



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CUAUTITLÁN

**“DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DEL
EXTRACTO DE *Melissa officinalis* EN BACTERIAS GRAM
POSITIVO Y GRAM NEGATIVO DE INTERÉS MÉDICO”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

BELEM GUZMÁN ORTEGA

ASESORES: M.V.Z GERARDO CRUZ JIMÉNEZ

M.V.Z JOSÉ ANTONIO LICEA VEGA

M en C. SOFÍA GONZÁLEZ GALLARDO



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE

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 :

"Determinación del efecto antimicrobiano del extracto de Melissa officinalis en bacterias gram positivo y gram negativo de interés médico"

que presenta la pasante: Belem Guzmán Ortega
con número de cuenta: 40200662-2 para obtener el título de :
Química Farmacéutica Biólogo

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 16 de Marzo de 2010

PRESIDENTE	<u>MVZ. Gerardo Cruz Jiménez</u>	
VOCAL	<u>D. Mario A. Morales Delgado</u>	
SECRETARIO	<u>Dra. Alma Lucila Núñez del Arco</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>MG. Ma. Guadalupe Avilés Robles</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>OPB. Jonathan Pablo Paradas Juárez</u>	

AGRADECIMIENTOS

Al profesor M.V.Z Gerardo Cruz Jiménez por haberme brindado la oportunidad de realizar la tesis bajo su supervisión, gracias por su comprensión, sus consejos, su apoyo, su entusiasmo y sobre todo por su paciencia.

Al profesor M.V.Z José Antonio Licea Vega por la colaboración en la tesis.

A la profesora M. en C. Sofía Gonzales Gallardo por todas las atenciones y facilidades prestadas para este proyecto, por su amistad y apoyo incondicional.

A todos los que formamos parte del Laboratorio de Microbiología de la Unidad de Posgrado: la señora Erika, Yolanda, Rubén, Diana, Gaby, Bere, Verónica y en especial a Ivonne, Lulú, Alejandra, Ulises gracias por su valiosa amistad y por darme un ambiente de trabajo agradable dentro y fuera del laboratorio.

A mis mejores amigos: Miriam, Giovanna, Pau, Eli, Laura, Jorge, Ulises, Gabriel, Ernesto con quienes he compartido muchos momentos inolvidables, y que espero que sigamos unidos. A ustedes que me han brindado su amistad y apoyo desinteresadamente, los quiero mucho.

A ti Alejandro Cortes Juárez que eres una persona muy especial, por brindarme tu cariño, amistad, comprensión, consejos y por dedicarme parte de tu tiempo. Gracias por tu apoyo y por estar en cada momento que te necesitaba, recuerda que te quiero mucho.

Agradezco de todo corazón a dios y a mis Padres que sin escatimar esfuerzo alguno, sacrificaron gran parte de su vida para educarme. Jamás encontrare la forma de agradecer el cariño, comprensión y apoyo brindado en los momentos buenos y malos de mi vida, hago este triunfo compartido, sólo esperando que comprendan que mis ideales y esfuerzos son inspirados en cada uno de ustedes. Los quiero mucho.

A ti Belén y Olivia que más que mis primas son como mis hermanas, gracias por su verdadera amistad, cariño y por estar en los momentos más difíciles de mi vida, las quiero mucho.



EXTRACTOS SIGMA

A EXTRACTOS SIGMA Empresa mexicana dedicada a elaborar, desarrollar y comercializar extractos de origen natural, gracias por su apoyo y colaboración en este proyecto.

DEDICATORIAS

A MI MAMÁ:

Te dedico este trabajo a ti por ser el ser más maravilloso del mundo, gracias por tu comprensión, por guiar mi camino y estar junto a mi en los momentos más difíciles. Por todo tu cariño y sobre todo tu alegría, por ser una gran amiga y apoyarme siempre y sobre todo por ser mi mamá. Te quiero mucho

A MI PAPA:

Te dedico este trabajo a ti por ser un amigo y apoyarme en mi camino en todos los aspectos, por tu apoyo en un ciclo más en mi preparación. Por todas tus sacrificios, platicas y consejos, jamás habrá palabras para agradecerte todo lo que me has brindado a lo largo de mi vida, gracias y recuerda que te quiero mucho.

A MI HERMANO:

Por ayudarme y aguantarme, aunque a veces no te entienda y estemos peleando, eres una persona que admiro mucho por como enfrentas la vida día a día aún a pesar de tu enfermedad, eso me hace quererte mucho más.



ÍNDICE GENERAL

	Pág.
Índice General.....	I
Índice de Figuras.....	IV
Índice de Tablas.....	V
Índice de Gráficas.....	VI
Lista de Abreviaturas.....	VII
Resumen.....	1
1. Introducción.....	2
1.1 Antecedente histórico de enfermedades infecciosas.....	2
1.2 Resistencia Bacteriana.....	4
1.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	5
1.3.1 Hábitat.....	5
1.3.2 Características generales.....	5
1.3.3 Importancia médica y epidemiológica.....	5
1.4 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	8
1.4.1 Hábitat.....	8
1.4.2 Importancia médica y epidemiológica.....	8
1.5 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
1.5.1 Hábitat.....	9
1.5.2 Características generales.....	10
1.5.3 Importancia médica y epidemiológica.....	10
1.6 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	12
1.6.1 Hábitat.....	12
1.6.2 Características generales.....	12
1.6.3 Importancia médica y epidemiológica.....	12
1.7 <i>Salmonella typhi</i>	13
1.7.1 Hábitat.....	13
1.7.2 Características generales.....	13
1.7.3 Importancia médica y epidemiológica.....	14
1.8 <i>Proteus mirabilis</i>	15
1.8.1 Hábitat.....	15
1.8.2 Características generales.....	15
1.8.3 Importancia médica y epidemiológica.....	15
1.9 <i>Escherichia coli</i>	16
1.9.1 Hábitat.....	16
1.9.2 Características generales.....	16
1.9.3 Enfermedades clínicas.....	17
1.9.4 Clasificación de cepas de <i>E. coli</i> que causan diarrea.....	18
1.9.5 Importancia médica y epidemiológica.....	18
1.9.5.1 <i>E. coli</i> enterotoxigénica.....	18
1.9.5.2 <i>E. coli</i> enterohemorrágica.....	18
1.9.5.3 <i>E. coli</i> enteroinvasiva.....	19
1.9.5.4 <i>E. coli</i> enteropatógena.....	19
1.10 <i>Melissa officinalis</i>	21
1.10.1 Nombre científico.....	21
1.10.2 Sinónimos.....	21



1.10.3 Distribución geográfica.....	21
1.10.4 Recolección.....	21
1.10.5 Descripción botánica.....	21
1.10.6 Acción farmacológica.....	22
1.10.7 Formas de uso.....	22
1.10.8 Composición química.....	23
1.11 Microscopia Electrónica de transmisión.....	24
1.12 Justificación.....	25
1.13 Hipótesis.....	25
2. Objetivos.....	26
2.1 General.....	26
2.2 Particulares.....	26
3. Material y equipo de trabajo.....	27
4. Diagrama de Trabajo.....	30
5. Metodología.....	31
5.1 Obtención del extracto de <i>Melissa officinalis</i>	31
5.2 Preparación del extracto de <i>Melissa officinalis</i>	31
5.3 Prueba de esterilidad de la solución de trabajo.....	31
5.4 Identificación de bacterias.....	31
5.5 Prueba cualitativa.....	32
5.6 Estandarización de cada una de las bacterias a trabajar.....	32
5.7 Ensayo en microplaca.....	32
5.8 Método de MTT (bromuro de (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio).....	35
5.9 Determinación de la concentración mínima inhibitoria.....	36
5.10 Determinación del efecto bactericida/bacteriostático.....	36
5.11 Microscopia Electrónica de Transmisión.....	37
5.11.1 Preparación de las bacterias.....	37
5.11.2 Fijación.....	37
5.11.3 Tinción negativa.....	37
6. Resultados.....	38
6.1 Identificación de bacterias.....	38
6.2 Extracto de <i>Melissa officinalis</i>	39
6.3 Prueba cualitativa.....	40
6.4 Efecto del extracto de <i>Melissa officinalis</i> en <i>Staphylococcus aureus</i> por el Método de Mosmann.....	41
6.5 Efecto del extracto de <i>Melissa officinalis</i> en <i>Staphylococcus epidermidis</i> por el Método de Mosmann.....	42
6.6 Efecto del extracto de <i>Melissa officinalis</i> en <i>Escherichia coli</i> por el Método de Mosmann.....	43
6.7 Efecto del extracto de <i>Melissa officinalis</i> en <i>Salmonella typhi</i> por el Método de Mosmann.....	44
6.8 Efecto del extracto de <i>Melissa officinalis</i> en <i>Klebsiella pneumoniae</i>	45
6.9 Efecto del extracto de <i>Melissa officinalis</i> en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> por el Método de Mosmann.....	46
6.10 Efecto del extracto de <i>Melissa officinalis</i> en <i>Proteus mirabilis</i> por el Método de Mosmann.....	47
6.11 Prueba bactericida/bacteriostático.....	48



6.12 Resultados de las observaciones obtenidas en Microscopio Electrónico de Transmisión.....	50
7. Discusión de Resultados.....	52
8. Conclusiones.....	29
9. Apéndices.....	60
10. Referencias.....	64



ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. No		Pág.
1	Hojas de <i>Melissa officinalis</i>	21
2	Compuestos identificados en <i>Melissa officinalis</i>	23
3	Microscopio Electrónico de Transmisión.....	24
4	Microplaca de 96 pozos mostrando las diluciones del extracto de <i>Melissa officinalis</i>	33
5	Esquema del sistema doble de diluciones.....	34
6	Microplaca mostrando las microdiluciones del extracto de <i>Melissa officinalis</i> evidenciando la actividad antibacteriana, lectura con el reactivo MTT.....	35
7	Placa de agar BHI mostrando como se siembra cada una de las diluciones de la microplaca.....	36
8	Prueba de esterilidad de <i>Melissa officinalis</i> en donde se observa que no hay ningún tipo de crecimiento después de 24-48 hrs de incubación a 37°C.....	39
9	Zona de inhibición del crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> por el extracto de <i>Melissa officinalis</i>	40
10	Ensayo bactericida/bacteriostático de <i>Staphylococcus epidermidis</i> en agar BHI. 1-9: Diluciones de extracto, C+: positivo, C-: control negativo. Se observa el efecto bacteriostático, al presentarse crecimiento de la bacteria ya que al no estar en presencia del extracto este nuevamente vuelve a crecer.....	49
11	Ensayo bactericida/bacteriostático de <i>Escherichia coli</i> en agar BHI. 1-9: Diluciones de extracto, C+: positivo, C-: control negativo. Se observa el efecto bacteriostático, al presentarse crecimiento de la bacteria ya que al no estar en presencia del extracto este nuevamente vuelve a crecer.....	49
12	Microfotografía electrónica de transmisión con tinción negativa de <i>Staphylococcus aureus</i> , control positivo a 10 000 magnificaciones, se puede observar a las bacterias agrupadas en racimos en donde los cocos tienen una morfología normal, bordes bien definidos y tamaño uniforme.....	50
13	Microfotografía electrónica de transmisión con tinción negativa de <i>Staphylococcus aureus</i> , tratada con el extracto de <i>Melissa officinalis</i> a 10 000 magnificaciones, en donde se puede observar que hay deformación de la pared celular.....	50
14	Microfotografía electrónica de transmisión con tinción negativa de <i>Klebsiella pneumoniae</i> , control positivo a 10 000 magnificaciones, se puede observar un bacilo con estructura morfológica bien definida.....	51
15	Microfotografía electrónica de transmisión con tinción negativa de <i>Klebsiella pneumoniae</i> tratada con el extracto de <i>Melissa officinalis</i> a 10 000 magnificaciones, en donde se puede observar que no hay ningún efecto por parte del extracto, ya que se tiene una estructura bacilar típica de las bacterias.....	51
16	Reducción de la sal de tetrazolium a formazan.....	55



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No		Pág.
1	Promedio de absorbancias obtenidas en la microplaca por el Método de Mosmann.....	41
2	Promedio de absorbancias obtenidas en la microplaca por el Método de Mosmann.....	42
3	Promedio de absorbancias obtenidas en la microplaca por el Método de Mosmann.....	43
4	Promedio de absorbancias obtenidas en la microplaca por el Método de Mosmann.....	44
5	Promedio de absorbancias obtenidas en la microplaca por el Método de Mosmann.....	45
6	Promedio de absorbancias obtenidas en la microplaca por el Método de Mosmann.....	46
7	Promedio de absorbancias obtenidas en la microplaca por el Método de Mosmann.....	47
8	Efecto bactericida/bacteriostático del extracto de <i>Melissa officinalis</i>	48
9	Pruebas realizadas para la validación de <i>S. aureus</i>	62
10	Pruebas realizadas para la validación de <i>S. epidermidis</i>	62
11	Pruebas realizadas para la validación de bacterias gram negativo.....	63



ÍNDICE DE GRAFICAS

Gráfica No		Pág.
1	Porcentaje de aislamiento de bacterias Gram + y Gram – aisladas de siete muestras clínicas.....	38
2	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del extracto de <i>Melissa officinalis</i> en <i>Staphylococcus aureus</i> a diferentes concentraciones. Obsérvese que a 72.2, 36.1, 18.05 y 9.025 mg/ml el crecimiento es inhibido por el extracto.....	41
3	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del extracto de <i>Melissa officinalis</i> en <i>Staphylococcus epidermidis</i> a diferentes concentraciones. Obsérvese que a 72.2, 36.1, 18.05 y 9.025 mg/ml el crecimiento es inhibido por el extracto.....	42
4	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del extracto de <i>Melissa officinalis</i> en <i>Escherichia coli</i> a diferentes concentraciones. Obsérvese que a 72.2, 36.1 y 18.05 mg/ml el crecimiento es inhibido por el extracto.....	43
5	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del extracto de <i>Melissa officinalis</i> en <i>Salmonella typhi</i> a diferentes concentraciones. Obsérvese que a 72.2, 36.1 y 18.05 mg/ml el crecimiento es inhibido por el extracto.....	44
6	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del extracto de <i>Melissa officinalis</i> en <i>Klebsiella pneumoniae</i> a diferentes concentraciones. Se puede observar que no hay inhibición por parte del extracto.....	45
7	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del extracto de <i>Melissa officinalis</i> en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a diferentes concentraciones. Se puede observar que no hay inhibición por parte del extracto.....	46
8	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del extracto de <i>Melissa officinalis</i> en <i>Proteus mirabilis</i> a diferentes concentraciones. Se puede observar que no hay inhibición por parte del extracto.....	47



LISTA DE ABREVIATURAS

BHI	Infusión Cerebro Corazón
° C	Grados centígrados
CA-MRSA	MRSA adquirida en la comunidad
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
DMSO	Dimetil-sulfoxido
EUA	Estados Unidos de América
ITU	Infecciones del Tracto urinario
MET	Microscopia Electrónica de Transmisión
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Meticilina Resistente
MTT	Bromuro de (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio)
mg	miligramos
ml	mililitros
µl	microlitros
rpm	Revoluciones por minuto
UFC	Unidades formadoras de Colonias
XTT	Sal de tetrazolio 2,3 bis(2 metoxi-4-nitro-5-sulfofenil-5- [(fenilamini)carbonil] 2H hidroxil de tetrazolio.



RESUMEN

La medicina tradicional es una fuente importante de productos biológicos para el tratamiento de enfermedades en países en vías de desarrollo. México posee un rico patrimonio de plantas curativas, es por ello que usan las plantas o sus componentes para curar varias enfermedades tales como infecciones del tracto urinario, bronquitis, diarrea, enfermedades parasitarias, entre otras. Por otro lado los antibióticos han reducido dramáticamente muchas enfermedades infecciosas, sin embargo aún existen muchos problemas sin resolver debido a la aparición de bacterias resistentes a antibióticos.

En el presente estudio se evaluó la actividad antimicrobiana del extracto de *Melissa officinalis* en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus mirabilis*. Los ensayos consistieron en enfrentar a las bacterias a diferentes concentraciones del extracto. Para esta prueba se utilizó la técnica de microdilución en caldo evidenciada por el método de Mosmann para así determinar la Concentración Mínima Inhibitoria.

El extracto fue esterilizado por filtración, el cual se llevo a sequedad total, obteniéndose la materia seca. Éste se disolvió con DMSO y solución salina fisiológica obteniéndose una concentración de trabajo de 72.2 mg/ml. Las bacterias fueron ensayadas en una microplaca de 96 pozos con el extracto, se sembraron 10 μ l tomados de cada pozo para determinar el efecto bactericida-bacteriostático. Finalmente el efecto producido en las bacterias tratadas con el extracto fue evidenciado mediante Microscopia Electrónica de Transmisión.

Los resultados obtenidos nos muestran que de las 7 bacterias estudiadas solo cuatro de ellas resultaron sensibles al extracto. Las Concentraciones Mínimas Inhibitorias para *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* fue de 9.025 mg/ml y para *Escherichia coli* y *Salmonella typhi* es de 18.05 mg/ml, estas presentaron mayor resistencia. Las únicas bacterias en donde el extracto no tuvo ningún efecto fue: *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*. Así mismo se presentó un efecto bacteriostático en las cuatro bacterias que resultaron sensibles al extracto. De las bacterias utilizadas, solo a dos de ellas se le realizó la Microscopia Electrónica de Transmisión, donde se observaron las alteraciones producidas por el extracto de *Melissa officinalis*.



1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedente Histórico de Enfermedades Infecciosas

El interés del hombre sobre la salud ha existido desde épocas antiguas. El estudio de las enfermedades como fenómenos poblacionales es casi tan antiguo como la escritura, las primeras descripciones de padecimientos que afectan a poblaciones enteras se refieren a enfermedades de naturaleza infecciosa. El papiro Ebers, es probablemente el texto en el que se hace la más antigua referencia a un padecimiento colectivo, también hay registros en los libros sagrados, como la Biblia y el Corán que adicionalmente contiene las primeras normas para prevenir las enfermedades contagiosas.

En solo 20 años se descubre la causa de 25 enfermedades infecciosas, algunas tan importantes como la tuberculosis, el carbunco, el cólera y la fiebre tifoidea o la peste que causaban estragos en aquella época.²⁰

La peste negra, gran epidemia que desde 1346 a 1361 azotó a casi todo el Continente Europeo. Esto induce a pensar que la epidemia procedía de Asia. A lo largo de la historia se conocen cuatro pandemias: la de Justiniano (540-590 D.C), la peste negra (1346-1361), la Gran Plaga en la década de 1660 y una pandemia que inició en Asia en 1855.¹²

En 1817 se inició la primera pandemia del cólera, la cual afectó a países de Asia, África y Europa.⁴² Desde 1961 la enfermedad se ha propagado de Indonesia; a través de casi toda Asia, Europa, África, a la Península Ibérica y en 1973 a Italia.⁶⁷ México padeció tres importantes epidemias de cólera en el siglo XIX: 1833, 1850 y 1882. La de 1833 fue la más devastadora y la que más se ha estudiado.⁶⁷

Desde las civilizaciones antiguas se tienen noticias de la existencia de la tuberculosis. Parece que haya sido una enfermedad que hubiese nacido aparentemente en un principio con la formación de las primitivas comunidades sociales. Se conocen vestigios de su ataque maligno en edades tan remotas como las de períodos neolíticos encontrados en huesos de procedencia europea que se fechan hacia 8000 años A.C.

También aparecen en culturas egipcias, así como en cerámicas muy representativas encontradas en el Nuevo Mundo y continúa causando estragos, a pesar de encontramos en el siglo XXI.¹⁵



Históricamente, la lepra se padecía ya en las antiguas civilizaciones de Egipto y de la India, muchos años antes del nacimiento de Cristo. Se difundió desde su probable zona de origen, en el Valle de la India hasta el Mediterráneo y regiones del norte de África. A Europa la trajeron los ejércitos romanos. Precisamente el extraordinario incremento de leproserías que se dio entre comienzos del siglo XII y mediados del XIII ha llevado a pensar que la lepra se convirtió por entonces en la enfermedad más característica.¹⁵

El carbunco también conocido como ántrax producido por el microorganismo *Bacillus anthracis* es una de las grandes enfermedades de la Antigüedad. Se cree que fue una epidemia de Carbunco en animales y humanos respectivamente la causa de la quinta y sexta plaga mencionada en el libro Éxodo 9:9 de la Biblia.³⁴

Hipócrates hace una de las primeras descripciones científicas de la infección gonocócica. Los primeros informes acerca de la sífilis se remontan al Renacimiento. En 1530 Girolamo Fracastoro dio el término "Syphilus". Como primera fruta del Nuevo Mundo se extendió como la pólvora por Europa a fines del siglo XV. Desde principios del siglo XVI se convirtió en un azote para la humanidad.¹² Históricamente las enfermedades infecciosas han afectado a la humanidad por cientos de años, cambiando la cultura de las poblaciones y causando estragos. Además aparecen nuevos problemas como la resistencia a los antimicrobianos.²⁰



1.2 Resistencia Bacteriana

Es el mecanismo por el cual la bacteria puede disminuir la acción de los agentes antimicrobianos.²⁵ Las bacterias, por su tremenda capacidad de adaptación, pueden desarrollar mecanismos que inhiban a los antibióticos.²³ Existen dos tipos:

- Natural: Es aquella programada en el genoma bacteriano.²⁵
- Adquirida: Es aquella debida a la modificación de la carga genética de la bacteria y puede aparecer por mutación cromosómica o por transferencia genética.²³

Las bacterias han desarrollado varios mecanismos para resistir la acción de los antibióticos, fundamentalmente son tres:

- Destrucción e inactivación del antibiótico: Se realiza mediante la producción de enzimas que inactivan el antibiótico; por ejemplo las betalactamasas, eritromicina estereasa, enzimas modificadoras de aminoglucósidos, etc. En los gram positivos suelen ser plasmídicas, inducibles y extracelulares, en las gram negativos son de origen plasmídico o por transposones.²³
- Barreras de permeabilidad: Las bacterias producen mutaciones en las porinas de la pared que impiden la entrada de ciertos antibióticos o alteran los sistemas de transporte. En otras ocasiones pueden provocar la salida del antibiótico por un mecanismo de expulsión activa, impidiendo que se acumule la cantidad suficiente para que actúe eficazmente.²³
- Alteración por parte de la bacteria de su punto diana: Se modifican algunos sitios específicos de la anatomía celular, como la pared, subunidad 50s, 30s ribosomales, etc.²³



1.3 *Staphylococcus aureus*

1.3.1 Hábitat

Los hábitats más comunes de *S. aureus* son el tracto respiratorio superior, especialmente la nariz, la garganta y la superficie de la piel, formando parte de la flora normal en muchos individuos, incluyendo pacientes y personal de hospitales. La frecuencia de colonización es más usual en el medio hospitalario, especialmente en pacientes sometidos a hemodiálisis, diabéticos tipo 1, pacientes con lesiones cutáneas y sujetos infectados con VIH.⁴⁷

1.3.2 Características generales

Es un coco Gram positivo, no móvil que mide de 0.8 a 1 μm de diámetro. Puede encontrarse solo, en pares, en cadenas cortas o en racimos. Es anaerobio facultativo, pero crece mejor en condiciones aerobias. El microorganismo produce catalasa, coagulasa y crece rápidamente en agar sangre. Produce un típico pigmento amarillo y muchas cepas producen hemólisis a las 24-36 hrs.^{11,40}

1.3.3 Importancia médica y epidemiológica

Staphylococcus aureus es un microorganismo de gran importancia médica. Desde hace muchos años se le ha reconocido como uno de los principales patógenos para el humano. Posee un alto grado de patogenicidad y es responsable de una amplia gama de enfermedades.^{11, 40} Es causante de infecciones respiratorias como neumonía, infecciones del tracto urinario, lesiones superficiales de la piel, abscesos subcutáneos, infecciones del sistema nervioso central, endocarditis, osteomielitis, produce síndrome del shock tóxico, síndrome de piel escaldada, septicemia y es la causa principal de infecciones nosocomiales.^{11,40}

Puede ser llevado por gente normal en una variedad de sitios del cuerpo sin presentar enfermedad. Es un agente causal de infecciones intrahospitalarias y adquiridas en la comunidad.⁴⁰



Estudios revelan que del 30-50% es transportado por personas fuera de un ámbito hospitalario y la tasa más alta es en personal de enfermería.⁴⁰

Estudios han demostrado que las personas pueden transportarlo intermitentemente o persistentemente, estos últimos son más comunes en niños, solo el 10% o 20% de adultos normales son portadores crónicos, no todos estos desarrollan lesiones por *Staphylococcus aureus* o ninguna de las otras enfermedades.⁴⁰

Las infecciones nosocomiales son un problema de salud pública, es de gran trascendencia económica y social. Son de importancia clínica y epidemiológica debido a que presentan altas tasas de mortalidad y morbilidad.¹⁰ Las infecciones nosocomiales se definen como aquellas infecciones que no estaban presentes ni en periodo de incubación, al momento en que el paciente ingresa al hospital. En EUA se reporta una incidencia promedio del 3-5 %.¹¹ El área hospitalaria con mayor frecuencia de infecciones nosocomiales es la Unidad de Terapia Intensiva. Las infecciones más frecuentes son en vías urinarias, seguidas por las bacteriemias, neumonías y de herida quirúrgica.¹¹

En México, la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica notificó que los porcentajes de mortalidad entre pacientes infectados con *S. aureus* varían entre 5 y 70 %. Con datos provenientes de hospitales generales, pediátricos, universitarios y de especialidades, esta misma red reportó que en el periodo de 1997-2003, *S. aureus* ocupó el tercer lugar de morbilidad y el cuarto en mortalidad. Un hospital Pediátrico de tercer nivel en México, registro un franco predominio de *S. aureus* relacionado con bacteriemias nosocomiales.⁸⁰

Una revisión retrospectiva de 23 años, sobre infecciones intrahospitalarias en un hospital pediátrico en Guadalajara, reconoce que actualmente el género *Staphylococcus* tiene una prevalencia del 36%. En México, diversos estudios de vigilancia de las infecciones nosocomiales indicaron que de 8.3 a 36% de esas infecciones fueron atribuibles a *S. aureus*. Dentro de los factores que afecta el éxito de la transmisión nosocomial de *S. aureus* se encuentran las características fenotípicas y genotípicas de las cepas, factores del huésped, esquemas de tratamiento antimicrobiano y medidas de control de las infecciones implementadas en las instituciones.⁸⁰

En Estados Unidos de América los Centros de prevención y control de enfermedades, han realizado recientemente un estudio nacional para determinar la prevalencia y colonización de *S. aureus* y cepas MRSA en la población.



En este estudio se encontró que el 32.4% de la población es portadora de *S. aureus* y el 0.8% esta colonizado con cepas MRSA. Se estima que 89.4 millones de estadounidenses presentan *S. aureus* y 2.3 millones son portadores de cepas MRSA.

La prevalencia de colonización con *S. aureus* es mayor entre la población de 6 a 11 años de edad. La colonización con cepas MRSA es mayor en mujeres de 60 años.¹¹ En este estudio no se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la colonización con *S. aureus* o cepas MRSA con otros factores epidemiológicos como pobreza, educación, nacimiento fuera de los EUA, servicio militar, diabetes y condición dermatológica.¹¹

En México existe un número limitado de estudios sobre la prevalencia de cepas MRSA. De acuerdo a algunos estudios realizados, se ha incrementado rápidamente en los hospitales durante los últimos años. Se estima que ha cambiado del 7% al 30%. En 1993, en el Hospital General de León Guanajuato se identificó una resistencia a la meticilina del 24%. Así mismo, en el Hospital civil de Guadalajara, se obtuvieron resultados del 7% en 1989 al 20% en 1998.¹¹

Hasta hace pocos años las infecciones por *S. aureus* meticilina resistentes generalmente se adquirían dentro de los hospitales. Sin embargo a finales de los años 90's, emergieron cepas MRSA en adultos y niños sanos en las comunidades. La prevalencia de estas infecciones ha aumentado significativamente en los últimos años. La adquisición de estas cepas se realiza fuera de los tradicionales factores de riesgo de las cepas MRSA hospitalarias, son susceptibles a pocos antibióticos. Las cepas de *S. aureus* que causan estas infecciones se han denominado cepas MRSA adquiridas en la comunidad (CA-MRSA).^{11, 58}

La prevalencia de cepas CA-MRSA en personas sin factores de riesgo nosocomial que viven en la comunidad está en aumento. En el Hospital General de San Francisco y clínicas asociadas, el porcentaje de CA-MRSA aumentó de 7% en 1993 a 29% en 1999. En otras poblaciones como Atlanta, Baltimore y Minnesota entre 2001 y 2002 se tuvo un aumento de 8% al 20%. Un estudio en niños realizado en Texas reporta un aumento de 14 veces en infecciones causadas por CA-MRSA en 2002, en comparación con años anteriores. En Los Ángeles se han encontrado infecciones en la piel de recién nacidos con cepas CA-MRSA que han variado del 29% en 1997 al 74% en 2003.¹¹



1.4 *Staphylococcus epidermidis*

1.4.1 Hábitat

Todos los seres humanos transportan el microorganismo como una parte de la flora normal de la piel. Los sitios más frecuentes incluyen cabeza, nariz, axilas, brazos, y piernas. Por consiguiente el hombre sirve como una fuente exógena de contaminación para la infección de otros y como fuente endógena.

1.4.2 Importancia médica y epidemiológica

Casi todas las infecciones causadas por *S. epidermidis* son adquiridas en el hospital como resultado de la contaminación de un sitio quirúrgico por los microorganismos provenientes de la piel del paciente o de su nasofaringe o del personal del hospital. Por lo general los aislamientos de *S. epidermidis* asociados a hospitales son resistentes a múltiples antibióticos, incluidos la meticilina y la penicilina.

Es un microorganismo de baja virulencia, pero cuando las defensas están debilitadas puede causar infecciones serias que con frecuencia ponen en peligro la vida, por lo tanto se le considera oportunista y es reconocido como un verdadero "agente patógeno".⁴ Tiene una predilección peculiar por los cuerpos extraños.³⁷ Es el principal patógeno en infecciones relacionadas con catéter, bacteriemias nosocomiales, tracto urinario, heridas quirúrgicas, infecciones relacionadas con diálisis peritoneal, infecciones de prótesis, infecciones de válvulas cardíacas artificiales, marcapasos.⁶³

Existe una estrecha relación entre los dispositivos médicos implantados y la colonización de estos por los estafilococos coagulasa negativos. Las infecciones causadas por *Staphylococcus epidermidis* a menudo son persistentes y hay recaídas.³⁷

Los estafilococos coagulasa negativos son los organismo causantes de 48-67% de complicaciones infecciosas, estos organismo también son responsables del 50-70% de las infecciones relacionadas con catéter. La alta tasa de cateterismo intravascular entre los pacientes hospitalizados pone de relieve el impacto clínico de las infecciones.³⁷



Los estafilococos coagulasa negativos también son responsables de una elevada proporción de infecciones de prótesis de válvulas cardíacas (40-50%), infecciones en el reemplazo de articulaciones (20-50%). La prevalencia de cepas de *S. epidermidis* resistentes a la meticilina y a la vancomicina en esta especie es más aún complicada. Aproximadamente el 55-75% de las cepas nosocomiales es resistente a la meticilina.⁶³ La aparición de cepas con mayor capacidad de colonizar estos biomateriales como las prótesis de las válvulas cardíacas tiene implicaciones importantes para el desarrollo y la aplicación de estrategias terapéuticas y medidas eficaces de control de la infección.³⁷

En un estudio realizado en un Hospital de Alta Especialidad en el estado de Tabasco, México, encontraron en relación a las infecciones nosocomiales que dentro de la bacteriemia relacionada al tratamiento intravenoso la bacteria que más predominó fue *Pseudomonas aeruginosa* junto con *Staphylococcus epidermidis* en un 22.58% y la infección relacionada con catéter fue de 11.76%.⁶⁹ Los *Staphylococcus coagulasa negativo* pocas veces causa Infección del tracto urinario. La mayoría de los casos se trata de contaminaciones o bacteriurias asintomáticas y ocurren en pacientes hospitalizados, así como los que han sufrido maniobras exploratorias, cirugías recientes, sondas permanentes, etc. El más frecuente es *Staphylococcus epidermidis* y produce infecciones clínicamente significativas sólo en un 10% de los casos.^{44, 63}

1.5 *Pseudomonas aeruginosa*

1.5.1 Hábitat

Muchas de las especies están comúnmente presentes en el suelo, agua, en medio hospitalario, y pueden formar parte de la flora normal del cuerpo. Más de 25 especies diferentes de *Pseudomonas* se asocian al hombre y su medio ambiente inmediato, pero solo *P. aeruginosa* representa más del 75% de las que se recuperan de muestras clínicas.⁵⁵ Especialmente *P. aeruginosa* es un patógeno oportunista.

Puede ser etiológicamente significativo, en general en pacientes previamente comprometidos, en heridas, quemaduras, infecciones postquirúrgicas, septicemias e infecciones del tracto respiratorio.⁵⁵



1.5.2 Características generales

Es un bacilo Gram negativo sumamente adaptable, mide de 0.5 a 1 μm por 3 a 4 μm , son móviles y tiene un flagelo polar. Estos microorganismos no son fermentadores, sus requerimientos nutricionales son sencillos, forman una cápsula mucoide.⁸² Las colonias características rugosas o mucoides, la β -hemólisis, pigmentación verde azulada y olor a frutas representa la identificación tentativa de esta especie en el laboratorio clínico.⁵¹

1.5.3 Importancia médica y epidemiológica

En la práctica clínica es el bacilo más importante de los bacilos gram-negativos no fermentadores, debido a que las infecciones sistémicas, figuran entre las de mayor tasa de mortalidad dado que el género y la especie de *P. aeruginosa* están asociados con enfermedades gastrointestinales o quemaduras.⁵⁵ En la clínica el comienzo de una bacteriemia por *Pseudomonas* puede ser fulminante seguido de una progresión rápida e hipotensión y shock.⁷ Las infecciones por esta bacteria pueden afectar múltiples órganos y sistemas. Las localizaciones más frecuentes son el tracto respiratorio, urinario, ótico, ocular y cutáneo.¹⁴

Pseudomonas aeruginosa constituye uno de los microorganismos más importantes y problemáticos en las bacteriemias por gram negativos, causante del 10% a 20% de ellas. Se presenta con más frecuencia en pacientes inmunocomprometidos con largos periodos de hospitalización, sometidos a diversas manipulaciones, con antecedentes de infecciones graves y uso previo de antibióticos de amplio espectro. Produce una mortalidad del 30% al 40%, fundamentalmente en las primeras 24 a 48 horas de su inicio.²⁹

En un estudio se encontró que la bacteriemia es una manifestación común de la infección por *P. aeruginosa*, con una incidencia aproximada de un episodio por cada 1000 ingresos, incidencia que se ha mantenido estable en las últimas décadas. Al igual que en otros estudios, encontraron que en los pacientes mayores de 50 años la bacteriemia por esta bacteria tiene mayor mortalidad.²⁹



Así mismo se reporta que el foco de infección en pulmones es del 29.3%, aparato urinario 21.8%, catéter 3.3%, herida quirúrgica 2.8%. En conclusión señalan que la bacteriemia por *P. aeruginosa* es la infección nosocomial por gram negativos de mayor gravedad.²⁹ La neumonía es otro caso importante de mortalidad y morbilidad en pacientes hospitalizados y es el principal agente causal de neumonía nosocomial. La mortalidad de esta es de un 40-50%. Existe un incremento en la prevalencia de neumonía en la comunidad por *P. aeruginosa* en los últimos años, en especial en pacientes con una lesión estructural previa de la vía aérea (enfermedad pulmonar crónica obstructiva, fibrosis quística entre otras).

En un Hospital se obtuvieron resultados similares al informe que proporciona el Sistema Nacional de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales (National Nosocomial Infections Surveillance System, NNIS). En donde se demostró que *Pseudomonas aeruginosa* (21%) junto con *S. aureus* (20%) son los microorganismos más frecuentes que causan neumonía en la unidad de cuidados intensivos en los EUA como infección nosocomial.¹⁸

Este patógeno también es el más aislado en quemaduras tras la primera o segunda semana de estancia en el hospital. La mortalidad es elevada si se acompaña de sepsis. La quemadura es un sitio susceptible y oportuno para la colonización. Es en particular problemática por la resistencia que presenta a muchos antibióticos. Ortiz Gil y colaboradores reportan que el 57.2 % mostro desarrollo de bacterias Gram-positivos y 42.8 % bacterias gram-negativos. De manera particular en cuanto al género *Pseudomonas*, 97.2% correspondió a *P. aeruginosa*. El grupo de edad con mayor presencia de quemaduras es de niños entre 1 y 10 años de edad, seguido de un grupo diferente de 31-40 años de edad.⁶¹ *Pseudomonas aeruginosa* es el bacilo Gram-negativo causante de infección urinaria en donde ocupa la tercera causa de infección en enfermos hospitalizados y especialmente en recuperaciones quirúrgicas y en unidades de cuidados intensivos.^{44, 46}



1.6 *Klebsiella pneumoniae*

1.6.1 Hábitat

Klebsiella spp. es ubicua en la naturaleza. Se encuentra en aguas superficiales, aguas residuales, en el suelo y sobre las plantas. En humanos portadores de *Klebsiella pneumoniae* se encuentran en las vías respiratorias superiores y en el tracto intestinal.⁶⁵

1.6.2 Características Generales

Es un bacilo Gram negativo, pertenece a la familia Enterobacteriaceae muestran crecimiento mucoso, grandes cápsulas de polisacáridos, ausencia de motilidad y por lo general dan pruebas positivas para lisina descarboxilasa y para el citrato.¹⁰

1.6.3 Importancia médica y epidemiológica

Klebsiella pneumoniae es un patógeno oportunista colonizador de piel y mucosas de pacientes hospitalizados, que pueden presentar infecciones invasoras como bacteremias (14%), septicemias e infecciones del tracto urinario (9%) en individuos inmunocomprometidos que se hayan hospitalizados y padecen enfermedades subyacentes. Usualmente las manos contaminadas del personal son el vehículo responsable de brotes epidémicos.^{3, 70, 73} Son especialmente susceptibles los pacientes ingresados en la unidad de cuidados intensivos, neonatos, diabéticos o alcohólicos.

Es la especie más importante del género desde el punto de vista médico y esta asociada a una alta morbilidad y mortalidad. Se estima que el género *Klebsiella* es el responsable del 8% de las infecciones nosocomiales bacterianas en los Estados Unidos y en Europa, lo cual lo sitúa entre los ocho patógenos infecciosos más importantes en hospitales.³⁶



En México existen algunos reportes en donde *K. pneumoniae* es uno de los principales microorganismo causantes de infecciones intrahospitalarias causando niveles significativos de morbilidad y mortalidad.³

Es causante de la neumonía asociada al ventilador en cuidados intensivos y tiene una alta tasa de mortalidad hasta de un 50 %.⁷⁸ Existe poca información sobre este problema en México. Sin embargo se puede suponer que la incidencia y la mortalidad asociada a esta son más elevadas que en países en desarrollados ya que los hospitales tienen menos recursos e infraestructura. En un estudio hecho en el estado de Yucatán la mortalidad de los pacientes fue del 88% en donde el 17% correspondió a *Klebsiella pneumoniae* ocupando así el tercer lugar.⁵⁷

El porcentaje de individuos portadores de *Klebsiella* aumenta radicalmente en el ambiente hospitalario y la colonización en el paciente se asocia significativamente con la utilización de antibióticos. Las terapias antimicrobianas, además, han sido a menudo responsables de la emergencia de cepas resistentes a múltiples antibióticos en hospitales.³⁶

1.7 *Salmonella typhi*

1.7.1 Hábitat

La mayoría de los serotipos de *Salmonella* habitan el intestino del hombre y de los animales. Hay algunos serotipos que se encuentran adaptados a una sola especie animal, como por ejemplo *Salmonella typhi* que se encuentra solo en el hombre, se adquiere al ingerir agua o alimentos contaminados con heces.⁶

1.7.2 Características Generales

El género *Salmonella* pertenece a la familia Enterobacteriaceae. Son bacilos gram negativos, que miden aproximadamente 2-3 por 0.4-0.6 μm , generalmente móviles por flagelos peritricos, anaerobios facultativos no encapsulados y no esporulados.³⁵



1.7.3 Importancia médica y epidemiológica

Salmonella typhi es el agente causal de la fiebre tifoidea en humanos. Es de distribución mundial, en México es endémica, es más frecuente en escolares y adolescentes, la mayor incidencia es en los meses de verano, el contagio se adquiere por el contacto directo con pacientes o por ingerir agua o alimentos contaminados por heces humanas o a través de portadores que manejen alimentos.

El periodo de incubación es de 1 a 3 semanas, el periodo de transmisibilidad es desde la primera semana y cerca del 10 % de los pacientes no tratados diseminan bacilos durante 3 meses y 5% tomarán portadores, en zonas endémicas es común entre los escolares.⁶

La fiebre tifoidea prevalece principalmente en países en vías de desarrollo, donde normalmente significa un reto a las autoridades en la salud pública, es decir predomina en países y zonas deprimidas con escaso nivel socio-económico, donde suelen existir, además una alta incidencia de *Salmonella* multiresistente.^{64, 71}

Hay aproximadamente 17 millones de casos anuales con casi 60,000 muertes, principalmente en Asia y África. Las más altas tasas se encuentran en Indonesia y en algunos puntos en el Sureste Asiático, como Nueva Guinea, en donde puede alcanzar niveles de 10^3 por cada 100,000 habitantes. En otros lugares en Asia la incidencia es menor. Interesantemente la mayoría de los casos en las regiones de mayor incidencia, se encuentra en niños y jóvenes en edad escolar de 13 a 19 años.¹³

En México se han reportado alrededor de 10 a 15 mil casos al año por cada 100,000 habitantes, aquí no se cuenta con estadísticas nacionales de infecciones por *Salmonella*. Con frecuencia, el médico hace un diagnóstico basándose en el cuadro clínico del paciente, pero sin contar con los estudios microbiológicos necesarios para establecer un diagnóstico certero.

La falta de un sistema de vigilancia con comunicación entre epidemiólogos, clínicos y el sector veterinario, así como la falta de infraestructura necesaria, impide que países como el nuestro pueda identificar las principales serovariedades de *Salmonella* en las diferentes clases de alimentos, así como el riesgo que causa para la salud de los seres humanos.⁴⁵

Esta información es indispensable para establecer las intervenciones necesarias para disminuir la morbilidad y mortalidad por las infecciones causadas por *Salmonella*.⁴⁵



Ciertamente las diferencias en incidencia en grupos de edad afectados son problemas de interés para la epidemiología, cuya resolución involucra la mejor comprensión de los modos de transmisión y sobrevivencia de la bacteria en el ambiente, el conocimiento más profundo de la respuesta inmunológica del hospedero y de las posibles variaciones genéticas entre los aislados clínicos de *S. typhi*.¹³

1.8 *Proteus mirabilis*

1.8.1 Hábitat

Su hábitat natural es el intestino y está ampliamente distribuido en el medio ambiente, presente en el agua contaminada y en el suelo y analizando su patogenicidad, se observa que son poco patógenos, pero que pueden originar infecciones en diversas regiones y sistemas del organismo.^{26, 43}

1.8.2 Características Generales

Es uno de los integrantes de la Familia Enterobacteriaceae. Se caracteriza por ser un bacilo Gram negativo, extraordinariamente móvil (lo que se demuestra cómo un crecimiento invasor en la superficie de los medios de cultivo sólidos), es facultativo anaerobio, y presenta actividad ureasa.^{10, 33}

1.8.3 Importancia médica y epidemiológica

Las infecciones del tracto urinario son las más frecuentes, alrededor del 20 % son adquiridas fuera del hospital. Casi el 90% de las infecciones urinarias son ascendentes en donde hay acceso a las vías urinarias a través de la uretra hasta la vejiga y luego a la parte superior. Causando al organismo una infección del tracto urinario (ITU).⁷⁶

Los agentes etiológicos más comunes causantes de las infecciones urinarias son Gram negativos pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae.⁷⁶



Después de *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* es un patógeno oportunista que causa una variedad de enfermedades humanas, pero principalmente las ITU³¹, primordialmente en aquellas personas con largos periodos de cateterización o individuos con anomalías estructurales del tracto urinario.²⁶

Las complicaciones de la infección por este microorganismo son con frecuencia graves, involucran la vejiga, la formación de cálculos renales y bacteriemia. De hecho esta bacteria coloniza a los riñones con más frecuencia que *Escherichia coli*.^{17, 50, 53} Además de ITU, este patógeno ha sido descrito como un agente oportunista en infecciones de las vías respiratorias, heridas, quemaduras, piel, ojos, oídos, nariz y garganta, así como en la gastroenteritis como resultado en el consumo de comida contaminada.²⁶

1.9 *Escherichia coli*

1.9.1 Hábitat

Escherichia coli. (E. Coli) forma parte de la flora normal del intestino del hombre y los animales de sangre caliente, constituyendo una de las especies bacterianas más abundantes en esta localización.⁴⁹ Esta bacteria coloniza el intestino pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causan daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos la diarrea.⁶⁸

1.9.2 Características Generales

Escherichia coli es un miembro de la familia Enterobacteriaceae y es la especie que mejor se conoce en relación a su capacidad patógena es un bacilo corto de 1.1-1.5 x 2.0-5.0 μm , Gram negativo, no esporulado, puede ser inmóvil, pero usualmente es móvil con flagelos peritricos.²¹ Frecuentemente presenta una microcapsula, por lo que algunas cepas producen colonias mucoide, la mayoría son fermentadoras de lactosa y de glucosa, con producción de ácido y desprendimiento de gas, dentro de las 48 horas de incubación a $35 \pm 2^\circ \text{C}$ y oxidasa negativa.



Es un anaerobio facultativo y crece en medios de cultivo simples y sintéticos, donde utiliza glicerol o glucosa como única fuente de carbono y energía.²¹

1.9.3 Enfermedades clínicas

Infecciones del aparato urinario: *E. coli* es la causa más común de infección del aparato urinario y es responsable de casi 90% de infecciones de vías urinarias primarias en mujeres jóvenes.¹⁰

Septicemia: Cuando las defensas normales del huésped son inadecuadas, *E. coli* puede alcanzar el torrente sanguíneo y causar septicemia.¹⁰

Meningitis: *E. coli* y los estreptococos del grupo B causan la mayoría de las infecciones del SNC en los niños menores de un mes.¹⁰

Gastroenteritis: Las cepas de *E. coli* provocan gastroenteritis.¹⁰

1.9.4 Clasificación de cepas de *E. coli* que causan diarrea

E. coli coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se considera de flora normal. Sin embargo, existen cepas patógenas causantes de diarrea que en base a su mecanismos de patogenicidad y cuadro clínico, se clasifican en: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica, también conocidas como productoras de toxina Vero (EHEC, VTEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroadherente (EAEC).⁷⁹



1.9.5 Importancia médica y epidemiológica

1.9.5.1 *E. coli* enterotoxigénica

Las ETEC colonizan la mucosa del intestino delgado por medio de pilis o fimbrias que tiene diversas formas, siendo su principal mecanismo de patogenicidad la síntesis de alguna o ambas enterotoxinas llamada toxina termolábil (LT) y toxina termoestable (ST).⁶⁸ Este serotipo es importante en países en vía de desarrollo.⁵ Las ETEC son importantes en lactantes, principalmente en menores de dos años, y en particular durante los primeros seis meses de vida.^{21, 68} La frecuencia de aislamiento de este grupo patógeno en niños con diarrea es de 10 a 30%.^{68, 19} En los niños en edad escolar y en adultos puede ser asintomática y poco frecuente o producir la diarrea del viajero. La contaminación fecal de agua y alimentos es la principal fuente de infección.⁶⁸

1.9.5.2 *E. coli* enterohemorrágica

EHEC es agente causal de numerosos brotes epidémicos asociados a la ingesta de agua y alimentos contaminados, a partir de la cual los individuos afectados padecen de diarreas comunes o sanguinolentas. Entre el 5% y 10% de las personas infectadas, en especial niños pequeños y ancianos, desarrollan una grave complicación denominada síndrome hemolítico⁶⁹ caracterizada por la insuficiencia renal aguda, trombocitopenia y anemia hemolítica que es particularmente grave en los niños pequeños y personas mayores; en países desarrollados tales como Japón, E.U.A, y el Reino Unido.⁸⁰

E. coli enterohemorrágica ha surgido como un patógeno entérico de gran importancia en Estados Unidos de Norteamérica y Canadá, reportado también en Argentina y Cuba, pertenece a la categoría de *E. coli* alta productora de citotoxinas. Dentro de estas cepas se agrupan varios serogrupos tales como O2, O7, O113, O114, O11, O1, O5, O18 y el mejor estudiado de todos el O157: H7.⁷⁹

Se ha informado que en más de 30 países en seis continentes, la tasa anual es de 8 casos por cada 100,000 habitantes registrados en las áreas de E.U.A, Japón, Escocia, Canadá y Reino Unido. La mayor frecuencia de EHEC asociada con la enfermedad es el serogrupo O157:H7.²⁷



En Europa se tienen datos que demuestran que en Escocia la tasa de infección en el 2005 fue de 3.26/100,000 de los cuales 95% fueron O157:H7, en comparación con Alemania que fue de 1.4/100,000 de los cuales solo el 10% fueron O157:H7. La tasa mayor en Europa en el 2005 fue encontrado en Suecia, con una incidencia de 4.09/100,000, con un 50% de O157:H7.⁹ Para los años 2000-2005, la base de datos muestra una tendencia en aumento de 2022 a 2660 (31%).

Existen numerosos informes de infecciones esporádicas que no son O157, descritos en Alemania y Dinamarca. Los serogrupos, implicados con mayor frecuencia: O26, O103, O91, O145, O121 y O111 con un panorama similar en todo el mundo.⁹ Las infecciones por EHEC se observa en niños de 4 años de edad. Los datos sobre distribución de género no mostraron diferencias significativas entre mujeres y hombres. Dichas infecciones tienen una tendencia marcada estacional, con más casos registrados con el aumento de la temperatura, alcanzando un pico en septiembre.⁹

1.9.5.3 *E. coli* enteroinvasiva

EIEC manifiesta menores incidencias que las anteriores, pero se encuentra muy relacionada bioquímica y genéticamente con *Shigella*, al grado de que comparte con este género su especial capacidad para invadir el intestino e inducir cuadros desinteriformes.²¹

Los serotipos asociados con EIEC son O28, O29 O112, O124, O135, O143, O144, O152, O167. No es un agente zoonótico y la transmisión se produce vía fecal-oral, por agua y alimentos contaminados y la transmisión persona-persona también es común. Brotes y casos esporádicos de gastroenteritis se informa sobre todo en las regiones con muy mala higiene.²¹

1.9.5.4 *E. coli* enteropatógena

EPEC fue la primera en describirse y es tal vez uno de los microorganismos más estudiados. La infección con EPEC es una de las causas más comunes de diarrea infantil en países en vías de desarrollo, como en México. Esto último se debe a que en el ámbito local se desconocen muchos aspectos relevantes acerca de la virulencia y el diagnóstico eficaz.⁸²



Estudios epidemiológicos realizados en países en vías de desarrollo, incluidos Latinoamérica y México, han demostrado que ETEC y EPEC son dos de los principales patógenos aislados en los casos de diarrea infantil.

Dentro de la vigilancia epidemiológica que llevan a cabo las autoridades de salud en México, se ha comunicado que EPEC se presenta en forma endémica hasta en 6% de la población, una cifra muy parecida a la informada para países industrializados como Alemania y Australia, en los que se ha encontrado que 5.9 y 7.6 respectivamente, de niños sanos son portadores normales de cepas de EPEC. En lo que respecta a niños con diarrea, en México se ha detectado un alto porcentaje de pacientes infectados con EPEC. En un estudio que se condujo en Guadalajara Jalisco, en 1987, se logro aislar cepas de EPEC en 17.5% de los casos de niños menores de dos años con diarrea.

En este estudio se identifico EPEC con mayor frecuencia que otros patógenos típicos, como *Shigella*, *Giardia*, *Salmonella* o rotavirus. Por otro lado, en 1991 Cravioto y colaboradores llevaron a cabo un estudio en niños con diarrea de una población rural del estado de Morelos. Ellos aislaron cepas de EPEC en 19% de los casos de diarrea en niños de esta región.

El grupo de investigación de los autores en colaboración con el laboratorio de bacteriología médica del Hospital Infantil de México, ha logrado aislar *E. coli* con adherencia localizada en 75 de los 208 casos de niños con un cuadro diarreico grave (cepas del tipo 1). Así mismo, 12% de los casos se identificaron en cepas con adherencia parecida a la localizada en este mismo grupo de pacientes (cepas del tipo 11).⁸¹

EPEC es posible advertir que es una bacteria causante de 17 a 19% de los casos de diarrea infantil en diversas regiones del país, lo que indica que en México uno de cada cinco niños que enferman de diarrea puede estar infectando con este serotipo de *E. coli*.⁸¹

En otras naciones en vías de desarrollo como Brasil y Chile, la epidemiología de EPEC es similar. Gomes y colaboradores encontraron que 23% de cepas de *E. coli* con adherencia localizada intervenía en grado significativo en casos de niños con diarrea, aun por encima de otros patógenos importantes como rotavirus o ETEC. Como hecho de interés, las EPEC atípicas son hoy las bacterias aisladas con más frecuencia de niños con diarrea en ese país, con una prevalencia elevada de 10.1 a 16.4%.⁸¹



1.10 *Melissa officinalis*

1.10.1 Nombre Científico

Melissa officinalis L.

1.10.2 Sinónimos

Melisa, toronjil, cedrón, citronela, hoja de limón.

1.10.3 Distribución Geográfica

Melissa officinalis es originaria de Europa, Región mediterránea, oeste de Asia y norte de África, pero actualmente se encuentra extensamente cultivada y naturalizada en muchos países de clima templado, crece de forma silvestre en prados húmedos y nitrificados, con buen aporte de sol ya que no resiste muy bien las heladas. *Melissa officinalis* hace su aparición desde fines del verano hasta mediados del otoño.^{1,41}

1.10.4 Recolección

La parte activa con propiedades terapéuticas se encuentra en las hojas jóvenes. Se recolectan antes o durante la floración. Se hacen varias recolecciones dependiendo del país.¹ Hay que secar a la sombra en un lugar bien ventilado. Se almacena en recipientes herméticos, preservados de la luz, polvo y humedad.¹

1.10.5 Descripción Botánica



Melissa officinalis es una planta aromática perenne, perteneciente a la familia de las Lamiáceas (labiadas), caracterizadas por presentar una altura cercana al metro. Tallo cuadrangular muy ramificado, hojas amarillo-verdosas, dentadas, de hasta 7.5 cm de largo y con olor a limón, flores blanquecinas al abrirse de 0.75-1.5 cm de largo. La parte utilizada son las hojas.¹

Fig. No 1 Hojas de *Melissa officinalis*³²



1.10.6 Acción Farmacológica

Actividad digestiva: El aceite esencial presenta efectos coleréticos y carminativos. En la actividad colerética jugarían un papel importante destacado el ácido rosmarínico, ácido clorogénico y ácido cafeico. También se demostró que tiene efectos antiespasmódicos y actividad antiulcerogénica gracias al citronelol.^{38,41}

Actividad en Sistema Nervioso: Tiene actividad en desordenes nerviosos, insomnio, estrés, depresión, sueño, debido principalmente a los ácidos fenólicos y flavonoides.^{38,41}

Actividad anti-tiroidea y otros: El extracto seco de Melisa ha demostrado ejercer un bloqueo parcial sobre receptores para la TSH. Por otro lado también posee actividad antioxidante, antiinflamatoria y reumática.⁷⁷

Actividad antimicrobiana: Se ha descrito actividad *in vitro* del extracto de Melisa frente al Virus de las paperas, Virus de Herpes simple tipo 1, Herpes Virus simple tipo II.¹ También tiene actividad antimicrobiana contra *Pseudomonas putida*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Proteus vulgaris*, *E. coli* y *Candida albicans*.³⁸ El aceite esencial demostró *in vitro* actividad inhibitoria frente a *Streptococcus hemolyticus*.¹

1.10.7 Formas de uso

Infusión: Al 5% se administran dos tazas diarias.

Extracto fluido: Relación 1:1 en alcohol de 45°, a razón de 2-4 ml diarios.

Extracto seco: relación 5:1, a razón de 330-900 mg diarios en forma de capsulas.

Aceite esencial: 2-4 gotas, 2-3 veces al día.

Tintura: relación 1:5 en alcohol de 45°. la dosis es de 2-6 ml.

Crema: Contienen 1% de extracto acuoso liofilizado. Se aplica 2-4 veces/día. Máximo 14 días de aplicación continua.



1.10.8 Composición Química

Aceite esencial: Contiene aproximadamente 0.02-0.37 % de aceite esencial en donde su composición es variable y depende de las condiciones de crecimiento, climáticas o geográficas. Contiene aldehídos monoterpenicos como el citronelal (30-40%), geranial y neral (20-30%). Monoterpenos: citronelol, geraniol, nerol, β -ocimeno, α -terpineol, metilcitronelal. Sesquiterpenos: β -cariofileno (10%), germacreno D (10%), α -cubebeno (0.1%), α -copaeno (2%). Sesquiterpenos: farnesol, 10-epi- α -cadinol.^{1, 16, 38.}

Flavonoides: luteolol-7-glucósido (0.0002%), luteolin-3-glucorónido, ramnicitrósido, apigenina, quercitrósido.^{16, 38}

Polifenoles: Acido cafeico, clorogénico, elágico, ferúlico, rosmarinico (2-5%), ursólico, y succínico.^{1, 38} Taninos catequicos (5%). Sales minerales (10-12%).

Otros: mucilagos, linalol (1.7%), metileugenol, metilheptenona, colina.¹

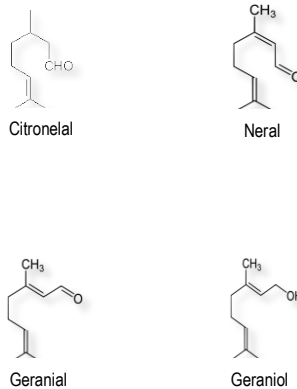


Fig. No 2 Compuestos identificados en *Melissa officinalis*



1.11 Microscopía Electrónica de Transmisión

La Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) puede ser usada para el diagnóstico de enfermedades de origen microbiana, aunque su principal aplicación es en investigación. La MET provee detalles ultra estructurales los cuales son útiles para la identificación de virus, bacterias, parásitos y hongos. Mediante este instrumento, se pueden examinar diferentes tipos de muestras clínicas: sangre, heces, orina, biopsias, fluidos corporales, etc.³⁹

Los estudios ultra estructurales de los microorganismos, tanto para diagnóstico como para investigación, se abordan utilizando dos de los métodos de procesamiento general para la MET uno de ellos es la tinción negativa, es una técnica sencilla y económica y su uso se ha generalizado como técnica fundamental para contrastar muestras particuladas. El contraste se obtiene embebiendo la partícula a observar en una sal de un metal pesado (ácido fosfotúngstico al 2%, acetato de uranilo al 4%), que perfila mínimos detalles ultra estructurales sobre un fondo oscuro; de ahí su denominación como técnica de "contraste negativo", o de tinción negativa.³⁹



Fig. No 3 Microscopio Electrónico de Transmisión



1.12 JUSTIFICACIÓN

La problemática de la resistencia a los antibióticos es un fenómeno mundial, complejo e incluye un gran número de especies bacterianas de importancia médica. El consumo, uso y/o abuso de los antibióticos ha contribuido al aumento de la resistencia no solo en bacterias patógenas sino también de las saprófitas y oportunistas. Los productos de origen natural se han venido utilizando desde hace mucho tiempo. En los extractos de muchas plantas se pueden encontrar actividades antimicrobianas. Es por ello la importancia de investigar nuevas sustancias naturales como una alternativa de tratamiento. Por tal motivo en el presente trabajo se decidió evaluar la actividad antimicrobiana del extracto de *Melissa officinalis* en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Proteus mirabilis*.

1.13 HIPÓTESIS

Si se comprueba el efecto inhibitorio del extracto de *Melissa officinalis* sobre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Proteus mirabilis* entonces podremos tener una alternativa de tratamiento contra este tipo de bacterias.



2. OBJETIVOS

2.1 General:

- Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto de *Melissa officinalis* en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella typhi* mediante el ensayo colorimétrico de Mosmann para determinar las concentraciones mínimas inhibitorias

2.2 Particulares:

- Identificación de bacterias mediante pruebas bioquímicas.
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del Extracto de *Melissa officinalis* por la técnica de microdilución en caldo evidenciado por el Método de Mosmann.
- Determinar el efecto bactericida y/o bacteriostático del Extracto de *Melissa officinalis*.
- Evidenciar el posible efecto producido por el Extracto de *Melissa officinalis* en las bacterias por medio de Microscopia Electrónica de Transmisión.



3. MATERIAL Y EQUIPO DE TRABAJO

Medios de Cultivo

- ❖ Agar Infusión Cerebro Corazón (BIOXON)
- ❖ Caldo Infusión Cerebro Corazón (BIOXON)
- ❖ Agar Mc Conkey (BIOXON)
- ❖ Agar Sales Manitol (BIOXON)
- ❖ Agar Base Sangre (BIOXON)
- ❖ Agar Eosina Azul de Metileno (MERCK)
- ❖ Agar Cetrimida (BIOXON)

Medios de cultivo en tubo

- ❖ Medio SIM (BIOXON)
- ❖ Medio MR-VP (BIOXON)
- ❖ Agar Citrato de Simmons (MAC-LAB)
- ❖ Agar de Hierro y Triple Azúcar (BIOXON)
- ❖ Caldo Urea (BIOXON)

Reactivos

- ❖ Aceite de inmersión (PARÍS)
- ❖ Cristal violeta (HYCEL)
- ❖ Lugol (REAMEX)
- ❖ Alcohol-acetona (GOLDEN-BELL)
- ❖ Safranina (FISHER)
- ❖ Peróxido de hidrógeno 3% (MEYER)
- ❖ Discos para prueba de oxidasa (DIFCO)
- ❖ Discos de Novobiocina 5 mcg. (DIFCO)
- ❖ Solución Salina Fisiológica estéril 0.85%
- ❖ Agua destilada estéril
- ❖ Indicador rojo de metilo (HYCEL)



- ❖ Alfa naftol al 5% (HYCEL)
- ❖ Hidróxido de potasio al 40% (BIOXON)
- ❖ Reactivo de Kovac's o Erlich (p-dimetil-aminobenzaldehido) (DIFCO)
- ❖ Dimetil-sulfóxido (SIGMA)

- ❖ MTT SIGMA M-2118
- ❖ Reactivo de Kamosky como fijador
- ❖ Acido fosfotúngstico para teñir
- ❖ Solución amortiguadora de fosfatos pH= 7.2
- ❖ Etanol al 96° (GOLDEN BELL)

Material

- ❖ Asa Bacteriológica
- ❖ Espátula
- ❖ Cajas Petri (PYREX)
- ❖ Matraces Erlenmeyer con taparroca de 250 ml (KIMAX)
- ❖ Portaobjetos 75x26x1 mm (MARIENFELD)
- ❖ Hisopos estériles
- ❖ Palillos estériles
- ❖ Propipeta
- ❖ Mechero bunsen y manguera de látex
- ❖ Gradilla
- ❖ Frascos de vidrio estériles (PYREX)
- ❖ Tubos de vidrio con taparroca (PYREX)
- ❖ Vasos de precipitado de 250 ml (KIMAX)
- ❖ Probeta graduada de 250 ml (KIMAX)
- ❖ Cristalizador 190x100 (PYREX)
- ❖ Pipetas graduadas de 2 ml, 5 ml y 10 ml (KIMAX)
- ❖ Viales color ámbar con capacidad de 10 ml
- ❖ Micropipeta de 5 µl (AIVA NUCLEAR)
- ❖ Micropipeta de 100 µl (OXFORD®)



- ❖ Puntas para micropipeta estériles
- ❖ Microplaca de 96 pozos de fondo plano (SARSTEDT)
- ❖ Membranas de Nitrato de celulosa de 0.45 μm (Millipore)

Equipo

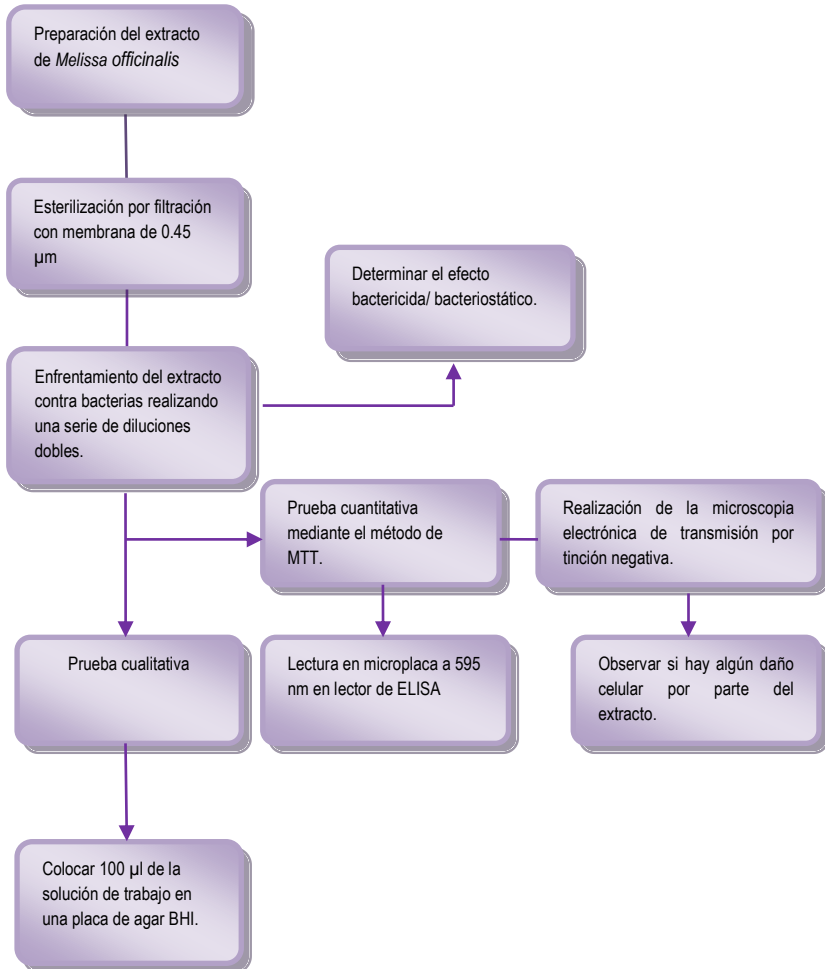
- ❖ Refrigerador (AMERICAN)
- ❖ Congelador (AMERICAN)
- ❖ Estufa bacteriológica (RIOSSA)
- ❖ Autoclave (All American Modelo 1925X)
- ❖ Microscopio óptico (Olympus modelo CH-S)
- ❖ Balanza granataria (Triple Beam 700 series)
- ❖ Balanza digital (SNUGH-II)
- ❖ Parrilla con agitador (NUOVA II STIR PLATE)
- ❖ Vortex (Genie-2)
- ❖ Centrifuga (Dynac)
- ❖ Campana de Flujo laminar (VECO)
- ❖ Portafiltro metálico tipo bala (Millipore)
- ❖ Bomba de vacío (Hoffman Pinter modelo 0210)
- ❖ Espectrofotómetro (Sanofi Diagnostic Pasteur Rx)
- ❖ Microscopio Electrónico de Transmisión JEOL JEM 100S

Material Biológico

- ❖ Sangre de carnero desfibrinada estéril
- ❖ Plasma humano
- ❖ Cepas bacterianas aisladas de muestras clínicas tales como: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhi*.
- ❖ Extracto de *Melissa officinalis*. (EXTRACTOS SIGMA)



4. DIAGRAMA DE TRABAJO





5. METODOLOGÍA

5.1 Obtención del Extracto de *Melissa officinalis*

El extracto de *Melissa officinalis* utilizado para la realización de este proyecto fue proporcionado por la empresa "Extractos Sigma".

5.2 Preparación del Extracto de *Melissa officinalis*

El extracto hidroalcohólico se esterilizó por medio de filtración con membrana de 0.45 μm recibiéndolo en un frasco estéril ámbar. Posteriormente se realizó una prueba de esterilidad, sembrando una pequeña cantidad del extracto en una placa de agar BHI, se incubo a 37 °C durante 24-48 hrs para corroborar que el extracto líquido estaba libre de bacterias.

El extracto hidroalcohólico se deposito en un cristizador y se coloco en el horno a una temperatura de 30-36 °C con la finalidad de evaporar los disolventes y llevar a sequedad total. El extracto seco se recolecto en un frasco ámbar estéril y se determino el rendimiento.

Se pesaron 722 mg del extracto seco y se disolvió con 1 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) llevándola a un aforo de 10 ml con Solución Salina Fisiológica Estéril. Obteniéndose así la solución de trabajo con una concentración de 72.2 mg/ml o bien 72.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

5.3 Prueba de esterilidad de la solución de trabajo

Se colocaron 100 μl de la solución de trabajo en una placa de agar BHI, sembrándola de forma masiva, se incubo a 37 °C durante 24-48 hrs para corroborar que no haya crecimiento bacteriano.

5.4 Identificación de bacterias

Cada cepa bacteriana fue proporcionada en un medio de cultivo en placa, se observo la morfología de las colonias. Posteriormente se realizaron pruebas bioquímicas primarias y secundarias. Así como aquellas pertinentes para cada bacteria. (Ver Apéndice B).



5.5 Prueba cualitativa

Se sembró la cepa de *Staphylococcus aureus* en agar BHI, se incubó a 37 °C durante 24 hrs y se estandarizó al 0.5 del Nefelómetro de McFarland en un tubo con caldo BHI. Se realizó un sembrado masivo y se colocó directamente 100 µl del extracto de *Melissa officinalis* sobre la placa y se incubó a 37 °C durante 24 hrs.

5.6 Estandarización de cada una de las bacterias a trabajar

Cada una de las bacterias a utilizar tales como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Proteus mirabilis* y *Pseudomonas aeruginosa* se sembraron en placas de agar BHI, se incubaron a 37 °C durante 24 hrs. Pasado el tiempo de incubación se realizó una suspensión de cada una de las bacterias en un tubo de ensayo conteniendo 4 ml de caldo BHI a doble concentración y por último se ajustó la suspensión al 0.5 del Nefelómetro de McFarland.

5.7 Ensayo en microplaca

Todos los ensayos extracto-bacteria se hicieron por triplicado en una microplaca de 96 pozos. Dicha microplaca está formada por 12 columnas y 8 filas de la A a la H, en donde cada columna representa una dilución y cada fila representa una bacteria diferente.

- Colocar en los pozos de la columna 2 hasta la columna 9, 100 µl de Solución Salina Fisiológica Estéril al 0.85% en las ocho filas.
- Colocar en todos los pozos de la columna 1 y 2, 100 µl del extracto de *Melissa officinalis*.
- A partir de los pozos de la columna 2 se procede a realizar una serie de diluciones dobles, transfiriendo 100 µl al pozo de la columna 3, así mismo transferir 100 µl de este al pozo de la columna 4 y así sucesivamente hasta el pozo de la columna 9, desechando 100 µl de este pozo.



- Adicionar 100 µl de bacteria ya estandarizada al 0.5 del Nefelómetro de McFarland desde el pozo de la columna 1 hasta el pozo de la columna 9 en las tres primeras filas (A, B, C). Realizar este mismo procedimiento con cada una de las bacterias a trabajar.
- Los pozos de la columna 10 corresponden al control +, al cual se le agrego 100 µl de Solución Salina Fisiológica Estéril y 100 µl de la bacteria estandarizada en cuestión.
- Los pozos de la columna 11 corresponden al control -, al cual se le agrego 100 µl de Solución Salina Fisiológica Estéril y 100 µl de caldo BHI.
- Los pozos de la columna 12 corresponden al blanco, al cual se le agrego 100 µl de caldo BHI y 100 µl del extracto de *Melissa officinalis*.
- Incubar la microplaca a una temperatura de 37 °C durante 24 Hrs.

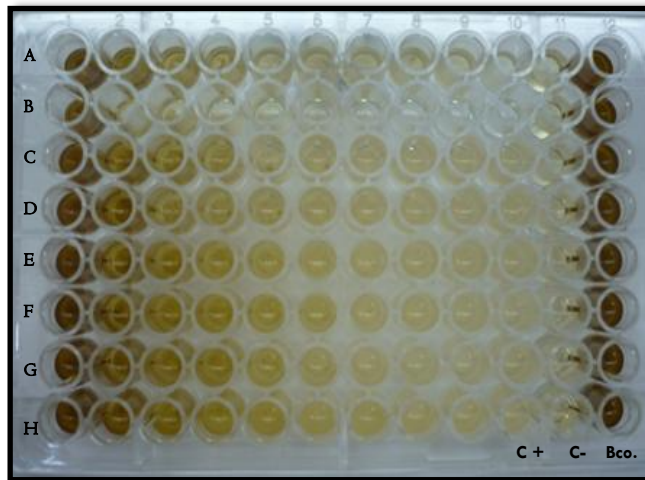


Fig. No 4 Microplaca de 96 pozos mostrando las diluciones del extracto de *Melissa officinalis*.

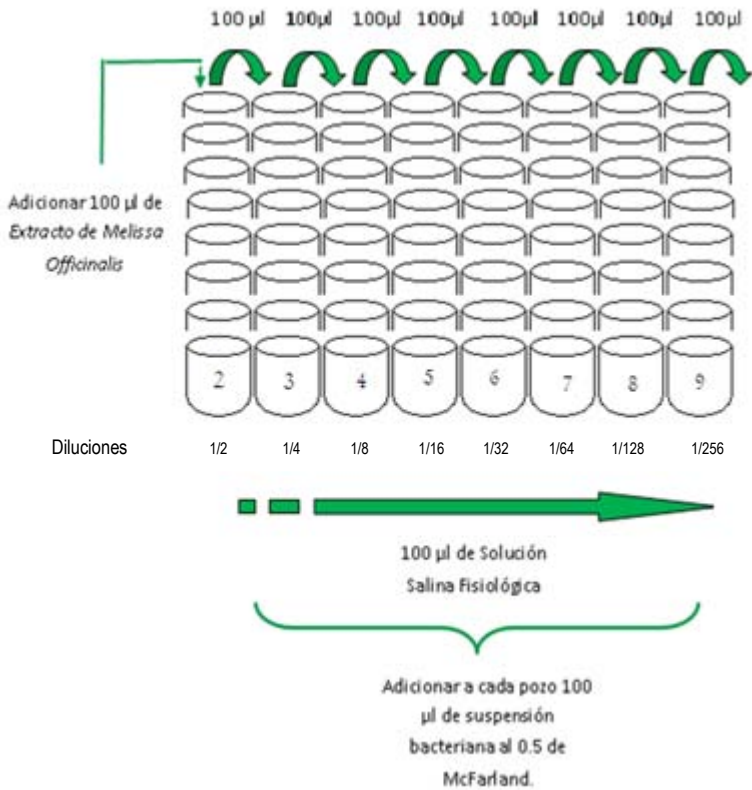


Fig. No 5 Esquema del sistema de diluciones dobles

5.8 Método de MTT (bromuro de (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio)

Este método es un ensayo colorimétrico en donde se utiliza al MTT, reactivo de oxido-reducción, que bajo condiciones de reducción como las generadas durante la actividad metabólica bacteriana, cambia de color amarillo a violeta (formazan) al incorporarse el reactivo a los pocillos de la placa. Esta técnica nos permite observar y determinar fácilmente que pozos de la microplaca presentan crecimiento y en que pozos se ha inhibido por acción del extracto y así determinar la CMI.

Después de las 24 horas de incubación de la microplaca se toman asadas de cada uno de los pozos para realizar la técnica de bactericida-bacteriostático y posteriormente a todos los pozos se adicionan 5 µl del reactivo MTT (bromuro de (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio). La microplaca se incuba a 37 °C de 15-30 minutos. Posteriormente se hace la lectura de las placas a una longitud de 595 nm a una temperatura de 24.3 °C. ⁸

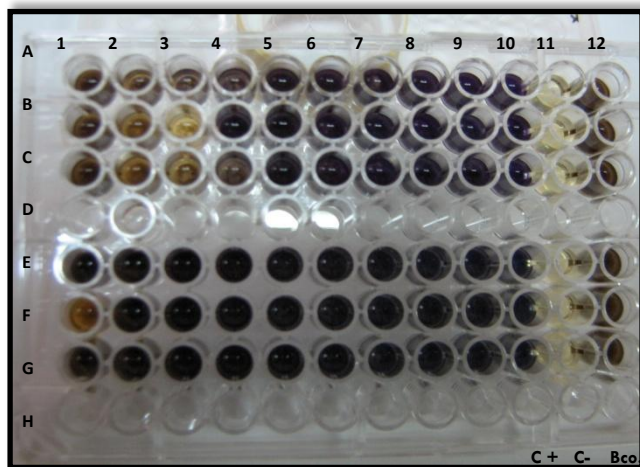


Fig. No 6 Microplaca mostrando las microdiluciones del extracto de *Melissa officinalis* evidenciando la actividad antibacteriana, lectura con el reactivo MTT.



5.9 Determinación de la concentración mínima inhibitoria

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determina con la lectura de los resultados de la microplaca y se considera que es la mínima concentración del extracto que inhibe la multiplicación y producción de un crecimiento visible de la cepa bacteriana, esto se evidencia por turbidez o por colorimetría empleando el reactivo MTT, en donde el color morado purpura indica desarrollo bacteriano y el color amarillo indica que no hay células bacterianas viables.

5.10 Determinación del efecto bactericida/bacteriostático

Para determinar qué efecto tuvo el Extracto de *Melissa officinalis* en cada una de las bacterias utilizadas, lo que se hizo fue que después de el ensayo extracto-bacteria, se tomaron 10 µl de cada una de las diluciones que se hicieron en la microplaca y se sembraron en placas de agar BHI, así como el control positivo y el control negativo, incubando a 37 °C durante 24 hrs. Transcurrido este tiempo se hace la lectura de las placas.

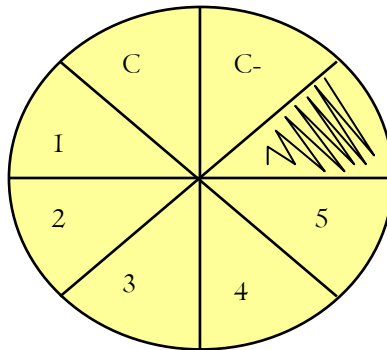


Fig. No 7 Placa de agar BHI mostrando cómo se siembra cada una de las diluciones de la microplaca



5.11 Microscopía Electrónica de Transmisión

5.11.1 Preparación de las bacterias

Realizar una suspensión bacteriana al 0.5 del Nefelómetro de McFarland en caldo BHI de cada una de las bacterias. Preparar las muestras como se menciona a continuación:

Tubo 1 Muestra problema: 2.5 ml de suspensión bacteriana en caldo BHI de *Staphylococcus aureus* más 2.5 ml de Extracto de *Melissa officinalis*.

Tubo 2 Control positivo: 2.5 ml de suspensión bacteriana en caldo BHI de *Staphylococcus aureus* más 2.5 ml de Solución Salina Fisiológica estéril.

Tubo 3 Muestra problema: 2.5 ml de suspensión bacteriana en caldo BHI de *Klebsiella pneumoniae* más 2.5 ml de Extracto de *Melissa officinalis*.

Tubo 4 Control positivo: 2.5 ml de suspensión bacteriana en caldo BHI de *Klebsiella pneumoniae* más 2.5 ml de Solución Salina Fisiológica estéril.

Incubar todos los tubos a 37 °C durante 24 hrs.

5.11.2 Fijación

Después del tiempo de incubación se centrifugan los tubos a 2500 rpm durante 15 minutos, se realizan tres lavados con Solución Salina Fisiológica estéril desechando el sobrenadante.

Posteriormente adicionar 1 ml del reactivo de Karnosky a cada tubo, dejar reposar durante una hora y centrifugar a 2500 rpm durante 30 minutos, desechar el sobrenadante y resuspender en Buffer de fosfatos o en Solución Salina Fisiológica. La muestra se ajusta a 1.5×10^8 UFC/ml igualando al estándar 0.5 del Nefelómetro de McFarland.³⁰

5.11.3 Tinción Negativa

Colocar una gota de suspensión bacteriana sobre papel parafilm, se colocan 2 rejilla con membrana para que se adsorba la muestra durante 20 minutos, posteriormente se toman las rejillas y se colocan en una gota de agua destilada, el exceso se absorbe con papel filtro, enseguida son teñidas con una gota de ácido fosfotúngstico durante un minuto y son secadas a temperatura ambiente. Las muestras son observadas y fotografiadas en el Microscopio Electrónico de Transmisión JEOL JEM 100S).³⁰

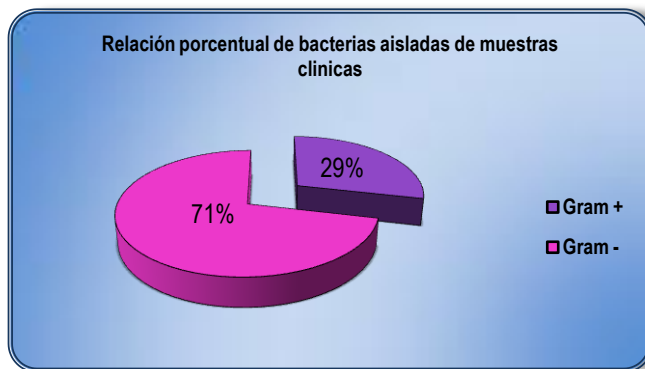


6. RESULTADOS

6.1 Identificación de bacterias

Se trabajo con 7 cepas bacterianas obtenidas de muestras clínicas proporcionadas por el Laboratorio del Hospital General de Zona No 57, las cuales se identificaron de manera satisfactoria en el Laboratorio de Microbiología de la Unidad de Posgrado de la FESC-1, realizando pruebas bioquímicas primarias y secundarias. (Ver apéndice II)

Se tiene que de 7 muestras el 29 % corresponde a bacterias Gram positivo entre las que destacan a *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* así mismo el 71 % corresponde a bacterias Gram negativo como *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* y *Salmonella typhi*.



Gráfica No 1 Porcentaje de aislamiento de bacterias Gram negativo y Gram positivo aisladas de siete muestras clínicas.



6.2 Extracto de *Melissa officinalis*

El rendimiento obtenido del extracto fue de 3.3481 g por cada 1000 ml. Se realizó una prueba de esterilidad de la solución de trabajo, sembrando el extracto en una placa de agar BHI incubando a 37 °C por 24-48 hrs en donde se puede observar que no hubo ningún tipo de crecimiento bacteriano. (Ver Fig. No 8)

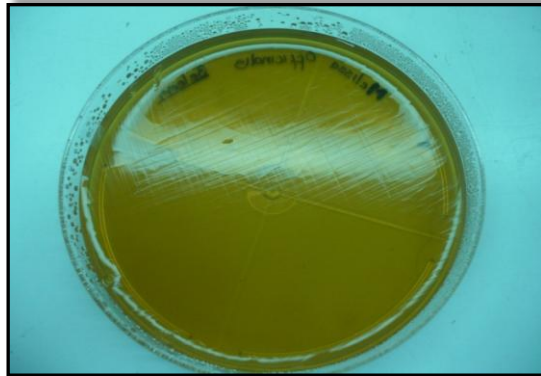


Fig. No 8 Prueba de esterilidad del extracto de *Melissa officinalis* en donde se observa que no hay ningún tipo de crecimiento después de 24-48 hrs de incubación a 37 °C.

6.3 Prueba cualitativa

Se realizó una prueba cualitativa para ver si el extracto posee actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, en la Fig. No 9 se puede apreciar que si hubo inhibición del crecimiento de dicha bacteria a una concentración de 72.2 mg/ml.

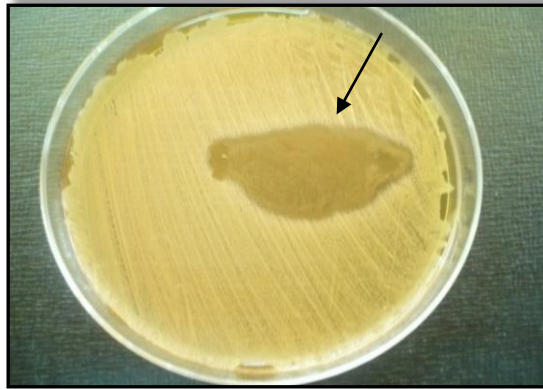


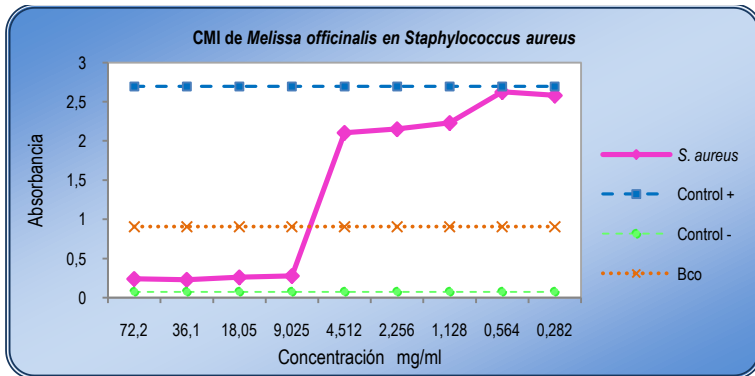
Fig. No 9 Zona de inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* por el extracto de *Melissa officinalis*.



6.4 Efecto del extracto de *Melissa officinalis* en *Staphylococcus aureus* por el método de Mosmann.

Pozo	Concentración (mg/ml)	Abs.
1	72.2	0.2410
2	36.1	0.2304
3	18.05	0.2615
4	9.025	0.2791
5	4.512	2.1046
6	2.256	2.1512
7	1.128	2.2303
8	0.564	2.6244
9	0.282	2.5801
Control +		2.695
Control -		0.0742
Blanco		0.9062

Tabla No 1 Promedio de absorbancias obtenidas en la microplaca por el Método de Mosmann.



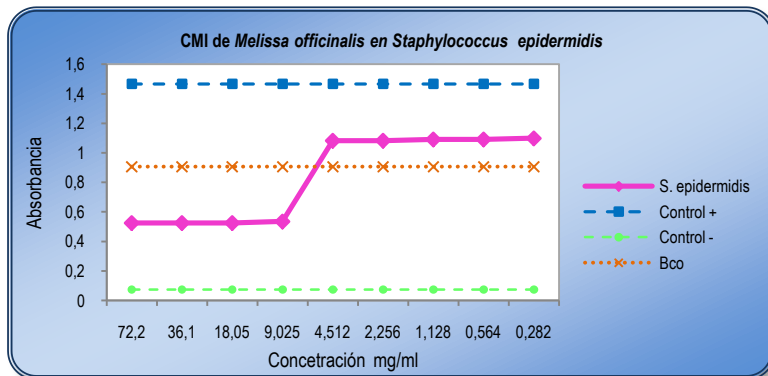
Gráfica No 2 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del extracto de *Melissa officinalis* en *Staphylococcus aureus* a diferentes concentraciones. Obsérvese que a 72.2, 36.1, 18.05 y 9.025 mg/ml el crecimiento es inhibido por el extracto.



6.5 Efecto del extracto de *Melissa officinalis* en *Staphylococcus epidermidis* por el método de Mosmann.

Pozo	Concentración (mg/ml)	Abs.
1	72.2	0.5248
2	36.1	0.5249
3	18.05	0.5249
4	9.025	0.5949
5	4.512	1.0831
6	2.256	1.0833
7	1.128	1.0917
8	0.564	1.0917
9	0.282	1.0989
Control +		1.4662
Control -		0.0686
Blanco		0.9062

Tabla No 2 Promedio de absorbancias obtenidas en la microplaca por el Método de Mosmann.



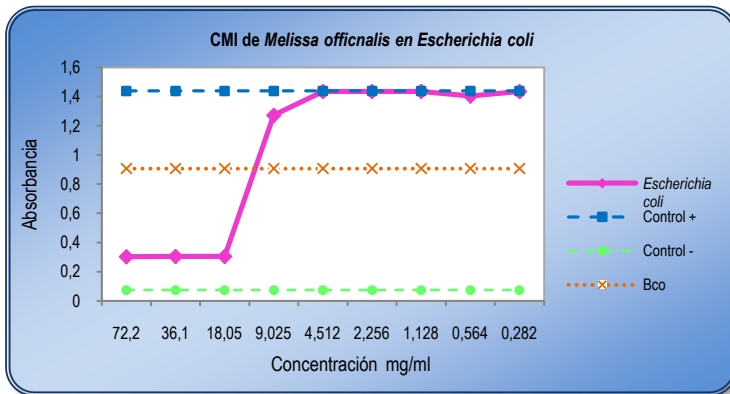
Gráfica No 3 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del extracto de *Melissa officinalis* en *Staphylococcus epidermidis* a diferentes concentraciones. Observe que a 72.2, 36.1, 18.05, 9.025 mg/ml el crecimiento es inhibido por el extracto.



6.6 Efecto del extracto de *Melissa officinalis* en *Escherichia coli* por el método de Mosmann.

Pozo	Concentración (mg/ml)	Abs.
1	72.2	0.3024
2	36.1	0.3045
3	18.05	0.3045
4	9.025	1.2717
5	4.512	1.4348
6	2.256	1.4390
7	1.128	1.4353
8	0.564	1.4041
9	0.282	1.4348
Control +		1.4378
Control -		0.0692
Blanco		0.9062

Tabla No 3 Promedio de absorbancias obtenidas en la microplaca por el Método de Mosmann.



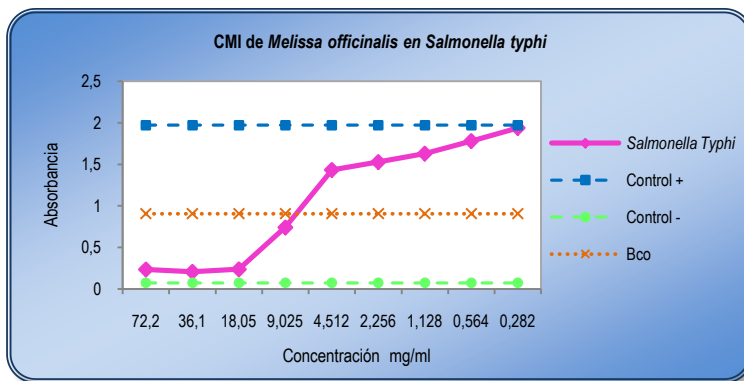
Gráfica No 4 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del extracto de *Melissa officinalis* en *Escherichia coli* a diferentes concentraciones. Obsérvese que a 72.2, 36.1, 18.05 mg/ml el crecimiento es inhibido por el extracto.



6.7 Efecto del extracto de *Melissa officinalis* en *Salmonella typhi* por el método de Mosmann.

Pozo	Concentración (mg/ml)	Abs.
1	72.2	0.2362
2	36.1	0.2083
3	18.05	0.2381
4	9.025	0.7414
5	4.512	1.4330
6	2.256	1.5284
7	1.128	1.6295
8	0.564	1.7805
9	0.282	1.9381
Control +		1.9714
Control -		0.0717
Blanco		0.9062

Tabla No 4 Promedio de absorbancias obtenidas en la microplaca por el Método de Mosmann.



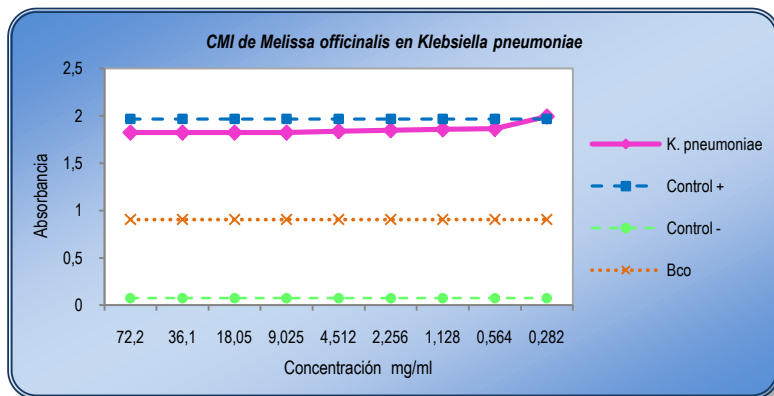
Gráfica No 5 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del extracto de *Melissa officinalis* en *Salmonella typhi* a diferentes concentraciones. Obsérvese que a 72.2, 36.1, 18.05 mg/ml el crecimiento es inhibido por el extracto.



6.8 Efecto del extracto de *Melissa officinalis* en *Klebsiella pneumoniae* por el método de Mosmann.

Pozo	Concentración (mg/ml)	Abs.
1	72.2	1.8250
2	36.1	1.8250
3	18.05	1.8394
4	9.025	1.8394
5	4.512	1.8384
6	2.256	1.8494
7	1.128	1.8590
8	0.564	1.8648
9	0.282	1.9954
Control +		1.9674
Control -		0.0750
Blanco		0.9062

Tabla No 5 Promedio de absorbancias obtenidas en la microplaca por el Método de Mosmann.



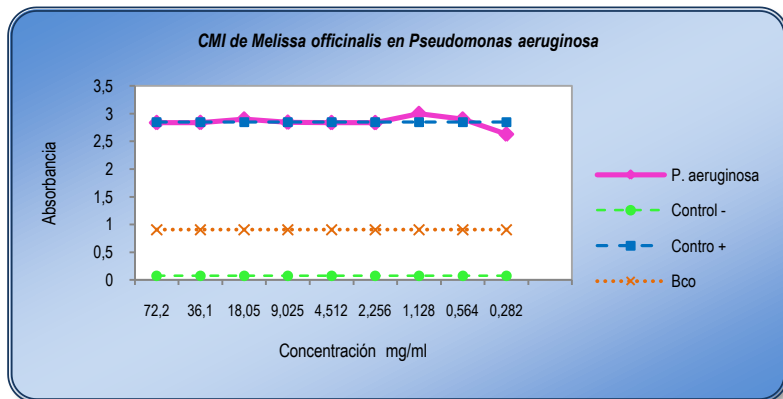
Gráfica No 6 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del extracto de *Melissa officinalis* en *Klebsiella pneumoniae* a diferentes concentraciones. Se puede observar que no hay inhibición por parte del extracto.



6.9 Efecto del extracto de *Melissa officinalis* en *Pseudomonas aeruginosa* por el método de Mosmann

Pozo	Concentración (mg/ml)	Abs.
1	72.2	2.8377
2	36.1	2.8359
3	18.05	2.9
4	9.025	2.8441
5	4.512	2.8372
6	2.256	2.8365
7	1.128	3
8	0.564	2.9
9	0.282	2.6298
Control +		2.8430
Control -		0.0768
Blanco		0.9062

Tabla No 6 Promedios obtenidos de absorbancias en microplaca por el Método de Mosmann.



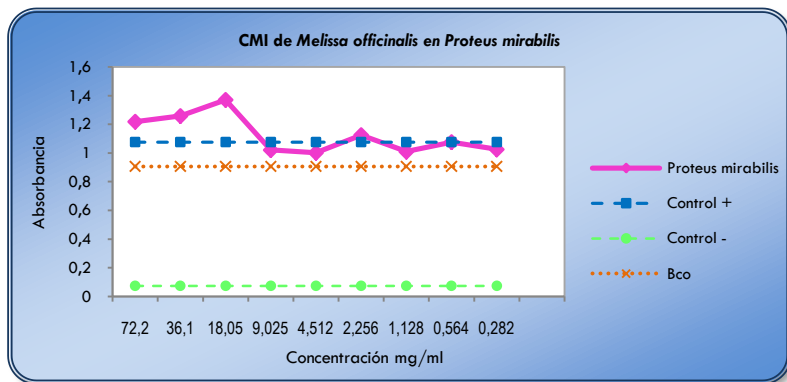
Gráfica No 7 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del extracto de *Melissa officinalis* en *Pseudomonas aeruginosa* a diferentes concentraciones. Se puede observar que no hay inhibición por parte del extracto.



6.10 Efecto del extracto de *Melissa officinalis* en *Proteus mirabilis* por el método de Mosmann

Pozo	Concentración (mg/ml)	Abs.
1	72.2	1.2180
2	36.1	1.2574
3	18.05	1.3697
4	9.025	1.0209
5	4.512	1.0021
6	2.256	1.125
7	1.128	1.0097
8	0.564	1.0764
9	0.282	1.0252
Control +		1.0764
Control -		0.0747
Blanco		0.9062

Tabla No 7 Datos obtenidos de absorbancias del ensayo en microplaca de *Proteus mirabilis*



Gráfica No 8 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del extracto de *Melissa officinalis* en *Proteus mirabilis* a diferentes concentraciones. Se puede observar que no hay inhibición por parte del extracto.



6.11 Prueba Bactericida/ Bacteriostático

Esta es una prueba cualitativa que nos permitió determinar el tipo de efecto que tiene el extracto sobre las bacterias para determinar si a las concentraciones de prueba fue capaz de eliminar completamente a la bacteria o solo inhibió su crecimiento durante su exposición.

El extracto presentó efecto bacteriostático en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* desde la concentración de 72.2 mg/ml hasta 9.025 mg/ml. *Escherichia coli* y *Salmonella typhi* presentaron efecto bacteriostático de la concentración de 72.2 mg/ml hasta 18.05 mg/ml.

Tabla No 8 Efecto bactericida/bacteriostático del extracto de *Melissa officinalis*

Bacteria	Concentración (mg/ml)	Efecto	
		Bactericida	Bacteriostático
<i>S. aureus</i>	72.2 a 9.025		X
<i>S. epidermidis</i>	72.2 a 9.025		X
<i>E. coli</i>	72.2 a 18.05		X
<i>S. typhi</i>	72.2 a 18.05		X
<i>K. pneumoniae</i>	72.2 a 0.282	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	72.2 a 0.282	-	-
<i>P. mirabilis</i>	72.2 a 0.282	-	-

- No presentó efecto

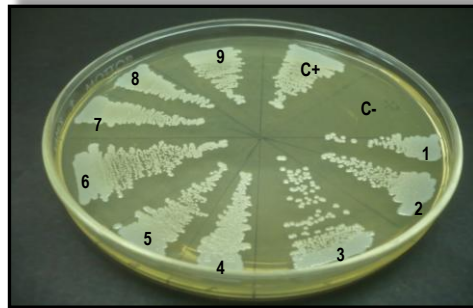


Fig. 10 *Staphylococcus epidermidis* en agar BHI. 1-9: Diluciones del extracto, C+: control positivo, C-: control negativo. Se observa el efecto bacteriostático, al presentarse crecimiento de la bacteria ya que al no estar en presencia del extracto este nuevamente vuelve a crecer.

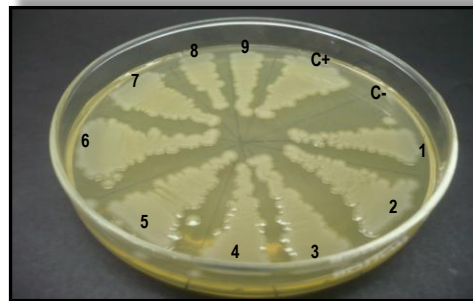


Fig. No 11 *Escherichia coli* en agar BHI. 1-9: Diluciones del extracto, C+: control positivo, C-: control negativo. Se observa el efecto bacteriostático, al presentarse crecimiento de la bacteria ya que al no estar en presencia del extracto este nuevamente vuelve a crecer.

6.12 Resultados de las observaciones obtenidas en Microscopio Electrónico de Transmisión

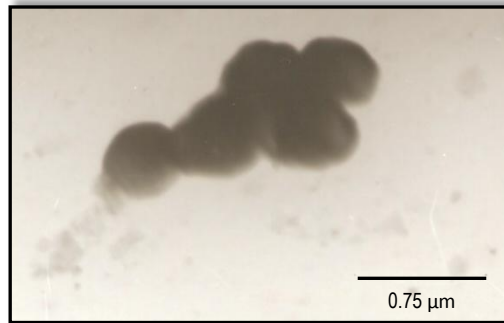


Fig. No 12 Microfotografía electrónica de transmisión con tinción negativa de *Staphylococcus aureus*, control positivo a 10,000 magnificaciones, se puede observar a las bacterias agrupadas en racimos en donde los cocos tienen una morfología normal.

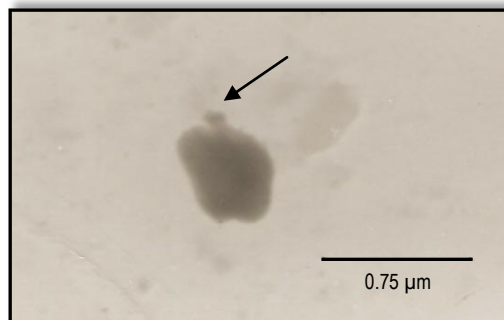


Fig. No 13 Microfotografía electrónica de transmisión con tinción negativa de *Staphylococcus aureus* tratada con el extracto de *Melissa officinalis* a 10,000 magnificaciones, en donde se puede observar que hay deformación de la pared celular.

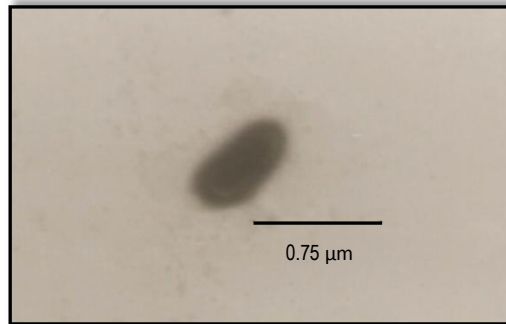


Fig. No 14 Microfotografía electrónica de transmisión con tinción negativa de *Klebsiella pneumoniae*, control positivo a 10,000 magnificaciones, se puede observar un bacilo con estructura morfológica bien definida y la presencia de su cápsula.

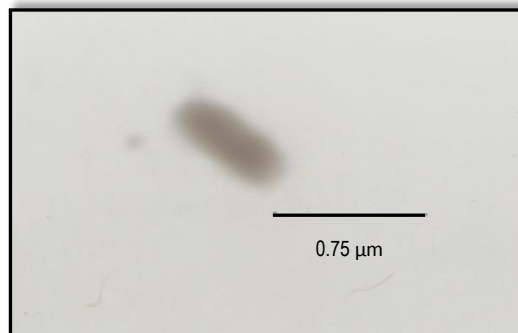


Fig. No 15 Microfotografía electrónica de transmisión con tinción negativa de *Klebsiella pneumoniae* tratada con el extracto de *Melissa Officinalis* a 10,000 magnificaciones, en donde se puede observar que no hay ningún efecto por parte del extracto, ya que se tiene una estructura bacilar típica de la bacteria



7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El tratamiento de las enfermedades bacterianas es la lucha del hombre frente a los microorganismos. El hombre dispone de las propias defensas del organismo y además de armas muy potentes como son los fármacos antimicrobianos, pero muchas de las bacterias pueden desarrollar mecanismos de resistencia. La resistencia de los microorganismos a los antibacterianos es actualmente un problema importante que amenaza la salud pública a nivel mundial, debido a que reduce la eficacia del tratamiento e incrementa la morbilidad, mortalidad y los gastos destinados a cuidados de la salud.⁵⁶

Debido a los problemas de toxicidad, altos costos y la misma resistencia, entre otros, de los fármacos sintéticos es evidente la necesidad de ampliar la oferta de nuevas moléculas con propiedades antibacterianas. Es por ello el interés por las plantas medicinales que ha surgido una vez más en el ámbito de la ciencia, ya que estas contienen una amplia gama de sustancias que pueden ser utilizadas para tratar enfermedades infecciosas.

En México existe una gran diversidad vegetal y cultural lo que ha resultado en un amplio uso con cerca de 7000 especies útiles de un total de casi 22000. De acuerdo con un informe de la Organización Mundial de la Salud, más del 80% de la población mundial depende de la medicina tradicional.⁵⁴ Es esencial la búsqueda de nuevas formas de tratar a las enfermedades, estimulando así la investigación de recursos naturales como una alternativa de tratamiento.

El objetivo principal de este trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana del extracto de *Melissa officinalis* en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus mirabilis*. Esta planta pertenece al género de las Lamiáceas posee propiedades terapéuticas como antiespasmódico, sedativo, anti-inflamatorio, antioxidante, antiviral y antibacterial.

La solución de trabajo se ensayo con las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi* y *Proteus mirabilis*, el criterio utilizado fue que son agentes patógenos para los humanos por su relación con diferentes cuadros clínicos además de que crean resistencia con mucha facilidad.



Ergin Uzun et al. 2004 quien investigo la actividad antimicrobiana de 12 plantas medicinales y Gislene G. et al. 2000 en donde determino la actividad antibacterial de extractos de plantas y fitoquímicos, evalúan su extracto con este tipo de bacterias.

El extracto se esterilizo por filtración, posteriormente se realizo una prueba de esterilidad sembrando en placas de agar BHI para corroborar que estuviera libre de microorganismos y así no interfirieran en el ensayo, obteniendo resultados negativos de crecimiento, lo cual nos indica que el método de esterilización por filtración, es eficaz para aquellos compuestos líquidos que pueden descomponerse por acción del calor.

Se lleva a sequedad a una temperatura de 30-36 °C, con la finalidad de evaporar a los disolventes, principalmente el etanol, para así descartar que el efecto antimicrobiano estuviera asociado a esté y no a los metabolitos extraídos por la mezcla hidroalcohólica.

Para evaluar la actividad antimicrobiana del extracto, la materia seca se disolvió con un 1 ml de DMSO y se aforo a 10 ml con Solución Salina Fisiológica estéril, teniendo una concentración de 72.2 mg/ml. Encontramos que el DMSO tiene propiedades bactericidas solamente a concentraciones entre 30-50%, por lo tanto podemos decir que en este trabajo el DMSO no interfiere ya que se encuentra en una concentración del 10%, además de que es un disolvente que nos permitió que el extracto se disolviera perfectamente.

Aunque nosotros no realizamos una prueba sobre el efecto del DMSO en las bacterias, en una investigación previa realizada por Martino Laura et al. 2009 quien investigo la composición química y actividad antimicrobiana *in-vitro* del aceite esencial de siete plantas, utilizó también como disolvente al DMSO en donde comprueba que este no interfiere en la actividad antimicrobiana de *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, y *Bacillus cereus*.

En este trabajo se determinó la sensibilidad del extracto en *Staphylococcus aureus*. En la Figura No 9 se puede ver que en donde se coloco la cantidad de extracto no hubo crecimiento, este nos permitió ver la actividad del extracto en dicha bacteria y damos la pauta a seguir con un método cuantitativo.

Nosotros obtuvimos una zona de inhibición no muy bien definida ya que al colocar la cantidad de extracto directamente sobre el agar, este se distribuyo de manera amorfa, por lo que sería más conveniente recurrir a otro método como el que utilizo Nurdan Sarac et al. 2007 para evaluar la



actividad de su extracto, en donde empleo la técnica de difusión en agar impregnando 20µl del extracto en discos de papel filtro, colocándolos en placas e incuban a 37 °C por 24 hrs. Al depositar el disco en la placa, los componentes del extracto se difunden al medio, permitiendo así la formación de zonas de inhibición bien definidas. Consideramos que esta técnica es adecuada para evaluar de manera cualitativa y rápida la posible actividad antimicrobiana de diversos extractos.

Shanab Bassam et al. 2006 utilizo el método de microdilución en caldo para determinar las Concentraciones Mínimas Inhibitorias de su extracto. Al igual que este autor nosotros empleamos la misma técnica pues es un método que nos proporciona datos cuantitativos, además de que tiene muchas ventajas, una de ellas es la utilización de pequeños volúmenes de reactivo y muestra, en donde pueden probarse grandes cantidades de bacterias de un modo simple y económico en comparación con la macrodilución en caldo que fue una de las primeras en desarrollarse y que aún sirve como método de referencia pero requiere de volúmenes mayores.

Para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), se realizaron diluciones dobles del extracto, utilizando como medio de cultivo BHI. Shiva Ramayoni et al 2007 menciona que para la evaluación de la Concentración Mínima Inhibitoria de extractos de plantas se puede utilizar caldo nutritivo, caldo triptona soya, caldo infusión cerebro corazón, ya que no existe una estandarización de la metodología para la evaluación de la capacidad inhibitoria de extracto de plantas, como se establece para los antibióticos, tal es el caso de Mann C. el at. 1998 en donde para determinar la CMI de su extracto emplea caldo nutritivo y caldo Infusión Cerebro Corazón.

Para evidenciar los resultados obtenidos por la dilución en microplaca se empleo el Método de Mosmann, el cual nos permitió determinar la Concentración Mínima Inhibitoria. Este método fue desarrollado por Mosmann en 1983 siendo modificado en 1986 por Francois Denizot y Rita Lang.²²También se ha podido determinar el efecto citotóxico de algunos extractos sobre líneas celulares ya que mide la viabilidad, proliferación y activación de células, o bien las CMI sobre bacterias como *Helicobacter Pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Candida albican*.⁶⁶

Este Método es un ensayo colorimétrico en donde nos permitió visualizar si hubo inhibición por parte del extracto. Las bacterias metabólicamente activas producen la reducción del compuesto dando como resultado el cambio de color a violeta (formazan).

Las bacterias no viables inhibidas por el extracto no inducen el cambio de color, permaneciendo el colorante en su forma oxidada de color amarillo.

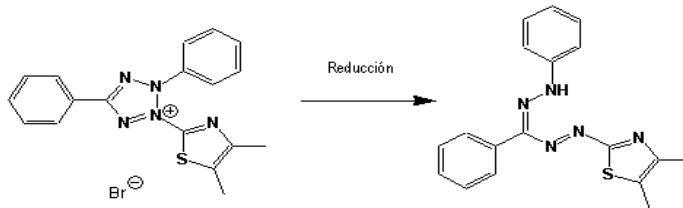


Fig. No 16 Reducción de la sal de tetrazolium a formazan

Las sales de tetrazolium se conocen desde 1894, son actualmente utilizadas para medir actividad respiratoria asociada a cadena de transporte de electrones que operan bajo condiciones de respiración aeróbica o anaeróbicas, de esta manera nos permiten medir la actividad metabólica de las bacterias ya que estas poseen sistemas de enzimas deshidrogenasas.

Amal G. et al 2007 utiliza la sal de XTT para determinar la actividad antimicrobiana de algunos extractos, el comenta que la actividad antimicrobiana también puede ser detectada al realizar un recuento viable después de la exposición del extracto. Si bien esto revela el número exacto de bacterias viables, surgen limitaciones con cepas bacterianas que tienden a agruparse y con una tasa de crecimiento lento. Por lo tanto considera que las técnicas que emplean este tipo de sales tienen ventajas como las de ser de rápido, fácil uso y la de detectar de manera rápida la CMI.

Los resultados obtenidos de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias por este método para bacterias Gram positivas se muestra en las gráficas No 2 y No 3, en donde para *Staphylococcus epidermidis* se determinó una concentración de 9.025 mg/ml al igual que para *Staphylococcus aureus*, esta concentración en comparación con la obtenida por Shanab Bassam et al. 2006 es más elevada ya que el reporta una concentración de 3.125 mg/ml y una Concentración Mínima Bactericida de 12.5 mg/ml. Nuestro extracto no presenta esta actividad. Esto probablemente se debió a que el contenido de los principios activos se sabe que depende considerablemente de factores intrínsecos y extrínsecos.



Así mismo hizo una comparación entre una extracción etanólica y una extracción acuosa por el método de difusión en agar, obteniéndose zonas de inhibición mayores con el extracto etanólico. Esto sin duda nos hace pensar que la elección del método de extracción y el uso de disolvente es un factor importante para la máxima obtención de los metabolitos presentes en las plantas.

Los resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria para bacterias Gram negativas se muestran en las gráficas No 4 y No 5 en donde para *Escherichia coli* y *Salmonella typhi* es de 18.05 mg/ml. Podemos notar que para estas bacterias se presento más resistencia al extracto que *S. aureus* y *S. epidermidis* ya que estas bacterias necesitaron menor concentración para inhibirlas.

En base a los resultados obtenidos podemos ver que *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, son más sensibles al extracto posiblemente puede deberse a la estructura de la pared ya que al ser un gram positivo posee una estructura menos compleja pues esta compuesta por una membrana citoplasmática y una capa gruesa de peptidoglicano, en comparación con las bacterias gram negativo que tienen una pared más compleja pues posee una membrana externa, membrana citoplasmática, una delgada capa de peptidoglicano, lipopolisacárido y proteínas que los hace más resistentes al extracto en el caso de *Escherichia coli* y *Salmonella typhi*.

Las únicas bacterias en donde el extracto no tuvo ningún efecto (Ver gráfica No 6, 7, 8) fue en *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*. Estos datos los comparamos con los obtenidos por Gislen G. et al. 2000, el enfrenta el extracto con *Pseudomona aeruginosa* aislada de muestras clínicas y *Pseudomona* resistente a varios antibióticos en donde no existió inhibición por parte del extracto, al igual que nuestro trabajo.

Más adelante hace lo mismo con *Klebsiella pneumoniae* (aislada de muestras clínicas resistente solo a ampicilina y otra resistente a una variedad de ellos). En este caso solo presenta inhibición en aquella que es resistente a ampicilina, por nuestra parte no obtuvimos inhibición, aquí la posible razón es que el extracto se utilizo a una concentración de 200 mg/ml que es mucho mayor que la que nosotros probamos.

La siguiente prueba que se realizó fue evaluar si el extracto presentaba actividad bactericida o bacteriostática. Después del periodo de incubación de la microplaca y antes de adicionar el reactivo de MTT se transfirió una asada de cada uno de las diluciones y se inocularon en placas de agar.



Los resultados se muestran en la Fig. No 10 en donde se puede observar que el efecto por parte del extracto en *S. epidermidis* fue bacteriostático, teniendo resultados iguales en *S. aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella typhi*, ya que al sembrarlas en un medio que carece de dicho inhibidor (extracto) pueden recuperar su crecimiento.

Finalmente para evidenciar el posible daño estructural de la bacteria producido por el extracto de *Melissa officinalis*, se empleo la Microscopia Electrónica de Transmisión en donde se utilizo la técnica de tinción negativa. Dado que esta técnica es costosa solo empleamos dos bacterias de las siete trabajadas. Una Gram positiva (*Staphylococcus aureus*) en donde el extracto presento actividad y una Gram negativa (*Klebsiella pneumoniae*) en donde no tuvo ningún efecto.

Al realizar las observaciones a 10,000 magnificaciones (Fig. No 11) de *Staphylococcus aureus* encontramos que la muestra no tratada (control positivo) se observan bordes bien definidos, tamaño uniforme y agrupamiento en forma de racimos. Mientras que la muestra tratada con el extracto (Fig. No 12) mostro deformación o bien inestabilidad de la pared celular y la posible formación de protoplastos debido probablemente a que el extracto esta actuando a nivel de la pared celular.

Pérez Avendaño et al 2008 también encontró este tipo de estructuras en *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus faecalis*, menciona que la formación de protoplastos anteceden a la lisis de bacterias gram positivas, se forman porque la pared celular se debilita y se pierde, por lo cual el agua puede entonces entrar a la célula y esta se hincha y explota en un fenómeno de lisis. Los protoplastos se presentan en bacterias gram positivas que han perdido su pared celular y son osmóticamente sensibles, al encontrarse las bacterias en un medio isotónico, la presión osmótica interna se equilibra con la externa, al perderse este equilibrio las bacterias se lisan inmediatamente.

Hay dos posibles métodos por los cuales se puede destruir la pared celular, uno es el ataque al peptidoglicano, como lo hace la enzima lisozima que hidroliza el enlace que une el ácido N-acetilmurámico con el carbono 4 de la N-acetilglucosamina o por inhibición de la síntesis de nuevo peptidoglicano en células en crecimiento como es el caso de la penicilina.

Al realizar las observaciones a 10,000 magnificaciones de *Klebsiella pneumoniae* (Fig. No 13) encontramos que la muestra no tratada (control positivo) y la tratada con el extracto (Fig. No 14) no tuvo ningún efecto, por lo tanto su estructura morfológica es la característica de un bacilo con pared bien definida.



Muchos mecanismos de acción de los extractos no son bien conocidos, pero se sabe que generalmente tienen actividad en la membrana celular o pared celular alterando su estructura, ya que se ven afectados lípidos y proteínas. Como consecuencia hay una pérdida de iones y de otros contenidos celulares desestabilizando así a la membrana.⁷⁵

Aunque no sabemos el mecanismo de acción y que compuestos son los que pudieran realmente estar actuando sobre las bacterias, los resultados obtenidos de las CMI y de la Microscopía Electrónica nos proporcionan un indicio de que este extracto está presentando actividad antimicrobiana sobre dichas bacterias. Por lo que marca la pauta a seguir realizando más estudios.



8. CONCLUSIONES

- Logramos identificar a *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus mirabilis* mediante pruebas bioquímicas primarias y secundarias.
- Se logro obtener las Concentraciones Mínimas Inhibitoria del extracto de *Melissa officinalis* en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* y *Salmonella typhi* por la técnica de microdilución en caldo evidenciado por el Método de Mosmann.
- Se logro determinar el efecto bacteriostático de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* y *Salmonella typhi*.
- Por medio de la Microscopia Electrónica de Transmisión nos permitió ver el efecto producido por el extracto en *Staphylococcus aureus*.



9. APÉNDICES

APÉNDICE A PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO.

MTT (bromuro de (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio)

Disolver MTT en RPMI-1640 rojo de fenol, hasta una concentración de 5 mg/ml.

Filtrar con membrana de 0.22 μ m.

Guardar a una temperatura de 4° C, hasta su uso.

Ácido Fosfotúngstico

El ácido es una solución al 2% ajustada al pH de 7.0 mediante NaOH 1N.

S5F estéril

Por cada 100 ml de agua destilada agregar 850 mg de NaCl

Esterilizar en autoclave a 121° C, 15 libras de presión, durante 15 minutos.

Tinción de Gram

- Fijar el frotis al calor
- Aplicar sobre el portaobjetos el primer colorante que corresponde a cristal violeta durante 1 minuto.
- Lavar con agua para eliminar el exceso de colorante.
- Colocar Lugol que actúa fijando el colorante anterior a las bacterias, aplicándose durante 1 minuto
- Se vuelve a eliminar el exceso mediante un lavado con agua.
- Decolorar con alcohol-cetona hasta arrastrar todos los restos.
- Lavar con agua.
- Cubrir el portaobjetos con el segundo colorante o colorante de contraste (safranina) durante 1 minuto.



- Dejar secar al aire libre y observar al microscopio

Interpretación Se observan por campo bacterias de color azul violáceo que corresponde a bacterias Gram + y/o bacterias de color rojo rosado que corresponden a Gram -.

Preparación de medios de cultivo.

Agar BHI

Disolver 37g del medio en 1 lt de agua destilada. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Esterilizar a 12 °C (15 libras de presión, durante 15 minutos. Dejar enfriar a temperatura ambiente y vaciar en cajas petri

Caldo BHI

Disolver 37g del medio en 1 lt de agua destilada. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Esterilizar a 12 °C (15 libras de presión, durante 15 minutos. Dejar enfriar a temperatura ambiente y vaciar en cajas petri

Agar Sangre

Disolver 40 g del medio en 1 lt de agua destilada. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Esterilizar a 12 °C (15 libras de presión, durante 15 minutos. Dejar enfriar y agregar 5 % de sangre de carnero desfibrinada estéril
Distribuir en placas estériles

Agar MacConkey

Disolver 50g del medio en 1 lt de agua. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121 °C (15 libras de presión), durante 15 minutos. Dejar enfriar a temperatura ambiente y vaciar en cajas petri.



APÉNDICE B IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS.

Bacterias Gram positivo

El aislamiento de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* cumplió con las características morfológicas y bioquímicas correspondientes para la identificación de dichas bacterias

Determinación	Resultado
Morfología colonial en agar sangre	Colonias circulares, superficie lisa pigmentación amarilla y beta hemolítica.
Morfología microscópica	Cocos Gram (+) en forma de racimo de uva.
Catalasa	+
Oxidasa	-
Coagulasa	+
Manitol	+

Tabla No 9 Pruebas realizadas para la validación de *Staphylococcus aureus*.

Determinación	Resultado
Morfología colonial en agar sales manitol	Colonias blancas circulares, superficie lisa
Morfología microscópica	Cocos Gram (+) en forma de racimo de uva.
Catalasa	+
Oxidasa	-
Coagulasa	-
Manitol	-
Novobiocina	Sensible

Tabla No 10 Pruebas realizadas para la validación de *Staphylococcus epidermidis*



Bacterias Gram negativo

Determinación	Resultado				
	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Proteus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. typhi</i>
Catalasa	+	+	-	+	+
Oxidasa	-	+	-	+	-
Motilidad	+	+	+	+	+
Indol	+	-	-	-	-
RM	+	-	+	-	+
VP	+	+	-	-	-
Citrato	-	+	+	+	+
Urea	-	-	+	+	-
H ₂ S	-	-	+	-	+
Malonato	-	-	-	+	-
Lactosa	+	-	-	-	-
Ornitina descarboxilasa	+	-	+	-	-
Lisina descarboxilasa	+	+	-	-	+
ONPG	+	+	-	-	-
NO ₂	+	+	+	-	-

Tabla No 11 Pruebas realizadas para la validación de bacterias gram negativo



10. REFERENCIAS

1. Alonso, Jorge. (2004). **Tratado de Fitofármacos y Nutracéuticos**. Editorial Corpus. Argentina. Pág. 272-754.
2. Amal G. et al. (2007). **Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetry and bacterial enumeration**. Journal of Microbiological Methods. 68:19-25.
3. Andrade Verónica, Silva Jesús. (2004). **Caracterización de *Klebsiella pneumoniae* productora de β -lactamasa SHV-5 en una unidad de cuidados intensivos**. Salud Pública México. 46:524-528.
4. Arciola Carla, Campoccia Davide. (2004). **Search for the insertion element IS256 within the ica locus of *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates collected from biomaterial-associated infections**. Biomaterials 25:4117-4125.
5. Arias Isabel y Hugué Carlos. (2002). **Detección molecular de toxinas termoestable y termolábil de *Escherichia coli* mediante hibridación**. Salud Pública México. 19:193-196.
6. Avalos, Luis. (2006). **Enfermedades bacterianas prevenibles con vacunas: fiebre tifoidea**. Salud Pública México. 40:311-315.
7. Azotla Gutiérrez, Jorge. (2000). **Estudio retrospectivo de la incidencia microbiana en heridas**. Tesis de Licenciatura Q.F.B. UNAM FES-C. Estado de México.
8. Biochemical's organic compound. (1994). For Research and Diagnostic Reagents, Sigma. Pág. 1625.
9. Bolton Declan, Duffy Geraldine, Baylis Chris. (2006). **Epidemiology and Transmission of Pathogenic *Escherichia coli***. Food Research. 1:1-22.
10. Brooks Geo, Butel Janel, et al. (2005). Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 18° ed. **El Manual Moderno**. México D.F
11. Bustos Jaime, Hamdan Aida, Gutiérrez Marcia. (2006). ***Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad**. Rev. Biomed. 17:287-305.
12. Cabrera, Gaytan. (2006). **Epidemiología: Historia de las epidemias en el mundo**. Salud Pública México. 23:1-3.
13. Calva, Edmundo. (2001). **Microbios**. UNAM. Instituto de Biotecnología. Estado de México. Pág. 1-12.



14. Camacho Adrian, Acosta Gisela. (2007). **Resistencia antimicrobiana de *Pseudomonas aeruginosa* en un hospital de enseñanza del norte de México.** Enf. Inf. Microbiol. 27:44-48.
15. Carmona, Ignacio. (2005). **Enfermedad y Sociedad en los primeros tiempos modernos.** Publicaciones de la Universidad de Sevilla. España. Pág. 135-136.
16. Carnat, D et al. (1998). **The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*) tea.** Pharmaceutica Acta Helvetiae. 72:3001-305.
17. Chippendale G, Warren J. (1994). **Internalization of *Proteus mirabilis* by Human Renal Epithelial cells.** Infection and Immunity. 62:3115-3121.
18. Costa, M et al. (2001). **Nosocomial pneumonia: importance of recognition of etiological agents to define an appropriate initial empirical therapy.** International Journal of Antimicrobial Agents. 17:147-150.
19. Cuesta Joao, Matar Salim. (2003). **Caracterización molecular de cepas de *E. coli* O157: H7 aisladas de humanos en Bogotá, D. C.** Universidad de Córdoba, Instituto de Investigaciones Biológicas del trópico, Colombia, Sur América. 35:116-121.
20. De la Rosa, Manuel. (1997). **Microbiología en ciencias de la salud conceptos y aplicaciones.** 2º ed. Elsevier. México. Pág. 45-47.
21. Del Carmen Peña, Noemí. (2006). **Investigación hemero-bibliografica de aspectos mas recientes de la producción de diarrea por los diferentes patotipos de *Escherichia coli* en México, haciendo énfasis en ETC y EHEC.** Tesis de Licenciatura Q.F.B. UNAM FES-C. Estado de México.
22. Denis Gerlier, Thomasset Nicole. (1986). **Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation.** Journal of Immunological Methods. 94:57-63.
23. Daza Pérez, R.M. (1998). **Resistencia a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria.** Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud. 22:57-67.
24. Ergin, Uzun et al. (2004). **Traditional medicine in Sakarya province and antimicrobial activities of selected species.** Journal of Ethnopharmacology. 95:287-296.
25. Fernández, Fernando. (2003). **Resistencia microbiana.** Med. Milit. 32:44-48.
26. Fernández, Milagro., Contreras, Mónica., García, Alexandra. (2007). **Occurrence of *Proteus mirabilis* Associated with two species of Venezuelan oysters.** Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo. 49:355-359.



27. Ferreira Aldo, Oliveira Juremi, Silvia. (2002). **The dangers of enterohaemorrhagic Escherichia coli: an emergent pathogen**. Rev Biomed. 13:124-129.
28. Gislene G, Locatelli J. et al. (2000). **Antibacterial activity of plant extracts phytochemicals on antibiotic resistant bacteria**. Journal of Microbiology. 31:247-256.
29. Gómez M, Alcántara E, Simarro B. (2002). **Bacteriemias por Pseudomonas aeruginosa: epidemiología, clínica y tratamiento. Estudio prospectivo de siete años**. Rev. Esp. Quimioterap. 15:360-365.
30. González, Sofía et al. (2003). **Guía de Microscopia Electrónica**. UNAM. FESC. Edo de México Cuautitlán Izcalli.
31. Green Amy, Boeldt Melissa. **Characterization of mutations in hpmB of the Proteus mirabilis Hemolysin System that Result in Altered activation and secretion functions of the Hemolysin**. Clinical Science. 20:201-208.
32. [http:// es .wikipedia.org/wiki/imagen:Melissa_Officinalis](http://es.wikipedia.org/wiki/imagen:Melissa_Officinalis)
33. http://es.wikipedia.org/wiki/proteus_mirabilis.
34. <http://www.geocities.com/anthacispy/histria.htm>.
35. <http://sisbib.unmsnm.edu.pe/bibvirtualdata/tesis/basic.antece.pdf>
36. Izquierdo, Luis. (2003). **Biosíntesis de lipopolisacárido de Klebsiella pneumoniae**. Tesis Doctoral en Biología. Universidad de Barcelona. Facultad de Biología.
37. James P, Humphreys H. (2001). **Staphylococcus epidermidis biofilms: importance and implications**. Med. Microbiol. 50:582-587.
38. Joanne Barnes, Anderson Linda, Phillipson David. (2007). **Herbal medicines**. 3º ed. London Pharmaceutical Press.
39. Jurado S, Petruccelli M. (2005). **Aplicaciones de la Microscopia Electrónica de Transmisión en el Diagnóstico microbiológico**. Veterinaria. 25:18-24.
40. Keiji Iwatsuki, Osamu Yamasaki, Shin Morizane. (2006). **Staphylococcal cutaneous infeccions: Invasion, evasión and aggression**. Journal of Dermatology Science. 42:203-214.
41. Kuklinski, Claudia. (2000). **Farmacognosia: estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural**. Ediciones Omega. Barcelona. Pág. 271.
42. Kumate, Jesus. (1993). El cólera: Epidemias, endemias y pandemias. Interamericana McGraw-Hill. México. Pág. 5-7.
43. Largo Rafael, Donoso José. **Neuropatía a Proteus**. Revista Chilena de Pediatría. 44:354-358.



44. López Bartolomé, De la Torre Fernando, Picazo Juan. **Infección del Tracto Urinario: flora saprofita, resistencia bacteriana a los antimicrobianos.** Servicios de Microbiología Clínica. Hospital Clínico San Carlos. Madrid. 5:65-79.
45. López M, Calva E. (2006). **Estudios Mexicanos sobre Salmonella: epidemiología, vacunas y biología molecular.** Revista latinoamericana de Microbiología. 48:121-125.
46. Lujan Daniel, Ibarra Jimmy, Mamani Edgar. (2008). **Resistencia a los antibióticos en aislados clínicos de Pseudomonas aeruginosa en un hospital universitario en Lima, Perú.** Rev. Biomed. 19:156-160.
47. Madigan Michael, Brock Jack. (2004). **Biología de los microorganismos.** 10º ed. Editorial Pearson. Madrid España.
48. Mann, C. (1998). **A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils.** Journal Microbiology 84:538-544.
49. Margall Nuria, Domínguez Ángela. (1997). **Escherichia coli Enterohemorrágica.** Rev. Espa. Salud Pública. 71:437-443.
50. Marhova M, Kaynarova E. (2005). **Effect of Blueberry extract on pathogenic strains Escherichia coli and proteus mirabilis.** Proceedings of the Balkan Scientific Conference of biology. Pág. 21-27.
51. Martínez, Juan. (1990). **Estudio de Pseudomona aeruginosa aisladas del Hospital General centro Medico "La Raza" mediante el uso de tres marcadores epidemiológicos.** Tesis de licenciatura Q.F.B. UNAM FES-C. Edo de México.
52. Martino, Laura. (2009). **Chemical composition and in vitro antimicrobial and mutagenic activities of seven Lamiáceas essential oils.** Molecules. 14:4213-4230.
53. Massad George, Zhao Hui. (1995). **Proteus mirabilis Amino Acid Deaminase: Cloning, Nucleotide sequence, and Characterization of add.** Journal of Bacteriology. 5:5878-5883.
54. Martínez, David et al. (2006). **Plantas medicinales de cuatro mercados del estado de Puebla, México.** Sociedad Botánica de México. 79:79-87.
55. Morales, S. (2002). **Efecto de Caléndula Officinalis en Pseudomonas aeruginosa por Microscopia Electrónica.** Tesis de Licenciatura Q.F.B. UNAM FES-C. Edo de México.
56. Murillo Joel, Quintero L, López Garamond. (2008). **Patrón de resistencia antimicrobiana de Pseudomona aeruginosa en el hospital de Culiacán.** Sociedad Medica del Hospital de Culiacán. 3:6-12.
57. Mussaret Zaidi, Martin Gloria, Rosado Rilke. (1999). **Epidemia de neumonía asociada a ventilación mecánica en Mérida Yucatán.** Salud Publica México. 41: 38-43.



58. Nicola Zetola, Francis John, Nuemberger Eric. (2005). **Community-acquired meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat**. *Lancets infect. Dis.* 5:275-86.
59. Narváez C, Carruyo G, Moreno M. (2007). **Aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7 en muestras de heces de ganado bovino doble propósito del municipio de Miranda, Venezuela**. *Revista científica.* 17:239-245.
60. Nurdan, Sarac. (2007). **Antimicrobial activities and usage in folkloric medicine of some Lamiáceas species growing un Mugla, Turkey**. *Journal of BioScienses.* 4:28-37.
61. Ortiz Miguel, Mora Javier. (2009). **Colonización bacteriana y susceptibilidad de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de pacientes quemados infectados del Hospital Regional de Alta Especialidad de Veracruz**. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología.* 29:11-19.
62. Pérez Avendaño, Yolanda. (2008). **Determinación del efecto inhibitorio de tres extractos naturales: *Caléndula officinalis*, *Echinacea purpúrea* e *Hippocratea excelsa*, (solos y combinados) en bacterias aisladas de casos de mastitis bovina**. Tesis de licenciatura Q.F.B. UNAM FES-C. Edo. de México.
63. Piette, G. Verschraegen. (2009). **Role of coagulase-negative staphylococci in human disease**. *Veterinary microbiology* 134: 45-54.
64. Pigott, D. (2008). **Enfermedades asociadas a los alimentos**. *Emergency Medical Clinic North America.* 26:475-97.
65. Podschun, R., and U. Ullman. (1998). ***Klebsiella spp* as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors**. *Clin. Microbiol. Rev.* 11:589-603.
66. Ramírez Zúñiga, Gabriela.(2009). **Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto *Eucalyptus globules* con *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* todas estas de importancia medica**. Tesis de Licenciatura Q.F.B. UNAM FES-C. Edo de México.
67. Rodríguez de Romo, Ana Cecilia. (1994). **Epidemia de cólera en 1850 [recurso electrónico]: Análisis histórico-médico de un curioso manuscrito**. *Nueva Época.* 4:6-9.
68. Rodríguez, Guadalupe. (2002). **Principales características y diagnostico de los grupos patógenos de *Escherichia coli***. *Salud Pública México.* 44:464-475.
69. Romero Argeo, Martínez Gilberto, Flores Oscar. (2007). **Perfil epidemiológico de las infecciones nosocomiales en un hospital de alta especialidad del sureste Mexicano**. *Salud en Tabasco.* 12:618-624.



70. Ryszard K, Adam K. (2003). **Ocurrence of the Yersenia high pathogenicity island and iron uptake systems in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae**. Microbial pathogenesis. 35:197-202.
71. Sánchez Martínez, M. Rodríguez Zapata. (1998). **Salmonelosis: fiebre tifoidea. Otras formas clínicas sistémicas**. Medicine. 7:3659-3665.
72. Shanab Bassam, Adwan Ghaleb, Jarrara Naser et al. (2006). **Antibacterial activity of four Plant Extracs used in Palestine in Folkloric Medice against Methicillin-resistant Staphylococcus aureus**. Journal Bio. 30:195-196.
73. Shinako R, Jimena A, Soichiro K. (2007). **Nosocomial outbreak of genetically related IMP-1 lactamase- rproducing Klebsiella pneumoniae in a general hospital in Japan**. Antimicrobial Agents. 29:306-310.
74. Shiva Ramayoni, Martin. (2007). **Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos**. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona. Facultad de Veterinaria.
75. Sikkema, J et al. (1995). **Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons**. Microbiology Rev. 50:201-222
76. Stankowska Dorota, Kwinkowski Marek. (2008). **Quantification of Proteus mirabilis virulence factors and modulation by acylated homoserine lactones**. Journal Microbiol Immunil Infect. 41:243-253.
77. Tóth J, Mrlianová M, Tekelová D. (2003). **Rosmarinic acid an important phenolic active compound of lemon balm (Melissa officinalis L.)** Faculty of Pharmacy. 50:139-146.
78. Trautmann M. (2004). **O antigen seroepidemiology of Klebsiella clinical isolates and implications for inmunoprophylaxis of Klebsiella infections**. Vaccine. 22:818-821.
79. Valdés Dapena, Rodríguez Orlando, Ceballos Elina. (1997). **E. coli enterohemorrágico (ECEH) O157:H7 como causa de diarreas**. Microbiology. 33:91-96.
80. Velázquez- Meza. (2005). **Surgingimiento y diseminación de Staphylococcus aureus meticilinorresistente**. Salud Publica México. 47:381-387.
81. Vidal E, Canizales A, Gutiérrez J. (2007). **Patogénesis molecular, epidemiología y diagnostico de Escherichia coli enteropatógena**. Salud Pública México. 49:376-386.
82. Zinsser, Hans. (1998). **Microbiología**. 20° ed. Médica Panamericana. Madrid España. Pág. 785, 570-571.