	III
Índice de Tablas	IV
Índice de Gráficas	V
Lista de Abreviaturas	VI
1. Resumen	1
2. Introducción	
2.1 Definición de Mastitis	3
2.2 Clasificación de Mastitis	3
2.3 Agentes Causantes de la Mastitis	4
2.4 Mastitis Causada por <i>Staphylococcus aureus</i>	5
2.5 Mastitis Causada por <i>Escherichia coli</i>	6
2.6 Mastitis Causada por Estreptococos (<i>Streptococcus uberis</i>)	8
2.7 Mastitis Causada por <i>Enterococcus faecalis</i>	9
2.8 Otros Agentes Causantes de Mastitis	9
2.9 Epidemiología	10
2.10 Importancia en Salud Pública	11
2.11 Diagnostico de la Mastitis	12
2.11.1 Recolección de la Muestra	12
2.11.2 Métodos de detección de la Mastitis Bovina	13
2.11.2.1 Pruebas Físicas	13
2.11.2.2 Pruebas Químicas	14
2.11.2.3 Pruebas Biológicas	16
2.12 Prevención de la Mastitis Bovina	21
2.12.1 Control de los patógenos contagiosos	21
2.12.2 Control de los patógenos ambientales	22
2.12.3 Control de los patógenos de la piel	23
2.13 Medicina Tradicional	24
2.14 <i>Caléndula officinalis</i>	25
2.15 Quitosán	27
2.16 Ensayo Colorimétrico de Mosmann	32
2.17 Microscopia Electrónica de Transmisión	33
2.18. Justificación	36
2.19. Hipótesis	36
3. Objetivos	37
3.1 General	37
3.2 Particulares	37
4. Material y Métodos	38
4.1. Diagrama de Flujo General	38
4.2 Obtención del extracto de <i>Caléndula officinalis</i>	39
4.3 Quitosán pH 4	39
4.4 Obtención de Cepas Bacterianas	39
4.5 Identificación de Cepas Bacterianas	39
4.6 Ensayo Bacteria- <i>Caléndula officinalis</i> y/o Quitosán	39
4.6.1 Prueba Cualitativa	39
4.6.2 Prueba Cuantitativa de Mosmann	41
4.6.3 Efecto Bactericida-Bacteriostático	42
4.6.4 Microscopia Electrónica de Transmisión	42

5. Resultados	44
5.1 Aislamiento e Identificación de Cepas	44
5.2 Prueba Cualitativa	45
5.3 Prueba Cuantitativa	46
5.3.1 <i>Escherichia coli</i>	46
5.3.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	49
5.3.3 <i>Streptococcus uberis</i>	52
5.3.4 <i>Enterococcus faecalis</i>	55
5.4 Efecto Bactericida-Bacteriostático	58
5.5 Microscopia Electrónica de Transmisión	59
5.5.1 <i>Escherichia coli</i>	59
5.5.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	60
5.5.3 <i>Enterococcus faecalis</i>	61
6. Discusión	62
7. Conclusiones	67
8. Anexo 1	68
8.1 Pruebas de Identificación Bacteriana	68
9. Apéndice 1	69
9.1 Material, Equipo y Reactivos.....	69
9.2 Preparación de Medios de Cultivo.....	71
10. Apéndice 2	74
10.1 Pruebas Bioquímicas.....	74
11. Referencias Bibliográficas	78

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mastitis en el ganado bovino.	3
Figura 2. Ubre de vaca con sintomatología de mastitis clínica.	4
Figura 3. Aparato para determinación de la conductividad eléctrica de la leche.	14
Figura 4. Prueba de California para mastitis.	16
Figura 5. Interpretación de los resultados de la Prueba de California.	18
Figura 6. Procedimiento de siembra, incubación e identificación.	20
Figura 7. Flor de <i>Caléndula officinalis</i>	25
Figura 8. Relación estructural entre la Quitina, el Quitosán y el Quitano.	27
Figura 9. Esquema general para el aprovechamiento de crustáceos en el desarrollo de aplicaciones a partir de sus subproductos Quitina y Quitosán.	29
Figura 10. Pared de bacterias Gram + y Gram -.	30
Figura 11. Microscopio Electrónico de transmisión de la FES C.	35
Figura 12. Microplaca de 96 pozos rotulada.	41
Figura 13. Caja Petri rotulada para determinar el efecto Bactericida-Bacteriostático.	42
Figura 14. Efecto Bactericida-Bacteriostático de Quitosán con <i>E. coli</i> de la muestra 253.	58
Figura 15. Efecto Bactericida-Bacteriostático de Caléndula officinalis con <i>E. coli</i> de la muestra 253. ..	58
Figura 16. Microfotografías Electrónicas de <i>Escherichia coli</i>	59
Figura 17. Microfotografías Electrónicas de <i>Staphylococcus aureus</i>	60
Figura 18. Microfotografías Electrónicas de <i>Enterococcus faecalis</i>	61

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tipos de microorganismos.	5
Tabla 2. Mastitis causada por <i>Streptococcus spp.</i>	8
Tabla 3. Microorganismos patógenos considerados como agentes menores causantes de mastitis.	9
Tabla 4. Bacterias de importancia para la salud pública.	11
Tabla 5. Interpretación de resultados de la prueba de Whiteside.	15
Tabla 6. Interpretación de resultados de la Prueba de California para Mastitis.	18
Tabla 7. La interpretación y registro de resultados se realiza bajo el siguiente criterio.	18
Tabla 8. Interpretación para prueba de Wisconsin.	19
Tabla 9. Forma de preparación y usos de <i>Caléndula officinalis</i>	26
Tabla 10. Actividad antimicrobiana de Quitosán.	31
Tabla 11. Concentraciones utilizadas en el ensayo cualitativo.	40
Tabla 12. Rotulo y contenido de tubos para las diluciones.	40
Tabla 13. Preparación de tubos para MET.	42
Tabla 14. Bacterias aisladas e identificadas de muestras de leche de vacas con mastitis.	44
Tabla 15. Resultados cualitativos obtenidos de las bacterias tratadas con Quitosán.	45
Tabla 16. Resultados cualitativos obtenidos de las bacterias tratadas con <i>Caléndula officinalis</i>	45
Tabla 17. Resultados cualitativos obtenidos de las bacterias tratadas con <i>Caléndula officinalis</i> y Quitosán (Mezcla).	45
Tabla 18. Valores de absorbancia del ensayo en microplaca de la muestra No. 253 tratada con Quitosán.	46
Tabla 19. Valores de absorbancia del ensayo en microplaca de la muestra No. 253 tratada con <i>Caléndula officinalis</i>	47
Tabla 20. Valores de absorbancia del ensayo en microplaca de la muestra No. 253 tratada con <i>Caléndula officinalis</i> /Quitosán.	48
Tabla 21. Valores de absorbancia del ensayo en microplaca de la muestra No. 169 tratada con Quitosán.	49
Tabla 22. Valores de absorbancia del ensayo en microplaca de la muestra No. 169 tratada con <i>Caléndula officinalis</i>	50
Tabla 23. Valores de absorbancia del ensayo en microplaca de la muestra No. 169 tratada con Quitosán y <i>Caléndula officinalis</i>	51
Tabla 24. Valores de absorbancia del ensayo en microplaca de la muestra No. 670 tratada con Quitosán.	52
Tabla 25. Valores de absorbancia del ensayo en microplaca de la muestra No. 670 tratada con <i>Caléndula officinalis</i>	53
Tabla 26. Valores de absorbancia del ensayo en microplaca de la muestra No. 670 tratada con Quitosán y <i>Caléndula officinalis</i>	54
Tabla 27. Valores de absorbancia del ensayo en microplaca de la muestra No. 65 tratada con Quitosán.	55
Tabla 28. Valores de absorbancia del ensayo en microplaca de la muestra No. 65 tratada con <i>Caléndula officinalis</i>	56
Tabla 29. Valores de absorbancia del ensayo en microplaca de la muestra No. 65 tratada con Quitosán y <i>Caléndula officinalis</i>	57
Tabla 30. Actividad bactericida o bacteriostática de Quitosán.	58
Tabla 31. Actividad bactericida o bacteriostática de <i>Caléndula officinalis</i>	58
Tabla 32. Pruebas de identificación de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus uberis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Escherichia coli</i>	68
Tabla 33. Interpretación de la prueba de OF.	75
Tabla 34. Identificación por medio de las pruebas de IMViC.	77

INDICE DE GRAFICAS

Grafica 1. Porcentaje de las bacterias aisladas e identificadas en las muestras de leche de vacas con mastitis.	44
Grafica 2. Porcentaje de las bacterias Gram + y Gram - aisladas e identificadas en las muestras de leche de vacas con mastitis.	45
Grafica 3. Ensayo de Qitosán con <i>Escherichia coli</i> aislada de la muestra 253.	46
Grafica 4. Ensayo de <i>Caléndula officinalis</i> con <i>Escherichia coli</i> aislada de la muestra 253.	47
Grafica 5. Ensayo de Qitosán y <i>Caléndula officinalis</i> con <i>Escherichia coli</i> aislada de la muestra 253.	48
Grafica 6. Ensayo de Qitosán con <i>Staphylococcus aureus</i> aislada de la muestra 169.	49
Grafica 7. Ensayo de <i>Caléndula officinalis</i> con <i>Staphylococcus aureus</i> aislada de la muestra 169.	50
Grafica 8. Ensayo de Qitosán y <i>Caléndula officinalis</i> con <i>Staphylococcus aureus</i> aislada de la muestra 169.	51
Grafica 9. Ensayo de Qitosán con <i>Streptococcus uberis</i> aislada de la muestra 670.	52
Grafica 10. Ensayo de <i>Caléndula officinalis</i> con <i>Streptococcus uberis</i> aislada de la muestra 670.	53
Grafica 11. Ensayo de Qitosán y <i>Caléndula officinalis</i> con <i>Streptococcus uberis</i> aislada de la muestra 670.	54
Grafica 12. Ensayo de Qitosán con <i>Enterococcus faecalis</i> aislada de la muestra 65.	55
Grafica 13. Ensayo de <i>Caléndula officinalis</i> con <i>Enterococcus faecalis</i> aislada de la muestra 65.	56
Grafica 14. Ensayo de Qitosán y <i>Caléndula officinalis</i> con <i>Enterococcus faecalis</i> aislada de la muestra 65.	57

ABREVIATURAS

<u>Abreviatura</u>	<u>Significado</u>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
RNA	Acido Ribonucleico
BHI	Agar Infusión cerebro Corazón
SM	Agar Sales Manitol
EMB	Agar Eosina Azul de Metileno
SIM	Ácido sulfhídrico-indol-motilidad
MIO	Motilidad Indol Ornitina
MR-VP	Rojo de Metilo - Vogues Proskauer
No	Número
PM	Peso Molecular
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
m. o.	Microorganismo
UFC	Unidad Formadora de Colonia
LPS	Lipopolisacarido
OMS	Organización Mundial de la Salud
MAT	Medicina Alternativa o Tradicional
PCE	Prueba de Conductividad Eléctrica
CMT	Prueba de California para Mastitis
WMT	Prueba de Wisconsin para Mastitis
CCS	Conteo de Células Somáticas
DMSO	Dimetil Sulfoxido
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 difeniltetrazol (Sal de Tetrazolium)
Qn	Quitosan
<i>C/</i>	<i>Caléndula</i> con....
spp	Sin especie particular
Lt	Litro
ml	Mililitros
µm	Micrómetro
µl	Microlitros
µg	Microgramos
g	Gramos
mg	Miligramo
nm	Nanómetros
°C	Grados Centígrados

1. RESUMEN

La mastitis bovina, es la respuesta inflamatoria de la glándula mamaria normalmente causada por bacterias. Es probablemente la más costosa de las enfermedades infecciosas endémicas que afecta a las vacas y otras especies lecheras. Su impacto es en la producción animal, bienestar animal y la calidad de la leche producida.⁽¹⁾

El presente trabajo se realizó en la FES-C Campo 1, en el laboratorio 10 de la Unidad de Posgrado. Su objetivo principal fue determinar el efecto inhibitorio del extracto de *Caléndula officinalis* y de Quitosán a pH 4, (solos y combinados), en bacterias aisladas de 10 muestras obtenidas de casos de mastitis bovina provenientes de la Cuenca Lechera de Tizayuca, Hidalgo. *Caléndula officinalis* es utilizada en la medicina tradicional por sus propiedades, tales como: antiinflamatorio, antibacteriano, cicatrizante, entre otras; sus flores eran consideradas históricamente benéficas para reducir la inflamación de diferentes traumas; y Quitosán es un biopolímero derivado de la Quitina, se puede encontrar de forma natural en las paredes celulares de algunas plantas y hongos; sin embargo, la fuente más importante de Quitosán, a nivel industrial, lo constituye la Quitina, la cual, mediante un proceso de desacetilación química o enzimática, ha permitido producirlo a gran escala. Algunas de sus propiedades son: biocompatible, biodegradable y buen adsorbente. A esto se le suma su actividad antimicrobiana por la presencia de grupos amino que se encuentran en forma catiónica.

Las bacterias que se aislaron fueron *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* y *Enterococcus faecalis*; estas se identificaron por medio de pruebas bioquímicas primarias y secundarias. *Streptococcus agalactiae* es una bacteria importante en mastitis bovina aunque no fue aislada en este trabajo creemos que es relevante en un futuro evaluar su sensibilidad con *Caléndula officinalis* y Quitosán.

El extracto de *Caléndula officinalis* se preparó colocando 15gr de pétalos en un litro de etanol al 70%, se esterilizó por filtración con membrana de 0.22µm, después se realizó una prueba de esterilidad sembrando el extracto en Agar BHI. Se evaporó hasta sequedad en un horno a una temperatura de 56 °C. Se recolectó, pesó y conservó en frascos ámbar estériles. Con la materia seca obtenida se preparó una solución a concentración de 40µg/µl. La solución de Quitosán (Qn) pH 4 al 1%, (proporcionado por el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1 del Área de Posgrado); se utilizó directamente teniendo así una concentración de 10µg/µl. Se realizaron diluciones dobles para hacer los ensayos en la microplaca con el extracto de *Caléndula officinalis* y Quitosán solos y combinados y las bacterias antes mencionadas, después se utilizó el método colorimétrico de Mosmann para determinar cuantitativamente la inhibición bacteriana, el cual evidencia la presencia de células viables a partir de la reducción del reactivo por la acción de una deshidrogenasa producida por dichas células; con los

resultados se obtuvo la CMI. También se determinó el efecto bactericida y/o bacteriostático de las cepas en cada ensayo resembrándolas en agar BHI. Por último se observó el daño que produce *Caléndula officinalis* y/o Quitosán en las bacterias por medio de Microscopía Electrónica de Transmisión (MET). *Caléndula officinalis* y Quitosán (solos y combinados), presentan un efecto inhibitorio en las 4 bacterias utilizadas, principalmente en *Streptococcus uberis* y *Streptococcus faecalis*, mientras que *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* no presentan una alta sensibilidad, esto se corrobora con la MIC; al combinarlos sus resultados no mejoran ya que las bacterias presentan inhibición a concentraciones de extracto mayores que cuando se trabajan solos. El efecto causado por *Caléndula officinalis* sobre las bacterias aisladas es bacteriostático en todas las concentraciones utilizadas, mientras que el efecto de Quitosán es bactericida en las dos primeras (10µg/µl y 5µg/µl). Las observaciones en el Microscopio Electrónico de Transmisión nos permitieron determinar que el efecto de *Caléndula officinalis* y Quitosán sobre *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus faecalis* es a nivel de pared celular visualizado por la formación de protoplastos. En *Escherichia coli* al ser bacteria Gram negativa se da la formación de esferoplastos y lisis de algunas bacterias. Determinamos el efecto inhibitorio de *Caléndula officinalis* y Quitosán solos y combinados, en bacterias aisladas de casos de mastitis bovina. Si se realizará un sellador de tetas con *Caléndula officinalis* y Quitosán cada uno de ellos produciría su efecto independientemente.

2. INTRODUCCION

2.1 DEFINICION DE MASTITIS

La mastitis es una reacción inflamatoria de los tejidos secretores o conductores de la leche en la glándula mamaria, como una respuesta a una infección bacteriana o lesión traumática. El termino deriva del griego “mastos”, ubre e “itis”, inflamación (Figura 1). ⁽²⁾

El propósito del proceso inflamatorio es eliminar o neutralizar a los microorganismos invasores y asistir en la reparación de tejidos dañados y de esta forma restablecer la función normal de la glándula. ⁽²⁾



Figura 1. Mastitis en el Ganado bovino. ⁽³⁾

2.2 CLASIFICACION DE LA MASTITIS

Se basa en el grado de severidad de los síntomas y su duración.

➤ MASTITIS CLÍNICA

Se presenta con signos y síntomas observables; hinchazón de uno o más cuartos en la ubre, calor y dolor al contacto y cambios macroscópicos en la leche. La severidad de este tipo de mastitis puede variar de una mastitis clínica leve hasta una mastitis clínica hiperaguda, en la cual se presenta sintomatología sistémica, como aumento en la temperatura corporal, deshidratación, inapetencia, malestar, que en algunos casos puede ser fatal. ⁽²⁾

Tiene una alta incidencia en los rebaños de todo el mundo, estimándose que en Estados Unidos, al menos el 40% de todas las vacas están infectadas con alguna forma de mastitis en uno o más de sus cuartos. ⁽⁴⁾

En la forma clínica se presentan evidentes signos de inflamación como tumefacción, rubor, dolor, cambios notables en la secreción y eventualmente, signos sistémicos como fiebre, pérdida del apetito y depresión (Figura 2). ⁽⁵⁾



Figura 2. Ubre de vaca con sintomatología de mastitis clínica. ⁽⁶⁾

➤ MASTITIS SUBCLINICA

No presenta signos o síntomas observables y por lo general el animal, la ubre y la leche aparentan ser normales. Este tipo de mastitis es prolongada o crónica a diferencia de la mastitis clínica que tiene una duración corta. ⁽²⁾

La detección de la mastitis subclínica puede hacerse mediante pruebas como el CMT, para apreciar el contenido celular somático en leche y el diagnóstico bacteriológico de las muestras tomadas en forma aséptica. ⁽²⁾

2.3 AGENTES CAUSANTES DE LA MASTITIS

Los agentes que causan la mastitis bovina son microorganismos que habitan en la ubre de la vaca y sus alrededores. De acuerdo con su epidemiología, pueden dividirse en tres grupos (Tabla 1): ^(2,5)

- **Contagiosos.** La fuente principal de estos patógenos son los cuartos de ubre infectados y su transmisión ocurre durante el ordeño a través de las manos del ordeñador, paños de secado y pezoneras.
- **Ambientales.** La fuente de infección es el ambiente de las vacas. Estos microorganismos provienen del suelo, heces, camas de los animales, aguas contaminadas y no dependen del momento del ordeño para ganar acceso al extremo del pezón; pueden provocar infecciones en cualquier momento, pero más frecuentemente en el período de secado y más probable en el lapso peri-parto.

- **Oportunistas.** La fuente más importante de infección es la piel de la vaca, la frecuencia de infección es mayor en el período de secado, durante el cual la piel del pezón no está expuesta a los germicidas usados en la desinfección post-ordeño. La frecuencia de infecciones causadas por los patógenos oportunistas es alta para el momento del parto, pero baja rápidamente durante la lactancia.

Tabla 1 Tipos de microorganismos ^(2,5)

Contagiosos	<i>Staphylococcus aureus</i>	
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	
	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	
	<i>Mycoplasma spp</i>	
	<i>Corynebacterium bovis</i>	
Ambientales	<i>Streptococcus no-agalactiae</i>	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>
		<i>Streptococcus uberis</i>
	<i>Enterobacterias</i>	<i>Escherichia coli</i>
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>
		<i>Enterobacter aerogenes</i>
	<i>Otros</i>	<i>Especies de Candida</i>
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Oportunistas	<i>Enterococcus faecalis</i>	
	<i>Staphylococcus coagulasa (-)</i>	

2.4 MASTITIS CAUSADA POR *Staphylococcus aureus*

La mastitis causada por este microorganismo en la vaca puede manifestarse en forma hiperaguda, aguda y crónica. Su forma más común es la crónica, por lo general subclínica, que puede convertirse en aguda en algunas etapas de la lactación. La fuente principal de infección es la ubre afectada, transmitiéndose básicamente a través de la máquina del ordeño; en consecuencia el lugar de contagio entre las vacas es la sala de ordeño durante el tiempo que permanecen en la misma, aunque también se informó contagio de terneras que ingerían leche contaminada con la bacteria. ⁽⁷⁾

Los signos de este tipo de mastitis varían según la enfermedad causada. En el caso de la mastitis subclínica son muy inespecíficos, como los floculos en la leche solo observables con la copa de fondo oscuro o reacciones positivas en el CMT. Con el tiempo este tipo de mastitis se convierte en crónica, detectándose mediante palpación debido a la fibrosis causada. El estudio histopatológico de la glándula mamaria realizado postmortem en vacas con mastitis crónica causada por *S. aureus* muestra mas estroma interalveolar y menos área luminal que en las glándulas de control no afectadas, con la diferencia del aumento de células inactivas y la disminución de células plenamente activas en el epitelio de las glándulas afectadas. ⁽⁷⁾

Características Generales. ⁽⁸⁾

Cocos Gram positivos agrupados en racimos.

Aproximadamente 1µm de diámetro.

Inmóviles.

No forman esporas.

La mayoría son anaerobios facultativos

Crece bien en agar sangre a 37°C.

Muchas veces, pueden presentar un pigmento de color amarillo.

Catalasa positivo.

Coagulasa positivo.

Manitol positivo.

Termonucleasa positivo.

Colonias medianas, blancas, cremosas y brillantes.

2.5 MASTITIS CAUSADA POR *Escherichia coli*

La mastitis causada por *Escherichia coli* tiene una variedad de síntomas locales y generales. En Israel, cerca del 60% de las mastitis clínicas son causadas por coliformes estando incluidos en este grupo los microorganismos de la familia Enterobacteriaceae, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* y *Citrobacter ssp*, aunque *Escherichia coli* es la principal causante de este tipo de mastitis. Todos ellos son parte de la flora intestinal del hombre y los animales, por lo tanto las heces son la primera fuente de contaminación.

En estudios de vigilancia epidemiológica sobre mastitis realizados en Inglaterra y Gales, sobre 45,000 vacas lecheras, *Escherichia coli* fue aislada en el 40% de los casos de mastitis aguda. ^(2, 7)

La exposición de la ubre a los agentes ambientales como *Escherichia coli*, ocurre en especial entre los ordeños, es decir, fuera de la sala, a diferencia de los patógenos contagiosos. Por lo tanto, todas las medidas

realizadas para controlar patógenos contagiosos, como por ejemplo inmersión de pezones con antiséptico después del ordeño o tratamiento de secado, no son efectivas para controlar a esta bacteria.

Escherichia coli infecta la glándula mamaria a través del canal del pezón. Las dosis infectivas son relativamente bajas, estando en el rango de las 50 UFC.

Las bacterias gran negativas, en este caso *Escherichia coli*, elaboran una endotoxina a partir de los lipopolisacáridos (LPS), que es parte de la membrana bacteriana y es producida durante la multiplicación y liberada con la muerte de las bacterias. Esta endotoxina causa después de su liberación una serie de eventos que finalizan en la sepsis y el shock séptico. ^(2,7)

La glándula mamaria posee distintos mecanismos de defensa que son en definitiva mecanismos anti-LPS, derivados de los leucocitos polimorfonucleares. Estos contienen un arsenal de anti-LPS, péptidos y proteínas situados en los gránulos, como por ejemplo: proteína BPI (bactericidal/permeability-increasing), lactoferrina, lisozima y la proteína antimicrobiana cationica.

La BPI es una proteína contenida en gránulos primarios, que bloquea el efecto de los LPS en la liberación del factor de necrosis tumoral. La proteína antimicrobiana cationica, también contenida en los gránulos de los PMN, inhibe la liberación de las citoquinas. La lactoferrina presente en la leche es un mecanismo de defensa importante contra *E. coli* y como agente neutralizador de los LPS, siendo el epitelio secretor mamario el responsable por la producción de lactoferrina. La lisozima es secretada por los PMN y forma complejos con los LPS que anulan la producción del factor de necrosis tumoral. Así mismo los PMN contienen la enzima aciloxiacil hidrolasa, que actúa reduciendo la toxicidad de los LPS. ^(2,7)

Características Generales ⁽⁸⁾

Bacilos Gram negativos.

Anaerobios facultativos.

Fermentan la glucosa.

Crecen en medios simples, diferenciales, selectivos y enriquecidos.

Forma colonias lisas, circulares, convexas con bordes bien diferenciados.

En el medio EMB forma colonias verdes con brillo metálico por utilización de la lactosa.

Metabolismo fermentativo.

2.6 MASTITIS CAUSADA POR ESTREPTOCOCOS (*Streptococcus uberis*)

Los estreptococos son también agentes de gran importancia como causantes de mastitis (Tabla 2). Pueden dividirse en dos grupos; el primero está constituido por los estreptococos contagiosos, que se transmiten de vaca en vaca, siendo el principal agente *Streptococcus agalactiae*. El segundo grupo abarca los agentes ambientales, en los cuales la fuente de contaminación son el entorno de la vaca; aquí se encuentra *Streptococcus uberis* y *Streptococcus dysgalactiae*, este último también puede estar dentro de los contagiosos. (2,7)

Tabla 2 Mastitis causada por *Streptococcus* spp. (2,7)

AGENTE	CARACTERISTICAS
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Sumamente contagioso, se transmite con rapidez de vaca en vaca y la ubre afectada constituye el reservorio. La leche proveniente de cuartos afectados posee una carga bacteriana alta; este tipo de infección es responsable de recuentos celulares y bacterianos elevados.
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	Es otra causa importante de mastitis contagiosa. Puede aparecer en vacas de primer parto y vacas secas debido a la succión de los pezones entre las terneras.
<i>Streptococcus uberis</i>	Mastitis ambiental. Asociada a camas con paja o aserrín. Aparición favorecida por la estabulación.

De estos microorganismos el que nos interesa es el *Streptococcus uberis* ya que es el que se aisló de las muestras de leche. Este es de gran relevancia en sistemas estabulados donde se lo puede encontrar en la cama donde se tumba la vaca; así mismo se aísla en labios, patas y piel de la ubre. Los factores de virulencia de este microorganismo son hemolisinas, hialuronidasa, ADNasa, estreptoquinasa, exotoxinas pirogénicas, capsula no antigénica de ácido hialurónico, que dificulta la fagocitosis, siendo el porcentaje de curación menor que para los demás estreptococos. (2,7)

Características Generales (8)

Cocos Gram + agrupados formando pares o cadenas de diferente largos.

Aerobias y anaerobias facultativas.

No presentan esporas.

Inmóviles.

Algunas forman cápsula.

Catalasa (-).

Oxidasa (-).

Metabolismo fermentativo.

Necesitan medio enriquecido (sangre).

Colonias muy pequeñas de bordes netos como gotas de rocío.

2.7 MASTITIS CAUSADA POR *Enterococcus faecalis*

Los enterococos o estreptococos fecales pueden causar mastitis en forma oportunista. ^(2, 7) Son de tratamiento difícil por su resistencia a los antibióticos. Son de incidencia esporádica como agentes etiológico de mastitis.

Características Generales

Se clasificaron previamente como estreptococos del grupo D debido a que poseen el antígeno de la pared celular del grupo D, un ácido teicoico con glicerol que se asocia a la membrana citoplasmática.⁽⁸⁾

Bacterias Gram (+).

Forma esférica.

Se disponen en parejas o en cadenas cortas.

Anaerobios facultativos.

Temperatura óptima de crecimiento de 35°C.

Toleran NaCl al 6.5% y sales biliares al 40%.

2.8 OTROS AGENTES CAUSANTES DE MASTITIS

En la Tabla 3 se mencionan otros agentes que causan mastitis bovina, señalando algunas características de la misma.

Tabla 3 Microorganismos patógenos considerados como agentes menores causantes de mastitis.

Agente	Características
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Por lo general causa mastitis severa y crónica. Los brotes están relacionados con agua y trapos contaminados.
<i>Mycoplasma bovis</i>	Mastitis clínica o subclínica de prevalencia alta en algunos países.
<i>Nocardia asteroides, N. farcinica</i>	Mastitis purulenta granulomatosa. De significación como zoonosis.
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	Mastitis clínica acompañada de secreción purulenta y de un característico olor fétido. Hay pérdida del cuarto afectado (necrosis).
<i>Bacillus cereus</i>	Mastitis hemorrágica o gangrenosa que puede estar acompañada de toxemia.
<i>Candida albicans (levadura)</i>	Mastitis clínica o subclínica. Ocurre en vacas debilitadas.
<i>Prototheca zopfii (alga)</i>	Causa reducción drástica en la producción de leche. Esta asociada a raciones contaminadas.
<i>Serratia marcescens</i>	Mastitis clínica leve. Puede contaminar antisépticos para uso en el pos ordeño. Característica tinción roja en el medio de cultivo.
<i>Pasteurella spp</i>	Mastitis clínica aguda o crónica. Puede ser transmitido a la ubre por la mamada del ternero. El estrés es un factor predisponente.
<i>Corynebacterium bovis</i>	Elevación de células somáticas. Puede ocurrir en ganaderías donde no se realiza desinfección después del ordeño.

2.9 EPIDEMIOLOGÍA

La infección de cada glándula mamaria ocurre a través del conducto del pezón a partir de dos fuentes principales de contaminación: la ubre infectada y el medio. La contaminación de las manos de los ordeñadores, paños de lavado y copas de aparatos de ordeño pueden diseminar con rapidez la infección a los pezones de otros animales por la leche procedente de cuarterones infectados. ⁽⁹⁾

Los microorganismos pueden invadir el canal del pezón por distintas vías:

1. Entre ordeños las bacterias pueden avanzar por el canal del pezón por multiplicación
2. Pueden ingresar por la presión física ejercida sobre la punta del pezón cuando la vaca se mueve
3. Durante el ordeño mecánico pueden ser impulsados hacia el canal del pezón o desde el mismo hacia el interior de la cisterna del pezón, por los impactos que causan las fluctuaciones de vacío contra el orificio del pezón
4. Durante la aplicación de un antibiótico pueden ser empujados físicamente a través del canal del pezón por la inserción completa de la cánula.

La invasión microbiana de la glándula mamaria está dada por tres etapas:

- **Etapas de invasión.**- es aquella en la que el microorganismo pasa del exterior de la ubre a la leche que se encuentra en el interior de la cisterna del pezón
- **Etapas de infección.**- este es el momento en que los microorganismos se multiplican rápidamente e invaden el tejido mamario; se establece una población bacteriana que se disemina por toda la glándula, dependiendo de la patogenicidad del microorganismo.
- **Etapas de inflamación.**- todo lo anterior deriva en una inflamación (mastitis) y aumenta notablemente la cuenta leucocitaria en la leche ordeñada.

Condiciones que favorecen la presentación de mastitis ⁽¹⁰⁾

- **Edad:** vacas de más de cinco partos suelen presentar mastitis subclínica.
- **Alojamiento y medio ambiente:** se aconseja una temperatura de 15 °C y una humedad de 70%.
- **Procedimiento de ordeño:** preparación de la ubre, lavado, colocación de pezoneras, desinfección y sellado de pezones.
- **Alimentación:** si esta es rica en proteínas predispone a una mastitis, igual que en una con deficiencia de minerales.
- **Estado funcional de la ubre:** la mayoría de las infecciones nuevas se establecen durante las tres primeras semanas del periodo seco y en el primer mes de lactación.

2.10 IMPORTANCIA EN SALUD PÚBLICA

La leche es un excelente medio de cultivo y protector para ciertos microorganismos en especial bacterias patógenas, provenientes del animal, el hombre o el medio ambiente. Estas pueden ser excretadas directamente por la glándula mamaria a la leche o estar originadas en la piel o mucosas del animal o del ordeñador y contaminar la leche. Una fuente importante de contaminación láctea suele ser el agua contaminada que se usa en el establecimiento. ⁽²⁾

Durante los últimos años, problemas higiénico-sanitarios debidos a bacterias patógenas en la leche, perjudicaron a la industria lechera. En muchos de estos casos la leche fresca fue la fuente de contaminación, como en el caso de *Listeria*, *Salmonella*, *Campylobacter* y *Staphylococcus aureus*.

Las bacterias presentes en la leche fresca, causantes o no de mastitis, que son consideradas peligrosas para la salud humana se describen en la Tabla 4. ⁽²⁾

Tabla 4 Bacterias de importancia para la salud pública. ⁽²⁾

Microorganismo	Tipo de mastitis	Enfermedad en el humano
<i>Listeria monocytogenes</i>	Mastitis leve y crónica.	Meningitis, septicemia, neumonía, endocarditis.
<i>Campylobacter jejuni</i>	Puede causar mastitis o ser aislado en la ubre sin causarla.	Enteritis.
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Puede inducir el aumento de células somáticas al inocularse en la ubre. Es aislada esporádicamente en muestras de leche.	Enteritis, pseudoapendicitis, artritis.
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i>	Mastitis lobular-infiltrativa o tuberculosis miliar.	Tuberculosis.
<i>Mycobacterium paratuberculosis</i>	Puede ser aislado en leche, llegando a la ubre dentro de los macrófagos.	Se sospecha, sin haber sido confirmado aun, enfermedad de Crohn.
<i>Brucella abortus</i>	Mastitis clínica o subclínica.	Infertilidad, aborto.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Mastitis clínica o subclínica.	1) Infecciones diversas 2) Intoxicación. Vómito diarreas.
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Mastitis clínica o subclínica.	Endocarditis, meningitis neonatal.
<i>Salmonella spp</i>	--	Diarrea, fiebre, vómitos.
<i>Escherichia coli</i>	Mastitis clínica o subclínica.	Enterotoxigenica, diarrea infantil.

2.11 DIAGNOSTICO DE LA MASTITIS

Los casos de mastitis clínica resultan fáciles de reconocer debido a las evidentes alteraciones que ocurren en la glándula mamaria y su secreción, aunque el diagnóstico del agente causal sólo se logra mediante cultivo microbiológico de la secreción. Para el diagnóstico de los casos subclínicos se requiere aplicar pruebas especiales, a fin de confirmar la presencia de un proceso inflamatorio; y de igual forma, el agente causal sólo puede ser identificado mediante el cultivo microbiológico. ^(2, 7)

2.11.1 RECOLECCIÓN DE MUESTRA

1. Lavar las manos con agua y jabón.
2. Usar tubos estériles con tapa de baquelita rotulados con el número correspondiente a la ganadería, a la vaca, cuarto de la ubre y fecha.
3. Lavar el pezón con agua potable. Desinfectarlo preferentemente con alcohol 70%.
4. Los primeros chorros de leche se deben descartar y no ser tomados ya que pueden agregar residuos del desinfectante a la muestra; asimismo, contienen mayor cantidad de bacterias contaminantes y células somáticas que el resto de la leche. Destapar el tubo estéril bajo la ubre. Sostener el tubo inclinado para evitar partículas de polvo contaminadas. El tubo no debe llenarse mas allá de las 2/3 partes. La boca del tubo no debe tocar el pezón. Comience por recolectar las muestras de los cuartos de ubre mas cercanos y por ultimo los mas alejados.
5. Cerrar inmediatamente el tubo, antes de desplazarlo.
6. Los tubos se mantienen en refrigeración a 4°C para evitar la multiplicación de microorganismos o inactivación de enzimas que se quieran estudiar.
7. Si las muestras no pueden ser procesadas antes de 36 de horas es necesario congelar a -20°C.

Nota: Como muchas de las bacterias causantes de mastitis son patógenas también para el hombre, se recomienda el uso de elementos de protección como guantes de látex o lentes protectoras, en especial en ganaderías con antecedentes o sospechas de enfermedades transmisibles al hombre. ^(2, 5)

2.11.2 MÉTODOS DE DETECCIÓN DE LA MASTITIS BOVINA

➤ Observación y palpación de la ubre

En la mastitis subclínica, la ubre de la vaca permanece aparentemente sana, la leche que produce, a simple vista, es una leche normal, pero una infección incipiente puede estar dañando el tejido glandular y provocando por lo tanto una alteración en la leche que esta produce. ⁽¹¹⁾

La infección puede provocar inflamación de uno, varios cuartos o de toda la glándula, aumento de la temperatura en el área afectada, así como enrojecimiento de la zona y dolor, estos eventos provocan que el sistema inmune del animal actúe tratando de aliviar el problema, además de lograr la mayoría de las veces mantener la infección únicamente en el área afectada sin alterar otros órganos o sistemas del animal. ⁽¹¹⁾

Cuando se encuentran todos o alguno de los síntomas enumerados se puede interpretar como un caso de mastitis clínica, donde además se encuentran cambios importantes en la leche que produce el tejido afectado, estos cambios pueden consistir en alteración del color, aparición de grumos, coágulos sanguinolentos, coágulos con pus, o una leche más acuosa, entre otros. ⁽¹¹⁾

2.11.2.1 PRUEBAS FÍSICAS

Estas sólo son útiles cuando la mastitis ya esta avanzada y no detectan mastitis subclínica. Dentro de estas se encuentran las siguientes: ⁽¹¹⁾

1. Prueba del paño negro

Esta se realiza durante la preparación de la vaca para la ordeña. Consiste en la detección de grumos en la leche (tolondrón) haciendo pasar los primeros chorros a través de una malla negra o bien utilizando una cubetilla especialmente diseñada para eso. Es recomendable realizar este procedimiento en todos los ordeños ya que además de detectar leche anormal, se eliminan bacterias que normalmente se encuentran en mayor cantidad en estos primeros chorros y además se estimula la "bajada" de la leche. ^(12, 13)

2. Taza probadora

Examine los primeros chorros de leche de cada ordeño sobre un recipiente (strip cup) de fondo oscuro. Los coágulos, escamas, hilos, materia fibrosa, secreciones acuosas, o color anormal indican que la leche no es normal y que hay problemas probables. En la mastitis crónica la leche no tiene apariencia visible anormal en todos los ordeños. ⁽¹⁴⁾

2.11.2.1 PRUEBAS QUÍMICAS

Entre éstas se encuentran: la conductividad eléctrica de la leche, papel indicador de mastitis y la prueba de Whiteside. Respecto a la conductividad eléctrica CE, el procedimiento químico es muy variable por lo que no es recomendable como prueba única.⁽¹¹⁾

1. Conductividad eléctrica de la leche

La Prueba de Conductividad Eléctrica (PCE) se ha utilizado como un indicador de la mastitis durante la última década, se basa en el aumento de conductividad eléctrica de la leche debido al mayor contenido electrolítico especialmente iones de sodio y de cloro y se ha desarrollado como un método para monitorear el estado de la mastitis en la vaca. ^(15, 16)

Se le encuentra como parte de algunos equipos de ordeño computarizados dentro de las salas de ordeño así como también en forma de medidores portátiles, lo que permite el monitoreo individual por cuarto. ^(15, 16)

Esta técnica es importante porque mide la lesión, como es el caso del recuento celular. Sin embargo, sus limitaciones probablemente restringen su uso a vacas de producción elevada que se mantienen en rebaños pequeños, o en laboratorios con autoanalizadores. ⁽⁹⁾

Se puede emplear una combinación de la detección de mastitis subclínica tomando como base la conductividad eléctrica de la leche, la producción láctea, el número de parto y los días de lactación, como un modelo logístico de regresión como instrumento de análisis en un rebaño con una incidencia alta de mastitis subclínica. ⁽⁹⁾

El aparato disponible que se promociona con más frecuencia, basado en la medición de la conductividad eléctrica de la leche, es un dispositivo que se sostiene con la mano y tiene una copa empotrada donde se lanzan los chorros de la leche (Figura 3). ⁽⁹⁾



Figura 3. *Aparato para determinación de la conductividad eléctrica de la leche*

Permite la identificación de la mastitis clínica con precisión, pero en el caso de las mastitis subclínicas, la precisión es solo del 50% en comparación con los métodos estándar. ⁽⁹⁾

Este instrumento proporciona una lectura digital del resultado de la PCE y representa una alternativa a la Prueba de California para Mastitis (CMT) como prueba de monitoreo de la mastitis subclínica al lado de la vaca. ⁽¹⁵⁾ Aunque a veces da como resultado un gran número de falsos positivos o de falsos negativos, por lo que no es muy confiable. ⁽¹⁷⁾

2. Papel indicador de mastitis

Este método, consiste en un papel sobre el que se hace caer directamente del pezón algunas gotas de leche, se consideran sospechosas las leches que dan una coloración correspondiente a un pH igual o superior a 7. La prueba descubre el 50% de las leches infectadas. ⁽¹²⁾

3. Prueba de Whiteside

La mezcla de leche con una solución de NaOH al 4% ocasiona que la leche se gelifique formando grumos que son visibles. Los grumos serán más grandes conforme la leche contenga mayor número de células somáticas. Para hacer más visible la reacción es conveniente usar una placa de acrílico negra que puede tener dibujada 4 cuadros de 3cm x 3cm, uno por cada cuarto. ^(13, 18)

Procedimiento:

- a. Colocar 5 gotas de leche fría en el centro del cuadrado y agregar 2 gotas de la solución de NaOH al 4%.
- b. Mezclar vigorosamente, dispersando la leche en el cuadrado por medio de un palillo. Continuar mezclando por alrededor de 20 segundos y dar lectura al resultado.
- c. Interpretar de acuerdo a la Tabla 5.

Tabla 5 Interpretación de resultados de la prueba de Whiteside. ⁽¹³⁾

mm de leche	Células somáticas / ml
Negativo 0	-325,000
Traza	300,000-600,000
1+	600,000-1,000,000
2+	1,000,000-2,000,000
3+	Mas de 2,000,000

2.11.2.3 PRUEBAS BIOLÓGICAS

Dentro de éstas se encuentran: la prueba de California para mastitis, prueba de Catalasa, prueba de Wisconsin, prueba de CAMP y el monitoreo de células somáticas, así como el diagnóstico bacteriológico. ⁽¹¹⁾

1. Prueba de California para Mastitis (CMT)

La Prueba de California para Mastitis (CMT, por sus siglas en inglés) ha sido empleada durante décadas y sigue siendo la prueba más utilizada a nivel de campo para el diagnóstico de mastitis en el ganado bovino lechero. ^(15, 19, 20, 21, 22)

Es una prueba sencilla que es útil para detectar la mastitis subclínica por valorar el recuento de células de la leche. No proporciona un resultado numérico, sino más bien una indicación de si el recuento es elevado o bajo, por lo que todo resultado por encima de una reacción vestigial se considera sospechoso. ^(22, 23)

Pasos a seguir para la realización de la Prueba de California para Mastitis:

1. Se desecha la leche del pre ordeño (Figura 4 A).
2. Se ordeñan uno o dos chorros de leche de cada cuarto en cada una de las placas de la paleta (Figura 4 B).
3. Se inclina la paleta de modo que se desecha la mayor parte de esta leche.
4. Se añade a la leche un volumen igual de reactivo (Figura 4 C).
5. Se mezcla el reactivo y se examina en cuanto a la presencia de una reacción de gelificación (Figura 4 D). Antes de continuar con la vaca siguiente se debe enjuagar la placa.



A*. *Despunte*



B**. *Utilización de la paleta*



C



D

Figura 4. Prueba de California para mastitis. ^(22, 23)

Los resultados pueden ser interpretados en cinco clases (Figura 5); 1) resultado negativo en el que la leche y el reactivo siguen siendo acuosos, 2) el recuento de células más elevado en el que la mezcla de la leche y el reactivo casi se solidifica. Esto se determina en relación a la reacción de gelificación (Tabla 6).^(13, 22, 23)

La prueba consiste en el agregado de un detergente a la leche, el alquilauril sulfonato de sodio, causando la liberación del ADN de los leucocitos presentes en la ubre y este se convierte en combinación con agentes proteicos de la leche en una gelatina.^(2, 15, 24)

A mayor presencia de células se libera una mayor concentración de ADN, por lo tanto mayor será la formación de la gelatina, traduciéndose en nuestra lectura e interpretación del resultado como el grado más elevado de inflamación.^(2, 15, 24)

Es decir, permite determinar la respuesta inflamatoria con base en la viscosidad del gel que se forma al mezclar el reactivo (púrpura de bromocresol) con la misma cantidad de leche en una paleta con cuatro pozos independientes permitiendo evaluar cada cuarto independientemente.^(2, 15, 24)

La Prueba de California es un método de diagnóstico que posee una sensibilidad del 97% y una especificidad del 93%. Sus ventajas principales son:

1. Es una técnica muy sensible y se puede utilizar tanto en una muestra de cuartos, como una muestra del tanque enfriador. En una muestra de tanque, los resultados de grado 2 y 3, indican un alto porcentaje de vacas infectadas.
2. El material extraño no interfiere con la prueba (pelo u otro material).
3. La prueba es simple y no requiere de equipo costoso.
4. La paleta es fácil de limpiar después de cada uso.⁽²⁵⁾

La técnica presenta los siguientes inconvenientes:

1. Los resultados pueden ser interpretados de forma variable, entre los individuos que realicen la prueba, por lo que resulta necesario uniformizar el criterio de casos positivos y su categorización en grados.
2. Pueden presentarse falsos positivos en leche de animales con menos de diez días de paridos o en vacas próximas a secarse.
3. La mastitis clínica aguda da resultados negativos, debido a la destrucción de los leucocitos por las toxinas provenientes de los microorganismos presentes.⁽²⁵⁾



Figura 5. Interpretación de los resultados de la Prueba de California. ⁽²⁵⁾

Tabla 6. Interpretación de resultados de la Prueba de California para Mastitis. ^(2, 25)

Escala de CMT	Rango relativo de células somáticas (cs/ml)
Negativo	<200,000
Trazas	150,000-500,000
1	400,000-1,500,000
2	800,000-5,000,000
3	>5,000,000

Tabla 7. La interpretación y registro de resultados se realiza bajo el siguiente criterio. ^(11, 26)

Negativo: 0	El estado de la solución permanece inalterado. La mezcla sigue en estado líquido. El 25% de las células son leucocitos polimorfonucleares
Trazas:	Se forma un precipitado en el piso de la paleta que desaparece pronto. De un a 30% son leucocitos polimorfonucleares.
1 (+):	Hay mayor precipitado pero no se forma gel. De 30 a 40 % son leucocitos PMN.
2 (++):	El precipitado se torna denso y se concentra en el centro. De un 40 a 70% son leucocitos polimorfonucleares
3 (+++):	Se forma un gel muy denso que se adhiere a la paleta. De un 70 al 80% son leucocitos polimorfonucleares.

2. Prueba de Wisconsin para Mastitis (WMT)

La Prueba de Wisconsin para Mastitis (WMT), fue diseñada para el uso en el laboratorio, y es utilizada para estimar el contenido de células somáticas de muestras de leche fresca mezclada o leche de tanques de enfriamiento, así como para muestreo de vacas individuales. Se utiliza una solución similar a la que se emplea con la prueba de California (CMT), pero en contraste con esta última, los resultados se miden cuantitativamente dependiendo de la viscosidad. ^(22, 27)

La técnica consiste en utilizar un tubo graduado en milímetros en donde se depositan 2 ml de leche y una mezcla de 2 ml de reactivo para CMT con agua destilada (1:1) ambas a temperatura ambiente. Enseguida se agita durante 10 segundos, horizontalmente y de izquierda a derecha. Se deja reposar 10 segundos y posteriormente se invierten los tubos durante otros 10 segundos.

Una vez transcurrido el tiempo, se procede a realizar la lectura en el tubo por debajo de la espuma que se forma. Los resultados se relacionan con la escala graduada en mililitros del tubo y su valor de células somáticas, empleando para su interpretación una tabla específica para la prueba (Tabla 8).⁽²⁷⁾

Los rebafios con una puntuación baja entre 3 y 12 están en condiciones buenas a regular, mientras que los rebafios con puntuaciones superiores a 12 requieren de atención inmediata.⁽¹⁴⁾

Tabla 8. Interpretación para prueba de Wisconsin.⁽²⁸⁾

Wisconsin (mm)	Conteo celular somático	Perdida de producción (%)
3	140,000	
4 - 7	165,000 – 260,000	5
8 - 16	300,000 – 675,000	8
17 - 30	730,000 – 1,700,000	9-18
31 - 35	1,800,000 – 2,280,000	19-25

3. Monitoreo del conteo de células somáticas

Con el nombre de células somáticas se designa a las células del propio organismo. Por tanto, las células somáticas son células corporales. Éstas pasan a la leche procedente de la sangre y del tejido glandular. El contenido de células somáticas en la leche nos permite conocer el estado funcional y de salud de la glándula mamaria en periodo lactante; debido a su estrecha relación con la composición de la leche, es un criterio de calidad muy importante.^(22, 29)

La leche de una ubre sana presenta pocas células somáticas. En este caso se trata de células de tejido (células epiteliales) y células inmunes (neutrófilos polimorfonucleares, granulocitos, macrófagos, linfocitos). El porcentaje de los diferentes tipos de células somáticas en la leche de las glándulas mamarias sanas es como sigue: a) macrófagos (60 %); b) linfocitos (25 %); y c) neutrófilos o leucocitos polimorfonucleares (15 %).^(22, 28,29)

De todas las células de la leche de un cuarto infectado, aproximadamente el 99 % serán leucocitos, mientras que el resto 1% serán células secretoras que se originan de los tejidos de la ubre. Juntos esos dos tipos de células constituyen la cuenta de células somáticas (CCS) de la leche que comúnmente es expresada en mililitros (ml).^(22, 28)

El conteo de células somáticas (CCS) es la medición más ampliamente utilizada para supervisar el estado inflamatorio de las glándulas mamarias, y puede ser realizada en la leche de: 1. cuartos individuales; 2. vacas individuales; 3. el hato completo; 4. un grupo de hatos.^(22, 28)

La infección intramamaria es el principal factor causante de cambios en la CCS en la leche. Cuando los microorganismos causantes de mastitis invaden un cuarto de la ubre y empiezan a multiplicarse o cuando el número de estos aumenta significativamente en un cuarto infectado, el organismo de la vaca tiende a reclutar leucocitos para combatir a dichos microorganismos causantes de la mastitis. ^(22, 28)

Las glándulas mamarias que nunca se han infectado normalmente tienen CCS de 20,000 a 50,000/ml. En grandes poblaciones de vacas, 80 % de los animales no infectados tendrán un CCS menor de 200,000/ml y 50% menor de 100,000/ml. Una razón de las cuentas ligeramente elevadas en animales no infectados es que algunos cuartos tuvieron una infección previa de la cual no se han recuperado totalmente. ^(11, 22, 28)

Según Philpot, (2001) datos obtenidos de numerosos estudios, señalan que la mayoría de las vacas con una CCS menor de 200,000/ml probablemente no están infectadas, y que la mayoría de esas vacas con cuentas mayores de 300,000/ml probablemente están infectadas.

Mientras que aquellas con una CCS entre 200,000 y 300,000/ml son difíciles de interpretar. ⁽²⁷⁾

4. Pruebas bacteriológicas

Los cultivos en laboratorio son necesarios para identificar los organismos específicos que se encuentran comprendidos en un caso clínico de mastitis y para distinguir los animales sanos de aquellos que presentan un caso subclínico. La fidelidad de los resultados de laboratorio depende de los cuidados sanitarios que se tengan durante la toma de muestras y su manipulación posterior (Figura 6). ⁽¹¹⁾



Figura 6. Procedimiento de siembra, incubación e identificación. ⁽¹¹⁾

Al extraer muestras se deben descartar dos o tres chorros de leche y se deben asegurar que las tetas estén bien limpias y que se han frotado los extremos de las mismas durante algunos segundos con un algodón húmedo con 70% de alcohol, antes y después de recoger las muestras en un recipiente esterilizado se deben congelar hasta entregarlas al laboratorio. Los procedimientos bacteriológicos son esenciales para la selección de los agentes terapéuticos que tienen especificidad para el microorganismo presente. ⁽¹¹⁾

2.12 PREVENCIÓN DE LA MASTITIS

2.12.1 Control de los patógenos contagiosos ⁽⁵⁾

1. **Prácticas de ordeño higiénico.** Incluye el ordeño de vacas con ubres y pezones limpios y secos; no debe usarse exceso de agua en la limpieza. Los paños y esponjas comunes deben erradicarse y sustituirse por toallas desechables individuales para cada cuarto. Las manos del ordeñador deben mantenerse limpias y secas. Desinfectar las pezoneras entre vacas.
2. **Sellado o desinfección de pezones post-ordeño.** Debe aplicarse inmediatamente después de finalizado el ordeño, preferiblemente por inmersión de los pezones, en productos iodados, hipoclorito de sodio, cloro ácido o clorheximida. Esta medida es uno de los pilares de los programas de control de mastitis.
3. **Terapia de vaca seca.** La mejor opción es aplicar el tratamiento a todos los cuartos y animales, pues se garantiza el tratamiento de todas las infecciones presentes y se previenen las infecciones durante el período seco temprano. La terapia selectiva sólo a las vacas con mastitis clínica o reacciones inflamatorias en su última lactancia o CMT positivo al momento del secado es menos costosa, pero no se atacan todas las infecciones presentes y no se evitan las nuevas infecciones en el período seco temprano. Las infecciones causadas por *S. agalactiae* suelen ser fácilmente eliminadas, así como también las infecciones recientes por *S. aureus*. En cambio, las infecciones crónicas causadas por *S. aureus*, así como las que afectan a más de un cuarto, difícilmente son eliminadas. Es importante aplicar el tratamiento luego de la limpieza y cuidadosa desinfección de los pezones.
4. **Adecuado funcionamiento del equipo de ordeño.** El adecuado funcionamiento del equipo de ordeño evita los escurrimientos, las fluctuaciones de vacío y las pulsaciones irregulares, que pueden inducir lesiones en los pezones que posteriormente se infectan, o permitir remanentes de leche en la ubre.
5. **Descartar animales crónicamente infectados.** Es una buena medida, especialmente cuando se trata de vacas crónicamente infectadas con *S. aureus*. Disminuye la prevalencia de mastitis y, más importante, elimina la principal fuente de infección para las vacas sanas.
6. **Segregación u ordenamiento de los animales.** Ordenar los animales según su estatus infeccioso o inflamatorio, para ordeñar en último lugar los animales infectados, reduce la exposición de los pezones a los patógenos contagiosos.
7. **Vacunación.** No se han desarrollado vacunas contra *Streptococcus agalactiae*, probablemente debido a la eficiencia y economía de los antibióticos actualmente usados para combatir las mastitis causadas por este agente y a su fácil erradicación.

Tampoco existen vacunas contra *Mycoplasma bovis* pero la importancia de este agente se limita a ciertas áreas geográficas. En algunos países existen vacunas comerciales contra *Staphylococcus aureus* pero su baja eficiencia no permite recomendar su uso.

8. Dietas. Los animales deben recibir dietas que suplan las necesidades de Vitamina E, Selenio y Cobre; los aspectos dietéticos son particularmente importantes para las vacas en descanso y para las que van a su primer parto.

2.12.2 Control de los patógenos ambientales ⁽⁵⁾

1. Proveer condiciones de higiene ambiental que permitan a las vacas permanecer limpias entre ordeños. Todas las medidas deben ir dirigidas a prevenir la contaminación de la punta del pezón, tales como áreas de descanso limpias y periodos pre-ordeño cortos. La exposición a patógenos ambientales es mayor en vacas confinadas. En los alojamientos es importante contar con buenos drenajes, remoción rutinaria del estiércol y ventilación adecuada. Es recomendable estimular la alimentación y el consumo de agua después del ordeño para evitar que las vacas se echen antes de que cierre el esfínter del pezón. A los bovinos en pastoreo no se les debe permitir desarrollar revolcaderos en áreas de sombra.
2. Prácticas de ordeño higiénico. Además de lo que se indicó para los patógenos contagiosos, el presellado o predesinfección de los pezones con una solución desinfectante es un excelente método para evitar el uso excesivo de agua, que sirve como vehículo para que los patógenos ganen acceso a la punta del pezón. El presellado de los pezones disminuye las mastitis por patógenos ambientales y mejora la calidad bacteriológica de la leche. El sellado posterior al ordeño no previene las mastitis causadas por coliformes y tiene poco impacto sobre las causadas por estreptococos ambientales.
3. Terapia de vaca seca. Reduce sustancialmente el número de nuevas infecciones debidas a estreptococos ambientales durante las primeras dos semanas del período seco, pero no reduce las que ocurren durante las dos semanas previas al parto. Tampoco disminuye la tasa de infecciones debidas a coliformes durante el período de seca.
4. Buen funcionamiento del equipo de ordeño. Se deben evitar los escurrimientos, las fluctuaciones de vacío y optimizar las pulsaciones.
5. Vacunación. Se han desarrollado diferentes vacunas contra coliformes que son efectivas contra la mayoría de las bacterias GRAM negativas que causan mastitis. Sin embargo, es importante destacar que la tasa de nuevas infecciones no se reduce, pero si la severidad de los signos clínicos. Se justifica su uso en fincas en las que los coliformes causan un elevado número de casos clínicos.

Generalmente se aplican las inmunizaciones al momento del secado y a las cuatro semanas previas al parto.

6. Dietas. En los animales con deficiencias de vitamina E y selenio la tasa de infecciones es mayor y suelen ser más severas. El aporte de Vitamina E debe ser de 1000 UI/vaca/día durante el período de seca y 400-600UI/vaca/día, durante la lactancia; el aporte de selenio debe ser de 6-7 mg/vaca/día tanto durante el período seco como durante la lactancia.
7. Terapia durante la lactancia. En general, la terapia con antibióticos eliminará sólo el 50% de las infecciones debidas a estreptococos ambientales y enterococos, y no tiene mayor influencia sobre las infecciones causadas por coliformes, Pseudomonas, Prototheca, Levaduras, Hongos, Arcanobacterium pyogenes y otros agentes ambientales.

2.12.3 Control de los patógenos oportunistas de la piel ⁽⁵⁾

El control de estos agentes no es fácil, debido a su amplia difusión en las vacas y su ambiente. El sellado o desinfección de pezones post-ordeño tiene poco efecto sobre la prevalencia de las infecciones debidas a estos agentes y puede alterar el patrón de las especies presentes en el rebaño y la Terapia de vaca seca es efectiva para eliminar las infecciones presentes al momento del secado. No evita las infecciones que pueden ocurrir al final del período de seca.

2.13 MEDICINA TRADICIONAL

En México la herbolaria ha sido y sigue siendo un recurso para buscar la cura a las enfermedades más comunes. Nuestro país ha sido geográficamente privilegiado, ya que posee una de las floras más ricas en el planeta. Y su herbolaria se ha enriquecido por la observación y paciencia de los pueblos que durante siglos, han buscado su poder en la curación. ⁽³⁰⁾

En los últimos años se ha expandido el uso de la medicina alternativa o tradicional (MT).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) la define como los conocimientos, destrezas y prácticas basadas en teorías, creencias y experiencias de diferentes culturas -con o sin explicación racional- utilizados para el mantenimiento de la salud, la prevención, el diagnóstico y la mejora de la salud física y mental.

Existe escasa información confiable acerca del uso de MT en la mayoría de los países del mundo. Una encuesta nacional de EEUU determinó una prevalencia de uso del 34%. En Europa, oscila desde un 23% (Dinamarca) hasta un 46-49% (Alemania y Francia respectivamente). Respecto de América Latina, en Chile el 71% de la población acepta la MAT y en Colombia el 40%.

El uso de plantas medicinales ha tenido un gran auge en los últimos años y múltiples estudios científicos buscan corroborar su efectividad, mostrando algunas cierta eficacia clínica para varias enfermedades o condiciones.

Si bien muchos pacientes que se automedican con plantas asumen que estos productos son seguros porque son naturales, algunos causan efectos adversos o tienen un potencial de interacción con otros medicamentos. ^(31, 32)

El Biólogo M.C. Mauricio González Ferrara refiere que en la herbolaria internacional se habla de tres países en cuanto a cultura herbolaria se refiere: México, India y China. La investigación de plantas medicinales consta de diferentes disciplinas: la etnomedicina, la farmacología, la fitoquímica, la toxicología, la investigación clínica, la biotecnología y el diseño de medicamentos. Este proceso de investigación no puede ser desarrollado por un solo grupo, en realidad es una larga cadena en la que debe intervenir mucha gente, diferentes instituciones, dependencias de gobierno y particularmente la industria.

2.14 *Caléndula officinalis*

Nombre científico: *Caléndula officinalis* (Carl von Linneo).

Familia: Asteraceae (Compuestas)

Nombre común: *Caléndula*, maravilla, marigold, alta reyna, mercadela.



Figura 7. Flor de *Caléndula officinalis*

DESCRIPCION

Es una planta anual originaria del sur de Europa y en México es cultivada como planta de ornato, se encuentra presente en clima semiseco y templado desde los 20 hasta 2000 m sobre el nivel del mar. ^(33, 34)

Planta herbácea de 30-50 cm, provista de tallos robustos vellosos y angulosos con hojas sentadas oblongo-espátuladas. Capítulos terminales, solitarios, con flores tubulosas amarillo-azafranadas, excepto las periféricas que son liguladas. Fruto en aquenios espinosos.

Se usa como planta ornamental y desde hace siglos se viene empleando como planta medicinal debido a sus cualidades terapéuticas. Desprende un olor desagradable y tiene un gusto amargo. ^(34, 35, 36, 37, 38)

PROPIEDADES E INDICACIONES

La parte más empleada de la planta es la flor ó los pétalos, que tienen entre los componentes que se han aislado los siguientes: flavonoides, carotenoides (β caroteno), un principio amargo (calendina), saponinas, mucilagos, pequeñas cantidades de ácido salicílico, vitaminas y aceites esenciales. ^(35, 36)

Los aceites esenciales son líquidos aceitosos obtenidos a partir de diferentes partes de las plantas como flores, yemas, semillas, hojas, ramas, corteza, hierbas, madera, frutos y raíces.

De acuerdo a sus características químicas son mezclas complejas de ésteres, aldehídos cetonas y terpenos. Además son compuestos olorosos, muy solubles en alcohol y poco solubles en agua.

Para la extracción de estos compuestos se pueden utilizar distintos disolventes como el etanol, y cloruro de etileno, originándose compuestos con alta actividad antimicrobiana. ⁽³⁹⁾

Sus propiedades más destacadas son:

- ✓ **Antiséptico:** con marcada actividad ante a estafilococos (aceite esencial).
- ✓ **Parasitocida:** activo frente a Trichomonas (mono y sesquiterpenos oxigenados).
- ✓ **Cicatrizante:** (mucílago, flavonoides, triterpenos, carotenos). Potencializa la regeneración de la piel dañada, estimulando la síntesis de glicoproteínas, nucleoproteínas y colágeno durante el periodo de regeneración tisular.
- ✓ **Emenagogo:** (flavonoides, fitosteroles, aceite esencial). Regulador del periodo menstrual y calmante de los dolores propios.
- ✓ **Colerético:** (aceite esencial, flavonoides). Aumenta la producción de bilis en el hígado. Resulta pues indicada en casos de congestión o insuficiencia hepática.
- ✓ **Anti-ulceroso:** tiene la capacidad de cicatrizar las úlceras de estomago y duodeno. También resulta eficaz en gastritis, gastroenteritis y vómitos.
- ✓ **Anti-edematoso-antiinflamatorio:** debido a la inhibición de la lipoxigenasa (flavonoides) y a sus antioxidantes y captadores de radicales libres (flavonoides y triterpenos).

Tabla 9. Forma de preparación y usos de *Caléndula officinalis*.⁽⁴⁰⁾

Forma de preparación	Usos
Infusión	Emenagogo y reguladora menstrual, colerético y anti ulcerosa. Gastroenteritis y vómitos
Pomada	Quemaduras y eccemas.
Aceite	Contra verrugas víricas (vulgares) de la piel. Suavizante e hidratante de la piel.
Loción de jugo	Quemaduras, furúnculos y eccemas.
Cataplasma	Quemaduras, furúnculos y eccemas. Acción antirreumática.
Compresas	Quemaduras, furúnculos, eccemas, antirreumática y callicida.

2.15 QUITOSAN

El Quitosán (Qn) es un biopolímero derivado de la Quitina, los dos son compuestos cristalinos cuya estructura está formada de polisacáridos que ha sido bien estudiada por medio de difracción de Rayos-X, Espectrofotometría de Infrarrojo, Espectroscopia vibracional. ⁽⁴¹⁾

La Quitina y el Quitosán están químicamente emparentados; la quitina; es una poli (β -Nacetil- glucosamina) (Figura 8), la cual, mediante una reacción de desacetilación que elimine al menos un 50% de sus grupos acetilo, se convierte en Quitosán (poli (β -N-acetil-glucosamina-co- β -glucosamina)). Cuando el grado de desacetilación alcanza el 100 % el polímero se conoce como quitano. ⁽⁴²⁾

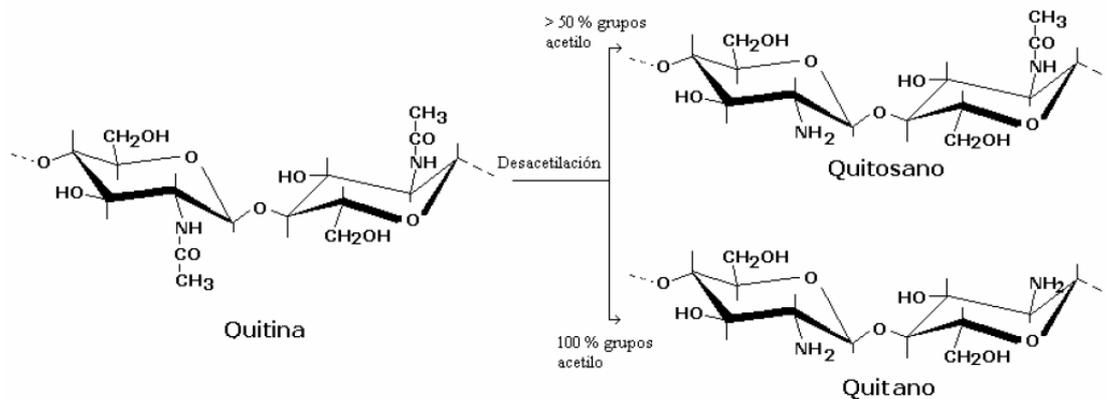


Figura 8. Relación estructural entre la Quitina, el Quitosán y el Quitano. ⁽⁴²⁾

La quitina (del griego *tunic*, envoltura) se encuentra distribuida ampliamente en la naturaleza y, después de la celulosa (materia base del papel), es el segundo polisacárido en abundancia. Sus fuentes principales son el exoesqueleto (caparazón) de muchos crustáceos, alas de insectos (escarabajos, cucarachas), paredes celulares de hongos, algas, etc. Sin embargo, la producción industrial de este biomaterial prácticamente se basa en el tratamiento de las conchas de diversos tipos de crustáceos (camarones, langostas, cangrejos y krill) debido a la facilidad de encontrar estos materiales como desecho de las plantas procesadoras de estas especies. ^(41, 42, 43)

El Quitosán se puede encontrar de forma natural en las paredes celulares de algunas plantas y hongos (por ejemplo en el *Mucor rouxii* llega a representar hasta un tercio de su peso). Sin embargo, la fuente más importante de Quitosán, a nivel industrial, lo constituye la quitina, la cual, mediante un proceso de desacetilación química o enzimática, ha permitido producirlo a gran escala.

El Quitosán es muy estudiado debido a sus potenciales aplicaciones en diferentes campos de la ciencia y tecnología. Este interés proviene de sus propiedades: biocompatible, biodegradable y buen adsorbente. A esto se le suma su actividad antimicrobiana por la presencia de grupos amino que se encuentran en forma catiónica. Sus propiedades dependen directamente del peso molecular y de su grado de desacetilación.

A continuación se mencionaran algunas de las principales aplicaciones (Figura 9) que tienen actualmente estos materiales en las áreas en diferentes áreas:

a) Agricultura: Se utiliza como:

- Recubrimiento de semillas con películas de Quitosán para su conservación durante el almacenamiento.
- Sistemas liberadores de fertilizantes.
- Agente bactericida y fungicida para la protección de plántulas (inicio de las plantaciones).

b) Medicina: hoy en día se sabe que la Quitina y el Quitosán han sido usados desde la antigüedad para acelerar el sanamiento de heridas. ⁽⁴¹⁾ Por ejemplo, los antepasados de los coreanos usaban la Quitina en el tratamiento de abrasiones (obteniéndola a partir de las plumas del calamar) y los antepasados de los mexicanos aplicaban Quitosán para la aceleración de la cicatrización de heridas (obteniéndolo de las paredes celulares de algunos hongos).

En la actualidad, entre los usos médicos más sencillos de estos materiales podemos mencionar:

- Producción de suturas quirúrgicas a partir de Quitina.
- Producción de gasas y vendajes tratados con Quitosán.
- Cremas bactericidas para el tratamiento de quemaduras.

c) Tratamiento de aguas: es una de las áreas más importantes debido a que el Quitosán y la quitina son sustancias “ambientalmente amigables”. Entre los principales usos en este campo tenemos:

- Coagulante primario para aguas residuales de alta turbidez y alta alcalinidad.
- Floculante para la remoción de partículas coloidales sólidas y aceites de pescado.
- Captura de metales pesados y pesticidas en soluciones acuosas. Algunos copolímeros de injerto del Quitosán muestran alta efectividad para remover metales pesados, especialmente los derivados de ácidos alquenodiólicos.

d) Cosméticos: Se mencionan tres de las más conocidas:

- Fabricación de cápsulas para adelgazar, denominadas “atrapagrasas”. Quizás sea la aplicación más extensamente aprovechada del Quitosán (Outfat es solo una de las marcas más conocidas).
 - Aditivo bactericida en jabones, champúes, cremas de afeitar, cremas para la piel, pasta dental, etc.
 - Agente hidratante para la piel, debido a que sus geles pueden suministrar agua y evitar la resequedad.
- Además, el Quitosán forma una película que ayuda a dosificar otros principios activos.

e) *Biosensores*: son numerosas las aplicaciones del Quitosán en este campo, especialmente como soporte para la inmovilización de enzimas sensibles a un sustrato específico. Algunos ejemplos son:

- Sensor para glucosa en sangre humana, basado en la inmovilización de la enzima glucosa oxidasa sobre Quitosán, usando adicionalmente Azul de Prusia.

Sensor para la detección de fenoles en aguas de desecho en plantas industriales, basado en la inmovilización de la enzima tirosinasa.

- Sensores basados en la inmovilización de nanopartículas espacialmente ordenadas.

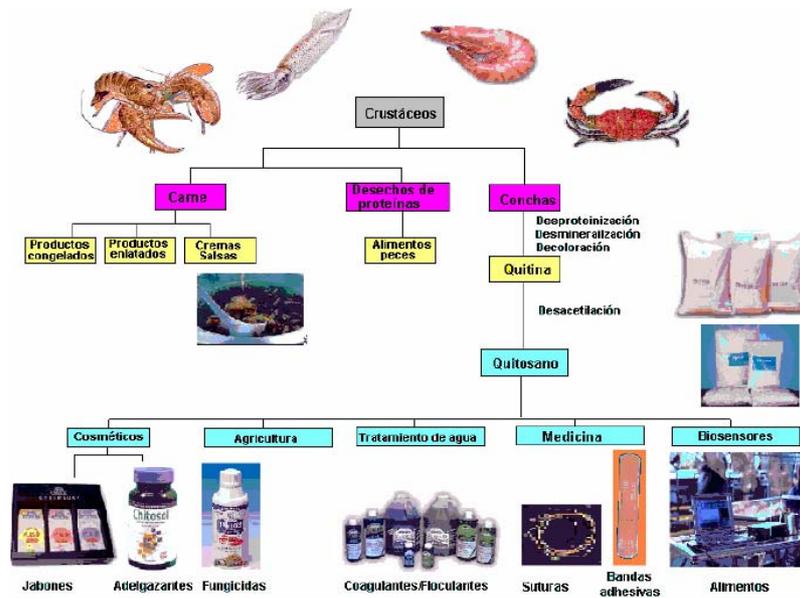


Figura 9. Esquema general para el aprovechamiento de crustáceos en el desarrollo de aplicaciones a partir de sus subproductos Quitina y Quitosán. (42)

El uso del Quitosán es el limitado por que es insoluble en agua, tiene alta viscosidad y tendencia a coagular con proteínas a alto pH, algunos investigadores preparan derivados modificados químicamente que incrementa la solubilidad en agua. Los mecanismos de acción por los cuales el Quitosán ejerce una actividad bactericida no han sido dilucidados completamente; sin embargo, hay algunos mecanismos propuestos para explicar acciones específicas, como por ejemplo: (44)

- La interacción electrostática entre el Quitosán cargado positivamente (polielectrolito catiónico) y algunas bacterias con membranas celulares cargadas negativamente (Gram negativas como la *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus typhimurium*, etc.) altera significativamente las propiedades de barrera de la membrana exterior del microorganismo.

Algunos autores han propuesto que la formación del complejo polielectrolito bloquea físicamente la membrana celular externa del microorganismo, impidiendo el flujo normal de nutrientes/desechos, provocando la muerte bacteriana.

- La interacción electrostática entre los grupos $^+NH_3$ del polication y los grupos fosforilos de los fosfolípidos presentes en la membrana celular de bacterias Gram negativas causa daños en ésta, provocando la salida de material intracelular. En este sentido se han realizado estudios espectroscópicos de la salida de dicho material, el cual absorbe en la región ultravioleta (270 nm). Para algunas bacterias Gram positivas (como *S. aureus* y *Bacillus cereus*) que carecen de cargas negativas en la membrana celular, el Quitosán ha mostrado actividad incluso mayor, en algunos casos, que para bacterias Gram negativas (Figura 10). En el caso de *S. aureus* recientemente se ha planteado la posibilidad de que la membrana celular de estos microorganismos tenga poros lo suficientemente grandes como para que el Quitosán logre entrar al interior de las células y alterar funciones vitales de éstas. Su interacción con el ADN, por ejemplo, podría inhibir la replicación del ARNm y la síntesis de proteínas y su efecto quelante podría disminuir la concentración de algunos metales necesarios en procesos enzimáticos. Sin embargo, otros autores creen que la longitud de persistencia del Quitosán cargado positivamente es demasiado grande para poder pasar al interior de las células.
- La interacción selectiva del Quitosán con trazas de metales pudiera inhibir la producción de toxinas y el crecimiento microbiano. En este sentido se conoce bien que el Quitosán puede ejercer una acción quelante bien específica.

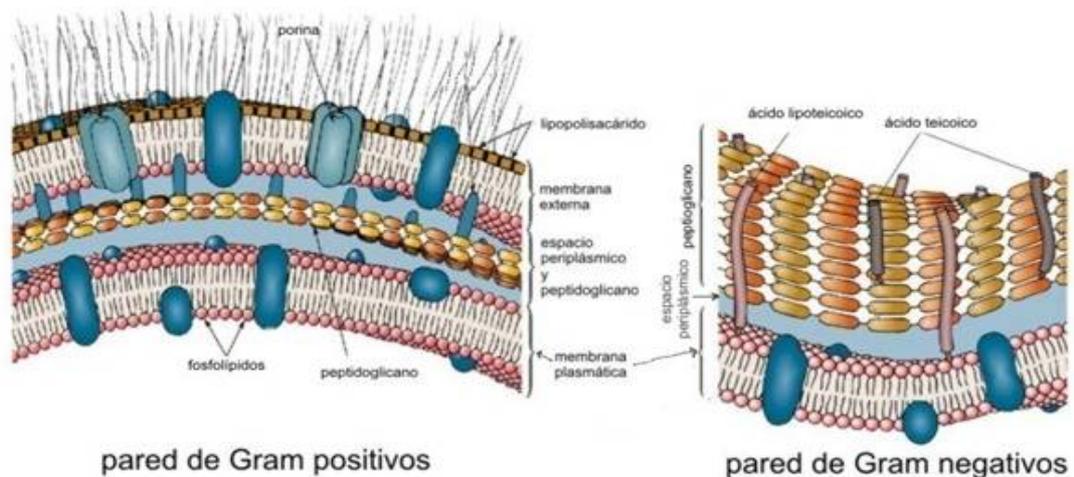


Figura 10. Pared de bacterias Gram + y Gram -. (45)

El sitio de acción de los biocidas catiónicos es la pared de la membrana celular de la bacteria, y el de los biocidas de bajo peso molecular es la membrana citoplasmática de la bacteria y el modo de acción es el siguiente: ^(46, 47)

1. Adsorción a la superficie de la célula bacteriana
2. Difusión a través de la pared celular
3. Unión a la membrana citoplasmática
4. Ruptura de la membrana citoplasmática
5. Liberación de los constituyentes tales como DNA, RNA e iones K
6. Muerte de la célula.

La densidad de carga con forma de una espiral sencilla de poli electrolitos que incrementa con el peso molecular, y hay potenciación de la adsorción de poli cationes en la superficie celular cargada negativamente. Lo que favorece a la unión del poli catión a la membrana citoplasmática. Se tiene antecedentes de que es más activo contra *Staphylococcus aureus* que contra *Escherichia coli*, se presume que esto es debido por la estructura de las paredes celulares Gram + y Gram -. Las bacterias Gram + tienen una pared celular con estructura simple. Fuera de la membrana citoplasmática hay solo una capa rígida, constituida de peptidoglicano.

Tabla 10. Actividad antimicrobiana de Quitosán. ^(48, 49)

Bacteria	CMI a (ppm)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	100
<i>Bacillus cereus</i>	1000
<i>Corinebacterium michiganence</i>	10
<i>Erwinia sp</i>	500
<i>Erwinia carotovora sub sp</i>	200
<i>Escherichia coli</i>	20
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	700
<i>Micrococcus luteus</i>	20
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	500
<i>Staphylococcus aureus</i>	20
<i>Xanthomonas campestris</i>	500

Las bacterias Gram - tienen pared celular más complicada fuera de la capa de peptidoglicano se encuentra la membrana externa con una estructura similar a la membrana citoplasmática. La membrana externa es una barrera potencial contra moléculas extrañas. La liberación de los constituyentes intracelulares es probablemente una de las claves en la inactivación celular. ⁽¹⁾

2.16 ENSAYO COLORIMÉTRICO DE MOSMANN

Mosmann en 1983 desarrolla este método, siendo modificado por Francois Denizot y Rita Lang. El MTT, también conocido como Azul de Tiazol, es una sal de tetrazolio soluble en agua. En solución tiene una coloración amarilla. ⁽⁵⁰⁾ La prueba colorimétrica de MTT ha sido previamente descrita para medir citotoxicidad y proliferación celular ⁽⁵¹⁾ así como para un índice de medición de activación celular ⁽⁵²⁾ ambos cuantitativa y cualitativamente.

La prueba de MTT se basa en la capacidad de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa de las células viables para transformar la sal de MTT tetrazolio (de color amarillo), en un producto de color azul (MTT formazona). La intensidad del color azul será proporcional al número de células vivas presentes.⁽⁵²⁾ La activación celular en respuesta a un mitógeno exógeno a diferentes concentraciones se lee después de 72 hrs. de cultivo por la formación de la formazona. La absorbancia del colorante se mide a una longitud de onda de 590 nm o a la longitud más cercana. ⁽⁵⁰⁾

2.17 MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION

El primer microscopio electrónico de transmisión fue desarrollado entre 1931 y 1933 por Ernst Ruska y sus colaboradores. La óptica básica de ese primer microscopio electrónico se mantiene hasta nuestros días; los cambios en los microscopios modernos consisten en adicionar más lentes para incrementar el ámbito de aumentos y darle mayor versatilidad. El primer microscopio electrónico de transmisión comercial lo construyó Siemens en 1939. ⁽⁵³⁾

El microscopio electrónico de transmisión (Figura 11) es un equipo complejo que funciona al alto vacío, en donde la imagen está dada por los electrones emitidos a través de la muestra, por ello se requiere que sea de un grosor menor a 100nm para obtener una buena resolución. Sin embargo debido a la interacción de los electrones de alta energía, la muestra requiere estar protegida con metales pesados para que soporten dicha interacción; las muestras que requieran ser observadas deben cumplir con las siguientes características: no puede ser observado al microscopio ningún material vivo o que contenga agua, porque el sistema funciona al alto vacío; además se debe proteger contra el haz de electrones. Las muestras deben tener un grosor adecuado para permitir que los electrones sean transmitidos y así poder tener una imagen con buena resolución. ⁽⁵⁴⁾

Componentes del MET ⁽⁵⁵⁾

➤ Cañón electrónico

El tipo más usado de cañón electrónico consiste de un filamento de alambre de tungsteno (10) doblado en forma de V. El electrodo de control se denomina cilindro de Wehnelt, y tiene una apertura circular de 1 a 3 mm de diámetro centrada en el ápice del filamento. La superficie cóncava hace las funciones de ánodo, y utilizando una superficie convexa la imagen de la fuente electrónica puede reducirse en tamaño respecto al electrodo cóncavo. La intensidad total del haz de cátodo a ánodo puede ser de 10 a 400 microamperios, pero solamente una pequeña fracción de éste llega hasta la muestra.

➤ Condensadores

Los dos condensadores son capaces de dar una amplia gama de intensidad ajustando el cañón electrónico. Esto reduce el área iluminada en la muestra. Sin embargo, otras partes de la muestra también sufren los efectos del haz electrónico. El primer condensador reduce la imagen de la fuente mientras que el segundo condensador obtiene la adecuada intensidad de iluminación.

➤ **Plataforma para la colocación de la muestra**

La plataforma para colocar la muestra está situada en frente del objetivo. Se introduce la muestra en la columna del microscopio a través de una abertura.

➤ **Objetivo**

El objetivo es la lente más importante en el microscopio electrónico. La distancia focal de esta lente está comprendida entre 1 y 5 milímetros, siendo 1.1 mm la más frecuente. Cuanto menor es la distancia focal, mayor es la resolución. Debido a que el haz de imagen tiene la máxima apertura angular en el primer objetivo, esta lente controla la calidad de la imagen producida. Se puede corregir la aberración esférica usando un "stigmator", que es un dispositivo que permite introducir metal para compensar la in-homogeneidad inherente de la lente, y obtener elevada resolución. Otro accesorio importante, permite regular la apertura del objetivo, la cual limita la dispersión de los electrones, evitando así la degradación de la imagen. Esta apertura mejora el contraste siendo 20 y 40 micrómetros (μm) los más frecuentes.

➤ **Lente intermedia**

La lente intermedia puede aumentar o disminuir la imagen. Se puede conseguir esto, aumentando o disminuyendo la potencia de la corriente a esta lente.

➤ **Lente de proyección**

La lente de proyección corresponde al ocular del microscopio óptico. Su función es la de proyectar la imagen real sobre la pantalla fluorescente, y permite una amplia gama de aumentos. Se puede variar la ampliación de 100 X hasta 300.000 X usando lentes intermedias y de proyección.

➤ **Cámara de observación**

La cámara de observación y la pantalla fluorescente están situadas en el fondo de la columna. La imagen se enfoca sobre un punto marcado y el enfoque fino se consigue con unos binoculares de 6 y 20 X. El diámetro del punto de enfoque es de 100 μm , por lo tanto la imagen debe ser mayor que este diámetro para ser resuelta. La cámara de observación está protegida por un vidrio grueso de plomo para evitar la emisión de rayos X.

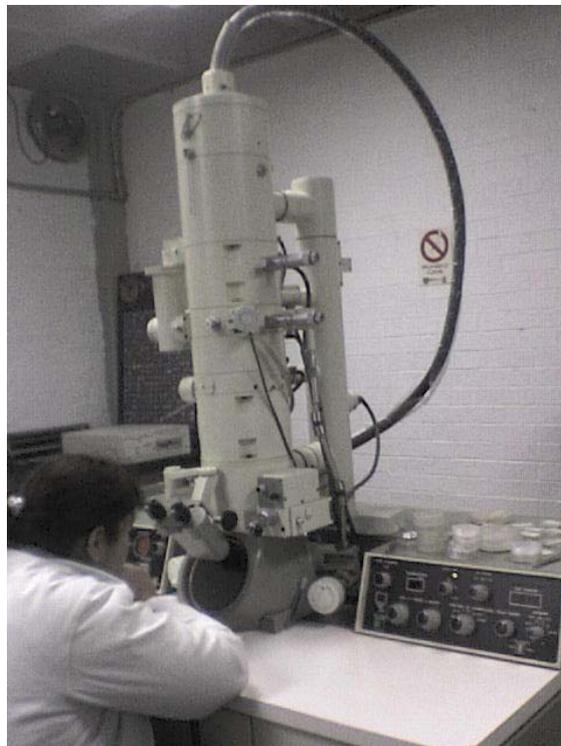
➤ **Cámara fotográfica**

La cámara fotográfica está situada debajo de la pantalla fluorescente. La pantalla fluorescente está sujeta por un lado, y al quitar el paso del haz electrónico la imagen se centra sobre la película fotográfica. Se pueden usar varios tipos de películas y placas de vidrio.

Ventajas y Desventajas: ⁽⁵⁶⁾

- ✧ Los elevados costos de los equipos y la debida adecuación de una infraestructura para el buen funcionamiento, hacen que esta técnica sea para investigadores privilegiados. Sin embargo, es común contratar estos servicios por horas o por fotografías requeridas.
- ✧ Los costos de reactivos también dan un factor decisivo para la elección de esta técnica. Aun cuando este proceso de investigación sea costoso, proporciona resultados muy precisos de amplia resolución y magnificación.
- ✧ La técnica de preparación de las muestras cumple con protocolos establecidos, pero son vulnerables y variados al tipo de investigación que se realice, contando más con la experiencia del investigador.
- ✧ La complejidad de los equipos, lo hacen susceptibles a la descalibración. Nuevamente encontrar las condiciones óptimas requiere de un proceso tedioso y prolongado.
- ✧ La manipulación de reactivos se torna peligroso por la elevada condición toxica de los mismos.
- ✧ Las imágenes obtenidas son monocromáticas y planas siendo necesario, en algunos casos, un tratamiento posterior mediante análisis de imágenes con un software especializado.

Figura 11. Microscopio Electrónico de transmisión de la FES C.



2.18 JUSTIFICACION

La producción de leche con vacas de buena calidad, bien alimentadas y sanas, proporcionan bienestar económico y empleo para la familia. La leche, además de ser un alimento de gran calidad, indispensable para el buen desarrollo de los niños, se puede transformar en otros productos alimenticios. ⁽⁵⁷⁾

La mastitis bovina es una enfermedad de distribución mundial y ha sido catalogada como la más costosa de todas las enfermedades que afectan al ganado lechero. Las pérdidas mundiales, anuales debido a la mastitis, se han estimado en 35 billones de dólares americanos. En Estados Unidos se ha estimado que los productores de leche pierden 2 billones de dólares anuales, en México esta enfermedad arroja pérdidas económicas de aproximadamente \$2'500,000.00 pesos, pero esto representa sólo del 20- 30% de las mastitis clínicas, la otra parte 70-80% lo representan las mastitis subclínicas. ^(58, 59)

El tremendo impacto económico de la mastitis se deriva de la reducción en la producción de leche, el descarte de la leche no comerciable, los costos de los reemplazos, costo de servicios veterinarios y tratamientos, labor extra, depreciación en los animales. Adicionalmente, la mastitis causa alteraciones en la composición láctea que tienen un impacto negativo en el rendimiento de la leche y en la calidad y vida útil de los productos derivados. ^(5, 57)

2.19 HIPOTESIS

Si el extracto de *Caléndula officinalis* inhibe cepas aisladas de casos de mastitis, y por otro lado Quitosán tiene propiedades antimicrobianas; entonces, la mezcla se podrá proponer como un sellador de tetas para ganado bovino.

3. OBJETIVOS

3.1 GENERAL

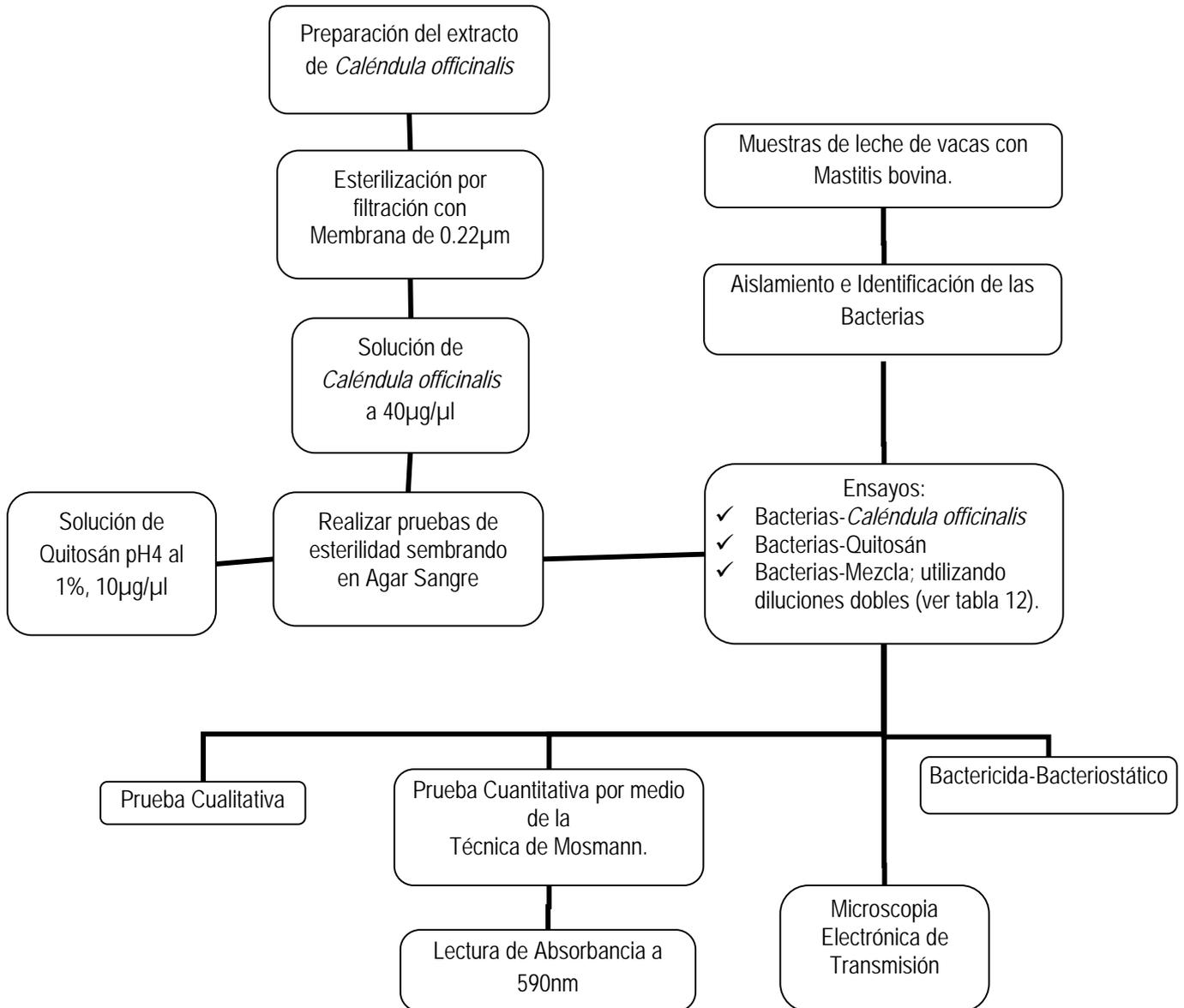
- ✓ Determinar el efecto inhibitorio de *Caléndula officinalis* y Quitosán solos y combinados, en bacterias aisladas de casos de mastitis bovina.

3.2 PARTICULARES

- ✓ Aislar e identificar bacterias a partir de leche de vacas con mastitis
- ✓ Ensayos de *Caléndula officinalis* y Quitosán solos con las bacterias aisladas e identificadas.
- ✓ Elaboración de una mezcla de Quitosán y *Caléndula officinalis* para ensayarlos "in vitro" (placas y tubos) con las bacterias aisladas e identificadas.
- ✓ Determinar la CMI de *Caléndula officinalis*, Quitosán y la mezcla con las bacterias aisladas.
- ✓ Evidenciar los resultados de los ensayos por la técnica de MTT.
- ✓ Observar el daño producido a las bacterias sensibles por medio de MET.

4. MATERIAL Y METODOS

4. 1 En el siguiente diagrama de flujo se expresa la metodología general.



4.2 OBTENCION DEL EXTRACTO DE *Caléndula officinalis*

Se pesaron 15gr de pétalos deshidratados y se colocaron en un frasco ámbar con 1Lt de etanol al 70 %, se mantuvo en agitación durante 3 días protegido de la luz. Se retiró el material insoluble por filtración empleando papel filtro del nº 3 Whatman®. El extracto se esterilizo por filtración con membranas de 0.22µm. Se colocó en un horno a 56 °C hasta sequedad. Se obtuvo material sólido, se peso y almaceno en un vial ámbar para su posterior utilización, se peso 1gr y se disolvió en 1 ml de DMSO y se aforó a 25 ml de SSF estéril, para una concentración de 40 mg/ml (40µg/µl).

4.3 Quitosán A pH 4.

El Quitosán de pH 4 al 1 % de concentración (10 µg/µl), fue proporcionado por el laboratorio de Biotecnología en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1 en el Área de Posgrado.

4.4 OBTENCIÓN DE CEPAS BACTERIANAS

Las cepas bacterianas fueron aisladas de 10 muestras de vacas lecheras con diagnostico clínico de mastitis, en la cuenca lechera de Tizayuca, Hidalgo, ubicada en el km. 57 de la carretera federal No. 85 México-Pachuca.

4.5 IDENTIFICACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS.

Cada muestra se sembró en Agar sangre, SM y Mc Conkey, observando las características del medio y de las colonias existentes se procedió a la resiembra de cada cepa. Posteriormente se realizaron las pruebas bioquímicas primarias y secundarias para determinar el género y especie, encontrando así su identificación.

Una vez logrado lo anterior se seleccionaron las cepas de interés de cada muestra y se sembraron en agar BHI en tubo para su conservación, debidamente rotuladas.

4.6 ENSAYO BACTERIA- *Caléndula* y/o Quitosán

4.6.1 PRUEBA CUALITATIVA

En este método se colocaron concentraciones decrecientes del agente antimicrobiano (*Caléndula officinalis*, Quitosán o la Mezcla), por medio de diluciones dobles (concentrado, 1:2 - 1:256); en 3 juegos de 12 tubos estériles con tapa rosca (para el caso del Quitosán se agrega *1 tubo para el control pH esto es para saber si el pH afecta en el resultado), para cada una de las bacterias aisladas y se rotulan, (Tabla 11 y 12).

Tabla 11. Concentraciones utilizadas en el ensayo.

Dilución	Caléndula officinalis (µg/µl)	Quitosán (µg/µl)	Caléndula/Quitosán (µg/µl)
Concentrado	40	10	40/10
1:2	20	5	20/5
1:4	10	2.5	10/2.5
1:8	5	1.25	5/1.25
1:16	2.5	0.625	2.5/0.625
1:32	1.25	0.313	1.25/0.313
1:64	0.625	0.156	0.625/0.156
1:128	0.313	0.078	0.313/0.078
1:256	0.156	0.039	0.156/0.039

Nota: Se debe tener en cuenta que para el ensayo se utilizaron 100µl de *Caléndula officinalis* y/o Quitosán excepto en la mezcla, en la que se utilizo 50µl de cada uno.

Tabla 12 Rotulo y contenido de tubos para las diluciones.

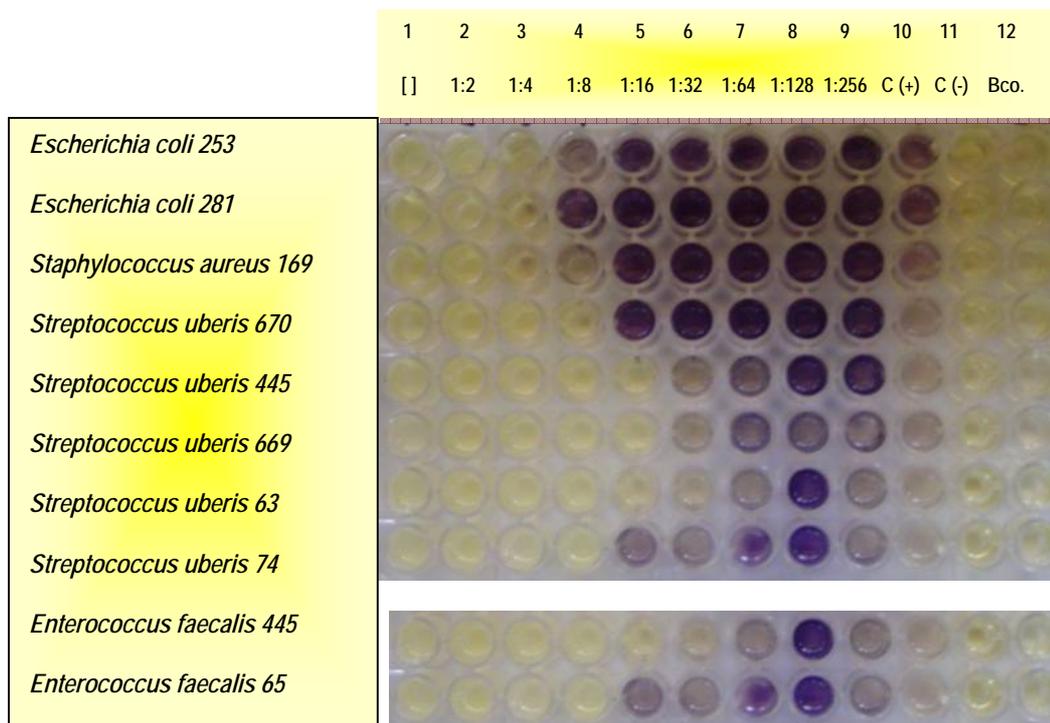
Tubo	Nombre	SSF (ml)	Caléndula y/o Quitosán (ml)	Dilución (ml)	Bacteria Estandarizada (ml)	BHI doble concentración (ml)	Agua Estéril pH 4 (ml)
1	Concentrado	--	1		1	--	--
2	1:2	1	1		1	--	--
3	1:4	1	--	1 tubo 2	1	--	--
4	1:8	1	--	1 tubo 3	1	--	--
5	1:16	1	--	1 tubo 4	1	--	--
6	1:32	1	--	1 tubo 5	1	--	--
7	1:64	1	--	1 tubo 6	1	--	--
8	1:128	1	--	1 tubo 7	1	--	--
9	1:256	1	--	1 tubo 8	1	--	--
10	C (+)	1	--		1	--	--
11	C (-)	1	--		--	1	--
12	Blanco	--	1		--	1	--
*13	C (pH)	--	--		1	--	1

Nota: Se rotula con el nombre del compuesto que se esté utilizando ya sea *Caléndula officinalis*, Quitosán o la Mezcla. Cada tubo debe contener solo 2ml en total.

El tubo 10 no recibe agente antimicrobiano y sirve de control de crecimiento, solo contiene 1ml de la bacteria estandarizada mas 1 ml de SSF estéril; el 11 es el control negativo el cual lleva 1ml de caldo BHI a doble concentración mas 1ml de SSF estéril y por ultimo el 12 es el blanco el cual contiene 1ml de caldo BHI a doble concentración y 1ml de extracto de *Caléndula y/o* Quitosán. Un día antes al ensayo se siembra la bacteria en agar BHI y se incuba por 24hrs para tener bacterias viables. En el ensayo se toma un inóculo y se ajusta al estándar de turbidez (0.5 de Mac Farland) en tubos con caldo BHI a doble concentración y se añade 1ml a cada tubo que contiene 1ml del agente antimicrobiano para después incubar 24hrs a 37 °C.

4.6.2 PRUEBA CUANTITATIVA DE MOSMANN

De los tubos anteriores, se toman 100µl y se depositan en los pozos de una microplaca estéril, añadiéndoles 5µl del reactivo MTT (para minimizar el consumo de este ya que es extremadamente caro), se incubo la placa tres horas a 37 °C, se leyó visualmente y espectrofotometricamente a una longitud de onda de 590nm. Con los resultados del ensayo se determina la CMI, que se lee como la concentración más baja del agente antimicrobiano que inhibió el crecimiento visible del m.o. (Figura 12).



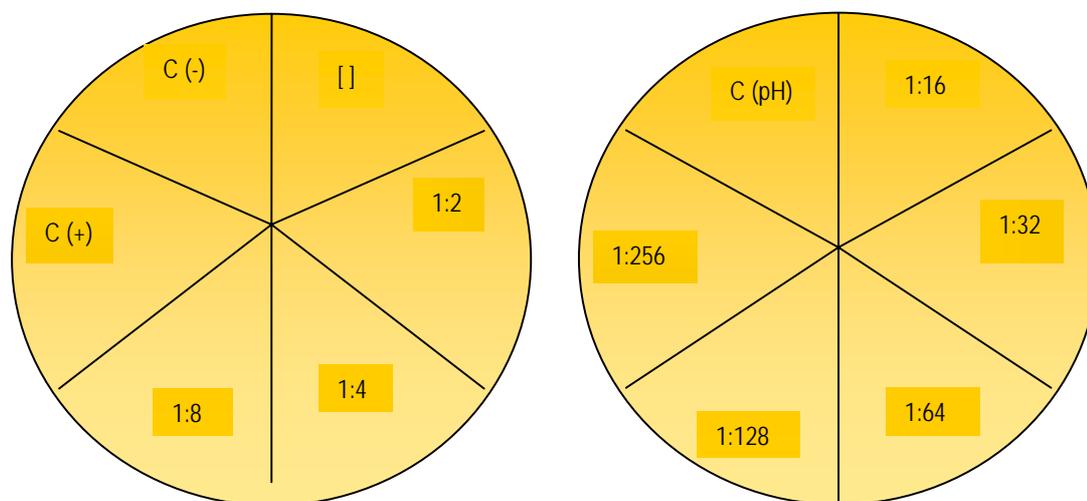
Nota: Se utiliza una placa completa y dos filas de otra ya que tengo 10 muestras.

Figura 12. Microplaca de 96 pozos rotulada.

4.6.3 EFECTO BACTERICIDA-BACTERIOSTATICO

En condiciones de esterilidad de cada tubo de la técnica anterior, se toma una asada y se siembra en una placa de agar BHI, esta se rotula (Figura 13) y se incuba 24 horas a 37 °C. Pasado este tiempo se realizan las lecturas y anotaciones correspondientes.

Figura 13. Caja Petri rotulada para determinar el efecto Bactericida-Bacteriostático.



4.6.4 MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION

Esta técnica se realizó para tres bacterias diferentes de un total de diez, ya que es cara y requiere de tiempo.

1. 169 *Staphylococcus aureus*
2. 253 *Escherichia coli*
3. 65 *Enterococcus faecalis*

Se utilizaron 4 tubos estériles con tapa rosca para cada una de ellas, ya que fue uno para la prueba con *Caléndula officinalis*, el segundo para Quitosán, otro para la Mezcla y el último se utilizó como control.

Tabla 13. Preparación de tubos para MET.

Tubo	<i>Caléndula officinalis</i> (ml)	Quitosán (ml)	Mezcla (ml)	Bacteria Estandarizada (ml)
1	3	--	--	3
2	--	3	--	3
3	--	--	3	3
4	--	--	--	6

Se incubaron a 37°C por 24 hrs.

Los tubos 1, 2 y 3 se centrifugaron a 2000rpm de 5 a 10min; el tubo 4 a 2000rpm durante 30min; se elimina el sobrenadante y a la pastilla se le agrega 3ml del reactivo de Karnosky, se deja reposar por 1 hora. Después se vuelve a centrifugar a 2000rpm durante 30min, se elimina el fijador y posteriormente se resuspende en 3 ml de Buffer de Fosfatos estéril.

PREPARACION DE REJILLAS CON MEMBRANA FOMVAR. ⁽⁵⁴⁾

1. Las rejillas deben ser lavadas con acetona y estar secas previamente.
2. Se prepara una solución de fomvar al 0.1% en cloroformo; si se hacen con parlodión se prepara una solución 0.1% de parlodión en acetato de amilo.
3. Se llena un vaso de precipitados (1lt) con agua destilada. Se coloca una lámpara que refleje la superficie del agua para que al despegar la membrana nos refleje el color y así las de color dorado o plateado serán las que se utilicen.
4. Un porta objetos se impregna de fomvar y se deja en reposo hasta que se seque la película; después con la ayuda de las uñas se cortan las cuatro orillas del porta objeto y sobre el baño de agua destilada se sumerge poco a poco hasta separar la película plástica.
5. Las rejillas son colocadas sobre la membrana y posteriormente recogidas con papel filtro. Las rejillas se secan perfectamente antes de volverlas a usar.

TINCION NEGATIVA. ⁽⁵⁴⁾

- ❖ Colocar una gota de suspensión bacteriana sobre papel parafilm y colocar 2 rejillas con membrana para que se absorba la muestra durante 20 minutos.
- ❖ Quitar el exceso con ayuda de un papel filtro.
- ❖ Tomar las rejillas y lavarlas con agua destilada.
- ❖ Quitar el exceso de agua absorbiéndolo con papel filtro.
- ❖ Teñir en 1 gota de ácido fosfotungstico (AFT solución al 1% con pH=7.2) durante 1 minuto.
- ❖ Absorber el exceso de colorante con papel filtro.
- ❖ Secar a temperatura ambiente o en estufa a 35°C.
- ❖ Observar y fotografiar las muestras en el Microscopio Electrónico de Transmisión. JEOL JEM 100S.

5. RESULTADOS

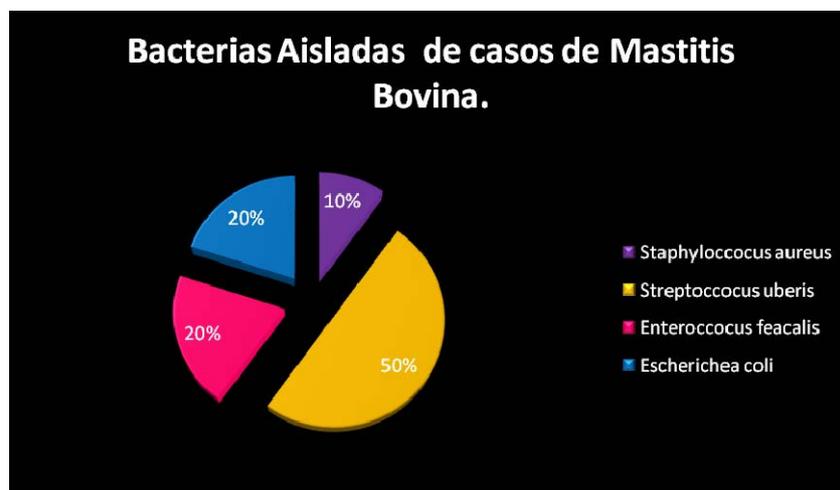
1.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE CEPAS

En 10 muestras de leche de vacas con mastitis bovina, procedentes de la Cuenca Lechera de Tizayuca, se aislaron e identificaron las siguientes bacterias: (Ver Tabla 11)

Tabla 14 Bacterias aisladas e identificadas de muestras de leche de vacas con mastitis.

Numero de Muestra	Bacteria
253	<i>Escherichia coli</i>
281	<i>Escherichia coli</i>
169	<i>Staphylococcus aureus</i>
670	<i>Streptococcus uberis</i>
445	<i>Streptococcus uberis</i>
669	<i>Streptococcus uberis</i>
63	<i>Streptococcus uberis</i>
74	<i>Streptococcus uberis</i>
445	<i>Enterococcus faecalis</i>
65	<i>Enterococcus faecalis</i>

Las bacterias aisladas corresponden al siguiente porcentaje:



Grafica 1. Porcentaje de las bacterias aisladas e identificadas en las muestras de leche de vacas con mastitis.

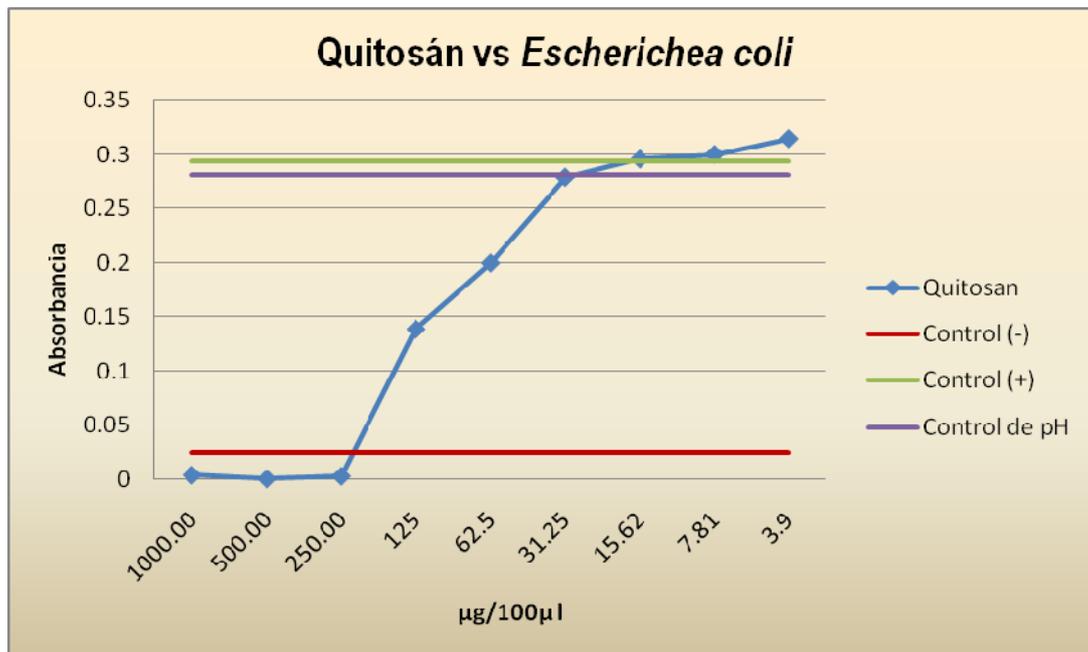
1.3 PRUEBA CUANTITATIVA

1.3.1 Resultado para *Escherichia coli* (muestra No.253-281)

En la muestra de leche No 253 se obtuvieron los siguientes resultados en la prueba cuantitativa de los ensayos realizados con *Caléndula officinalis* y/o Quitosán, determinando con estas la MIC.

µg/100µl	1000	500	250	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.9
Quitosán	0.0045	0.0011	0.0035	0.1389	0.1997	0.2787	0.2954	0.2997	0.3142
Control (-)	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.0250
Control (+)	0.2934	0.2934	0.2934	0.2934	0.2934	0.2934	0.2934	0.2934	0.2934
Control de pH	0.2806	0.2806	0.2806	0.2806	0.2806	0.2806	0.2806	0.2806	0.2806

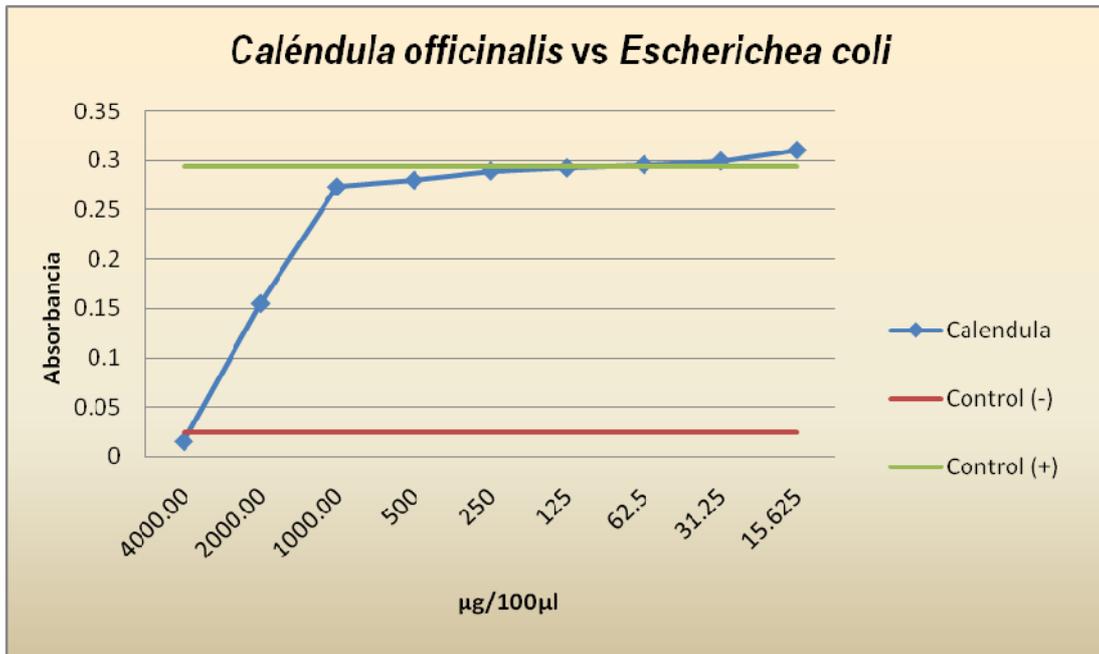
Tabla 18. Valores de absorbancia del ensayo en microplaca de la muestra No. 253 tratada con Quitosán.



Gráfica 3. Ensayo de Quitosán con *Escherichia coli* aislada de la muestra 253.

$\mu\text{g}/100\mu\text{l}$	4000	2000	1000	500	250	125	62.5	31.25	15.625
Caléndula	0.0152	0.155	0.2734	0.2801	0.2894	0.2924	0.2957	0.2995	0.3105
Control (-)	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
Control (+)	0.2934	0.2934	0.2934	0.2934	0.2934	0.2934	0.2934	0.2934	0.2934

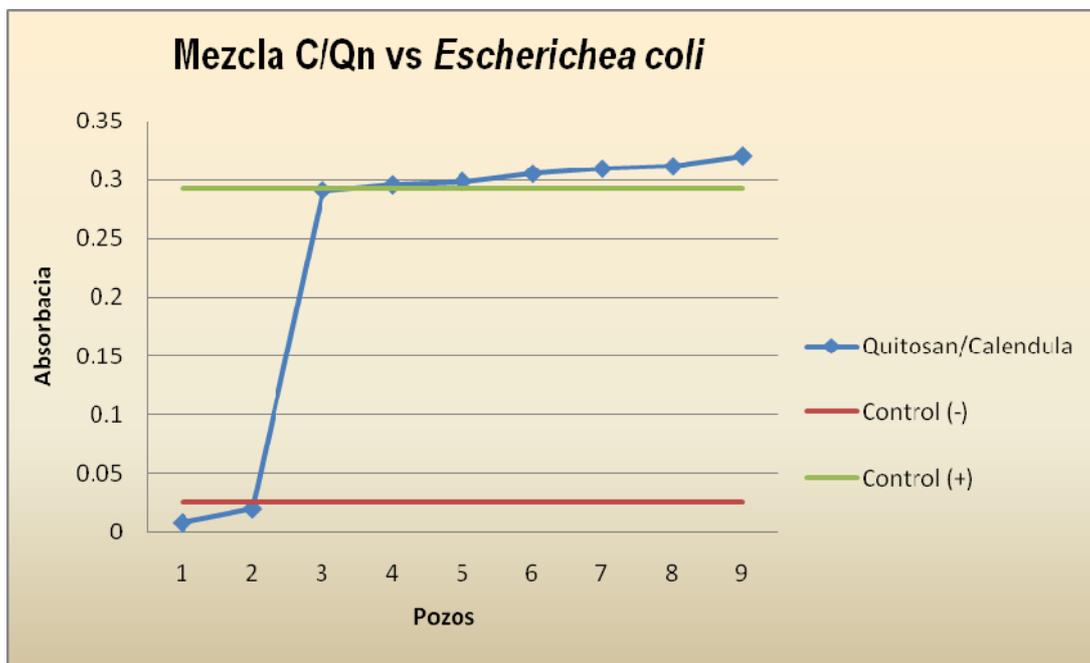
Tabla 19. Valores de absorbancia del ensayo en microplaca de la muestra No. 253 tratada con *Caléndula officinalis*



Grafica 4. Ensayo de *Caléndula officinalis* con *Escherichia coli* aislada de la muestra 253.

($\mu\text{g}/50\mu\text{l}$)	2000 /500	1000 /250	500 /125	250 /62.5	125 /31.25	62.5 /15.62	31.25 /7.81	15.62 /3.90	7.81 /1.95
C/Qn	0.0078	0.0194	0.2914	0.2959	0.2989	0.3056	0.3098	0.3118	0.3208
Control (-)	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
Control (+)	0.2934	0.2934	0.2934	0.2934	0.2934	0.2934	0.2934	0.2934	0.2934

Tabla 20. Valores de absorbancia del ensayo en microplaca de la muestra No. 253 tratada con *Caléndula officinalis*/Quitosán. El valor numérico superior de la barra corresponde a las concentraciones de *Caléndula officinalis* y el inferior a las de Quitosán.



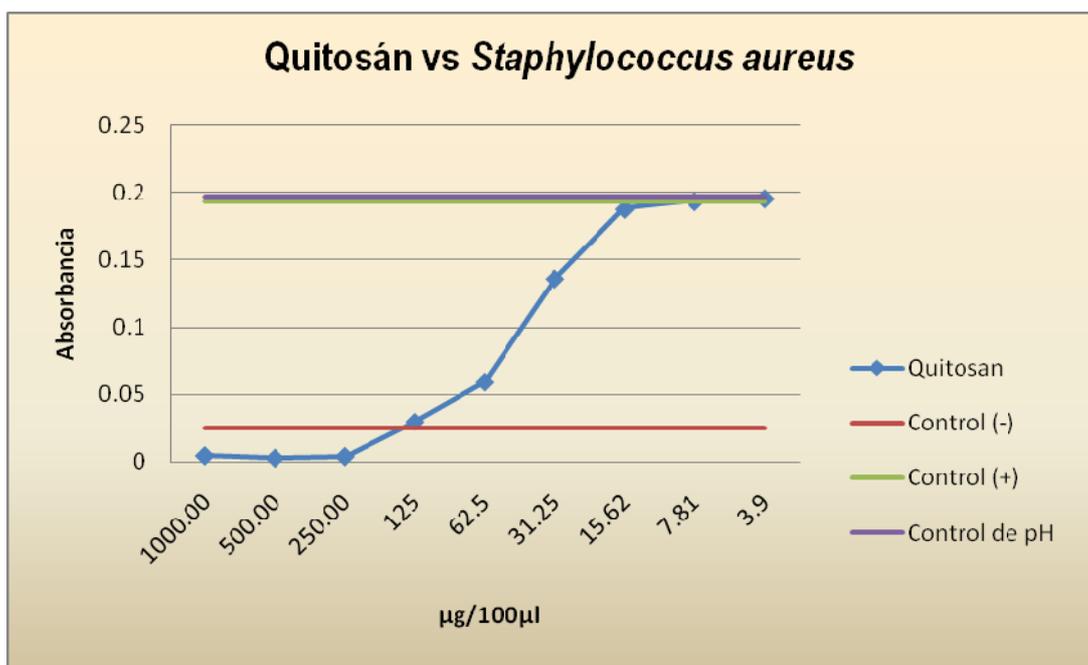
Grafica 5. Ensayo de Quitosán y *Caléndula officinalis* con *Escherichia coli* aislada de la muestra 253.

1.3.2 Resultado para *Staphylococcus aureus* (muestra No.169)

En la muestra de leche No 169 se obtuvieron los siguientes resultados en la prueba cuantitativa de los ensayos realizados con *Caléndula officinalis* y/o Quitosán, determinando con estas la MIC.

µg/100µl	1000	500	250	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.9
Quitosán	0.0051	0.0033	0.0045	0.0303	0.0597	0.1363	0.1879	0.1935	0.1957
Control (-)	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
Control (+)	0.1928	0.1928	0.1928	0.1928	0.1928	0.1928	0.1928	0.1928	0.1928
Control de pH	0.1972	0.1972	0.1972	0.1972	0.1972	0.1972	0.1972	0.1972	0.1972

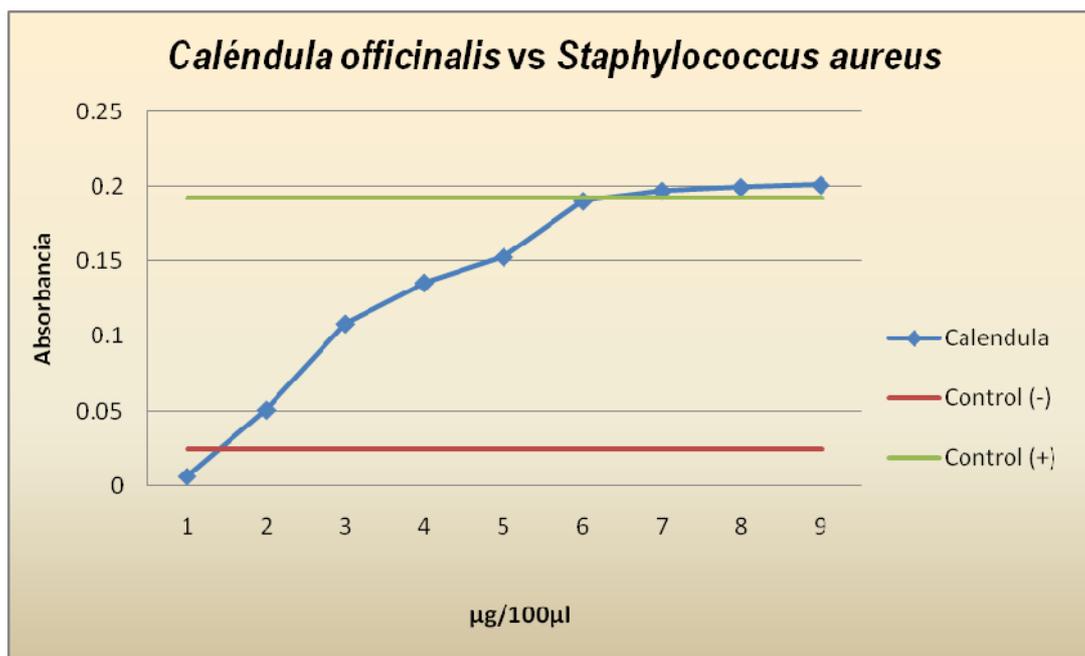
Tabla 21. Valores de absorbancia del ensayo en microplaca de la muestra No. 169 tratada con Quitosán.



Grafica 6. Ensayo de Quitosán con *Staphylococcus aureus* aislada de la muestra 169.

$\mu\text{g}/100\mu\text{l}$	4000	2000	1000	500	250	125	62.5	31.25	15.625
Caléndula	0.0062	0.0507	0.1084	0.1358	0.153	0.1905	0.1973	0.1998	0.2013
Control (-)	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
Control (+)	0.1928	0.1928	0.1928	0.1928	0.1928	0.1928	0.1928	0.1928	0.1928

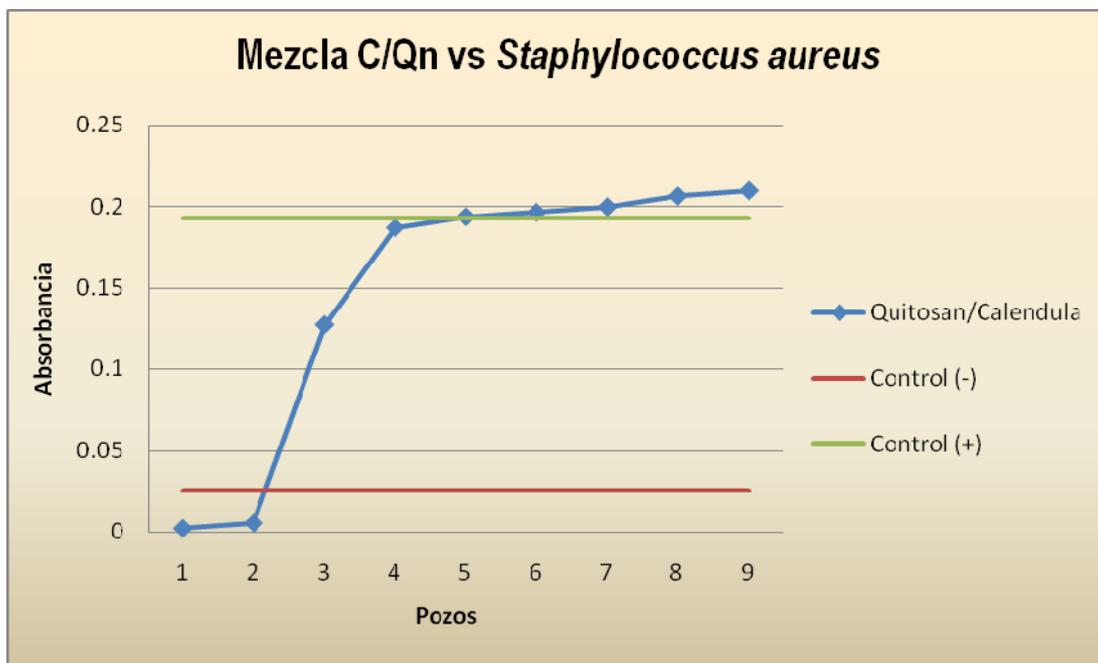
Tabla 22. Valores de absorbancia del ensayo en microplaca de la muestra No. 169 tratada con *Caléndula officinalis*.



Grafica 7. Ensayo de *Caléndula officinalis* con *Staphylococcus aureus* aislada de la muestra 169.

($\mu\text{g}/50\mu\text{l}$)	2000 /500	1000 /250	500 /125	250 /62.5	125 /31.25	62.5 /15.62	31.25 /7.81	15.62 /3.9	7.81 /1.95
C/Qn	0.0022	0.0055	0.1273	0.1869	0.1937	0.1964	0.1998	0.2065	0.2098
Control (-)	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
Control (+)	0.1928	0.1928	0.1928	0.1928	0.1928	0.1928	0.1928	0.1928	0.1928

Tabla 23. Valores de absorbancia del ensayo en microplaca de la muestra No. 169 tratada con Quitosán y *Caléndula officinalis*. El valor numérico superior de la barra corresponde a las concentraciones de *Caléndula officinalis* y el inferior a las de Quitosán.



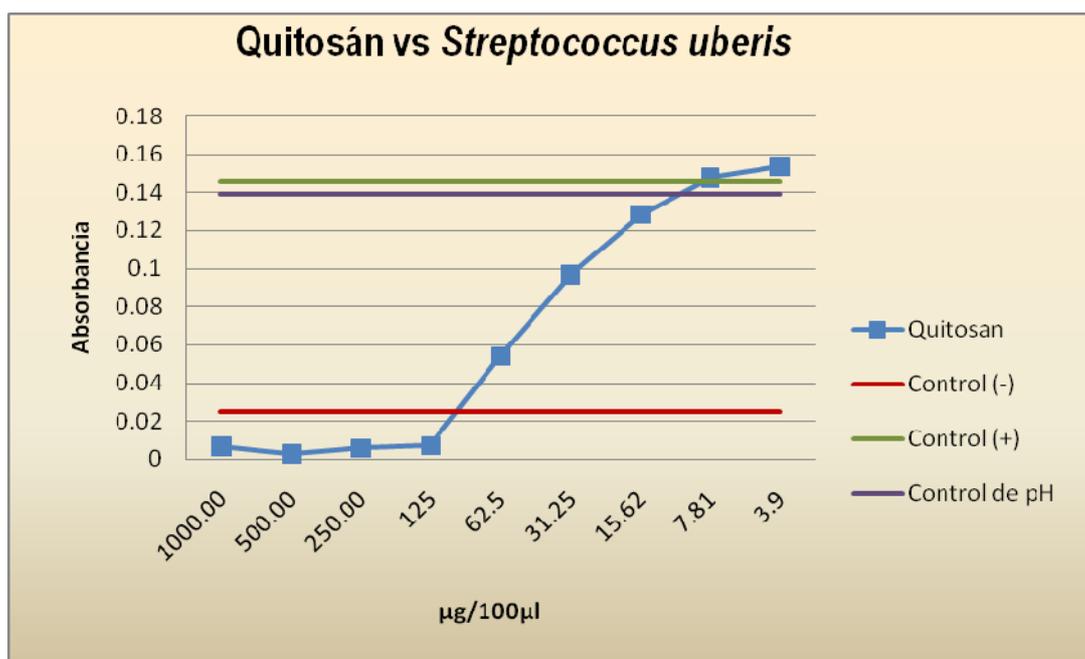
Grafica 8. Ensayo de Quitosán y *Caléndula officinalis* con *Staphylococcus aureus* aislada de la muestra 169.

1.3.3 Resultado para *Streptococcus uberis* (muestra No.670, 445, 669, 63, 74)

En la muestra de leche No 670 se obtuvieron los siguientes resultados en la prueba cuantitativa de los ensayos realizados con *Caléndula officinalis* y/o Quitosán, determinando con estas la MIC.

µg/100µl	1000	500	250	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.9
Quitosán	0.0066	0.0027	0.0057	0.0071	0.0541	0.097	0.1286	0.1478	0.1538
Control (-)	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
Control (+)	0.1457	0.1457	0.1457	0.1457	0.1457	0.1457	0.1457	0.1457	0.1457
Control de pH	0.1391	0.1391	0.1391	0.1391	0.1391	0.1391	0.1391	0.1391	0.1391

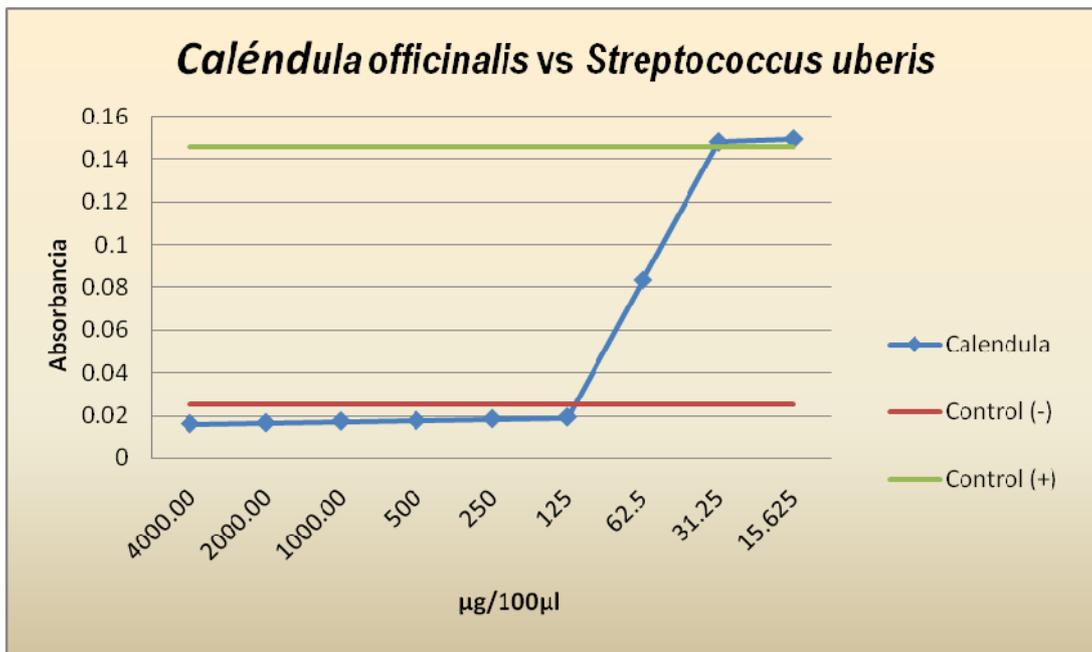
Tabla 24. Valores de absorbancia del ensayo en microplaca de la muestra No. 670 tratada con Quitosán.



Gráfica 9. Ensayo de Quitosán con *Streptococcus uberis* aislada de la muestra 670.

$\mu\text{g}/100\mu\text{l}$	4000	2000	1000	500	250	125	62.5	31.25	15.625
Caléndula	0.0161	0.0165	0.0173	0.0176	0.0184	0.0192	0.0832	0.1478	0.1491
Control (-)	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
Control (+)	0.1457	0.1457	0.1457	0.1457	0.1457	0.1457	0.1457	0.1457	0.1457

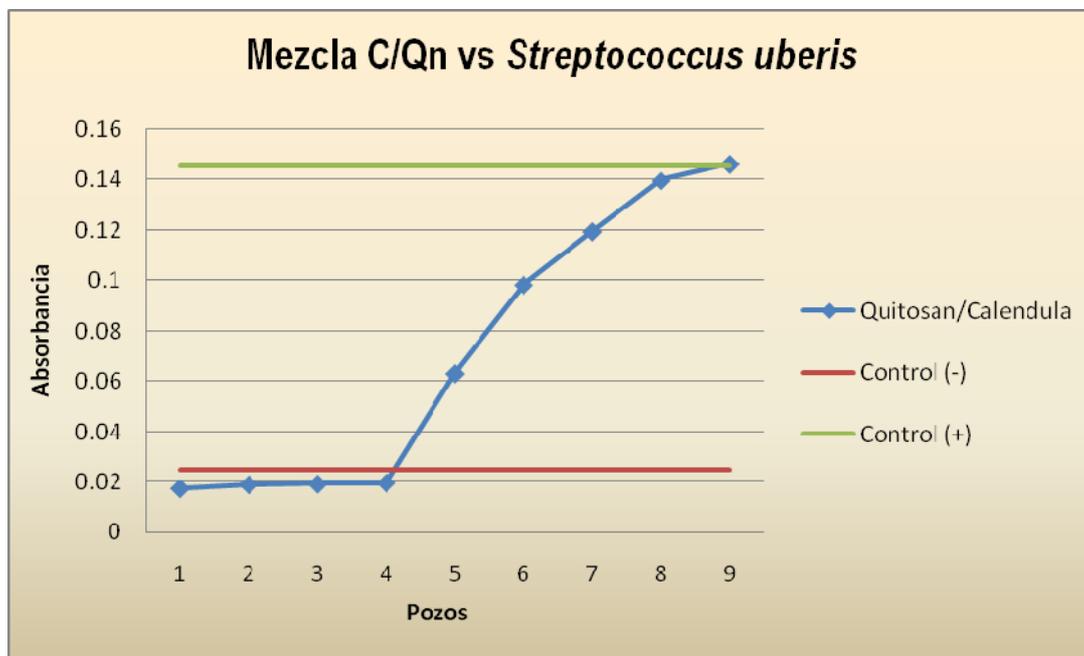
Tabla 25. Valores de absorbancia del ensayo en microplaca de la muestra No. 670 tratada con *Caléndula officinalis*.



Grafica 10. Ensayo de *Caléndula officinalis* con *Streptococcus uberis* aislada de la muestra 670.

($\mu\text{g}/50\mu\text{l}$)	2000 /500	1000 /250	500 /125	250 /62.5	125 /31.25	62.5 /15.62	31.25 /7.81	15.62 /3.9	7.81 /1.95
C/Qn	0.0175	0.01905	0.0193	0.0197	0.0632	0.0984	0.1196	0.1398	0.1464
Control (-)	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
Control (+)	0.1457	0.1457	0.1457	0.1457	0.1457	0.1457	0.1457	0.1457	0.1457

Tabla 26. Valores de absorbancia del ensayo en microplaca de la muestra No. 670 tratada con Quitosán y *Caléndula officinalis*. El valor numérico superior de la barra corresponde a las concentraciones de *Caléndula officinalis* y el inferior a las de Quitosán.



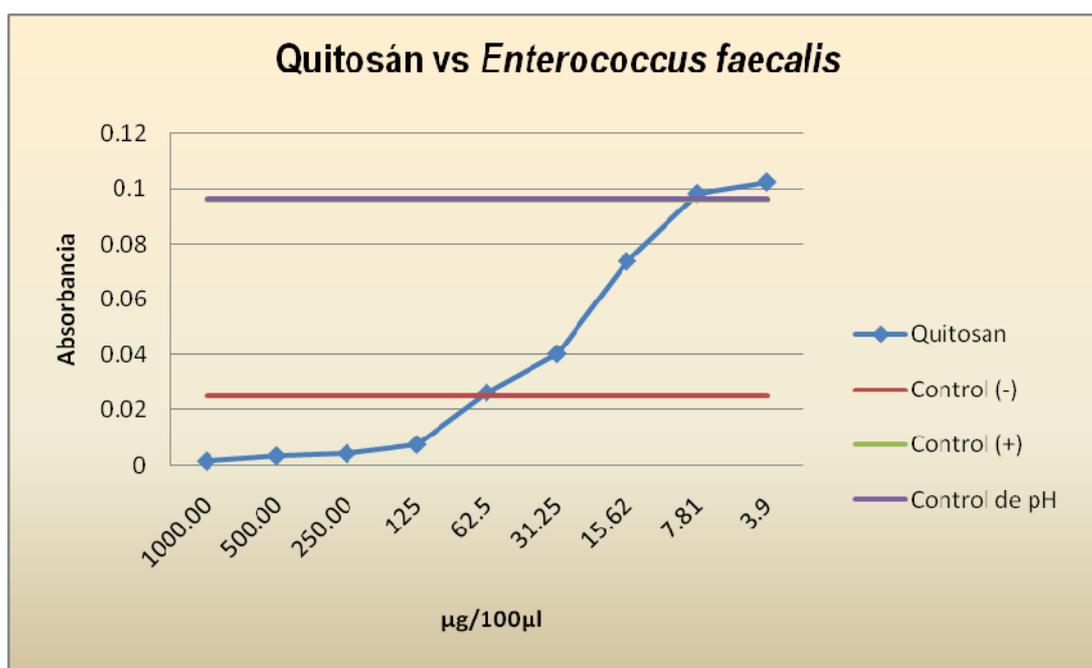
Grafica 11. Ensayo de Quitosán y *Caléndula officinalis* con *Streptococcus uberis* aislada de la muestra 670.

1.3.4 Resultados para *Enterococcus faecalis* (muestra No.65,445)

En la muestra de leche No 65 se obtuvieron los siguientes resultados en la prueba cuantitativa de los ensayos realizados con *Caléndula officinalis* y/o Quitosán, determinando con estas la MIC.

µg/100µl	1000	500	250	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.9
Quitosán	0.0016	0.0035	0.0043	0.0076	0.0264	0.0404	0.0739	0.0984	0.1025
Control (-)	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
Control (+)	0.0961	0.0961	0.0961	0.0961	0.0961	0.0961	0.0961	0.0961	0.0961
Control de pH	0.0963	0.0963	0.0963	0.0963	0.0963	0.0963	0.0963	0.0963	0.0963

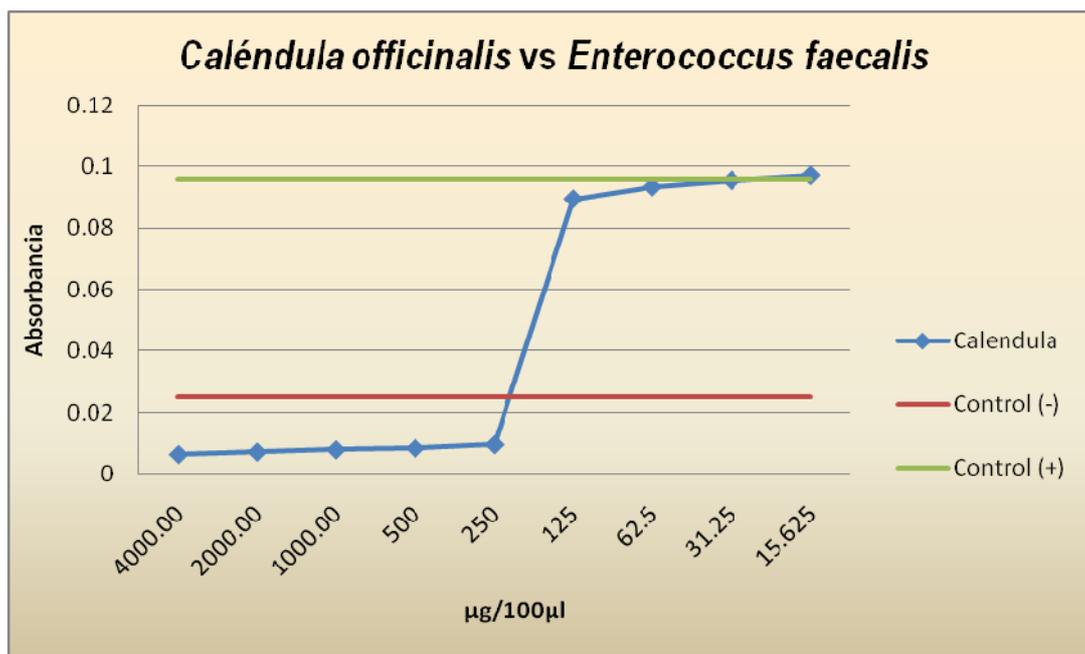
Tabla 27. Valores de absorbancia del ensayo en microplaca de la muestra No. 65 tratada con Quitosán.



Gráfica 12. Ensayo de Quitosán con *Enterococcus faecalis* aislada de la muestra 65.

$\mu\text{g}/100\mu\text{l}$	4000	2000	1000	500	250	125	62.5	31.25	15.625
Caléndula	0.0063	0.0071	0.0078	0.0083	0.0095	0.0897	0.0936	0.0957	0.0973
Control (-)	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
Control (+)	0.0961	0.0961	0.0961	0.0961	0.0961	0.0961	0.0961	0.0961	0.0961

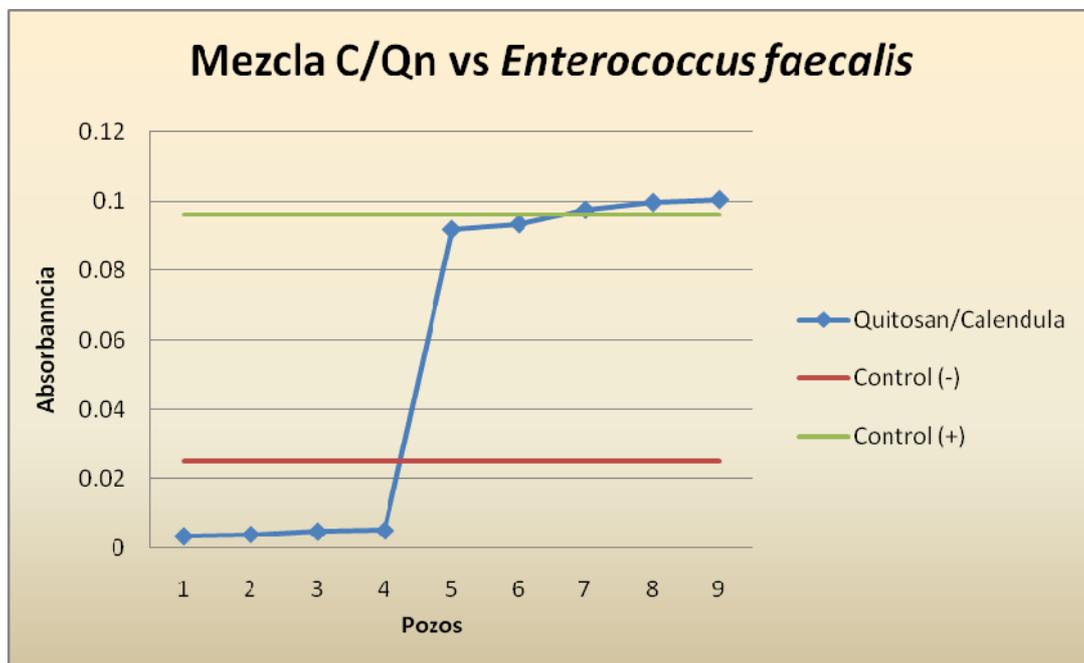
Tabla 28. Valores de absorbancia del ensayo en microplaca de la muestra No. 65 tratada con *Caléndula officinalis*.



Grafica 13. Ensayo de *Caléndula officinalis* con *Enterococcus faecalis* aislada de la muestra 65.

($\mu\text{g}/50\mu\text{l}$)	2000 /500	1000 /250	500 /125	250 /62.5	125 /31.25	62.5 /15.62	31.25 /7.81	15.62 /3.9	7.81 /1.95
C/Qn	0.0036	0.0041	0.0049	0.0053	0.0918	0.0934	0.0975	0.0997	0.1005
Control (-)	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
Control (+)	0.0961	0.0961	0.0961	0.0961	0.0961	0.0961	0.0961	0.0961	0.0961

Tabla 29. Valores de absorbancia del ensayo en microplaca de la muestra No. 65 tratada con Quitosán y *Caléndula officinalis*. El valor numérico superior de la barra corresponde a las concentraciones de *Caléndula officinalis* y el inferior a las de Quitosán.



Grafica 14. Ensayo de Quitosán y *Caléndula officinalis* con *Enterococcus faecalis* aislada de la muestra 65.

5.4 EFECTO BACTERICIDA-BACTERIOSTÁTICO DE Quitosan y *Caléndula officinalis*

TABLA 30. Actividad bactericida o bacteriostática de Quitosán.

Quitosán μg/100μl	1000	500	250	125
Bacteria				
<i>Escherichia coli</i>	Bactericida	Bactericida	Bacteriostático	Bacteriostático
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bactericida	Bactericida	Bacteriostático	Bacteriostático
<i>Streptococcus uberis</i>	Bactericida	Bactericida	Bacteriostático	Bacteriostático
<i>Enterococcus faecalis</i>	Bactericida	Bactericida	Bacteriostático	Bacteriostático

TABLA 31. Actividad bactericida o bacteriostática de *Caléndula officinalis*.

<i>Caléndula officinalis</i> μg/100μl	4000	2000	1000	500
Bacteria				
<i>Escherichia coli</i>	Bacteriostático	Bacteriostático	Bacteriostático	Bacteriostático
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bacteriostático	Bacteriostático	Bacteriostático	Bacteriostático
<i>Streptococcus uberis</i>	Bacteriostático	Bacteriostático	Bacteriostático	Bacteriostático
<i>Enterococcus faecalis</i>	Bacteriostático	Bacteriostático	Bacteriostático	Bacteriostático

Figura 14. Efecto Bactericida-Bacteriostático de Quitosán con *E. coli* de la muestra 253.

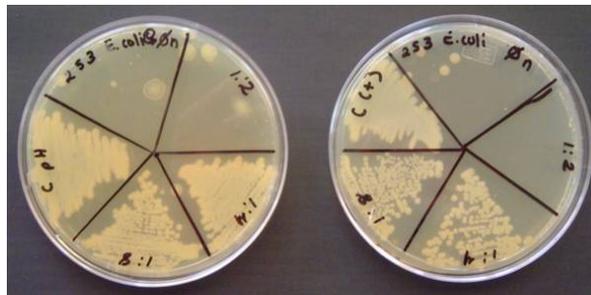


Figura 15. Efecto Bactericida-Bacteriostático de *Caléndula officinalis* con *E. coli* de la muestra 253.



1.5 PRUEBA DE MICROSCOPIA ELECTRONICA DE Quitosan y *Caléndula officinalis*

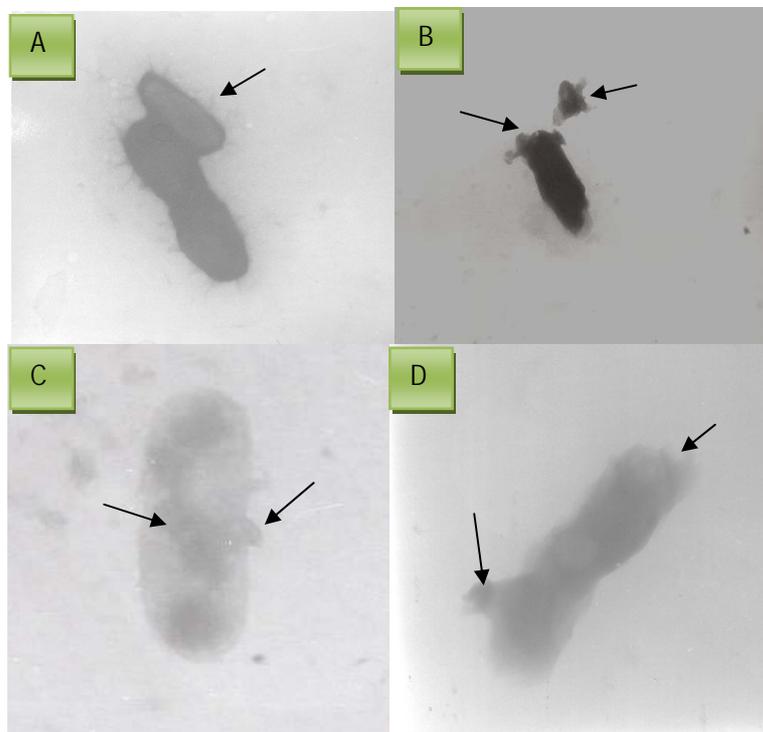


Figura 16. Microfotografías Electrónicas de *Escherichia coli* obtenidas a 10 000 magnificaciones, "A" pertenece al control (no tratada); "B" es la tratada con *Caléndula officinalis*; "C" con Quitosán y por ultimo "D" corresponde a la tratada con la mezcla de Quitosán y *Caléndula officinalis*.

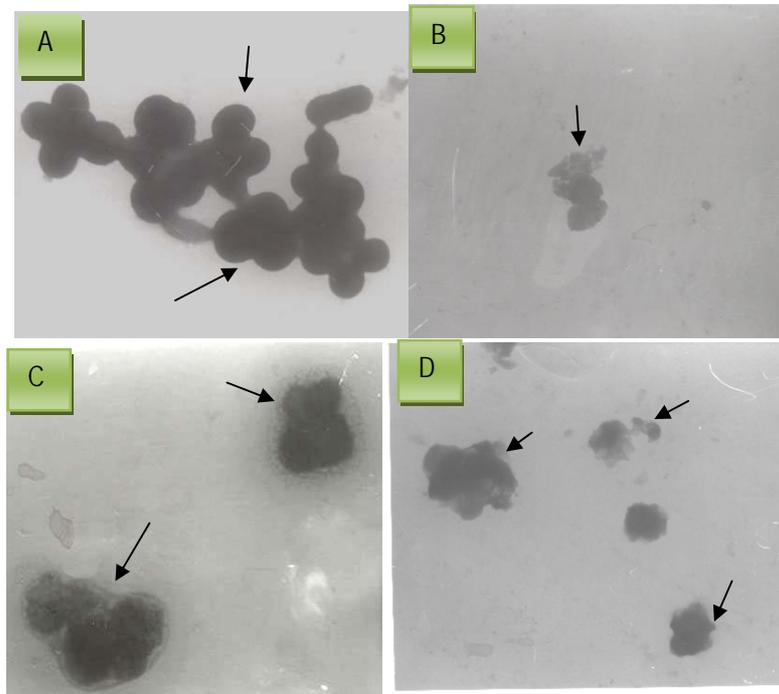


Figura 17. Microfotografías Electrónicas de *Staphylococcus aureus* obtenidas a 10 000 magnificaciones, "A" pertenece al control (no tratada); "B" es la tratada con *Caléndula officinalis*; "C" con Quitosán y por ultimo "D" corresponde a la tratada con la mezcla de Quitosán y *Caléndula officinalis*.

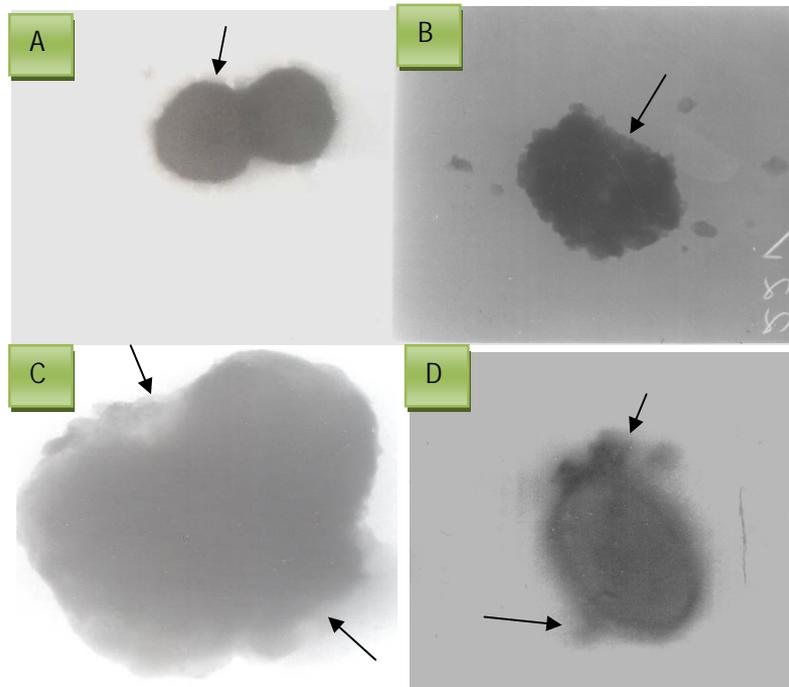


Figura 18. Microfotografías Electrónicas de *Enterococcus faecalis* obtenidas a 20 000 magnificaciones, "A" pertenece al control (no tratada); "B" es la tratada con *Caléndula officinalis*; "C" con Quitosán y por ultimo "D" corresponde a la tratada con la mezcla de Quitosán y *Caléndula officinalis*.

6. DISCUSION

La mastitis, es la respuesta inflamatoria de la glándula mamaria normalmente causada por bacterias. ⁽¹⁾ Es muy persistente en el ganado lechero, usualmente es tratada o prevenida con antibióticos intramamarios; representando una carga económica muy alta a los productores de leche en todo el mundo. Las pérdidas mundiales, anuales debido a la mastitis, se han estimado en 35 billones de dólares americanos. ⁽⁵⁹⁾

La leche es un producto universal de origen animal que por su alto valor nutritivo es de suma importancia en la alimentación humana, siendo los niños los principales consumidores. ⁽⁶⁰⁾

La leche puede estar contaminada por una gran variedad de microorganismos ya que es un excelente medio de conservación y crecimiento para ellos. ⁽⁵⁷⁾

El uso indiscriminado de antibióticos en el tratamiento de mastitis, determina la presencia de estos en la leche, teniendo consecuencias graves en la salud del consumidor, como son: alergias, cambios en la flora intestinal, resistencia bacteriana. ⁽⁶⁰⁾

La Medicina Alternativa, trata de ser una herramienta para resolver estos problemas de salud pública por la ingesta de residuos de antibióticos en la leche ya que generan resistencia bacteriana. ⁽¹⁰⁾

Cordero y González en 2005 reportaron que *Caléndula officinalis* presenta una actividad antimicrobiana en las bacterias comúnmente causantes de mastitis bovina.

Lastra en 1999 y Hamburger en 2003 detectaron una actividad antiinflamatoria en el extracto de *Caléndula officinalis* atribuyendo esta a sus constituyentes triterpenoides en especial los esteroides de faradiol y taraxasterol.

En 1999 García comprobó la actividad antibacteriana del Quitosán con diferentes cepas, teniendo mejores resultados con Gram positivas como *Staphylococcus aureus* y diferentes *Streptococcus*. Se utilizó Quitosán pH 4 ya que Hernández en 2008 realiza un estudio a diferente pH reportando mejores resultados antimicrobianos el de pH 4.

Streptococcus agalactiae es una bacteria importante en mastitis bovina aunque no fue aislada en este trabajo creemos que es relevante en un futuro evaluar su sensibilidad con *Caléndula officinalis* y Quitosán. Cortes en 2008, trabajo con muestras de leche de vacas con mastitis, con el propósito de aislar *Nocardia* lo que nos indica que también es un microorganismo importante en esta enfermedad y por lo tanto sería bueno probar el extracto de *Caléndula officinalis* y Quitosán contra esta bacteria.

Se trabajó con 10 muestras de leche de vacas con mastitis, procedentes de la Cuenca Lechera de Tizayuca; en ellas se aislaron e identificaron 10 bacterias; las cuales fueron 2 *Escherichia coli* pertenecientes de las muestras 253 y 281, 1 *Staphylococcus aureus* de la muestra 169, 5 *Streptococcus uberis* de las muestras 670, 445, 669, 63 y 74, y por último 2 *Enterococcus faecalis* de las muestras 445 y 65 (Tabla 14).

De las bacterias aisladas e identificadas el 50% está representado por *Streptococcus uberis*, el 20 % por *Enterococcus faecalis*, 20% por *Escherichia coli* y 10% para *Staphylococcus aureus* (Grafica 1). *Staphylococcus aureus* está clasificado como un microorganismo contagioso, se transmite de vaca a vaca o a través de las manos del ordeñador, paños de secado y pezoneras. ⁽⁵⁹⁾ *Streptococcus uberis* y *Escherichia coli* son microorganismos ambientales, la fuente de infección es: suelo, heces, camas de los animales, aguas contaminadas etc. ⁽⁵⁹⁾ *Streptococcus faecalis* es un agente oportunista, se encuentra en la piel de la vaca y su frecuencia de infección es alta en el momento del parto. Se observó que el 80% de las bacterias aisladas fueron Gram + y tan solo el 20% Gram – (Grafica 2).

Para facilitar la lectura e interpretación de los resultados solo se reporta una cepa de cada bacteria, ya que presentaron el mismo comportamiento, cada ensayo se realizó por triplicado, y se ocuparon los promedios de todas las lecturas con el propósito de tener un solo resultado representativo de cada una de las cepas.

En el resultado del ensayo cualitativo con Quitosán se puede observar que el efecto que se presenta es inhibitorio desde una concentración de 1000 µg/100µl hasta 250 µg/100µl para E. coli y S. aureus, después de esta concentración empieza a mostrar un resultado dudoso ya que se muestra un poco de turbidez en 125 y 62.5 µg/100µl, en las siguientes diluciones (31.25, 15.62, 7.81 y 3.9 µg/100µl) se presenta totalmente turbio como el control positivo (Tabla 15). Estas mismas bacterias al enfrentarlas con el extracto de *Caléndula officinalis* presentan un efecto inhibitorio a una concentración de 4000 µg/100µl y después de esta, se empieza a notar turbidez en los tubos (Tabla 16). Mientras que con la Mezcla se presenta una inhibición en las dos primeras concentraciones 2000/500 µg/50µl y 1000/250 µg/50µl, esto parece tener un efecto indiferente ya que ni aumenta ni disminuye. En el caso de S. uberis y E. faecalis el efecto de Quitosán es inhibitorio desde una concentración de 1000 hasta 125 µg/100µl después de esta y hasta la última dilución (62.5-3.9 µg/100µl) ya no son sensibles ya que existe turbidez; con *Caléndula officinalis* presentan una inhibición desde 4000 µg/100µl hasta 125 µg/100µl, o sea que es mayor que con Quitosán y con la Mezcla la inhibición es desde 2000/500 µg/50µl hasta 125/31.25 µg/50µl (Tabla 17).

Para poder evidenciar los resultados obtenidos en el ensayo cuantitativo utilizamos el método colorimétrico de Mosmann, este nos permitió observar el efecto antibacteriano del extracto de *Caléndula officinalis* y/o Quitosán así como también se pudo determinar la Concentración Mínima Inhibitoria. Este método fue desarrollado por Mosmann en 1983 y modificado posteriormente en 1986 por Francois Denizot y Rita Lang.⁽⁵²⁾

En el caso de *Escherichia coli* y Quitosán la MIC es de 250 µg/100µl (pozo 3) mientras que cuando tratamos a esta misma bacteria con el extracto de *Caléndula officinalis* la MIC fue de 4000 µg/100µl (pozo 1) esto nos sugiere que Quitosán tiene un mejor efecto con esta bacteria que *Caléndula officinalis*, estos resultados no concuerdan con Hernández en 2008 ya que reporta para *E. coli* una MIC de 62.5 µg/100 µl de Quitosán, con *Caléndula officinalis* la MIC es 25 µg/100µl, lo que nos indica que con una concentración menor se está inhibiendo a la bacteria, esto se puede deber a que el estudio realizado por Hernández se llevo a cabo con cepas aisladas de heridas de humanos. Cuando realizamos la mezcla de Quitosán - *Caléndula officinalis* - Bacteria, notamos indiferencia o incluso un posible antagonismo en cuanto a su actividad encontrando una MIC de 1000/250 µg/50µl (pozo 2) (Ver Grafica 3, 4 y 5), nosotros creemos que en el caso de la mezcla deberíamos de encontrar un efecto sinérgico mostrándonos una MIC en el pozo 4, 5 o 6.

En el ensayo cuantitativo de *Staphylococcus aureus* y Quitosán la MIC fue de 250 µg/100µl (pozo 3). Hernández 2008 reporta que la MIC para *S. aureus* - Quitosán es de 62.5 µg/100µl, la diferencia se debe a que utilizo bacterias aisladas de heridas de humanos.

Con *Caléndula officinalis* se tiene una MIC de 4000 µg/100µl (pozo 1), lo cual indica que el Quitosán tiene un efecto mayor sobre esta bacteria que *Caléndula officinalis*; al efectuar la mezcla Quitosán - *Caléndula officinalis* - Bacteria se tiene una MIC de 1000/250 µg/50µl (pozo 2) (ver Grafica 6, 7 y 8). En el caso de la Mezcla nosotros esperábamos encontrar un efecto sinérgico mostrándonos una MIC en el pozo 4 o 5, pero lo que notamos es indiferencia o incluso un posible antagonismo en cuanto a su actividad antimicrobiana.

Quitosán presenta una actividad inhibitoria mayor sobre *Streptococcus uberis* (comparándolo con el efecto sobre *E. coli* y *S. aureus*) teniendo una MIC de 125 µg/100µl (pozo 4) (ver Grafica 9), al realizar el ensayo con *Caléndula officinalis* resulta una MIC de 125 µg/100µl (pozo 6) (ver Grafica 10), lo que nos está indicando que en este caso *Caléndula officinalis* tiene un efecto inhibitorio mayor que Quitosán con esta cepa; mientras que cuando realizamos el ensayo con la Mezcla la MIC es de 250/ 62.5 µg/50µl (pozo 4) (ver Grafica 11), esto nos indica que existe indiferencia o incluso un posible antagonismo entre los compuestos.

En el ensayo de Quitosán - *Enterococcus faecalis* se tiene una MIC de 125 µg/100µl (pozo 4) (ver Grafica 12), por otro lado, con el extracto de *Caléndula officinalis* la MIC resulto de 250 µg/100µl (pozo 5) (ver Grafica 13) lo cual nos está indicando que *Caléndula officinalis* tiene un efecto inhibitorio mayor que Quitosán sobre esta cepa. Al efectuar la mezcla Quitosán - *Caléndula officinalis* - Bacteria, se tiene una MIC de 250/62.5 µg/50µl (pozo 4) (ver Grafica 14), a pesar de que nosotros esperábamos encontrar un sinergismo el resultado nos indica que existe indiferencia entre los compuestos.

Para determinar si existe sinergismo, antagonismo o indiferencia entre una combinación de extractos se pueden realizar isobogramas que son representaciones gráficas en un eje de coordenadas de dosis efectivas en cada uno de los antibacterianos utilizados individualmente y de su combinación. ^(8, 41) Hernández en 2008 estudió el efecto de sinergismo o antagonismo del extracto de *Caléndula officinalis* y Quitosán en bacterias asociadas a infecciones en heridas de humanos, para evidenciar resultados empleó el Método Colorimétrico de Mosmann, así mismo realizó los isobogramas para determinar sinergismo o antagonismo estos no presentaron una diferencia significativa en comparación a sus resultados obtenidos por el Método Colorimétrico de Mosmann.

La actividad bactericida se refiere a la acción de un fármaco que produce la muerte de más del 99.9% de las bacterias probadas. La actividad bacteriostática se refiere a la acción de un fármaco de inhibir el desarrollo visible de las bacterias probadas. ⁽⁸⁾ Se determinó que la actividad del extracto de *Caléndula officinalis*, es bacteriostático ya que se ven inhibidas pero al ser colocadas en un medio de cultivo en condiciones de nutrimentos, temperatura óptima y sin la presencia del extracto presentan crecimiento; por otro lado Quitosán tiene un efecto bactericida para todas las bacterias a una concentración de 1000 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ y 500 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$. El efecto bactericida y/o bacteriostático de Quitosán con las bacterias es dependiente de la concentración. (Figura 14 y 15) Helander en 2001 refiere que la carga positiva que se desarrolla en el Quitosán en medio ácido ($\text{pH} < 5.5$), debido a la protonación del grupo amino presente en cada una de sus unidades glucosamina, lo hace soluble en medio acuoso confiriéndole una mayor actividad biocida.

Realizamos Microscopia Electrónica de Transmisión usando el ácido fosfotúngstico en una tinción negativa para las bacterias control positivo así como las tratadas con Quitosán, *Caléndula officinalis* y la Mezcla, lo cual evidencio el daño que se produce cuando han sido inhibidas por estos compuestos naturales. En el caso de *Escherichia coli* podemos observar las fimbrias en la bacteria control positivo y pared completamente normal (Figura 16 A). Al hacer la comparación con la tratada con el extracto de *Caléndula officinalis* observamos una superficie completamente irregular y la formación de esferoplastos, estructuras inequívocamente que anteceden a la lisis bacteriana (Figura 16 B). Por otro lado E. coli con Quitosán muestra una superficie menos alterada aunque se observan protuberancias bien definidas en la pared celular, la parte interna tiene una apariencia uniformemente disminuida (Figura 16 C), esto se puede deber a la interacción electrostática entre los grupos $^+\text{NH}_3$ del polication y los grupos fosforilos de los fosfolípidos presentes en la membrana celular de bacterias Gram negativas causando daños en ésta, provocando la salida de material intracelular. ⁽⁶¹⁾ Cuando observamos E. coli con la mezcla de Quitosán y *Caléndula officinalis* se aprecia un esferoplasto y en uno de los extremos el posible estallamiento de la bacteria (Figura 16 D). Tal vez en la mezcla los compuestos

tengan un efecto de indiferencia y cada altere la estructura bacteriana por medio de mecanismos propios. Siendo el mayor efecto comparativamente.

En las microfotografías tomadas para *Staphylococcus aureus* se puede observar en el control positivo (Figura 17 A), a los cocos agrupados en racimos así como la pared completamente normal, bien definida; en la tratada con *Caléndula officinalis* (Figura 17 B) se puede apreciar la presencia de protoplastos, los cuales anteceden a la lisis de las bacterias Gram positivas, y en uno de los extremos el estallamiento de la bacteria. Cuando observamos a *S. aureus* con Quitosán (Figura 17 C), apreciamos que la bacteria se encuentra envuelta en una solución mucoide así como también tiene protoplastos y su pared esta irregular y en uno de sus lados se ve el estallamiento de la bacteria, recientemente Chung y Chen en 2008 ⁽⁶²⁾ han determinado que la salida del material intracelular bacteriano se ve favorecida por grados de acetilación más altos, tanto en bacterias Gram negativas (*E. coli*) como en Gram positivas (*Staphylococcus aureus*). Por otro lado en la microfotografía de *S. aureus* y la Mezcla de Caléndula y Quitosán (Figura 17 D) se aprecia que la pared celular está completamente irregular y también se observa como si la bacteria hubiera estallado y esparcido sus componentes.

Por último, *Enterococcus faecalis* en las microfotografías se aprecia en el control positivo dos cocos en agrupación par como lo es característico de esta cepa con su pared bien definida completamente normal (Figura 18 A); en comparación con la que está tratada con *Caléndula officinalis* (Figura 18 B) observamos una superficie completamente irregular lo cual nos indica que el efecto del extracto es a nivel de la pared celular. Por otro lado *E. faecalis* con Quitosán (Figura 18 C) muestra que se encuentran dos cocos de forma irregular envueltos en una solución mucoide, así como también la posible formación de protoplastos. Al combinar *E. faecalis* con la Mezcla de Caléndula y Quitosán (Figura 18 D) es evidentemente la formación de protoplastos en un costado de la bacteria.

7. CONCLUSIONES

- ✓ Se determino el efecto inhibitorio de *Caléndula officinalis* y Quitosán solos y combinados, en bacterias aisladas de casos de mastitis bovina.
- ✓ Se logro aislar e identificar 10 bacterias a partir de muestras de leche de vacas con mastitis.
- ✓ Se elaboro una mezcla de Quitosán y *Caléndula officinalis* para realizar los ensayos "in vitro" con las diferentes bacterias.
- ✓ Se determino la CMI de *Caléndula*, Quitosán y la mezcla para las diferentes bacterias.
- ✓ El método de Mossman es una buena técnica para valorar la actividad inhibitoria de diferentes productos en bacterias.
- ✓ *Caléndula officinalis* mostro un efecto bacteriostático en las diferentes bacterias utilizadas, Quitosán tiene un efecto bactericida o bacteriostático dependiente de la concentración.
- ✓ La MET permitió evidenciar el daño causado por *Caléndula officinalis*, Quitosán y la mezcla.
- ✓ Al hacer la Mezcla de *Caléndula officinalis* – Quitosán encontramos un efecto de indiferencia.
- ✓ Si se realizara un sellador de tetas con *Caléndula officinalis* y Quitosán cada uno de ellos produciría su efecto independientemente.

8. ANEXO 1

TABLA 32. Pruebas de identificación de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Enterococcus faecalis* y *Escherichia coli*.

Característica	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus uberis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Escherichia coli</i>
Tinción de Gram	+	+	+	-
Morfología	Cocos en racimos	Cocos en pares o cadenas	Cocos en pares o cadenas cortas	Bacilos
Motilidad	-	-	-	+
Catalasa	+	-	-	+
OF	F	F	F	F
Oxidasa	-	-	-	-
Coagulasa	+	NR	NR	NR
Fermentación de manitol	+	NR	+	+
Fermentación de glucosa	+	NR	NR	NR
Hidrolisis de esculina	NR	+	+	NR
NaCl 6.5%	NR	-	+	NR
Indol	NR	NR	NR	+
Rojo de metilo	NR	NR	NR	+
Voges Proskauer	NR	NR	NR	-
Citratos	NR	NR	NR	-
Reducción de nitratos	NR	NR	NR	+

Fuente: (8, 63, 64, 65)

9. APÉNDICE 1

9.1 MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS.

Medios de cultivo en placa:

- Agar Sangre
- Agar SM
- Agar Mac Conkey
- Agar BHI
- Agar Verde brillante

Medios de cultivo en tubo:

- Medio SIM. (BIOXON)
- Medio MIO. (BIOXON)
- Medio Citratos. (DIBICO)
- Medio TSI. (BIOXON)
- Caldo Urea. (BIOXON)
- Caldo Nitratos. (DIBICO)
- Caldo MR-VP. (DIBICO)
- Caldo BHI a doble concentración. (Diagnóstica MERCK)
- Medio BHI para conservación. (Diagnóstica MERCK)

Reactivos:

- Aceite de inmersión
- Etanol al 70%
- Agua destilada
- Cloruro de sodio
- Solución salina fisiológica estéril
- Solución buffer de fosfatos PBS
- Glutaraldehido
- Dimetil sulfoxido DMSO
- MTT SIGMA M-2128
- Agua destilada estéril pH 4
- Rojo de metilo
- Alfa naftol 5%
- Hidróxido de potasio 40%
- Reactivo de Ehrlich o Kovac´s
- Alfa naftilamina
- Ácido sulfanílico
- Zinc metálico
- Cristal Violeta
- Lugol
- Alcohol-acetona
- Safranina
- Peróxido de Hidrógeno

MATERIAL

- Vaso de precipitados de 50, 100, 250, 500, 1000ml.
- Probeta graduada de 100, 250, 500ml.
- Matraz erlenmeyer de 250, 500, 1000ml.
- Matraz aforado de 100ml.
- Varilla de vidrio
- Embudo de vidrio
- Cajas petri desechables estériles
- Tubos de vidrio con tapón de rosca
- Frascos ámbar de 20, 50, 100, 250, 500, 1000ml.
- Pipetas graduadas de 1, 2, 5, 10ml.
- Micro pipeta de 5 μ l, 100 μ l.
- Termómetro
- Balanza granataria
- Mechero bunsen
- Soporte universal
- Portaobjetos.
- Microplacas de 96 pozos estériles.
- Filtro de bala
- Manguera de látex
- Espátula
- Gradilla
- Asa bacteriológica
- Puntas para micropipetas de 5 μ l, 100 μ l.
- Papel filtro
- Membrana Millipore de 0.22 μ m
- Marcador indeleble
- Cinta adhesiva

EQUIPO

- Autoclave All American Modelo 1925X.
- Estufa bacteriológica Ríos Rocha S.A.
- pHmetro (HANNA)
- Balanza analítica
- Agitador Vortex Genie 2 Scientific Industries Modelo G560.
- Centrifuga Dynac
- Bomba de vacío Hoffmann Pinther Modelo 0210
- Horno Pasteur Ríos S.A. Modelo HS-41
- Parrilla con agitadores NOUVA II Stir Plate
- Microscopio óptico Olympus Modelo CHS
- Microscopio electrónico de transmisión

MATERIAL BIOLÓGICO

- Bacterias aisladas de casos de mastitis bovina.
 - *Escherichia coli* (251, 253)
 - *Staphylococcus aureus* (169)
 - *Streptococcus uberis* (63, 74, 445, 670, 669)
 - *Streptococcus faecalis* (65, 445)
- *Caléndula officinalis*
- Quitosán

9.2 Preparación de Medios de Cultivo

1. Agar Mac. Conkey (BIOXON)

Formula para 1000ml de agua destilada:

➤ Peptona de Caseína	1.500g
➤ Peptona de Gelatina	17.000g
➤ Peptona de Carne	1.500g
➤ Lactosa	10.000g
➤ Sales Biliares	1.500g
➤ Agar	13.500g
➤ Rojo Neutro	0.030g
➤ Cristal Violeta	0.001g

pH final 7.1 +/- 0.2

Método de Preparación:

Suspender 50g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Mezclar bien hasta que se obtenga una suspensión uniforme. Dejar reposar de 10 a 15 minutos. Calentar suavemente agitando frecuentemente y hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

2. Agar Infusión de Cerebro y Corazón

Formula para 1000ml de agua destilada:

➤ Infusión de Cerebro de Ternera	200.0g
➤ Infusión de Corazón de Res	250.0g
➤ Peptona de Gelatina	10.0g
➤ Cloruro de Sodio	5.0g
➤ Fosfato Disódico	2.5g
➤ Dextrosa	2.0g

pH final 7.4 +/- 0.2

Método de preparación:

Disolver 37gramos de material deshidratado en un litro de agua destilada. Para cultivos en sangre agregar 0.5 a 1.0g de agar por litro de medio hidratado y hervir durante un minuto. Distribuir y esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras de presión de vapor) durante 15 o 20 minutos.

3. Agar-Eosina-Azul de Metileno-Lactosa-Sacarosa (EMB) (MERK)

Composición (g por litro):

➤ Peptona de Caseína	10.0
➤ Lactosa	5.0
➤ Sacarosa	5.0
➤ Di-Potasio hidrogeno fosfato	2.0
➤ Eosina Y ₁ amarillenta	0.4
➤ Azul de Metileno	0.065
➤ Agar-Agar	13.5

pH del medio listo para usarse a 37°C 7.1 +/- 0.1

Preparación:

Suspender 36g en un litro de agua recién destilada o completamente desmineralizada dejar remojar durante 15 minutos. Hervir en la olla de presión o baño María hasta completa disolución. Esterilizar en autoclave (15 minutos a 121°C).

4. Agar Manita-sal común-rojo de fenol (Sales Manitol) (MERCK)

Composición (g/litro):

➤ Extracto de Carne	1.0
➤ Peptona especial	10.0
➤ Cloruro de Sodio	75.0
➤ D (-) Manita	10.0
➤ Rojo de Fenol	0.025
➤ Agar-Agar	12.0

pH del medio listo para usarse (a 37°C) 7.4 +/- 0.1

Preparación:

Disolver el contenido del sobre en 1 litro de agua destilada o desionizada. Remojar durante 15 minutos y calentar en baño María hirviente hasta disolución total. Esterilizar en autoclave (15 minutos, 121°C). Vaciar con agitación continua.

5. Base de Agar Sangre (DIBICO)

Formula (gramos por litro de agua destilada):

➤ Agar	15.0
➤ Cloruro de Sodio	5.0
➤ Infusión de Músculo Cardíaco	10.0
➤ Peptona	10.0

pH 7.3 +/- 0.2

Preparación:

Rehidratar 40g del medio en un litro de agua destilada. Reposar 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para disolverlo por completo. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Enfriar aproximadamente a 45°C y agregar de 5 a 10% de sangre de carnero o conejo estéril desfibrinada girando suavemente el matraz para evitar la formación de burbujas homogenizar y vaciar en cajas petri estériles.

10. APENDICE 2

10.1 Pruebas Bioquímicas

A. CATALASA

Fundamento: Determinar la capacidad de una bacteria para desdoblar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, por medio de la enzima catalasa.

Realización e Interpretación:

1. Transferir un inóculo denso del centro de una colonia a un portaobjetos limpio con ayuda de un palillo estéril.
2. Dejar caer una o dos gotas de Peróxido de hidrógeno al 30%
3. La formación de burbujas indica un resultado positivo. La ausencia de burbujas indica un resultado negativo.

B. OXIDASA

Fundamento: Determinar si una bacteria produce la enzima oxidasa intracelular, la cual participa dentro de la cadena respiratoria (Sistema citocromo oxidasa).

Realización e Interpretación:

- 1) Tomar un disco o tira estéril para oxidasa (impregnados con tetrametil-p-fenilendiamina).
- 2) Transferir un inóculo del centro de una colonia al papel o tira con ayuda de un palillo estéril.
- 3) La aparición de un color morado en el sitio de aplicación máximo a los 10 segundos indica un resultado positivo. Si no aparece ningún color o aparece después de los 10 segundos, el resultado es negativo.

C. MOTILIDAD

Fundamento: Determinar si una bacteria tiene la capacidad de desplazarse.

Realización: Se puede evaluar usando medios de cultivo semisólidos en tubo o por medio de una preparación en gota suspendida.

Uso de medios de cultivo semisólidos en tubo:

- Se realiza la siembra con ayuda de un asa de inoculación recta, picando en el centro y abarcando por lo menos 2/3 partes del medio, sacando el asa por el mismo lugar donde entró.
- Incubar por 24 a 48 horas y leer.

Prueba de gota suspendida:

- 1) Sobre un cubreobjetos limpio se colocan cuatro bolitas de plastilina en los extremos.
- 2) En el centro del cubreobjetos se colocan dos o tres asadas de agua destilada estéril.
- 3) Agregar una asada ligera de bacterias tomadas del centro de una colonia.
- 4) Voltear la preparación y colocarla sobre un portaobjetos limpio.
- 5) Colocar en el microscopio óptico y observar a 10x y 40x.
- 6) Observar con detenimiento, fijando la vista en un punto del campo, usando poca luz y moviendo el tornillo micrométrico según se requiera.

Interpretación de resultados:

- ♀ *Movimiento de corrientes*: es una falsa motilidad debida al movimiento de la mesa (**Motilidad negativa**).
- ♀ *Movimiento Browniano*: es una falsa motilidad debida al choque de las moléculas de agua con las bacterias, que se encuentran en suspensión (**Motilidad negativa**).
- ♀ Movimiento en todas direcciones: como cuando se observa un charco con renacuajos, es la única motilidad verdadera (**Motilidad positiva**).

D. OXIDACION / FERMENTACION (OF)

Fundamento: Determinar si una bacteria utiliza un carbohidrato en presencia (Oxidativo) o ausencia de oxígeno (Fermentativo).

Realización e interpretación:

- 1) Inocular dos tubos con medio de OF por medio de picadura con un asa recta.
- 2) Agregar a uno de los tubos aceite mineral estéril.
- 3) Incubar de 24 a 48 horas a 37 C.
- 4) Realizar la lectura conforme al siguiente cuadro:

Tabla 33. Interpretación de la prueba de OF

TUBO ABIERTO	TUBO SELLADO	INTERPRETACIÓN	COMENTARIOS
Amarillo	Verde ó azul	O	Oxidativa
Amarillo	Amarillo	F	Fermentativa facultativa
Verde ó azul	Amarillo	F	Fermentativa estricta
Verde ó azul	Verde ó azul	OF -	Inerte

E. CITRATOS

Fundamento: Determinar la capacidad de una bacteria para utilizar al Citrato como única fuente de carbono y a la sal de amonio como única fuente de nitrógeno.

Realización e Interpretación:

- Siembra de un inóculo liviano por medio de asa bacteriológica* trazando una estría en la superficie.
- Incubación con las tapas flojas, pues la reacción requiere de oxígeno, por 24 - 48hrs a 35 ó 37 C. Puede requerirse una incubación prolongada (hasta 4 días).

- Casos excepcionales incubación a temperatura ambiente por 7 días en casos dudosos a las 48 horas, inoculando un nuevo pico de flauta.
- Un resultado positivo se interpreta por el cambio a un color azul de Prusia oscuro.
- En un resultado negativo el medio permanece de color verde.

NOTA: Resultado positivo aunque no se evidencie cambio de color si existe un crecimiento visible de colonias a lo largo de la estría de inoculación. En este caso confirmar con una incubación adicional otras 24 horas, después de las cuales se desarrollará el cambio de color.

F. SIM Sulfhídrico Indol Motilidad

Fundamento:

S: Determinar si se ha liberado enzimáticamente ácido sulfhídrico (H₂S) gaseoso a partir de los aminoácidos azufrados o del tiosulfato de sodio, para producir una reacción coloreada visible negra en presencia de un sistema indicador de H₂S.

I: Determinar la capacidad de una bacteria para producir indol a partir del triptofano por acción de la enzima triptofanasa.

M: Determinar si una bacteria es capaz de desplazarse por su presencia de flagelos.

Realización e Interpretación:

- Siembra por medio de asa de filamento recto por medio de picadura hasta 0.5 a 1.25 cm del fondo, retirando la aguja siguiendo el trayecto inicial.
- Incubación por 18 a 24 hrs a 35 ó 37 C.

PRUEBAS IMViC

I = Indol

M = Rojo de metilo (MR)

V = Vogues Proskauer (VP)

C = Citratos

Son utilizadas para la identificación rápida de Enterobacterias. Sirven principalmente para diferenciar de manera primaria entre *Escherichia coli* y los grupos *Klebsiella* y *Enterobacter*.

Tabla 34. Identificación por medio de las pruebas de IMViC

	I	M	V	C	
<i>Escherichia coli</i> (Ocasionalmente algunas especies de <i>Proteus</i>)	+	+	-	-	-/+ = Menos del 90% negativas
<i>Klebsiella</i>	-/+	-	+	+	+/- = Menos del 90% positivas
<i>Enterobacter</i>	-	-	+	+	+ = 90% de los aislamientos son positivos.
<i>Salmonella</i>	-	+	-	-	
<i>Shigella</i>	+/-	+	-	-	- = 90 % de los aislamientos son negativos.
<i>Citrobacter</i>	-	+	-	+	
<i>Proteus</i>	d	+	d	+	d = Positiva tardía.

MR – VP MR = Rojo de metilo VP = Voges Proskauer

Fundamento: Evaluar la ruta fermentativa a partir del ácido pirúvico que lleva a cabo la bacteria. Estas rutas son, respectivamente: Ácidos mixtos y 2, 3 – butanediol, que son fermentaciones ácido fórmicas.

Realización e Interpretación: Siembra de uno o dos tubos con caldo MR-VP por medio de asa bacteriológica por agitación. Incubación por 24 a 48 hrs a 37 C. Lectura de MR a 48 hrs y VP a 24 horas. El tiempo de lectura de MR se puede reducir mediante el uso de alícuotas.

11. REFERENCIAS

1. Bedolla, CC, Castañeda, VH., **Métodos de detección de la mastitis bovina.** Revista Electrónica de Veterinaria. Guadalajara, México.
2. Sarán, Dr. Arthur. **Mastitis y Calidad de Leche.** Ed. Intermedica. Buenos Aires, República Argentina. 2000.
3. <http://www.portalechero.com/IMAGES/mastitis.jpg>
4. <http://www.cnmweb.bizland.com/publicaciones/Dr. Aguado.PDF>
5. Aura Scaramelli, Lic., Zuleima González, MV., **Epizootiología y diagnóstico de la mastitis bovina.**, Manual de Ganadería Doble Propósito. 2005.
6. http://www.ucm.es/info/otri/complutecno/imagenes/tec_fuente1_2.jpg
7. Birgersson, B., Jonsson, P. and Holmberg, O., **Species identification and some characteristics of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine udders.** Veterinary Microbiology, 31. 1992.
8. Koneman Elmer, Stephen Allen, et al. (2001). **Diagnóstico microbiológico: Texto y atlas a color.** 5ª ed. Ed. Médica Panamericana. Madrid España.
9. Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. **Veterinary Medicine A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses.** 9th ed. London, GB: WB Saunders Co. 2000.
10. Cordero Sevilla A., González Morales A., Cruz Jiménez G., Licea Vega A., (2005). **Tesis de Licenciatura QFB: Reto Microbiológico de Extractos de Caléndula officinalis con Bacterias Aisladas en Casos de Metritis y Mastitis Bovina.** UNAM FES-C. México DF.
11. Pérez CG, Bedolla CC, Castañeda VH. **Importancia del conteo de células somáticas en la cría sustentable de vacas productoras de leche.** Sustentabilidad. Vol. III, No 1. Universidad de Guadalajara, Jalisco., México. 2005.
12. Charles A. **Ciencia de la leche. Principios de técnica lechera.** Edit. CECSA, México. 1984.
13. Pérez DM. **Manual sobre ganado productor de leche.** Edit. Villicaña S.A., México. 1986.
14. Carrión GM. **Principios básicos para el control de la mastitis y el mejoramiento de la calidad de leche.** Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional-Michoacán, Departamento de Recursos Naturales Programa de Apoyo a la Ganadería Regional. 2001.
15. Medina CM, y Montalvo VH. **El uso de la prueba de conductividad eléctrica y su relación con la prueba de California para mastitis.** CNM. V Congreso Nacional de Control de Mastitis. Aguascalientes, Ags., México. 29-31 de Mayo. 2003.
16. Norberg E, Hogeveen H, Korsgaard IR, Friggens NC, Sloth KHMN, y Lovendahl P. **Electrical Conductivity of Milk: Ability to Predict Mastitis Status.** J. Dairy Sci. 2004.
17. Wolter W, Castañeda H, Kloppert B, y Zschöck M. **Mastitis bovina. Prevención, diagnóstico y tratamiento.** Editorial Universitaria. Universidad de Guadalajara. 2004.
18. Ávila TS. **Producción intensiva de ganado lechero. Anatomía y fisiología de la glándula mamaria.** Edit. Continental. México. 1984.
19. Morresey PR. **Bovine Mastitis.** In: Howard JL, Smith RA, editors. Current Veterinary Therapy 4 Food Animal Practice. Philadelphia, Penn: WB Saunders Co, 563 568. 1999.
20. Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. **Medicina Veterinaria. Mastitis Bovina.** Edit. Mcgraw-hill. 9o Edición. Vol 1. Madrid, España. 2002.
21. Erskine RJ. **Mastitis Control in Dairy Herds.** In: Radostits OM, editor. Herd Health Food Animal Production Medicine. Philadelphia, Penn: WB Saunders Co. 2001.
22. Bedolla CC. **Métodos de detección de la mastitis bovina.** Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Mimeo. 2004.
23. Blowey R, y Edmonson P. **Control de la mastitis en granjas de vacuno de leche.** Acribia. Zaragoza. 1995.
24. Smith BP. **Large Animal Internal Medicine.** St Louis, Missouri: The C. V. Mosby Co. 1990.

25. Báez GJJ. **Estudio epidemiológico de mastitis subclínica bovina en el sector II de Téjaro, Michoacán. (Tesis de licenciatura).** Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Facultad de medicina Veterinaria y Zootecnia. Morelia, Michoacán, México. 2002.
26. DVG, Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft. **Leitlinien zur Bekämpfung der Mastitis als Bestandsproblem.** 5.Ausfl. Verlag DVG e.V., Gießen. 2000.
27. Fernández del Río JA. **Mastitis. Tema V., en: Calidad y eficiencia en la producción de leche.** Manual de procedimientos para la ordeña. Virbac. Departamento técnico. 1997.
28. Philpot WN, y Nickerson SC. **Mastitis: El contra ataque.** Publicado por Surge Internacional. Naperville, IL. U.S.A. 1992.
29. Wolter W, Castañeda H, Kloppert B, y Zschöck M. **Mastitis bovina. Prevención, diagnóstico y tratamiento.** Editorial Universitaria. Universidad de Guadalajara. 2004.
30. www.acupunturaobjetiva.org/acupuntura/herbolaria.htm - 16k
31. Hernández, Alejandro, et-al. **Uso de plantas medicinales en adultos que acuden a una unidad de atención primaria d Panamá.** Archivos de Medicina Familiar y General. Vol 4. Numero 1. 2007.
32. http://es.wikipedia.org/wiki/Medicina_tradicional
33. Juscafresca, Baudillo. **Guía de la flora medicinal.** Edit. AEDOS, Barcelona. España. 1995
34. Lara, O. F. y C. M. Alonso. **Plantas medicinales de México: composición, usos y actividad biológica.** UNAM. México. 1996.
35. <http://www.hierbitas.com/nombrecomun/Calendula.htm>
36. <http://www.plantascurativas.com/plantascurativas.phtml>
37. Farmacopea Homeopática de los estados Unidos Mexicanos. 3ª edición. México 1998.
38. Instituto Nacional Indigenista. **Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana I.** México 1994
39. Rosa M. Raybaudi-Massilia, Robert Solia Fortuna, Olga Martín Beloso. **Uso de agentes antimicrobianos para la conservación de frutas frescas y frescas cortadas.** I Simposio Ibero-Americano de Vegetais Frescos Cortados, San pedro, SP Brasil, Abril 2006.
40. **Plantas que curan.** Enciclopedia de las Plantas Medicinales. Planeta D'Agostini. Vol. 11. Barcelona, España. 1999.
41. Hernández Zamora S., Cruz Jiménez G., Licea Vega A., Miranda Castro S., (2008). **Tesis de Licenciatura QFB: Efecto sinérgico y/o antagónico de Quitosán y extracto de *Caléndula officinalis* en bacterias comúnmente asociadas a infecciones de heridas en humanos.** UNAM FES-C. México DF.
42. Lárez Velásquez, Cristóbal. **Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro.** Avances en Química, 1(2), 15-21. 2006.
43. Carhuapoma, Wilson et al. **Caracterización de hidrogeles de quitosano-alcohol polivinílico obtenidos por radiación gamma.** Revista Iberoamericana de Polímeros. Volumen 6(4), 2005.
44. Lárez Velásquez Cristóbal. **Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica.** Revista UDO Agrícola 8 (1): 1-22. 2008.
45. www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar
46. Miranda CSP. **Evaluación de la actividad antibacteriana de Quitosán, caracterizado física y químicamente.** Tesis de Maestría, 2000.
47. Sudarshan, VR, JG, Hoover and Knorr. **Antibacterial action of chitosan,** Food Biotechnology. 1992.
48. XIAO FEI LIU, YUN LIN GUAN, DONG ZHI YANG, ZHI LI, KANG DE YAO. Research Institute of Polymeric Materials, Tianjin University, Tianjin 300072, People's Republic of China. **Antibacterial Action of Chitosan and Carboxymethylated Chitosan.** Journal of Applied Polymer Science, Vol. 79, 1324-1335 (2001)_© 2000 John Wiley & Sons, Inc.
49. Entsar I. Rabea,† Mohamed E.-T. Badawy,† Christian V. Stevens,*,‡ Guy Smagghé,† and Walter Steurbaut†. **Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action.** Department of Crop Protection and Department of Organic Chemistry, Faculty of Agricultural and Applied Biological Sciences, Ghent University, Coupure Links 653, B-9000 Gent, Belgium. Published by the American Chemical Society. Biomacromoléculas. Volume 4, Number 6. 2003.

50. Biochemicals Organic Compounds for Research and Diagnostic Reagents. Sigma Chemical Company. St. Loui. 1994.
51. Mosmann, T. 1983. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** J. Immunol. Meth.
52. Gerlier, D., Tomaste, N. 1986. **Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation.** J. Immunol. Meth.
53. http://www.wikipedia.org/wiki/Microscopio_electrónico_de_transmisión - 22k
54. González Gallardo Sofia, et al. **Guía de Microscopia Electrónica.** UNAM FESC. 2003. Mexico DF. FES C Cuautitlan Izcalli Edo. De México.
55. http://www.criba.edu.ar/cribabb/servicios/secegrin/microscopia/apunte_col.htm - 18k
56. <http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/celular/microelectrans.htm> - 32k -
57. Herrera Haro, Dr. José G., **Sistema de producción de leche en granjas bovinas familiares.**, SAGARPA.
58. Romero, A. T. 2004. **Situación actual de la mastitis en México.** Dpto. Producción Animal, FMVZ-UNAM. México D. F.
59. Bedolla, CC, Ponce de León, MER. (2008). **Economic causalties inflicted by the bovine mastitis in the milk industry.** Revista electrónica de Veterinaria. Volumen IX Número 4.
60. Hamburger, S. Adlera, D. Baumann, A. Forgb, B. Weinreich. (2003). **Preparative purification of the major anti-inflammatory triterpenoid esters from Marigold (*Calendula officinalis*).** Fitoterapia 74, 328–338.
61. Liu, H.; Y. Du, X. Wang and L. Sun. 2004. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. International Journal of Food Microbiology 95: 147– 155.
62. Chung, Y. C. and C. Y. Chen. 2008. **Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan.** Bioresource Technology 99: 2806-2814.
63. Wolfgang Joklik, Willet Hilda, et al. (1998). **Zinsser Microbiología.** Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires Argentina.
64. Echeverría Guercenea Juan Miguel. (2000). ***Streptococo uberis*: Un problema creciente ¿Cómo controlarlo?** Boehringer Inhelheim, División Veterinaria.
65. Brooks Geo, Butel Janet, et al. (2002). **Microbiología médica de Jawets, Melnick y Adelberg.** Ed. Manual Moderno. México DF.
66. Lastra Valdés Humberto y Piquet García Rosario, (1999). ***Caléndula officinalis*.** Revista Cubana de Farmacia. 33(3):188-94
67. García. A. H. **Pruebas de actividad antimicrobiana de Quitosán.** 1999. Tesis de Licenciatura Q.F.B. FESC, UNAM.
68. Helander, I. M., et al. 2001. **Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria.** International Journal of Food Microbiology 71.