



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

“RETO MICROBIOLOGICO DE EXTRACTOS DE
Calendula officinalis CON BACTERIAS AISLADAS EN
CASOS DE METRITIS Y MASTITIS BOVINA”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A N :

ANGELICA CORDERO SEVILLA

ANEL GEORGINA GONZALEZ MORALES

ASESORES: MVZ. GERARDO CRUZ JIMENEZ
MVZ. JOSE ANTONIO LICEA VEGA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA 28
MEXICO

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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

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



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

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

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

"Reto microbiológico de extractos de Calendula officinalis
con bacterias aisladas en casos de metritis y mastitis bovina"

que presenta la pasante: Angélica Cordero Sevilla
con número de cuenta: 9656454-5 para obtener el título de :
Química Farmacéutica Bióloga

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 2 de Marzo de 2005

PRESIDENTE	MVZ. Gerardo Cruz Jiménez	
VOCAL	QFB. Juan Chiu Chan	
SECRETARIO	Dra. Susana E. Mendoza Elvira	
PRIMER SUPLENTE	MC. Lidia Rangel Trujano	
SEGUNDO SUPLENTE	QFB. Benjamín Velasco Bejarano	



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

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



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

**DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAL TITLAN
P R E S E N T E**

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

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

"Reto microbiológico de extractos de Calendula officinalis

con bacterias aisladas en casos de metritis y mastitis
bovina"

que presenta 1a pasante: Anel Georgina González Morales
con número de cuenta: 9658500-5 para obtener el título de :
Química Farmacéutica Bióloga

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

**ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 2 de Marzo de 2005

PRESIDENTE	MVZ. Gerardo Cruz Jiménez	
VOCAL	QFB. Juan Chiu Chan	
SECRETARIO	Dra. Susana E. Mendoza Elvira	
PRIMER SUPLENTE	MC. Lidia Rangel Trujano	
SEGUNDO SUPLENTE	QFB. Benjamín Velasco Bejarano	

AGRADECIMIENTOS:

A la UNAM y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por mi formación profesional.

A mis asesores MVZ. Gerardo Cruz y MVZ. José A. Licea por todo el tiempo y enseñanzas compartidas.

A los sinodales por su valiosa colaboración en la conclusión de este trabajo, así como a los profesores: Guadalupe Sevilla, Susana E. Mendoza y Enrique Angeles en la realización del mismo.

A mi amiga de tantos años y que quiero mucho: Anel, por tu amistad incondicional y por tu apoyo en todo momento.

A quienes me ayudaron y confiaron en mí, en especial a Alejandra y al Q. Guillermo Rodríguez.

A todas esas personas tan importantes en mi vida que con su aliento hicieron posible que terminara uno de mis sueños. Muchas Gracias.

Angélica

DEDICATORIAS:

A mi madre:

Esto comenzó por ti y es el resultado de tu amor, paciencia, apoyo y sacrificios compartidos conmigo. Te amo.

A mis hermanos:

Diana y José Luis por tenerlos siempre a mi lado.

Angélica

AGRADECIMIENTOS

A Dios: Gracias, por darme la vida, por los padres que me diste, pero sobre todo te doy gracias por la maravillosa hija que me mandaste.

A la más grande casa de estudios la UNAM, gracias por abrirme sus puertas y ser universitaria.

A mi FES-Cuautitlán por ser parte de mi vida, por ser mi segunda casa en donde realice mis sueños "Ser profesionista".

A mis asesores MVZ Gerardo Cruz Jiménez y MVZ J. Antonio Licea Vega, por su tiempo, enseñanza y paciencia que me brindaron.

A mis sinodales, por haber dedicado su valioso tiempo en la revisión y mejoramiento de esta tesis.

A mis profesores que me dieron sus conocimientos y que han sido un granito de arena en mi vida profesional, así como su ayuda en la realización de esta tesis: Guadalupe Sevilla, Susana E. Mendoza, Enrique Angeles, Andrea Becerril, Alma Núñez, Enrique Salas.

A mis padres por que solo ellos sabían de donde sacaban fuerzas para que saliera adelante.

A mi esposo por que sin su ayuda no hubiera logrado mi sueño, por todo el apoyo que me has dado.

A mis suegros que siempre me han apoyado incondicionalmente.

A mi gran amiga "Angie" por su apoyo en cualquier situación, por sus consejos, por brindarme tu amistad y paciencia. Gracias por ser mi amiga.

A mi hija "Anel Paola" por tratarme de entender.

Anel Georgina

Dedicatorias

A mis padres: Elo y Meme que son mi símbolo de valor, orgullo y respeto, que me enseñaron a ser una persona humilde y cumplir con mis objetivos, por tantos sacrificios para que yo saliera adelante. Con mucho amor.

A mi gran riqueza: Anel Paola, por iluminar mi vida, por llenarme de esperanza e ilusiones y por ser el principal motivo para seguir superándome. Te lo dedico en especial a ti y te lo pongo como un reto a vencer, que estoy segura que lo superarás y con ello nos llenarás de orgullo. Te amo mucho.

A mi esposo: Angel mi compañero que ha estado en las buenas y en las malas conmigo y que me ha apoyado en todo momento. Gracias por compartir tu vida conmigo. Te amo.

A mis suegritos: Martha y Carlos por que desde el momento que formé parte de su familia me han brindado su aprecio y apoyo incondicional, como aquel que se le da a un hijo, y por que han creído en mí. Con cariño.

A mis hermanos: Efra, Olquis, Elen, Melis (manita querida), Paty (hermanacomadremadrina), Claus, Meme y Mau, que siempre han tenido un consejo o unas palabras de aliento y que han sido necesarias para triunfar en la vida. Con mucho cariño.

A mis sobrinos: Almita, Agus, Ale, Chegaro, Eri, Guicho, Azya, Said, Magui, Lalo, Carlitos, Yuli, Luisito, Yanet, Lili, Pelón, Dianis, Carlitos, Fer, Dani, y sobrinos nietos: Rebe, Kuri, Said y Keni. Como una muestra de cariño de su tía.

A mis cuñadas y cuñados, principalmente Raque y esposo, Compadre y Joaquis que de alguna u otra forma contribuyeron a esto.

A mi madrina Georgina, mi padrino e hijos Fabi, Leo y Jorge que me han echado siempre la mano, con el cuidado y paciencia que le han tenido a mi hija.

Anel Georgina.

ÍNDICE	Página
Lista de tablas	v
Lista de gráficos	vii
Lista de abreviaturas	ix
Resumen	1
Justificación	2
1. Generalidades	3
1.1. Metritis bovina	4
1.2. Clasificación de las meiritis	5
1.2.1. Metritis séptica	5
1.2.2. Metritis ligera	6
1.2.3. Metritis subclínica	6
1.2.4. Piómetra	7
1.3. Mastitis bovina	7
1.4. Clasificación de las mastitis	8
1.4.1. Mastitis subclínica	8
1.4.2. Mastitis clínica	8
1.5. Condiciones que favorecen la presentación de mastitis	8
1.6. Estrés e inmunosupresión	10

1.7. Alternativas para el tratamiento de metritis y mastitis	12
1.8. Resistencia bacteriana	15
1.9. Características de agentes infecciosos causantes de mastitis y metritis bovina	16
1.10. Leche	19
1.11. Antecedentes nacionales de la producción lechera	20
1.12. Reglamentaciones nacionales e internacionales	21
1.13. Residuos de fármacos en productos de origen animal	22
1.14. Importancia de la fitoterapia	24
1.15. <i>Calendula officinalis</i>	25
1.15.1. Clasificación científica	25
1.15.2. Composición y aspectos farmacológicos	26
1.15.3. Actividad antibacteriana de <i>C. officinalis</i>	27
1.16. Método colorimétrico de Mosmann	28
2. Hipótesis	29
3. Objetivos	30
3.1. Objetivo general	30
3.2. Objetivos particulares	30
4. Resumen de la metodología	31

5. Materiales y métodos	32
5.1. Obtención de las flores	32
5.2. Obtención de los extractos	32
5.2.1. Filtración por membrana	32
5.2.2. Extracto hidroalcohólico	32
5.2.3. Extracto acuoso	33
5.2.4. Extracto etanólico	33
5.3. Obtención de las cepas bacterianas	33
5.3.1. Identificación de las bacterias	33
5.4. Enfrentamiento bacteria-extracto	33
5.5. Técnica de MTT	34
6. Resultados	35
6.1. Resultados cualitativos	39
6.2. Resultados cuantitativos	41
6.3. Análisis estadístico	53
7. Discusión	57
8. Conclusiones	61
9. Apéndice	62
9.1. Material	62
9.2. Material biológico	62
9.3. Equipo	63
9.4. Reactivos	63

10. Glosario	66
11. Referencias bibliográficas	67

LISTA DE TABLAS

Tabla A. Agentes infecciosos causantes de mastitis bovina.

Tabla B. Composición de la leche de vaca (g/100 ml).

Tabla C. Métodos de detección de antibióticos (inhibidores) en leche.

Tabla I. Identificación de cepas del género *Staphylococcus*.

Tabla II. Identificación de cepas del género *Streptococcus*.

Tabla III. Identificación de cepas de la familia *Enterobacteriaceae*.

Tabla IV. Identificación de *Nocardia asteroides*.

Tabla V. Cepas obtenidas y resultados cualitativos de las valoraciones bacteria-extracto de *Caléndula officinalis*.

Tabla VI. Resultados del valor de DMS para las cepas.

Tabla 1. Lecturas de absorbancia y porcentajes de crecimiento e inhibición de la cepa 1 de *Staphylococcus aureus*.

Tabla 2. Lecturas de absorbancia y porcentajes de crecimiento e inhibición de la cepa 2 de *Staphylococcus aureus*.

Tabla 3. Lecturas de absorbancia y porcentajes de crecimiento e inhibición de la cepa 3 de *Staphylococcus aureus*.

Tabla 4. Lecturas de absorbancia y porcentajes de crecimiento e inhibición de la cepa 4 de *Staphylococcus aureus*.

Tabla 5. Lecturas de absorbancia y porcentajes de crecimiento e inhibición de la cepa 1 de *Streptococcus agalactiae*.

Tabla 6. Lecturas de absorbancia y porcentajes de crecimiento e inhibición de la cepa 2 de *Streptococcus agalactiae*.

Tabla 7. Lecturas de absorbancia y porcentajes de crecimiento e inhibición de la cepa 1 de *Enterococcus faecalis*.

Tabla 8. Lecturas de absorbancia y porcentajes de crecimiento e inhibición de la cepa 2 de *Enterococcus faecalis*.

Tabla 9. Lecturas de absorbancia y porcentajes de crecimiento e inhibición de la cepa de *Streptococcus pyogenes*.

Tabla 10. Lecturas de absorbancia y porcentajes de crecimiento e inhibición de la cepa de *Escherichia coli*.

Tabla 11. Lecturas de absorbancia y porcentajes de crecimiento e inhibición de la cepa de *Klebsiella oxytoca*.

Tabla 12. Lecturas de absorbancia y porcentajes de crecimiento e inhibición de la cepa de *Nocardia asteroides*.

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica No. I. Porcentajes de las diferentes bacterias aisladas.

Gráfica 1. Porcentajes de crecimiento e inhibición de la cepa 1 de *Staphylococcus aureus* en el enfrentamiento con el extracto de *Calendula officinalis*.

Gráfica 2. Porcentajes de crecimiento e inhibición de la cepa 2 de *Staphylococcus aureus* en el enfrentamiento con el extracto de *Calendula officinalis*.

Gráfica 3. Porcentajes de crecimiento e inhibición de la cepa 3 de *Staphylococcus aureus* en el enfrentamiento con el extracto de *Calendula officinalis*.

Gráfica 4. Porcentajes de crecimiento e inhibición de la cepa 4 de *Staphylococcus aureus* en el enfrentamiento con el extracto de *Calendula officinalis*.

Gráfica 5. Porcentajes de crecimiento e inhibición de la cepa 2 de *Streptococcus agalactiae* en el enfrentamiento con el extracto de *Calendula officinalis*.

Gráfica 6. Porcentajes de crecimiento e inhibición de la cepa 2 de *Streptococcus agalactiae* en el enfrentamiento con el extracto de *Calendula officinalis*.

Gráfica 7. Porcentajes de crecimiento e inhibición de la cepa 1 de *Enterococcus faecalis* en el enfrentamiento con el extracto de *Calendula officinalis*.

Gráfica 8. Porcentajes de crecimiento e inhibición de la cepa 2 de *Enterococcus faecalis* en el enfrentamiento con el extracto de *Calendula officinalis*.

Gráfica 9. Porcentajes de crecimiento e inhibición de la cepa de *Streptococcus pyogenes* en el enfrentamiento con el extracto de *Calendula officinalis*.

Gráfica 10. Porcentajes de crecimiento e inhibición de la cepa de *Escherichia coli* en el enfrentamiento con el extracto de *Calendula officinalis*.

Gráfica 11. Porcentajes de crecimiento e inhibición de la cepa de *Klebsiella oxytoca* en el enfrentamiento con el extracto de *Calendula officinalis*.

Gráfica 12. Porcentajes de crecimiento e inhibición de la cepa de *Nocardia asteroides* en el enfrentamiento con el extracto de *Calendula officinalis*.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABHI	Agar Infusión Cerebro-Corazón
ABS	Absorbancia
AMc	Agar McConkey
ANOVA	Análisis de variancia
AS	Agar Sangre
ASM	Agar Sales Manitol
BHI	Infusión Cerebro-Corazón
°C	Grados centígrados
CAMP	Factor de Christie Atkins Munch-Petersen
CONC	Concentración
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
DMS	Diferencia Mínima Significativa
g	Gramo
G (+)	Bacterias Gram positivas
G (-)	Bacterias Gram negativas
H ₂ S	Ácido sulfhídrico
Hep2	Células del carcinoma epidermoide humano
Ho	Hipótesis nula
Hi	Hipótesis verdadera
IBR virus	Rinotraqueitis infecciosa bovina
IMViC	Pruebas de Indol, Rojo de Metilo, Voges- Proskauer y Citratos
Kg	Kilogramo
KIA	Agar Hierro de Kligler
L	Litro
LIA	Agar Lisina Hierro
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µm	Micrómetro
min	Minuto
MIO	Motilidad, Indol, Ornitina
MTT	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2 il)-2,5- difenil tetrazolio

MVZ	Médico Veterinario Zootecnista
nm	Nanómetro
NaCl	Cloruro de sodio
OF	Oxidación/Fermentación
POA	Productos de Origen Animal
R	Resistente
s	Segundo
S	Sensible
SIM	Ácido Sulfhídrico, Indol, Motilidad

RESUMEN

El presente trabajo se realizó en la FES-C Campo 1, Unidad de Posgrado. El objetivo del presente trabajo fue determinar la concentración mínima inhibitoria o efectos de los extractos de *Calendula officinalis* sobre bacterias aisladas de casos de mastitis y metritis bovina. Estas enfermedades provocan grandes pérdidas económicas, porque en el hato lechero se ven afectados los parámetros reproductivos y la producción nacional de leche ha sido insuficiente para cubrir la demanda total del lácteo. Además de que por ley y ética, la leche obtenida de una vaca en tratamiento médico a base de antibióticos debe ser desechada; por lo que en la pasteurización y la ebullición no pueden ser destruidos éstos y a la larga pueden producir alergias en los consumidores.

Las flores de *Calendula officinalis* son utilizadas en la medicina tradicional como antiinflamatorio, antibacteriano, regenerador del epitelio, antiviral entre otras propiedades. Las flores de caléndula históricamente eran consideradas benéficas para reducir la inflamación, herida curativa y como antiséptico. La caléndula fue utilizada para tratar diferentes enfermedades de la piel, extendiéndose de ulceraciones de la piel al eczema, no se ha encontrado todavía una correlación entre los principios activos que posee con las propiedades medicinales que presenta.

Para llegar a nuestro objetivo se realizaron extracciones hidroalcohólicas, acuosas y etanólicas de los pétalos de la flor, para enfrentarlos en una prueba cualitativa con las 12 cepas bacterianas aisladas de los casos de metritis y mastitis bovinas de las diferentes vacas lecheras; encontrando que tuvo mejor efecto bactericida el extracto hidroalcohólico y posteriormente se llevó a cabo una prueba cuantitativa en microplaca con dicho extracto, empleando el método colorimétrico de Mosmann en el cual se utiliza bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), que determina la presencia de bacterias vivas a partir de la reducción de éste por la acción de una deshidrogenasa producida por dichas bacterias, la cantidad de éstas fue determinada por un método espectrofotométrico obteniendo los resultados con un lector de ELISA, los cuales fueron tratados estadísticamente, para calcular las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI).

Este trabajo demuestra que la fitoterapia es otro camino para el tratamiento de enfermedades que la medicina alópata no puede controlar debido tal vez al mal uso de los mismos, como en el caso de los antibióticos, por lo que se requiere de mayor investigación sobre la elaboración de productos farmacéuticos con esta planta.

JUSTIFICACIÓN:

Ante la inquietud por brindar una mejor producción y calidad de la leche y no tener grandes pérdidas económicas, es necesario proponer el tratamiento de enfermedades bacterianas en vacas lecheras; por ejemplo la mastitis y metritis que son un problema en el ganado bovino debido a que producen efectos adversos en la calidad y composición de la leche, originando un peligro para la salud humana, generando casos de alergia principalmente en niños por la presencia de residuos de antibióticos en la misma y resistencia de bacterias a constante contacto de dichos residuos. Es por esta razón que es preciso investigar y experimentar con la fitoterapia, caso de *Calendula officinalis* que por sus propiedades bactericidas nos aporta nuevos conocimientos para el desarrollo de presentaciones farmacéuticas con productos de origen natural.

1. GENERALIDADES.

La principal raza del ganado lechero bovino es la Holstein Friesian procedente de Holanda y zonas adyacentes. Es la de mayor tamaño, una vaca adulta pesa al menos 675 Kg., es blanca y negra, algunos ejemplares pueden ser blancos y rojizos. Aunque su leche es menos sustanciosa que la de otras razas es la que más volumen produce. Los ganaderos ordeñan las vacas cada 12 horas casi siempre con una ordeñadora. Un tubo de cristal lleva la leche directamente de la ubre a un depósito, preservando su sabor y limpieza. Una vaca que produce 6,100 L de leche al año amortiza los costos de producción, pero un buen ejemplar puede producir un 50% más. ¹

En cuanto a la anatomía de la vaca, el útero es un órgano estéril aislado del medio externo por el cérvix el cual permanece cerrado todo el tiempo, excepto en el estro y en el parto. Durante los días siguientes al parto, el cérvix se va cerrando paulatinamente, lo que representa una vía para las bacterias que se encuentran en el ambiente; de esta forma, bacterias de distintas especies invaden y proliferan en el útero. Las infecciones uterinas son más frecuentes en ganado productor de leche, ya que las condiciones sanitarias de las áreas destinadas a partos, frecuentemente son malas y con pocas medidas higiénicas. ²

Las infecciones uterinas posparto son infecciones inespecíficas; esto significa que están involucradas diferentes especies de bacterias tanto aeróbicas como anaeróbicas. Principales son *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp*, *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus spp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Actynomices pyogenes*, (antes *Corynebacterium pyogenes*), *Fusobacterium necrophorum*, *Bacteroides spp.*, entre ellas se manifiesta un sinergismo en su patogenicidad. Existen otras que frecuentemente se llegan a aislar del útero posparto; sin embargo su participación en el proceso infeccioso es baja aunque ocasionalmente afectan los resultados de los tratamientos debido a que ciertas especies llegan a ser resistentes y producir penicilasa, la cual protege bacterias sensibles. Las vacas con infecciones uterinas raramente llegan a desarrollar problemas sistémicos como metritis séptica o toxémica, en la mayoría no se afecta su estado general aunque algunas pueden presentar fiebre ligera, anorexia y disminuyen la producción de leche. ^{2,3}

Tomando en cuenta la etiología de la metritis y el proceso normal de la involución y el papel de los loquios, la metritis se debe diagnosticar correctamente y no se debe confundir con variaciones en los loquios normales. El hecho de no diagnosticar ni tratar la metritis se traducirá en

insuficiencia reproductora por falta de estro, en reabsorción de los embriones y en disminución de la función ovárica. 4.

Las vacas con metritis severa al principio del puerperio es más probable que sean tratadas porque manifiestan signos de enfermedad. Otras vacas afectadas menos severamente pueden tener una patología significativa, endometritis y secreción uterina, pero no parecen enfermas. La endometritis benigna puede no producir otros signos que no sean las secreciones purulentas. 3.

1.1 METRITIS BOVINA.

Se denomina metritis a la inflamación de todo el útero (miometrio y endometrio), se presenta desde unos días hasta dos semanas después del parto, generalmente afecta el apetito, la producción de leche, hay depresión, la temperatura suele elevarse muy pronto en el curso de la enfermedad, algunos casos pueden estar complicados con tenesmo. Las descargas vaginales van de cantidades abundantes de rojo a rojo-negro, acuoso y de olor fétido, la vulva y la vagina están hinchadas y profundamente congestionadas, la exploración vaginal y uterina provoca molestias agudas y esfuerzos de expulsión persistentes. Los signos clínicos varían según el número y la virulencia del microorganismo y en casos más graves puede estar acompañada por septicemia y/o toxemia en los cuales los signos clínicos incluyen: taquicardia 80 a 90 latidos por minuto, aumento de la frecuencia respiratoria, aumento de la temperatura, atonía ruminal y la disminución de la producción de leche es muy notable, el curso de la metritis séptica normalmente es corto con una recuperación o muerte del animal de 2 a 6 días. 5, 6, 7, 8. El útero se puede infectar al momento del parto si este es manipulado cuando la placenta no es expulsada completamente y cuelga sirviendo de continuidad hasta el útero. 9.

Esta es una de las enfermedades importantes que se presenta en el hato lechero y que afecta los parámetros reproductivos, el porcentaje de frecuencia de un hato es del 5% al 20%, aumenta el intervalo a la concepción en 18 días, retrasan el retorno al estro en 7 días, el periodo entre el primer y último servicio aumenta en 15 días, los servicios por concepción aumentan en un 0.3%, se experimenta un 8% en la reducción a primer servicio, se incrementan los días abiertos, se disminuye la producción de leche de un 3 a 5% y las vacas con metritis tienen 1.3 veces más posibilidades de ser desechadas que las vacas sin metritis. Se dice que un 20 a 25% total de desecho es debido a un fracaso reproductivo. 10.

Las vacas con infecciones uterinas severas tienen bajos niveles de concepción. Las infecciones pueden reducirse si alimentamos adecuadamente a las vacas con niveles óptimos de vitamina A, vitamina E y selenio ya que son importantes para el sistema inmune. ⁹

La etiología es multifactorial, es frecuente la flora mixta, que incluye microorganismos como *Escherichia coli*, *Actinomyces pyogenes*, *Streptococcus spp*, *Staphylococcus spp*, *Pseudomonas aeruginosa*, especies de *Proteus*, *Fusobacterium necrophorum* y en ocasiones especies de *Clostridium*, en cuyo caso el proceso suele ser mortal. ^{11, 12}

Se ha considerado que la enfermedad se desencadena por una secuela de la inercia uterina y una combinación de insuficiencia de la involución uterina normal debido a:

Partos inducidos, distocia prolongada, abortos, operaciones obstétricas traumáticas, prolapso uterino, fetotomías, la incidencia aumenta en un 80% a todas aquellas vacas que cursen retenciones placentarias, partos gemelares, instrumentos y manos del operador que asisten el parto, época del año, carga bacteriana, enfermedades metabólicas, infecciones contaminantes con microorganismos inmunosupresores tales como el virus de IBR y así como la edad es importante ya que se tiene una menor habilidad de combatir la enfermedad. ⁶

1.2 CLASIFICACIÓN DE LAS METRITIS.

1.2.1. Metritis séptica.

Las vacas con metritis séptica o tóxica enfermarán en los primeros 10 días, por lo general en los primeros 7 días del puerperio. Son signos comunes, fiebre (de 40.0 a 41°C, taquicardia, inapetencia, producción disminuida, éstasis del rumen y toxemia. También se observa deshidratación, diarrea y abatimiento de intensidad variable. La infección sumamente grave puede originar decúbito subordinado a la toxemia, debilidad y trastornos metabólicos. En la vulva se puede ver una secreción uterina acuosa de olor fétido, puede manchar la cola o es posible que para descubrirla, sea necesario realizar un examen vaginal. Estas secreciones uterinas tienen un color que varía de pardo a ámbar gris o rojo, pero siempre son líquidas, con un contenido escaso de moco y purulentas. Si bien la mayoría de las vacas con metritis séptica tienen un antecedente de distocia, de parto gemelar o de retención placentaria. Se usa el término general toxemia porque, dependiendo de la mezcla exacta de organismos causantes, en la fisiopatología de los signos sistémicos pueden estar implicadas las endotoxinas, las exotoxinas y otros mediadores. Por lo

general, la exploración rectal descubre un útero hipotónico o atónico con distensión por líquido. También puede existir una piómetra que puede motivar que el cuerno uterino lleno de gas-líquido se confunda con otras vísceras, por ejemplo con un ciego distendido. Una exploración vaginal es imperativa para el diagnóstico porque este procedimiento permite la diferenciación de la vaginitis necrótica o de la cervicitis y también permite la identificación de las retenciones placentarias y de otra patología. 4, 13.

1.2.2. Metritis ligera.

Debido al amplio espectro de gravedad que se observa en la endometritis-metritis del posparto, algunas vacas que acaban de entrar en el periodo del puerperio (< 14 días) no son ni toxémicas ni están perfectamente sanas. Las vacas tiene signos de apetito reducido, abatimiento y frecuentemente padecen enfermedades metabólicas como cetosis e hipocalcemia. Estas vacas pueden estar febriles o no y si tienen fiebre, ésta es solo ligera (de 39.7 a 40.2 °C). La exploración rectal descubre un útero hipotónico que involucre mal y que contiene una cantidad excesiva de líquido. El masaje suave del cuerpo del útero y de la vagina anterior hace aparecer en la vulva una secreción uterina purulenta de color amarillo claro, de olor ligeramente fétido o de consistencia espesa. La exploración vaginal descarta otras causas de esta secreción y permite la evacuación de grandes cantidades de este material. 4.

1.2.3. Metritis subclínica.

El grupo final y quizá la que es más probable que pase inadvertida a la identificación, esta integrada por vacas con endometritis subclínica. En este tipo de metritis las vacas están sanas y pueden presentar secreción uterina anormal intermitente o ninguna secreción en absoluto. Cuando se observa secreción anormal, típicamente aparece como un moco turbio o en forma de manchas o de coágulos en un moco por lo demás transparente. La secreción se puede observar durante el celo o se puede extraer del útero mediante masaje durante las palpaciones rectales de rutina previas a la cubrición. Se supone que la endometritis por *Actinomyces pyogenes*, es la causa más corriente de esta enfermedad pero, desgraciadamente, el carácter empírico de los reconocimientos del tracto reproductor de las vacas, rara vez proporciona material de cultivo o de biopsia para confirmar la causa. La exploración vaginal sirviéndose de un espéculo es muy útil para confirmar el diagnóstico y para descartar otras enfermedades, por ejemplo la cervicitis, de hecho, la exploración con espéculo vaginal es un excelente instrumento diagnóstico para todos excepto para los casos más evidentes de metritis y es mucho más precisa que la palpación rectal. 4.

1.2.4. Piómetra.

Es un tipo de presentación clínica de la inflamación uterina, se define como el acumulo de una cantidad variable de exudado purulento en la luz del útero y la persistencia de un cuerpo lúteo en uno de los ovarios. Las vacas con piómetra pocas veces presentan signos clínicos; sin embargo puede observarse una descarga vaginal purulenta en algunos casos. El pronóstico de recuperación va de favorable a bueno, especialmente si se diagnostica pronto en el curso de la enfermedad. 8, 14.

Evidentemente *Actynomices pyogenes* ha llegado a ser la bacteria principal en el útero de estas vacas porque la infección mixta ha evolucionado hacia una infección en la que predomina la misma. Es posible que la enfermedad no sea diagnosticada hasta la palpación rectal de rutina de rutina del puerperio, transcurridos de 10 a 30 días después del parto, cuando existe endometritis crónica. La exploración rectal descubre que uno de los cuernos uterinos, o ambos, contienen de 1 a 10 litros de pus. El masaje rectal del útero y del tracto reproductor caudal favorece la evacuación del material purulento espeso. 4.

1.3. MASTITIS BOVINA

La mastitis es una enfermedad que surge como respuesta de los tejidos productores de leche ante una lesión traumática o a la presencia de microorganismos infecciosos que han ingresado a la ubre, en este último caso los microorganismos penetran en el canal del pezón y se multiplican dentro de la glándula mamaria. Así mismo este padecimiento produce efectos adversos en la calidad y composición de la leche y se caracteriza por daños en el epitelio glandular, seguido por una inflamación que puede presentarse con cambios patológicos localizados o generalizados, dependiendo de la magnitud del daño. 3, 15.

La base del control de la mastitis es la prevención de las infecciones, por lo que es necesario poner especial atención en el medio ambiente y en las prácticas higiénicas debido a que los microorganismos que causan este padecimiento viven en la vaca, en la ubre y sus alrededores. Microorganismos contagiosos dentro de los que se encuentra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* así como *Micoplasma bovis* y *Corynebacterium bovis*. 11. Microorganismos oportunos, incluyen más de 20 especies de estafilococos y otros microorganismos entre los que se encuentra *Pseudomonas aeruginosa* y *Actinomyces pyogenes*. 16.

1.4. CLASIFICACIÓN DE LAS MASTITIS.

1.4.1. Mastitis subclínica.

La mastitis subclínica se caracteriza por la inflamación de la glándula mamaria sin signos clínicos observables, tiene una alta incidencia en los rebaños lecheros de todo el mundo, estimándose que en los Estados Unidos, al menos el 40% de todas las vacas están infectadas con alguna forma de mastitis en uno o más de sus cuartos. ¹⁷.

La glándula mamaria a la inspección y palpación, se encuentra aparentemente sin cambio alguno en el parénquima glandular, la leche extraída no tiene cambios en cuanto a su color, sabor, consistencia, etc. La vaca no presenta signos de infección tales como fiebre, anorexia, atonía, taquicardia, polipnea. Es la que más pérdidas produce porque no se ve y no se le toma importancia. ¹⁸.

1.4.2. Mastitis clínica.

Presenta alteraciones que se pueden manifestar como cambios en el color de la leche (amarillenta, rojiza, etc.), en su sabor, consistencia (cremosa, espesa, etc.), acompañada de coágulos y/o natillas. A la palpación se pueden manifestar cambios en el parénquima glandular detectándose caliente, firme y duro. Los animales pueden presentar fiebre, taquicardia, polipnea, anorexia. ¹⁸.

Lo anterior causa grandes pérdidas económicas al productor por merma en la producción de leche (70 % del total de las pérdidas), leche descartada (8 %), medicinas y gastos veterinarios (8 %) y eliminación de animales que han perdido sus capacidad productiva (14 %). ¹⁷.

1.5. CONDICIONES QUE FAVORECEN LA PRESENTACIÓN DE MASTITIS

- Edad: vacas de más de cinco partos suelen presentar mastitis subclínica.
- Alojamiento y medio ambiente: se aconseja una temperatura de 15 °C y una humedad de 70%.
- Procedimiento de ordeño: preparación de la ubre, lavado, desinfección de copa de exprimido, colocación de pezoneras, desinfección y sellado de pezones.

- Alimentación: una alimentación rica en proteína predispone a una mastitis, igual que en una con deficiencia de minerales.
- Estado funcional de la ubre: la mayoría de las infecciones nuevas se establecen durante las tres primeras semanas del periodo seco y en el primer mes de lactación.

La aparición de mastitis se puede explicar en los siguientes tres pasos:

- 1) Invasión: los microorganismos penetran del exterior del pezón a la leche que se encuentra en el canal del mismo y se ve favorecida cuando el esfínter del pezón se encuentra lesionado, facilitando la entrada de los microorganismos.
- 2) Infección: se caracteriza porque los gérmenes se multiplican rápidamente invadiendo el tejido glandular, una vez que las bacterias se encuentran en un ambiente propicio para su desarrollo y multiplicación, se valen de sus toxinas para invadir tejidos adyacentes.
- 3) Inflamación: la presencia de bacterias y/o toxinas en el tejido glandular, crea un efecto quimiotáctico sobre las células de defensa del huésped, lo que aumenta la afluencia de leucocitos, macrófagos y demás elementos que participan en este proceso. Se aprecia por la tumefacción, enrojecimiento y aumento de la temperatura local, a esto es lo que se conoce propiamente como mastitis.¹⁹

Como se observa en la tabla A existen diversos agentes que causan esta enfermedad, pero solo algunos de ellos pueden desarrollarse adecuadamente en la leche e infectar el tejido glandular. Aproximadamente el 70% de las mastitis son ocasionadas por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*.²⁰

Tabla A. Agentes infecciosos causantes de mastitis bovina.

Bacterias Gram (+)	Bacterias Gram (-)	Otras bacterias	Hongos y levaduras
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Mycoplasma bovis</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Streptococcus disgalactiae</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Mycoplasma bovigenitalium</i>	<i>Trichosporum sp</i>
<i>Streptococcus uberis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Mycoplasma alkalescens</i>	<i>Criptococcus neoformans</i>
<i>Streptococcus zoopedirmicus</i>	<i>Proteus sp.</i>	<i>Mycoplasma canadensis</i>	<i>Sacharomyces sp</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Pasteurella multocida</i>	<i>Nocardia asteroides</i>	<i>Torulopsis sp</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Mycobacterium sp.</i>	<i>Pichia farinosa</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Serratia marcescens</i>		
<i>Actynomices pyogenes</i>	<i>Brucella abortus</i>		
<i>Corinebacterium bovis</i>	<i>Brucella melitensis</i>		
<i>Clostridium perfringes</i>			

1.6. ESTRÉS E INMUNOSUPRESIÓN.

En animales jóvenes sin un sistema inmune maduro, el estrés puede ser aditivo con otros factores inmunosupresores. Detrimiento psicológico causado por factores tales como destete, introducción de animales nuevos, restablecimiento de órdenes de jerarquía y otros parecidos pueden ser levemente inmusupresores, pero cuando se agregan otras causas de inmunosupresión tales como la

alimentación pobre, infección viral y/o coccidiosis, pueden conducir a una inmunosupresión severa y a una enfermedad que amenace la vida. 21.

La mayoría de las infecciones, aproximadamente el 80 %, que se presentan después del parto persisten durante toda la lactancia sin importar el tipo de microorganismo involucrado y sólo un 16% de las vacas eliminan su infección en el caso de patógenos mayores como *Staphylococcus aureus*. Sin embargo, más de la mitad de los cuartos sufren reinfecciones las cuales ocurren principalmente en los 3 primeros meses de la lactancia, y muy especialmente posterior al parto cuando el animal es sometido a una situación de estrés. 22.

Durante el parto, ocurren una serie de cambios que pueden inducir a inmunosupresión en la vaca. En primer lugar, se conoce del aumento del cortisol sanguíneo especialmente en el feto, el cual tiene un efecto sobre la madre causando disminución en el secuestro de leucocitos, principalmente PMN de la médula ósea. En la madre, se producen además las llamadas proteínas de fase aguda que contrarrestan este efecto del cortisol puesto que son capaces de inducir, entre otras cosas, leucocitosis. Sin embargo, si los niveles de cortisol son muy altos por una situación de estrés prolongada en el parto, estas proteínas de fase aguda pueden verse deprimidas y el resultado neto de esto será una inmunosupresión. Además de lo anteriormente dicho, algunos autores han demostrado que durante el período postparto pueden ocurrir desbalances metabólicos tales como hipocalcemia y acetoneamia, lo cual puede deprimir las funciones normales de polimorfonucleares causando por lo tanto inmunosupresión. 22.

En la actualidad, se han hecho múltiples esfuerzos por lograr la prevención de nuevas infecciones intramamarias estimulando el sistema inmune. Entre estas podemos señalar el uso de vacunas intramamarias y sistémicas, que han dado buenos resultados en la disminución de la severidad de los casos clínicos pero no en la prevención de nuevas infecciones intramamarias; el uso de citocinas como interleukinas 1 y 2; factor estimulante de las colonias de granulocitos y macrófagos (GMCS); suplementación con vitamina E y selenio; utilización de lactoferrina hidrolizada tratada con calor a pH ácido; inmunoestimulantes inespecíficos como el levamisol. 22.

1.7. ALTERNATIVAS PARA EL TRATAMIENTO DE METRITIS Y MASTITIS.

En términos generales, un tratamiento intrauterino debe cumplir con tres condiciones: primero ser efectivo en la eliminación de los agentes infecciosos; segundo, no afectar los mecanismos de defensa del útero, particularmente la actividad fagocitaria y, en tercer lugar, esta terapia no debe representar un riesgo de adulteración de la leche destinada para consumo humano. ²³

La elección del mejor tratamiento debe considerar diversos factores entre los cuales destacan:

- Selección de las vacas que necesitan verdaderamente la administración de antibióticos.
- Efectividad del antibiótico en las condiciones del útero posparto y que éste no interfiera con los mecanismos de defensa uterinos.
- Costo del tratamiento y la posible adulteración de la leche.
- Posibilidad de otros tratamientos alternativos como la utilización de prostaglandinas. ^{2, 4}

Con respecto al uso de antibióticos los factores a considerar en la selección de los mismos para el tratamiento de las metritis son: el microorganismo involucrado, ruta de administración del antibiótico, la severidad de irritación causada por el antibiótico o por el vehículo en el endometrio cuando se usa terapia intrauterina, el medio ambiente uterino y resultados de la terapia. Existen tratamientos sobre la utilización de gran número de antibióticos (administrados por vía intrauterina) como son las penicilinas, sulfonamidas, estreptomycinas y oxitetraciclinas. ²⁴

El espectro antibacteriano de las penicilinas abarca cocos G (+) sensibles y G (-) anaerobios. Este grupo de antibióticos inhiben la síntesis de la pared del péptidoglucano de la bacteria. Los microorganismos infectantes del útero suelen ser sensibles a la penicilina, pero durante las primeras cuatro semanas del parto los microorganismos contaminantes llegan a producir enzimas que inactivan antibióticos como la penicilinas. Por lo tanto, la penicilina no parece ser efectiva si se administra localmente durante los primeros periodos posparto pero puede resultar útil si se administra en forma sistémica, es eliminada en orina, bilis y otras vías. ^{25, 26}

La penicilina G sódica y potásica es efectiva para curar infecciones uterinas pero sólo cuando se administra entre los 25 y 30 días posparto, es decir, cuando ya ha habido una disminución en la diversidad de las especies bacterianas y predominan *Actynomices pyogenes* y bacterias Gram (-) anaeróbicas, las cuales son sensibles a la infusión intrauterina de penicilina. Bajo estas circunstancias disminuye la probabilidad de que alguna bacteria produzca penicilinas e inactive

a este antibiótico. 2, 27.

Las sulfonamidas son análogos estructurales y antagonistas, competitivos del ácido p-aminobenzoico (PABA) por tal razón, impiden que la bacteria utilice de manera el PABA en la síntesis del ácido fólico. Son inhibidores competitivos de la dihidropteroato sintetasa, la enzima bacteriana que incorpora PABA en el ácido dihidropteroico, precursor inmediato del ácido fólico. El espectro antibacteriano de estos antibióticos *in vitro* están *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *H. ducreyi*, *Nocardia*, *Actinomyces* y *C. trachomatis*. Su eliminación es principalmente orina, heces, bilis, leche materna y otras secreciones. Sin embargo, las sulfonamidas quedan inactivadas por el detritus orgánico y son una mala elección para la terapia intrauterina. 9, 25, 26.

Los antibióticos aminoglucósidos (estreptomina, kanamicina, gentamicina, neomicina) inhiben la síntesis proteica y disminuye la fidelidad de traducción del RNAm en el ribosoma. El espectro antimicrobiano abarca bacterias G (-) aeróbicas y su acción contra casi todas las bacterias G (+) es limitada. Se eliminan por orina. 25.

El mecanismo de acción de las tetraciclinas es inhibir la síntesis de proteínas de la bacteria al ligarse al ribosoma bacteriano 30S y evitar la llegada del aminoacil RNAt al sitio receptor (A) en el complejo RNAm-ribosoma. Es un grupo de antibióticos a elegir debido a su amplio espectro contra bacterias G (+) y G (-), aerobias y anaerobias, rickettsias, micoplasmas y clamidias. Son útiles en la terapia intrauterina por su aceptable actividad en presencia de exudado purulento y baja tensión de oxígeno, es decir es activa en un ambiente anaerobio. 15. Estos antibióticos se elimina por leche en concentraciones no permisibles, así como en orina y bilis, pueden estar en el organismo mucho tiempo después de que dejaron de utilizarse. 23, 26. Las oxitetraciclinas son activas contra muchos de los microorganismos que infectan el útero del bovino.

Algunas preparaciones de tetraciclinas irritan el endometrio, cérvix y vagina, ya que pueden provocar necrosis y proporciona un medio ambiente adecuado para el crecimiento de bacterias y hongos, así que estos deben utilizarse con cuidado. 28.

El mecanismo de acción de los nitrofuranos es interferir en la síntesis de la pared celular de las bacterias en forma semejante a la penicilina. Se acumula la N-acetilglucosamina que forma parte del nucleótido de Park. El espectro antibacteriano es diverso y amplio, contra G (+) como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus β -hemolítico* y *Enterococos*, además de bacilos G (+) como

Bacillus anthracis y género *Clostridium*; bacilos G (-) como *H. influenzae* y género *Shigella*. Un ejemplo de estos es la nitrofurazona, recomendada en el tratamiento de infecciones uterinas, pero es casi imposible alcanzar la concentración mínima inhibitoria en el lugar de la infección.

Los nitrofuranos no son activos en presencia de sangre y exudado purulento, son productos irritantes y se ha demostrado que reducen la fertilidad de las vacas tratadas; se eliminan en orina y heces. 9, 25.

Se recomienda la utilización de estrógenos administrados intramuscularmente al mismo tiempo que antibioterapia por vía intrauterina. Estilbestrol (estrógeno sintético) tiene una acción oxitóica, una interesante propiedad antiséptica genital, favorece la defensa y regeneración de la mucosa, pero dosis altas de estrógenos pueden dar problemas tales como quistes ováricos persistentes y salpingitis. 14, 29, 30.

Otro tratamiento es a base de prostaglandinas que ejercen su efecto al acoplarse a un receptor específico presente en la membrana celular, donde induce un cambio electromagnético que les permite atravesar la membrana celular externa y acoplarse con adenilciclasa y activar el AMPc, que a su vez actúa como segundo mensajero en el interior de la célula. Así el AMPc, activa los sistemas enzimáticos de las cinasas que son las que desatan la respuesta celular característica. La prostaglandina PGF_{2α} (estimulante de contracciones del tejido miometrial de la hembra gestante y no gestante) coadyuva para el tratamiento de la metritis y sus análogos sintéticos, causan regresión del cuerpo lúteo si está presente, la inducción del crecimiento folicular y producción de estrógeno. Se provoca la contracción del útero, expulsión de pus y desechos uterinos, tanto por acción del fármaco como por el estrógeno producido, así como la posible estimulación de la fagocitosis por la leucocitosis. 5, 30, 31.

En el caso de las mastitis se utilizan tratamientos con aplicación parenteral de antibióticos de amplio espectro como el levamisol y antiinflamatorios potentes como la dexametasona. 22.

El levamisol es un antihelmíntico, que posee acción antimicrobiana muy diversa y amplia; algunos estudios 22, han demostrado que tiene efectos de estimulador sobre la respuesta inmunitaria en los animales frente a antígenos bacterianos. Este fenómeno se refiere a la inmunidad celular mediada por los linfocitos T que son estimulados así como la actividad de los macrófagos. 25.

La vía intramamaria es la más utilizada para la terapia de la mastitis, ya sea en vacas secas con preparados de larga acción o en vacas de lactancia en forma de infusión. Para casi todos los

fármacos, el uso de estas vías significa concentraciones desiguales y muchas veces no detectables en el tejido mamario donde la infección tiene lugar.

La terapia con antibióticos en el secado ha sido la principal medida de control utilizada contra los diferentes patógenos de la ubre, pero para el caso específico de *Staphylococcus aureus*, su utilidad ha sido muy limitada. La razón por la que no se obtiene un 100 % de eficiencia con la antibioterapia, es porque las toxinas producidas por la multiplicación de la bacteria en las áreas distales de la glándula mamaria, causan migración de células inflamatorias y en especial polimorfonucleares hacia los tejidos secretorios donde exteriorizan sus enzimas lisosomales causando daño en el tejido, con formación de microabscesos y obstrucción de pequeños ductos lo cual hace imposible la penetración de los antibióticos. 22.

En medicina veterinaria la farmacología sugiere medicamentos de rápida acción lo que facilita el tratamiento de enfermedades infecciosas en los animales. Sin embargo debemos tomar en cuenta que existen otras posibilidades, por ejemplo el uso de plantas medicinales con las cuales se puede llevar a cabo una terapia con resultados efectivos.

1.8. RESISTENCIA BACTERIANA

La resistencia bacteriana a los antibióticos puede ocurrir por mecanismos no genéticos o genéticos durante el tratamiento. Por lo general, la resistencia de tipo no genético suele atribuirse a la ausencia de los “lugares de destino” del fármaco dentro de la bacteria, es decir, que no existen receptores de unión al fármaco o falta la vía metabólica necesaria para que este desarrolle su actividad y entonces las bacteria mostrarán una resistencia extrínseca. 32.

Para comprender los mecanismos de la resistencia bacteriana es necesario entender la fisiología bacteriana, la farmacología de los principios activos y la biología molecular de los agentes infecciosos. 33.

Algunos microorganismos logran escapar las consecuencias del efecto farmacológico a través de 1) la síntesis de una enzima que destruye el antibiótico (p.ej. β -lactamasa que escinde anillos β -lactámicos de la penicilina y cefalosporina); 2) la alteración de las macromoléculas a las que se une el antibiótico y 3) la inactivación por un mecanismo bioquímico, como es la acetilación de los aminoglucósidos por los bacilos Gram negativos. 32.

Los genes para el mecanismo de la resistencia pueden ubicarse tanto en cromosoma como en un elemento extracromosómico denominado plásmido. La vinculación de los genes de resistencia para múltiples antibióticos en un plásmido permite la transferencia en masa de la resistencia que caracteriza a muchos de los microorganismos resistentes más nuevos. El mecanismo más común por el cual se transfieren los genes de la resistencia es la conjugación. ³³

Se ha encontrado que la prevalencia de organismos patógenos humanos resistentes a los antibióticos es cada vez mayor, pero el descubrimiento y desarrollo de nuevos antibióticos que controlen éstos es mucho más lento son varias razones las que explican este hecho: costo de la síntesis hasta el mercadeo del medicamento; falta de nuevos blancos para la acción de los antibióticos, entre otras. ³²

1.9. CARACTERÍSTICAS DE AGENTES INFECCIOSOS CAUSANTES DE MASTITIS Y METRITIS BOVINA.

Streptococcus agalactiae.

Es un microorganismo coco Gram (+) perteneciente al grupo B de la clasificación de Lancefield, estos cocos se agrupan en cadenas y son catalasa (-), oxidasa (-), anaerobio facultativo, β -hemolíticos, producen el factor CAMP e hidrolizan el hipurato de sodio. ³⁴

Factores de patogenicidad más importantes: hialurodininas y hemolisinas.

Se considera un parásito obligado de la glándula mamaria ya que puede morir al ser expuesto a la piel; sin embargo, puede sobrevivir por un mes o más en el ambiente, ubres infectadas (leche) y utensilios contaminados. El contagio se da de vaca a vaca durante el ordeño, a través de manos del personal, pezoneras no desinfectadas y trapos de uso. ¹⁷

En ocasiones *Streptococcus agalactiae* invade en forma transitoria el tejido glandular y posteriormente viaja por linfa hasta los linfonodos supramamarios. El resultado es una quimiotaxia de los leucocitos (PMN); además, la opsonización se deriva probablemente del complemento (C3) en la secreción inflamatoria y se fija a la superficie bacteriana siguiendo la activación del complemento por la vía alterna. ¹⁷

Streptococcus pyogenes.

Son cocos en forma de cadenas, que pertenece al grupo A de la clasificación de Lancefield, Gram (+), catalasa (-), oxidasa (-), OF (+), debido a la hemolisina que presenta es β hemolítico; dado que es el mayor en importancia clínica por producir endocarditis valvular, glomerulonefritis, artritis reumatoide o fiebre reumatoide, faringitis, etc. 33, 34.

Sus factores de patogenicidad más importantes son la proteína M, estreptolisinas O y S (hemolisina), la C5a peptidasa, contiene ácido hialurónico, etc. La identificación se realiza por medio del crecimiento en agar sangre con una β -hemólisis y con un disco de bacitracina de 0.040 UI, pasado el tiempo de incubación 37 °C/24 hrs. se observa un halo de inhibición. 22.

Enterococcus faecalis.

Son microorganismos Gram positivos, en forma de cocos, pertenecen al grupo D de la clasificación de Lancefield, con tolerancia a la sal (NaCl 6.5%), dan un resultado positivo a la prueba de bilis esculina por lo que se diferencia de otros estreptococos no enterococos. El grupo D da o varía la hemólisis α o δ , estas pruebas nos ayudan a su identificación. Produce infecciones urinarias, abscesos pélvicos, peritonitis, infecciones de heridas, endocarditis. 33, 34.

En el ganado bovino se halla en el tracto intestinal, estiércol, ubres infectadas y equipo contaminado. 17.

Staphylococcus aureus.

Es un microorganismo coco Gram (+) agrupados en racimos, anaerobio facultativo, catalasa y coagulasa (+), oxidasa (-), no es móvil, y no forma esporas. Su agar selectivo y diferencial es el medio de sal y manitol (NaCl 7.5%) y por lo tanto son manitol (+), se encuentran en las mucosas y en la piel de los animales y humanos. 22.

Posee varias propiedades que contribuyen a su capacidad de producir enfermedad, sin embargo, estos factores de virulencia no se encuentran en todas las cepas de *Staphylococcus aureus*. Estas propiedades incluyen las siguientes: proteína A, ácidos teicoicos y peptidoglicanos (pared celular), enzimas (catalasa, coagulasa, fibrinolisisina, hialurodinasa, lipasa), hemolisinas (α , β , δ), toxinas. 22. La infección por *Staphylococcus aureus* es complicada debido a que esta bacteria posee diversos mecanismos para evadir al sistema inmunológico, entre los que encontramos el desarrollo de una

cápsula de exopolisacarido y la pared celular inhibe el reconocimiento de anticuerpos y neutrófilos. 17.

En el ganado bovino infectado se encuentra en ubres (leche), lesiones en la piel de los pezones: cortadas, cuarteaduras, y lesiones de viruelas, costras y úlceras; pezoneras contaminadas. El contagio esta dado de vaca a vaca durante el ordeño (leche de vacas infectadas, manejo de ordeñadores y pezoneras sin desinfectar entre vaca y vaca, trapos de uso), medio ambiente y moscas. 17.

Escherichia coli.

Pertenece a la familia Enterobacteriaceae, bacilo Gram (-), móvil, lactosa (+), catalasa (+), oxidasa (-), anaerobio facultativo. Se identifica también por IMViC, siendo Indol (+), MR (+), VP (-) y citratos (-); urea (-), KIA ácido/ácido y lisina (+). 33.

Son microorganismos oportunistas, dado que son flora normal en el intestino y dependiendo de la cepa es el daño que produce.

Con base en su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico, las cepas de *E. coli* causantes de diarrea se clasifican en 6 grupos: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica también conocidas como productoras de toxinas Vero o toxina semejante a Shiga (EHEC), enteroinvasivas (EIEC), enteropatógena (EPEC) y enteroagregativa (EAEC) y adherencia difusa (DAEC) que para su identificación se realizan pruebas como serología, inmunofluorescencia, prueba de ratón lactante y ELISA. *Escherichia coli* produce enfermedades intestinales y extraintestinales en los animales domésticos y el hombre. 35.

La procedencia en el ganado bovino es de origen fecal, medio ambiente contaminado y agua. 22.

Klebsiella oxytoca.

Son microorganismos en forma de bacilos Gram (-), catalasa (+), oxidasa (-), es anaerobio facultativo, motilidad (-), ornitina(-), lactosa (+) lenta, KIA ácido/ácido, urea (+) lenta, lisina (+), arginina (-), malonatos (+), su IMViC es (+) (-) (+) (+). 33.

Es una enterobacteria y el factor de patogenicidad es su cápsula porque inhibe la fagocitosis. Produce diarrea, septicemias, meningitis o peritonitis, en ocasiones produce infección en vías urinarias. ²²

Su procedencia en el ganado bovino es: suelos y tierra, paja contaminada (cama), aserrín de cama. Es uno de los principales causantes de mastitis bovina. El contagio se da en el medio ambiente de la vaca. ¹⁷

Nocardia asteroides.

Microorganismos aerobios que se encuentran en el suelo. Existen formas bacilares y filamentosas que pueden ser observados en los exudados de tejidos en el pus.

Las colonias son cerasas con pigmentación que varían desde amarilla a anaranjada o rojiza. *N. asteroides* no digiere la caseína, tirosina, xantina e hipoxantina; no fermenta los carbohidratos, es positiva a la acción de la ureasa y a la reducción de nitratos. Es resistente a la lisozima. También se pueden teñir los cortes de tejido con metenamina-plata. ³³

La principal enfermedad que causa es la nocardiosis, enfermedad pulmonar oportunista en el humano que puede diseminarse a otras partes del cuerpo.

Las nocardias potencialmente patógenas tienen su procedencia en el suelo, agua, aire y heces de pájaros. Las infecciones en los animales de granja son bastantes comunes; las mastitis en las vacas y el resto del ganado en ocasiones se hallan diseminadas por el medio ambiente, a través del ordeño y preparaciones caseras vía intramamaria contaminadas, frascos, cánulas, tapones, jeringas. ¹⁷

1.10. LECHE

La leche es la secreción normal de la glándula mamaria de todos los mamíferos terrestres; secreción que comienza una vez que las hembras han parido. Es necesario tomar leche por ser un alimento complementario, de gran riqueza nutritiva y alta digestibilidad. Su importancia como alimento para consumo humano se debe principalmente a tres de sus ingredientes: proteína, calcio y riboflavina; además de la vitamina A, B, C, niacina y hierro. Su composición resulta muy notable, ya que la mayoría de sus componentes se sintetizan especialmente para formar parte de ella y no se encuentran en ninguna otra parte del organismo. ^{36, 37, 38}

El consumo habitual de leche disminuye en un 60% el riesgo de contraer cáncer de mama gracias

a la lactosa. Su contenido en calcio hace que sea indispensable para evitar la osteoporosis y su contenido vitamínico hace que su consumo diario supla 1/3 de las necesidades diarias. ³⁹

La vaca lechera es un animal altamente eficiente como transformador de proteína y energía contenida en los forrajes y suplementos en alimento consumible por el humano. La leche es una mezcla estable de grasa, proteínas y otros sólidos suspendidos en agua, es aproximadamente 90% agua (Ver tabla B). Las características organolépticas de la leche son: líquido opaco de color blanco amarillento debido a los carotenos de la grasa tiene un olor característico. ^{36, 37, 38.}

Tabla B. Composición de la leche de vaca. (g/100 ml)

Componente	Mínimo	Máximo
Agua	84.0	89.0
Sólidos	10.6	17.9
Lípidos	2.6	8.4
Proteínas	2.4	6.5
Lactosa	2.4	6.1
Cenizas	0.6	0.9

1.11. ANTECEDENTES NACIONALES DE LA PRODUCCIÓN LECHERA

La producción de leche en México se obtiene de 4 sectores: productos especializados, semiespecializados, de doble propósito y familiar. Para 1998 los primeros dos sectores aportaron el 71%, el tercer grupo aporta un 20% y el familiar sólo el 9%. ^{40.}

La producción nacional ha sido insuficiente para cubrir la demanda total del lácteo, entonces, para completar el abasto nacional se ha recurrido a las importaciones logrando un limitado desarrollo lechero en nuestro país. Hasta antes de los 90's el abasto de la leche estaba sustentado en el control de precios e importación de leche en polvo. ^{40.}

1.12. REGLAMENTACIONES NACIONALES E INTERNACIONALES

Como se ha manifestado el Reglamento Sanitario de Salubridad resulta poco específico, ya que se estipula que los Productos de Origen Animal (POA) y sus derivados destinados al consumo humano deben de estar libres de antibióticos y otros agentes bacteriostáticos. Sin embargo, la palabra libres implica la ausencia total de estos productos en los POA, cuando en la mayoría de los países se acepta un determinado nivel de residuos. Esto da lugar a que en el sentido legal las normas sanitarias en muchas ocasiones presentan un aspecto vago de la problemática de residuos de antibióticos en los POA. Una regulación correcta en lo que respecta a residuos de fármacos en POA pudiera incluir el nivel máximo aceptable como el tiempo mínimo en que se debe retirar al animal de la línea de producción. Sí se acepta que en México tanto los MVZ como los productores utilizan una gran cantidad de fármacos, en particular antibióticos para el tratamiento de enfermedades básicas en el sentido de que es necesario un programa constante de educación como las que se han implementado en otros países. En nuestro país no existe fuera del reglamento de salubridad y del Instituto Nacional de la Leche un comité de seguimiento de educación para los productores y mejoramiento de métodos de acción de antibióticos por los veterinarios. ⁴¹

Es importante detectar los residuos de antibióticos en los POA por tres razones principales:

- 1) No hacerlo es un procedimiento ilegal.
- 2) Es posible que estos productos contengan agentes patógenos.
- 3) La presencia de fármacos y metabolitos activos pueden facilitar el desarrollo de reacciones anafilácticas o de otros efectos colaterales.

Además de que dichos residuos afectan la industrialización de los POA, así como sabor. La calidad de la leche que se produce y comercializa en nuestro país no esta sujeta a las restricciones que en otras naciones se observan, por ejemplo, la leche que se distribuye no debe ser aquella que provenga de vacas con 4 días de posparto, que provenga de animales enfermos, de vacas que estén siendo tratadas con hormonas. ⁴¹

Resulta evidente que no existe en el país una reglamentación detallada de los tiempos de retiro de los POA necesarios para prevenir su consumo con residuos de fármacos.

Para analizar la importancia de la detección de residuos en POA, se consideró de interés realizar una disertación adicional sobre el tema, particularizando en uno de los productos deficitarios en

producción en el país, la leche. 41.

Actualmente la producción de leche a nivel nacional en comparación con el exterior se desarrolla en condiciones muy desiguales, pero si analizamos los porcentajes de volumen de leche en polvo importada con la producción nacional en los próximos 10 años la población de menores de 10 años tendrá un incremento considerable aunado al cierre de fronteras para la importación de leche en polvo de algunos países que ocasionaran un aumento en la demanda de productos lácteos, por esto se necesita planear estrategias para aumentar la producción y así evitar el déficit de leche. 42.

43.

1.13. RESIDUOS DE FÁRMACOS EN PRODUCTOS DE ORIGEN ANIMAL.

La contaminación de la leche, carne y huevo con diferentes fármacos como son, antibióticos, antisépticos, promotores de crecimiento, etc., es una secuela frecuente posterior al tratamiento o prevención de enfermedades que afectan a los animales de producción. Existen pérdidas evidentes si se retira la ordeña de manera muy estricta y sin datos específicos a los animales tratados con fármacos.

Por otro lado, las consecuencias de permitir la distribución de esos productos para la población, puede acarrear serios problemas para la salud. Por ejemplo se ha comentado que la presencia de antibióticos en la leche puede inducir alergias y resistencias bacterianas, a otro nivel puede afectar los procesos de industrialización de la misma. Y quizá el aspecto que más temor causa, es la incertidumbre de que aun no se sabe cuales y que tan graves efectos tendrán los residuos de tantos fármacos ingeridos de manera crónica. 23.

Por ley y por ética, la leche obtenida de una vaca en tratamiento médico a base de antibiótico debe ser desechada, la leche que se expende comúnmente lleva elevadas cargas de antibióticos que no pueden ser destruidos por la pasteurización ni por la ebullición y que a la larga pueden producir alergias en los consumidores (principalmente en los niños) y el aumento de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos, con el riesgo potencial de que al momento de que una persona que sin saber que es alérgico a un determinado antibiótico recibe un tratamiento severo con él, sufra un choque anafiláctico que le puede incluso costar la vida. 2, 27.

El uso de antibióticos en la resolución de enfermedades del ganado se ha hecho sin tomar en

cuenta los efectos que en la leche para la venta tiene, pues no se siguen las recomendaciones del fabricante para cumplir los periodos de retiro, no enviando a la venta la leche de vacas tratadas.

Se han usado varios antibióticos individualmente o en combinación para el tratamiento de la metritis, pero la desventaja principal en la utilización de estos es que pueden aparecer residuos en la leche que van de 53 a 144 horas esto en el caso de las oxitetraciclinas, pero la duración de los residuos depende de varios factores, tales como relativo flujo de sangre del miometrio, la cantidad de oxitetraciclina expulsada por la vagina durante las contracciones del útero, las cantidades de fluidos en el útero y los niveles de producción diarias de leche. 23, 44.

Actualmente existen otros métodos para detectar antibióticos (inhibidores) en leche, como se muestran en la tabla C.

Tabla C. Métodos de detección de antibióticos (inhibidores) en leche. 45.

Métodos de rastreo	Pruebas para identificar y confirmar
Prueba inhibitoria con <i>Bacillus stearothermophilus</i>	Prueba enzimática para betalactámicos
Prueba inhibitoria con <i>Streptococcus thermophilus</i>	Inmunoensayo por aglutinación
Prueba inhibitoria con <i>Bacillus subtilis</i>	Prueba de las tres placas
Prueba inhibitoria con <i>Sarcina lutea</i>	Prueba de las seis placas
Prueba de inhibición del yogurt	Detección e identificación de antibióticos mediante la prueba de receptores microbianos (charm test)

1.14. IMPORTANCIA DE LA FITOTERAPIA

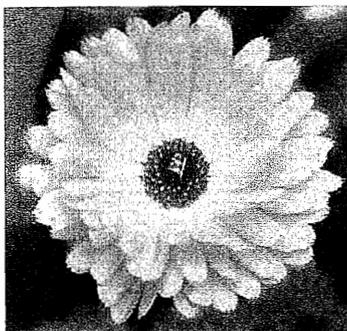
Durante mucho tiempo los remedios naturales, y sobre todo las plantas medicinales, fueron el principal e incluso el único recurso de que disponían los médicos. Esto hizo que se profundizara en el conocimiento de las especies vegetales que poseen propiedades medicinales y ampliar sus experiencias en el empleo de productos que de ellas se extraen. ⁴⁶

La fitoterapia, nombre que se aplica al uso medicinal de las plantas, nunca ha dejado de tener vigencia. Muchas de las especies vegetales utilizadas por sus virtudes curativas entre los antiguos egipcios, griegos y romanos pasaron a formar parte de la farmacopea medieval, que más tarde se vio enriquecida por el aporte de los conocimientos del Nuevo Mundo. Dichas plantas medicinales y los remedios que entonces utilizaban se siguen usando hoy en día. ⁴⁷

A principios del siglo pasado, el desarrollo de la química y el descubrimiento de procesos complejos de síntesis orgánica desembocaron en la puesta en marcha, por parte de la industria farmacéutica, de una nueva producción de medicamentos. No debemos olvidar que algunas veces los remedios a base de plantas medicinales presentan una inmensa ventaja con respecto a los tratamientos químicos. En las plantas los principios activos se hallan siempre biológicamente equilibrados por la presencia de sustancias complementarias que van a potenciarse entre sí. Sin embargo, a pesar de que han aumentado las investigaciones y estudios científicos de las plantas medicinales, todavía no se conocen muchos de los principios activos de las plantas que le confieren sus extraordinarias cualidades y no se sabe si se acumulan en el organismo. ^{46, 47}

Recordar también la gran importancia que posee la forma de recolección y conservación de las plantas, ya que las células vegetales, desde el mismo momento de la recolección, sufren transformaciones biológicas. Así al separar la parte aérea de la raíz, se provoca una interrupción del flujo alimenticio y de transpiración. Las enzimas que contiene, y que antes favorecían la formación de material activo, empiezan ahora a descomponerla. En el organismo vegetal, las anteriores reacciones de síntesis orgánica, comienzan a ser suplantadas por reacciones de degradación y el producto se transforma desde el punto de vista químico. Estas transformaciones se manifiestan con emisión de olor, modificación del color, etc. Una incorrecta recolección y desecación, aumenta la cantidad de productos de degradación, perdiendo la planta parte de su calidad. ^{46, 47}

1.15. *Calendula officinalis*



Nombre común.

Caléndula, Maravilla, Alta reina, Mercadela ⁴⁸.

La palabra “caléndula” viene de las calendas del latín que designaban el primer día del mes. Es así que la caléndula florece todos los meses del año, incluso los de invierno siempre y cuando este sea suave. ⁴⁹.

1.15.1. Clasificación científica.

El género Caléndula pertenece a la familia Asteraceae. *Calendula officinalis* es una planta anual que se cultiva en todo el mundo y sus flores son utilizadas tanto desde el punto de vista ornamental como para la industria farmacéutica y cosmética. En nuestro país la *C. officinalis* crece adecuadamente en condiciones de cultivo y sus flores cumplen con los requisitos establecidos por las farmacopeas internacionales para su uso como planta medicinal. ^{48, 50}.

Calendula officinalis es una hierba anual más o menos pelosa, de 30 a 60 cm. de altura; hojas simples, alternas, algo gruesas, de oblongas a obovado oblongas, enteras o diminutas y remotamente denticuladas; cabezuelas solitarias en pedúnculos robustos, vistosos de 3.75 a 5 cm. de diámetro; los radios planos, extendidos de color amarillo blanquecino hasta anaranjado subido, que se cierran por la noche; a veces la planta es prolifera desde el involucro, y porta varias cabezuelas pedunculadas en un círculo. ^{48, 50}.

En los estudios farmacognósticos presenta: índices de humedad (<14%), cenizas (<11%), sustancias extraídas con éter etílico, etanol al 70% y agua. También se demostró que ni la fecha de plantación ni el tipo de secado (sol, sombra, estufa) afectan los metabolitos reportados para la especie. ⁵¹.

El secado de la planta tiene gran importancia para la preservación de los principios activos. Se plantea la necesidad del secado de las flores de Caléndula lo más inmediato a su colecta ya que su almacenamiento por 3.5 h en sacos de polietileno conlleva una pérdida del 28-30% de los carotenoides y del 24-26% de los flavonoides; y se recomienda la temperatura de 80 °C para secar el material vegetal porque se obtienen los mayores rendimientos de carotenoides y flavonoides. En general, el secado a temperatura de 80 °C tiene un mayor rendimiento (20-200%) de carotenoides que a 20 °C, debido al menor tiempo de secado y por tanto a una menor actuación de las enzimas.

49, 51.

1.15.2. Composición y aspectos farmacológicos.

Contiene aproximadamente 0.02% de esencia, materia amarga amorfa 19%, una sustancia llamada calendulina, carotina en las flores, ésteres colesterínicos de los ácidos láurico, mirístico, palmítico esteárico y pentadecílico, un hidrocarburo glucósido; xantofila, mucílagos, ácidos orgánicos, ácido málico, ácido salicílico, materia colorante y vitamina C. ⁵⁰.

Se han identificado algunos componentes lipofílicos activos de las flores de *C. officinalis* como las saponinas con propiedades mutagénicas; triterpenos hidroxilados con propiedades antiinflamatoria y antiedematosa; glicósidos de flavonol con posibles propiedades anticarcinogénicas, analgésica y antitumoral, donde se aprobó que extractos de la hoja de la planta tenían propiedades citotóxica en tres líneas celulares MRC5, Hep 2 y células ascíticas del carcinoma de Ehrlich. ⁵².

Las flores de Caléndula presentan un amplio espectro de tipos de compuestos químicos, lo cual está en concordancia con la diversidad en acciones farmacológicas que presenta la planta. Entre los compuestos más investigados dado su interés farmacológico están los carotenoides y los flavonoides encontrados en altas cantidades en caléndula, que explican mucha de su actividad antiinflamatoria, antiviral y antihistamínica, así como tener una acción hipotensora y vasodilatadora. Otros compuestos presentes son las saponinas y ácidos fenólicos como el coumárico, gentísico, vainílico, caféico, etc., que le confieren una acción emenagoga, antiespasmódica sudorífica y colerética. ^{53, 54, 55}.

Contienen alcoholes triterpénicos (arnidiol, faradiol, taraxasterol, alfa y beta-amirina) y su

contenido en un principio amargo (calendina) le confieren una acción antibiótica, antiparasitaria (sobre todo *Trichomonas vaginalis*), antifúngica, antiviral (herpes simple y virus de la influenza) y estrogénica. ⁵⁶.

Uso en medicina tradicional. Las flores de caléndula tienen un amplio espectro en cuanto al tratamiento de diversas afecciones, entre las que podemos citar de una forma selectiva las siguientes: para la curación de las heridas, como colutorios en las estomatitis, y en la piorrea; en problemas de gastritis, de úlceras, hepatitis y otras enfermedades gastrointestinales; en los casos de hipertensión, taquicardia y arritmia; así como en diversas afecciones del sistema urinario, y en enfermedades del SNC y periférico, etc. ⁴⁸.

Las flores de *C. officinalis* presentan las propiedades farmacológicas siguientes: cicatrizante, antiinflamatorio, antibacteriano y tranquilizante, lo cual hace de ésta materia prima natural de interés para la industria farmacéutica. ⁴⁸.

1.15.3. Actividad antibacteriana de *Calendula officinalis*.

Algunos trabajos han demostrado que *C. officinalis* es eficaz para inhibir el crecimiento de bacterias como *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*. ⁵⁵. El efecto de los extractos acuoso, etanólico e hidroacetónico fueron estudiados por Dumenil ⁵³, encontrando que el extracto etanólico al 80% produce un efecto bactericida sobre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa* lo cual nos hace pensar en la necesidad de buscar nuevas alternativas en el tratamiento contra estas bacterias. ⁵³.

1.16. MÉTODO COLORIMÉTRICO DE MOSMANN.

El método colorimétrico descrito por primera vez por Mosmann en 1983 el cuál está basado en la conversión del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), color amarillo a cristales de formazan color violeta, producto de las enzimas deshidrogenasas mitocondriales en células viables. La concentración del producto colorido puede ser medido espectrofotométricamente y es proporcional al número de células viables. ⁵⁷.

Este método ha sido usado ampliamente en estudios de radiosensibilidad, estimulación celular, en inmunología en estudios de actividad inmunocitotóxica, producción de citocinas y en pruebas de citotoxicidad. ⁵⁷.

2. HIPÓTESIS:

Si el uso del extracto hidroalcohólico, acuoso o etanólico de *Calendula officinalis* inhibe el crecimiento de bacterias patógenas aisladas de casos de metritis y mastitis bovina, entonces se podrá usar como alternativa en el tratamiento de estas enfermedades.

3. OBJETIVOS

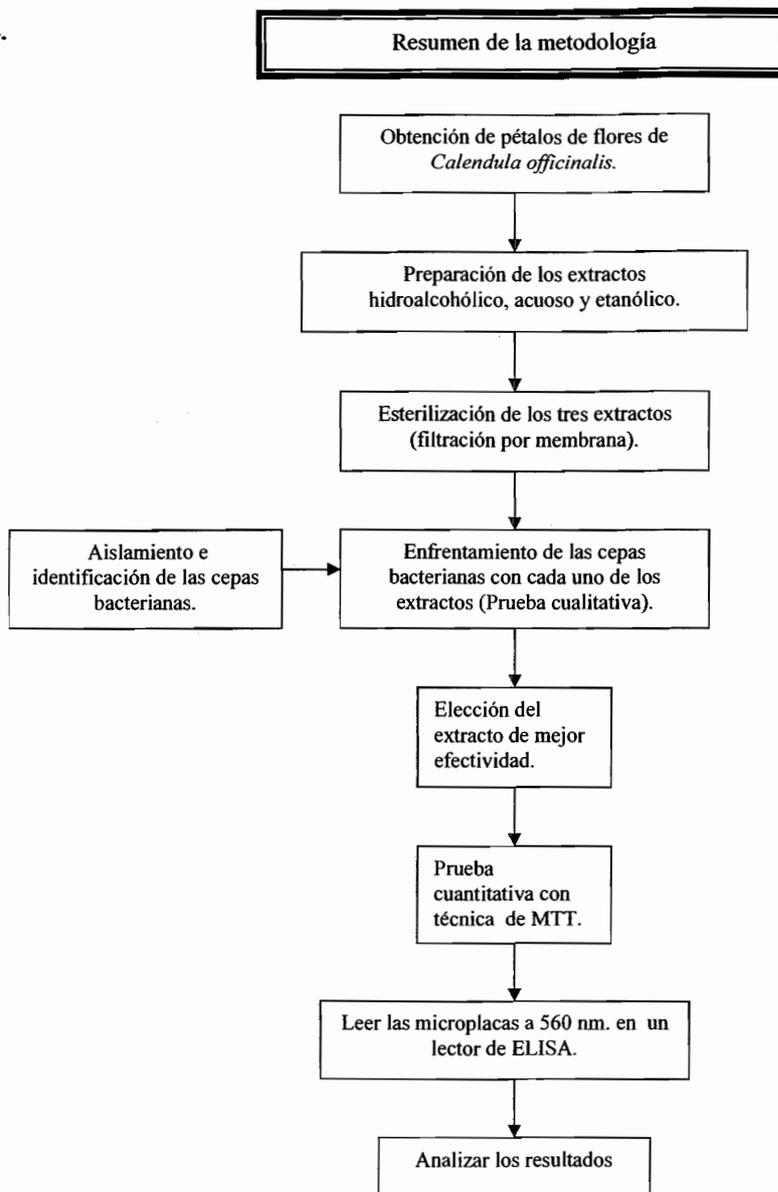
3.1. Objetivo general:

- ☞ Demostrar el efecto antibacteriano (citotóxico) de los extractos de *Calendula officinalis* mediante el método colorimétrico de Mosmann (MTT) para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto que sea capaz de producir dicho efecto.

3.2. Objetivos particulares:

- ☞ Obtener los extractos hidroalcohólico, acuoso y etanólico de *Calendula officinalis*.
- ☞ Por medio de pruebas de laboratorio, aislar e identificar las bacterias presentes en casos de metritis y mastitis bovina.
- ☞ Mediante la prueba en tubo, retar a las bacterias identificadas con los tres extractos para evaluar la efectividad de cada uno (prueba cualitativa).
- ☞ Determinar la CMI aplicando el método colorimétrico de Mosmann (prueba cuantitativa).

4.



5. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1. Obtención de las flores.

Los pétalos de las flores de *Calendula officinalis* y se secaron en la estufa a 56 °C por una semana. (Las flores fueron compradas en “La Magnolia”, ubicada en Guatemala No. 10, Col. Centro, México, D.F.; siendo identificadas por la Dra. en Biología Rocío Rosette en Campo 4 de la FES-C).

5.2. Obtención de los extractos.

5.2.1. Filtración por membrana.

Las bacterias pueden eliminarse de los líquidos haciéndolos pasar a través de filtros con poros muy pequeños que impiden su paso. Los filtros de membranas porosas se fabrican con ésteres de celulosas (acetato de celulosa, nitrato de celulosa, coloidón, etc.) biológicamente inertes.

Los filtros bacterianos tienen un tamaño de poro menor de 0.75 micras. Las membranas pueden esterilizarse en autoclave. La membrana se monta sobre una plataforma soporte (de acero inoxidable) que queda cerrada herméticamente entre los embudos superior e inferior. La filtración se obtiene aplicando presión positiva al lado de entrada o negativa en la salida. La presión del aire negativa que se emplea, se regula mediante un manómetro con una válvula de vacío y debe estar de 200 a 400 mm de Hg. ^{58, 59.}

5.2.2. Extracto hidroalcohólico.

Se pesaron 15 gramos de pétalos y se agregó 500 ml. de etanol al 70%, y se dejó en la oscuridad por tres días con agitación diaria, pasado este tiempo se filtro previamente usando el papel filtro (para eliminar impurezas de tamaño grande); se adicionaron 300 ml de agua destilada, se pasó al rotavapor con una temperatura constante de 56 °C hasta que restó un volumen aproximado de 0.4 litros. El extracto se esterilizó por filtración con membranas con poro de 0.8, 0.45 y 0.22 µm. La concentración del extracto fue de 6.72 mg de sólidos por ml. ^{60.}

5.2.3. Extracto acuoso.

Se realizó una infusión (15 g. de pétalos de las flores secas en un litro de agua desionizada), es decir, se hirvió el agua y se adicionó las flores, durante 1.5 minutos. Se retiraron los sólidos con un filtro de papel, el filtrado se esterilizó con una membrana con poro de 0.22 μm . Para determinar la concentración del extracto se tomó una alícuota de 5 ml, secándose en la estufa durante 10 días a una temperatura de 56-60 °C obteniéndose el peso seco de 9.82 mg de sólido por ml. ⁶⁰.

5.2.4. Extracto etanólico.

15 g de muestra seca en un litro de etanol absoluto se dejó en agitación por tres días a temperatura ambiente protegido de la luz, se retiró el material insoluble por filtración, la solución se sometió a evaporación total del etanol manteniendo una temperatura no superior a 60 °C hasta sequedad. Los sólidos restantes se pesaron y se disolvieron en dimetilsulfóxido DMSO, los que fueron de 4.2 mg de sólidos del extracto por ml. ⁶⁰.

5.3. Obtención de las cepas bacterianas.

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

5.3.1. Identificación de las bacterias.

La identificación se realizó por medio de su crecimiento en agares ricos, selectivos y diferenciales; realizando pruebas bioquímicas primarias y secundarias para determinar género y especie de las cepas reportadas. ^{33, 34}.

5.4. Enfrentamiento bacteria-extracto. Prueba cualitativa.

Rotular por separado 3 tubos estériles para cada cepa bacteriana, el tubo 1 llevara 1 ml de extracto más 1 ml de bacteria estandarizada (tubo problema), el tubo 2 será el control (+) el cuál tendrá 2 ml de bacteria estandarizada en caldo BHI, y el tubo 3 es el control (-) que lleva 2 ml de extracto,

todos los tubos se incuban a 37 °C por 24 horas y se observan los resultados.

5.5. Técnica de MTT. (Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio). Prueba cuantitativa.

Debido a la sensibilidad del método se procede de la siguiente forma: La prueba se realiza bajo condiciones de esterilidad, en una microplaca de 96 pozos, se adiciona 50 µL de SSF de la columna 2 a la 9, la columna 1 llevara 100µL del extracto la columna 2 llevara 50µL del extracto y se procede a realizar las diluciones dobles hasta la columna 9; posteriormente agregar 100µL de la bacteria estandarizada de la columna 1 a la 9. Para el blanco serán los pozos de la columna 10, este contendrá 100µL de SSF + 100µL de caldo BHI, para el control (+) serán los pozos de la columna 11 y contendrá 200µL de la bacteria estandarizada en BHI y el control (-) serán los pozos de la columna 12 y llevarán 200µL del extracto. Para cada cepa se realizara por cuadruplicado, esto es, de la fila A a la fila D es una cepa, y de la E a la H será otra cepa bacteriana. Se incuba a 37°C /24 horas. Pasando este tiempo se agrega de 10 - 20µl de MTT (5 mg/ml) a cada pozo, incubar por 2 horas a 37 °C después se adiciona 40µL del reactivo de paro (ver apéndice). Finalmente leer en el Elisómetro lector de ELISA a una longitud de onda de 560 nm.

NOTA: Las cepas con las que se trabaja son resembradas para que sean de 24 horas de crecimiento para su estandarización con el 0.5 de Nefelómetro de Mc Farland , para las pruebas cualitativa y cuantitativa.

6. RESULTADOS

Para identificar las cepas bacterianas obtenidas del cultivo de los exudados de mastitis y metritis bovina en el ganado Holstein Friesian en la cuenca lechera de Tizayuca Hgo., se realizaron pruebas bioquímicas primarias, secundarias y selectivas. (Ver tablas I, II, III, IV).

Tabla I. Identificación de cepas del género *Staphylococcus*.

PRUEBAS	
Crecimiento en AS	+
Crecimiento en A SM	+
Forma y agrupación	Cocos, en racimos
Gram	+
Catalasa	+
Oxidasa	-
OF	+, (O/F)
Glucosa	+
Coagulasa	+
Reducción de nitratos	+
Bacteria identificada	<i>Staphylococcus aureus</i>
No. de cepas	4

Tabla II. Identificación de cepas del género *Streptococcus*.

PRUEBAS			
Crecimiento en AS	+	+	+
Hemólisis	β	β	α
Forma y agrupación	Cocos en cadenas largas	Cocos en cadenas cortas	Cocos en cadenas cortas
Gram	+	+	+
Catalasa	-	-	-
Bacitracina 0.040 UI	+	-	-
CAMP	-	+	-
Hidrólisis de hipurato	-	+	-
Bilis esculina	-	-	+
NaCl (6.5%)	-	-	+
Optoquina	-	-	-
Bacteria identificada	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
No. de cepas	1	2	2

Tabla III. Identificación de cepas de la familia *Enterobacteriaceae*.

PRUEBAS		
Crecimiento en AS	+	+
Crecimiento en A Mc	+	+
Forma	Bacilo	Bacilo
Gram	-	-
Catalasa	+	+
Oxidasa	-	-
OF	+(O/F)	+(O/F)
Indol	+	+
MR	+	-
VP	-	+
Citratos	-	+
Motilidad	+	-
H ₂ S	-	-
Malonatos	-	+
Urea	-	+
KIA	Ácido/ácido	Ácido/ácido
Glucosa	+	+
Lactosa	+	+
Manitol	+	+
Reducción de nitratos	+	+
Lisina	+	+
Arginina	-	-
Ornitina	-	-
Bacteria identificada	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
No. de cepas	1	1

Tabla IV. Identificación de *Nocardia asteroides*.

PRUEBAS	
Crecimiento en AS	+
Crecimiento en A BHI	+
Forma	Cocos
Gram	+
OF	O
Motilidad	-
Reducción de nitratos	+
Lactosa	-
Ureasa	+
No. de cepas	1

6.1. RESULTADOS CUALITATIVOS

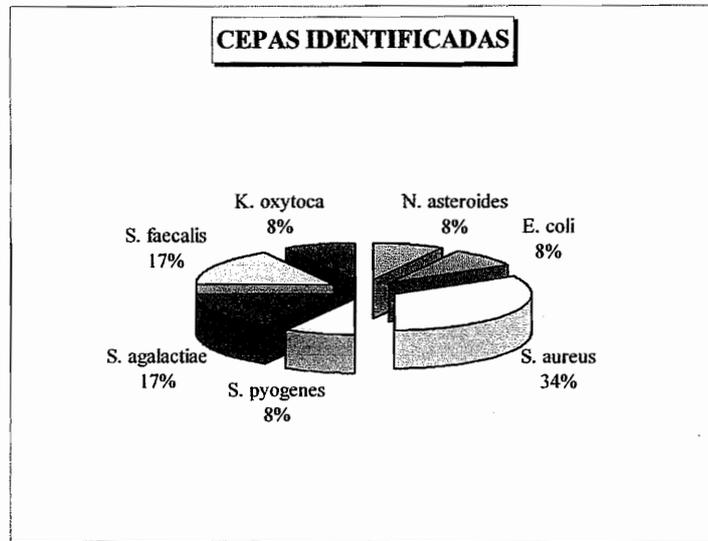
NUM. DE CEPA*	BACTERIA	EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO	EXTRACTO ACUOSO	EXTRACTO ETANÓLICO
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	(+/-)	(-)	(-)
2	<i>Staphylococcus aureus</i>	(+/-)	(-)	(-)
3	<i>Staphylococcus aureus</i>	(+/-)	(-)	(-)
4	<i>Staphylococcus aureus</i>	(+/-)	(-)	(-)
1	<i>Streptococcus agalactiae</i>	(+)	(-)	(+/-)
2	<i>Streptococcus agalactiae</i>	(+)	(-)	(+/-)
1	<i>Streptococcus pyogenes</i>	(+)	(-)	(+/-)
1	<i>Enterococcus faecalis</i>	(+/-)	(-)	(+)
2	<i>Enterococcus faecalis</i>	(+/-)	(-)	(+)
1	<i>Escherichia coli</i>	(+/-)	(-)	(-)
1	<i>Nocardia asteroides</i>	(+/-)	(-)	(-)
1	<i>Klebsiella oxytoca</i>	(+/-)	(-)	(-)

Tabla V. Cepas obtenidas y resultados cualitativos de las valoraciones bacteria-extracto de *Calendula officinalis*; se realizaron los siguientes extractos: un hidroalcohólico, un acuoso y un etanólico con el fin de evaluar de manera general efecto que tienen sobre éstas.

(+): Inhibición y/o citotoxicidad bacteriana; (-): No inhibición; (+/-): Inhibición escasa.

* No. de muestras aisladas de diferentes vacas.

NOTA: Hablaremos de efecto inhibitorio, antibacteriano o citotóxico a la muerte celular producida por el extracto.



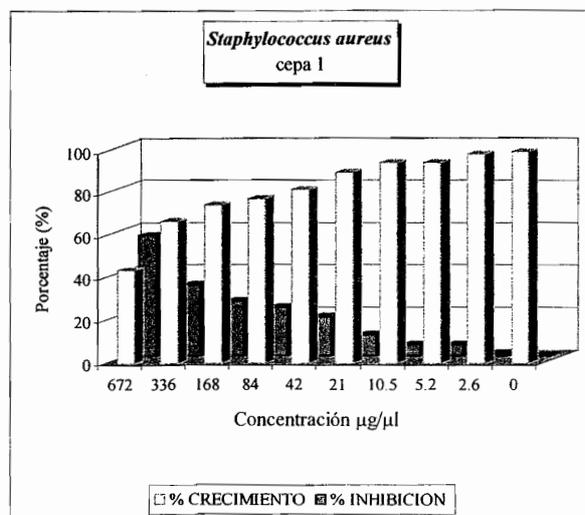
Gráfica I. Porcentajes de las diferentes bacterias aisladas de los casos de mastitis y metritis bovina. Obsérvese que la cepa que más afecta a este tipo de infecciones corresponde a *Staphylococcus aureus*.

6.2. RESULTADOS CUANTITATIVOS

A continuación se muestran los resultados cuantitativos de las cepas bacterianas las cuales están numeradas porque fueron aisladas de diferentes animales. A cada tabla le corresponde una gráfica.

CARRIL	CONC. ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	ABS	% DE CRECIMIENTO	% DE INHIBICIÓN Y/O CITOTOXICIDAD
1	672	0.971	43.6	56.4
2	336	1.488	66.9	33.1
3	168	1.654	74.3	25.7
4	84	1.718	77.2	22.8
5	42	1.822	81.8	18.2
6	21	2.003	90.0	10.0
7	10.5	2.110	94.8	5.2
8	5.2	2.115	95.0	5.0
9	2.6	2.200	98.9	1.1
10(C+)	0	2.225	100	0
11(C-)	672	0.198	0	0

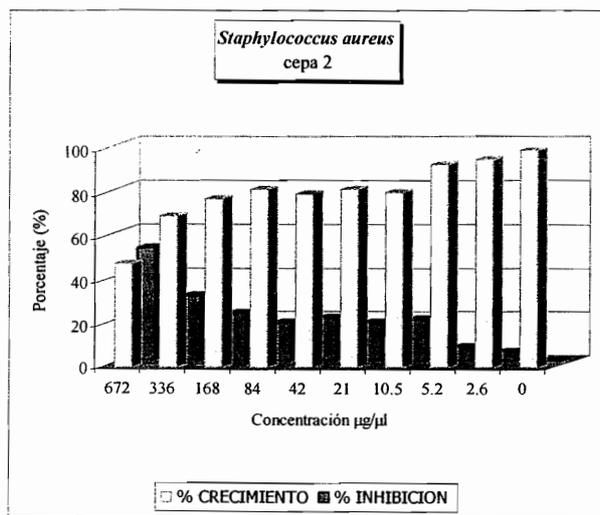
Tabla 1. Lecturas de absorbancia a 560 nm de longitud de onda en Elisómetro. Técnica en microplaca. Obsérvese los porcentajes de crecimiento (células viables) y porcentajes de inhibición (citotoxicidad bacteriana) de la cepa 1 de *Staphylococcus aureus*.



Gráfica 1. Porcentajes de crecimiento e inhibición de la cepa 1 de *Staphylococcus aureus* en el enfrentamiento con el extracto de *Calendula officinalis* a diferentes concentraciones (diluciones dobles). Obsérvese que en la concentración $0\mu\text{g}/\mu\text{l}$, corresponde al control positivo con el 100% de crecimiento.

CARRIL	CONC. ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	ABS	% DE CRECIMIENTO	% DE INHIBICIÓN Y/O CITOTOXICIDAD
1	672	1.437	48.2	51.8
2	336	2.089	70.0	30.0
3	168	2.324	77.9	22.1
4	84	2.451	82.2	17.8
5	42	2.39	80.2	19.8
6	21	2.459	82.5	17.5
7	10.5	2.412	80.9	19.1
8	5.2	2.788	93.5	6.5
9	2.6	2.851	95.6	4.4
10(C+)	0	2.981	100	0
11(C-)	672	0.313	0	0

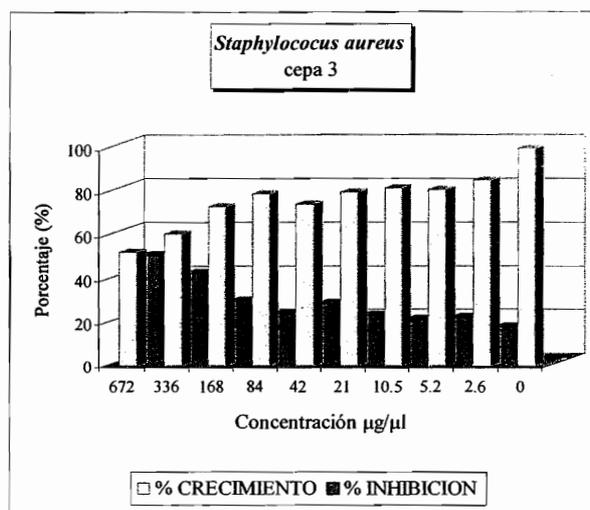
Tabla 2. Lecturas de absorbancia a 560 nm de longitud de onda en Elisómetro. Técnica en microplaca. Obsérvese los porcentajes de crecimiento (células viables) y porcentajes de inhibición (citotoxicidad bacteriana) de la cepa 2 de *Staphylococcus aureus*.



Gráfica 2. Porcentajes de crecimiento e inhibición de la cepa 2 de *Staphylococcus aureus* en el enfrentamiento con el extracto de *Calendula officinalis* a diferentes concentraciones (diluciones dobles). Obsérvese que en la concentración $0\mu\text{g}/\mu\text{l}$, corresponde al control positivo con el 100% de crecimiento.

CARRIL	CONC. ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	ABS	% DE CRECIMIENTO	% DE INHIBICIÓN Y/O CITOTOXICIDAD
1	672	1.438	52.5	47.5
2	336	1.660	60.7	39.3
3	168	2.014	73.6	26.4
4	84	2.167	79.2	20.8
5	42	2.037	74.5	25.5
6	21	2.133	79.9	20.1
7	10.5	2.220	81.8	18.2
8	5.2	2.234	81.2	18.8
9	2.6	2.237	85.3	14.7
10(C+)	0	2.735	100	0
11(C-)	672	0.202	0	0

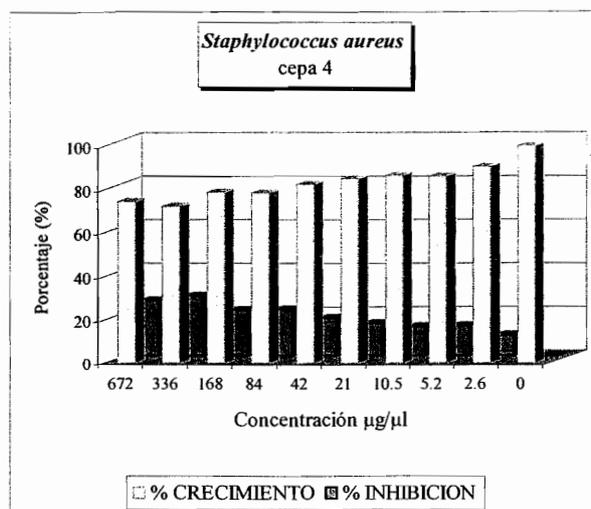
Tabla 3. Lecturas de absorbancia a 560 nm de longitud de onda en Elisómetro. Técnica en microplaca. Obsérvese los porcentajes de crecimiento (células viables) y porcentajes de inhibición (citotoxicidad bacteriana) de la cepa 3 de *Staphylococcus aureus*.



Gráfica 3. Porcentajes de crecimiento e inhibición de la cepa 3 de *Staphylococcus aureus* en el enfrentamiento con el extracto de *Calendula officinalis* a diferentes concentraciones (diluciones dobles). Obsérvese que en la concentración $0\mu\text{g}/\mu\text{l}$, corresponde al control positivo con el 100% de crecimiento.

CARRIL	CONC. ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	ABS	% DE CRECIMIENTO	% DE INHIBICIÓN Y/O CITOTOXICIDAD
1	672	1.646	74.7	25.3
2	336	1.592	72.3	27.7
3	168	1.738	78.9	21.1
4	84	1.737	78.8	21.2
5	42	1.819	82.6	17.4
6	21	1.893	85.0	15.0
7	10.5	1.908	86.6	13.4
8	5.2	1.999	86.2	13.8
9	2.6	1.994	90.5	9.5
10(C+)	0	2.202	100	0
11(C-)	672	0.271	0	0

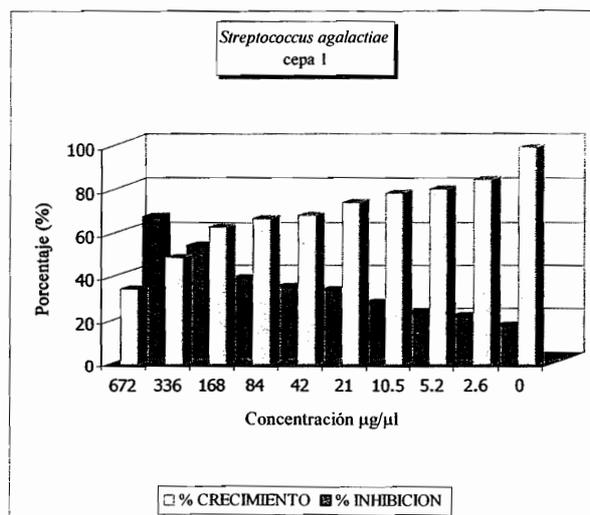
Tabla 4. Lecturas de absorbancia a 560 nm de longitud de onda en Elisómetro. Técnica en microplaca. Obsérvese los porcentajes de crecimiento (células viables) y porcentajes de inhibición (citotoxicidad bacteriana) de la cepa 4 de *Staphylococcus aureus*.



Gráfica 4. Porcentajes de crecimiento e inhibición de la cepa 4 de *Staphylococcus aureus* en el enfrentamiento con el extracto de *Calendula officinalis* a diferentes concentraciones (diluciones dobles). Obsérvese que en la concentración $0\mu\text{g}/\mu\text{l}$, corresponde al control positivo con el 100% de crecimiento.

CARRIL	CONC. ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	ABS	% DE CRECIMIENTO	% DE INHIBICIÓN Y/O CITOTOXICIDAD
1	672	0.740	35.0	65.0
2	336	1.045	49.5	51.5
3	168	1.346	63.8	36.2
4	84	1.431	67.8	32.2
5	42	1.460	69.2	30.8
6	21	1.587	75.2	24.8
7	10.5	1.677	79.4	20.6
8	5.2	1.719	81.4	18.6
9	2.6	1.808	85.7	14.3
10(C+)	0	2.111	100	0
11(C-)	672	0.251	0	0

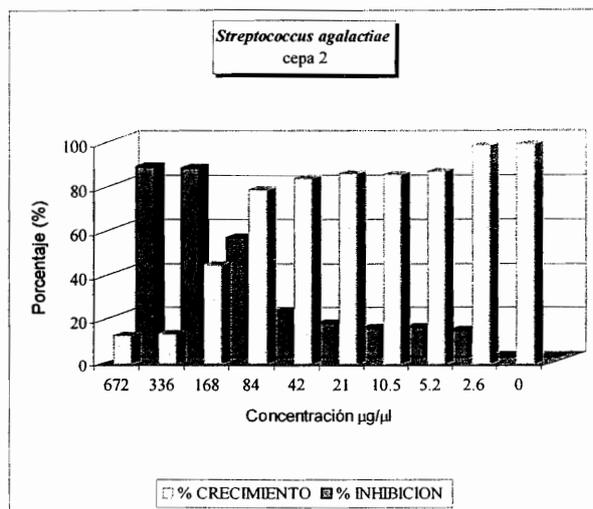
Tabla 5. Lecturas de absorbancia a 560 nm de longitud de onda en Elisómetro. Técnica en microplaca. Obsérvese los porcentajes de crecimiento (células viables) y porcentajes de inhibición (citotoxicidad bacteriana) de la cepa 1 de *Streptococcus agalactiae*.



Gráfica 5. Porcentajes de crecimiento e inhibición de la cepa 2 de *Streptococcus agalactiae* en el enfrentamiento con el extracto de *Calendula officinalis* a diferentes concentraciones (diluciones dobles). Obsérvese que en la concentración $0\mu\text{g}/\mu\text{l}$, corresponde al control positivo con el 100% de crecimiento.

CARRIL	CONC. ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	ABS	% DE CRECIMIENTO	% DE INHIBICIÓN Y/O CITOTOXICIDAD
1	672	0.139	13.5	86.5
2	336	0.148	14.4	85.6
3	168	0.470	45.7	54.3
4	84	0.819	79.6	20.4
5	42	0.871	84.7	15.3
6	21	0.890	86.6	13.4
7	10.5	0.889	86.5	13.5
8	5.2	0.905	88.0	12.0
9	2.6	1.023	99.5	0.5
10(C+)	0	1.028	100	0
11(C-)	672	0.040	0	0

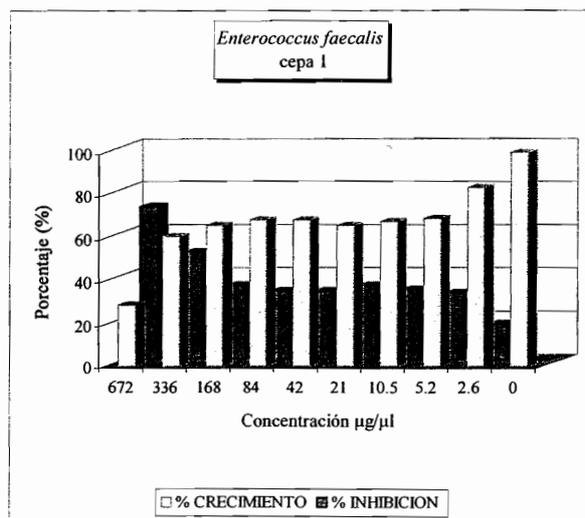
Tabla 6. Lecturas de absorbancia a 560 nm de longitud de onda en Elisómetro. Técnica en microplaca. Obsérvese los porcentajes de crecimiento (células viables) y porcentajes de inhibición (citotoxicidad bacteriana) de la cepa 2 de *Streptococcus agalactiae*.



Gráfica 6. Porcentajes de crecimiento e inhibición de la cepa 2 de *Streptococcus agalactiae* en el enfrentamiento con el extracto de *Calendula officinalis* a diferentes concentraciones (diluciones dobles). Obsérvese que en la concentración $0\mu\text{g}/\mu\text{l}$, corresponde al control positivo con el 100% de crecimiento.

CARRIL	CONC. ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	ABS	% DE CRECIMIENTO	% DE INHIBICIÓN Y/O CITOTOXICIDAD
1	672	0.587	29.1	70.9
2	336	1.221	60.5	49.5
3	168	1.326	65.8	34.2
4	84	1.376	68.2	31.8
5	42	1.378	68.4	31.6
6	21	1.323	65.6	34.4
7	10.5	1.364	67.7	32.3
8	5.2	1.394	69.1	30.9
9	2.6	1.681	83.4	16.6
10(C+)	0	2.016	100	0
11(C-)	672	0.052	0	0

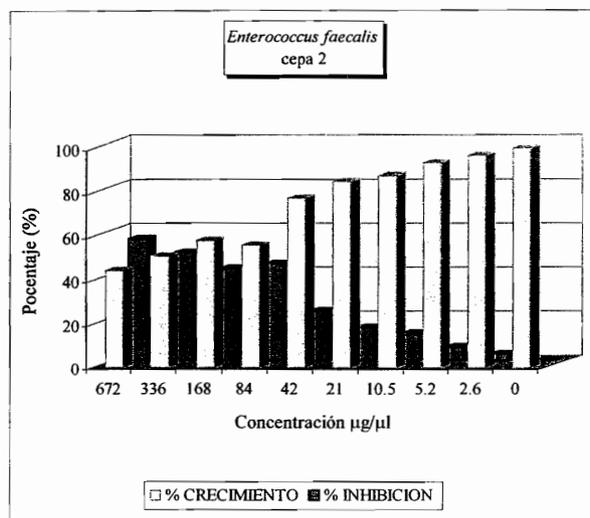
Tabla 7. Lecturas de absorbancia a 560 nm de longitud de onda en Elisómetro. Técnica en microplaca. Obsérvese los porcentajes de crecimiento (células viables) y porcentajes de inhibición (citotoxicidad bacteriana) de la cepa 1 de *Enterococcus faecalis*.



Gráfica 7. Porcentajes de crecimiento e inhibición de la cepa 1 de *Enterococcus faecalis* en el enfrentamiento con el extracto de *Calendula officinalis* a diferentes concentraciones (diluciones dobles). Obsérvese que en la concentración $0\mu\text{g}/\mu\text{l}$, corresponde al control positivo con el 100% de crecimiento.

CARRIL	CONC. ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	ABS	% DE CRECIMIENTO	% DE INHIBICIÓN Y/O CITOTOXICIDAD
1	672	1.116	44.6	55.4
2	336	1.278	51.1	48.9
3	168	1.456	58.2	41.8
4	84	1.406	56.2	43.8
5	42	1.940	77.6	22.4
6	21	2.131	85.2	14.8
7	10.5	2.196	87.8	12.2
8	5.2	2.341	93.6	6.4
9	2.6	2.421	96.8	3.2
10(C+)	0	2.501	100	0
11(C-)	672	0.099	0	0

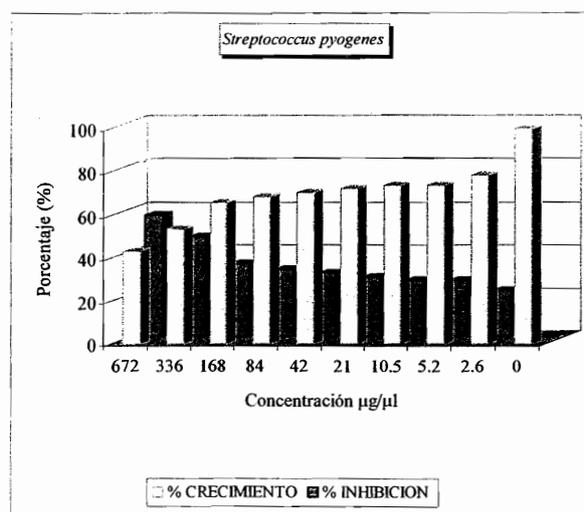
Tabla 8. Lecturas de absorbancia a 560 nm de longitud de onda en Elisómetro. Técnica en microplaca. Obsérvese los porcentajes de crecimiento (células viables) y porcentajes de inhibición (citotoxicidad bacteriana) de la cepa 2 de *Enterococcus faecalis*.



Gráfica 8. Porcentajes de crecimiento e inhibición de la cepa 2 de *Enterococcus faecalis* en el enfrentamiento con el extracto de *Calendula officinalis* a diferentes concentraciones (diluciones dobles). Obsérvese que en la concentración $0\mu\text{g}/\mu\text{l}$, corresponde al control positivo con el 100% de crecimiento.

CARRIL	CONC. ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	ABS	% DE CRECIMIENTO	% DE INHIBICIÓN Y/O CITOTOXICIDAD
1	672	0.524	43.3	56.7
2	336	0.651	53.8	46.2
3	168	0.800	66.1	33.9
4	84	0.832	68.7	31.3
5	42	0.854	70.6	29.4
6	21	0.874	72.2	27.8
7	10.5	0.893	73.8	26.2
8	5.2	0.894	73.8	26.2
9	2.6	0.950	78.5	21.5
10(C+)	0	1.210	100	0
11(C-)	672	0.066	0	0

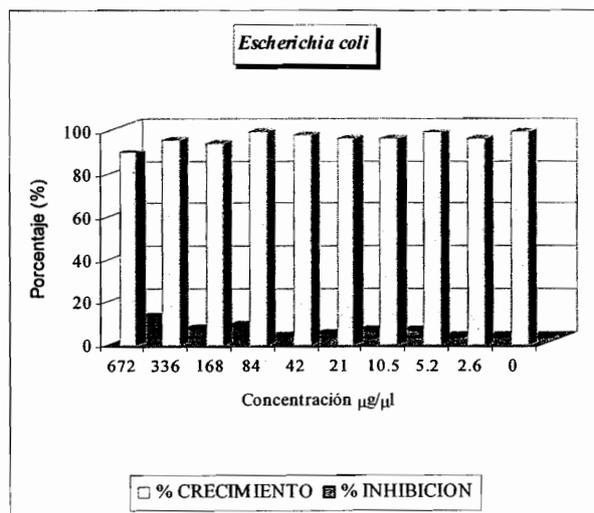
Tabla 9. Lecturas de absorbancia a 560 nm de longitud de onda en Elisómetro. Técnica en microplaca. Obsérvese los porcentajes de crecimiento (células viables) y porcentajes de inhibición (citotoxicidad bacteriana) de la cepa de *Streptococcus pyogenes*.



Gráfica 9. Porcentajes de crecimiento e inhibición de la cepa de *Streptococcus pyogenes* en el enfrentamiento con el extracto de *Calendula officinalis* a diferentes concentraciones (diluciones dobles). Obsérvese que en la concentración $0\mu\text{g}/\mu\text{l}$, corresponde al control positivo con el 100% de crecimiento.

CARRIL	CONC. ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	ABS	% DE CRECIMIENTO	% DE INHIBICIÓN Y/O CITOTOXICIDAD
1	672	2.701	90.3	9.7
2	336	2.870	95.9	4.1
3	168	2.824	94.4	5.6
4	84	2.991	100	0.0
5	42	2.945	98.5	1.5
6	21	2.896	96.8	3.2
7	10.5	2.904	97.1	2.9
8	5.2	2.980	99.6	0.4
9	2.6	2.980	96.8	0.4
10(C+)	0	2.990	100	0
11(C-)	672	0.146	0	0

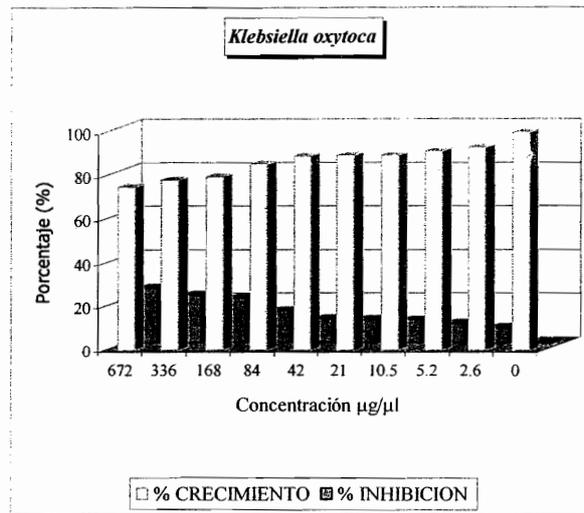
Tabla 10. Lecturas de absorbancia a 560 nm de longitud de onda en Elisómetro. Técnica en microplaca. Obsérvese los porcentajes de crecimiento (células viables) y porcentajes de inhibición (citotoxicidad bacteriana) de la cepa de *Escherichia coli*.



Gráfica 10. Porcentajes de crecimiento e inhibición de la cepa de *Escherichia coli* en el enfrentamiento con el extracto de *Calendula officinalis* a diferentes concentraciones (diluciones dobles). Obsérvese que en la concentración $0\mu\text{g}/\mu\text{l}$, corresponde al control positivo con el 100% de crecimiento.

CARRIL	CONC. ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	ABS	% DE CRECIMIENTO	% DE INHIBICIÓN Y/O CITOTOXICIDAD
1	672	2.367	75.0	25.0
2	336	2.467	78.2	21.8
3	168	2.521	79.9	20.1
4	84	2.698	85.5	14.5
5	42	2.816	89.3	10.7
6	21	2.819	89.4	10.6
7	10.5	2.831	89.7	10.3
8	5.2	2.881	91.4	8.6
9	2.6	2.936	93.1	6.9
10(C+)	0	3.153	100	0
11(C-)	672	0.174	0	0

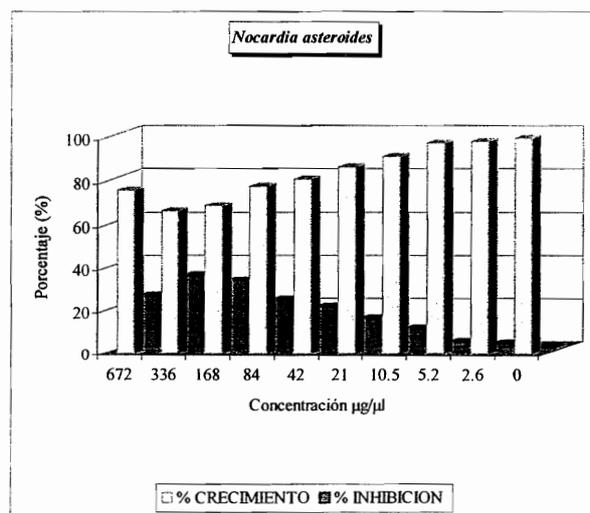
Tabla 11. Lecturas de absorbancia a 560 nm de longitud de onda en Elisómetro. Técnica en microplaca. Obsérvese los porcentajes de crecimiento (células viables) y porcentajes de inhibición (citotoxicidad bacteriana) de la cepa de *Klebsiella oxytoca*.



Gráfica 11. Porcentajes de crecimiento e inhibición de la cepa de *Klebsiella oxytoca* en el enfrentamiento con el extracto de *Calendula officinalis* a diferentes concentraciones (diluciones dobles). Obsérvese que en la concentración $0\mu\text{g}/\mu\text{l}$, corresponde al control positivo con el 100% de crecimiento.

CARRIL	CONC. ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	ABS	% DE CRECIMIENTO	% DE INHIBICIÓN Y/O CITOTOXICIDAD
1	672	0.449	76.3	23.7
2	336	0.433	66.7	33.3
3	168	0.482	69.2	30.8
4	84	0.508	78.3	21.7
5	42	0.530	81.6	18.4
6	21	0.555	87.0	13.0
7	10.5	0.595	91.7	8.3
8	5.2	0.636	98.0	2.0
9	2.6	0.641	98.7	1.3
10(C+)	0	0.649	100	0
11(C-)	672	0.057	0	0

Tabla 12. Lecturas de absorbancia a 560 nm de longitud de onda en Elisómetro. Técnica en microplaca. Obsérvese los porcentajes de crecimiento (células viables) y porcentajes de inhibición (citotoxicidad bacteriana) de la cepa de *Nocardia asteroides*.



Gráfica 12. Porcentajes de crecimiento e inhibición de la cepa de *Nocardia asteroides* en el enfrentamiento con el extracto de *Calendula officinalis* a diferentes concentraciones (diluciones dobles). Obsérvese que en la concentración 0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, corresponde al control positivo con el 100% de crecimiento.

6.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Mediante el uso del programa Mac Stat 2.0 se realizó el análisis de variancia (ANOVA) que es una técnica en la que la variancia total de un conjunto de datos se divide en dos o más componentes, y cada uno de ellos se asocia con una fuente específica de variación, de manera que durante el análisis es posible encontrar la magnitud con la que contribuye cada una de esas fuentes en la variación total y fue llevado a cabo con las lecturas de absorbancia de cada una de las cepas identificadas.

El ANOVA tiene una amplia aplicación en el análisis de datos de experimentos y se utiliza para cumplir dos objetivos: 1) estimar y probar hipótesis respecto a las variancias de las poblaciones y 2) estimar y probar hipótesis respecto a las medias de las poblaciones. ⁶¹.

Utilizando el Diseño por Bloques Completos y Aleatorizados que es un diseño en el que las unidades (llamadas *unidades de experimentación*) a las que se aplican los tratamientos son subdivididas en grupos homogéneos llamados *bloques*, de tal manera que el número de unidades de experimentación en un bloque es igual al número (o a un múltiplo del mismo) de tratamientos en estudio. El objetivo de este método es aislar y eliminar del término de error la variación atribuible a los bloques, y asegurar que las medias del tratamiento estén libres de los efectos del bloque. Y una de las ventajas de este diseño es que se comprende fácilmente y además, algunas complicaciones que podrían surgir en el transcurso del experimento son fáciles de controlar. ⁶¹.

Prueba de hipótesis.

$H_0: \mu_x \neq \mu_{11}$ La media de la CMI es diferente a la media del control positivo.

$H_1: \mu_x = \mu_{11}$ La media de la CMI es igual a la media del control positivo.

$F_{\text{tablas}} = 2.46$

RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE VARIANZA DE CADA CEPA BACTERIANA

Bacteria: *Staphylococcus aureus*, cepa 1.

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F
Entre grupos (A)	11	2.1616	13.1095
Entre bloques (B)	3	0.2193	1.33
Error de muestreo	33	0.1649	

Bacteria: *Staphylococcus aureus*, cepa 2.

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F
Entre grupos (A)	11	4.9805	132.004
Entre bloques (B)	3	0.0382	1.021
Error de muestreo	33	0.0377	

Bacteria: *Staphylococcus aureus*, cepa 3.

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F
Entre grupos (A)	11	2.6902	40.9516
Entre bloques (B)	3	0.0684	1.0419
Error de muestreo	33	0.0657	

Bacteria: *Staphylococcus aureus*, cepa 4.

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F
Entre grupos (A)	11	2.6496	32.1968
Entre bloques (B)	3	0.5102	6.1999
Error de muestreo	33	0.0823	

Bacteria: *Streptococcus agalactiae*, cepa 1.

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F
Entre grupos (A)	11	1.8590	6.5851
Entre bloques (B)	3	0.2037	0.7214
Error de muestreo	33	0.2823	

Bacteria: *Streptococcus agalactiae*, cepa 2.

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F
Entre grupos (A)	11	0.5886	29.6461
Entre bloques (B)	3	0.0248	1.2887
Error de muestreo	33	0.0199	

Bacteria: *Enterococcus faecalis*, cepa 1.

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F
Entre grupos (A)	11	1.1715	21.8968
Entre bloques (B)	3	0.0939	1.7544
Error de muestreo	33	0.0535	

Bacteria: *Enterococcus faecalis*, cepa 2.

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F
Entre grupos (A)	11	1.9988	35.0910
Entre bloques (B)	3	0.2138	3.7529
Error de muestreo	33	0.0570	

Bacteria: *Streptococcus pyogenes*.

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F
Entre grupos (A)	11	0.5160	25.3918
Entre bloques (B)	3	0.0219	1.0767
Error de muestreo	33	0.0203	

Bacteria: *Escherichia coli*.

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F
Entre grupos (A)	11	4.6490	60.3037
Entre bloques (B)	3	0.1029	1.3345
Error de muestreo	33	0.0771	

Bacteria: *Klebsiella oxytoca*.

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F
Entre grupos (A)	11	4.3616	60.3650
Entre bloques (B)	3	0.0335	0.4630
Error de muestreo	33	0.0723	

Bacteria: *Nocardia asteroides*.

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F
Entre grupos (A)	11	0.0933	4.2887
Entre bloques (B)	3	0.0127	0.5838
Error de muestreo	33	0.0218	

BACTERIA	No. DE CEPA	CMI DEL EXTRACTO ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	DMS	CONCLUSIÓN (H_0)
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	672	± 0.611	Se acepta
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	336	± 0.281	Se acepta
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	336	± 0.3679	Se acepta
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	R	± 0.4118	Se rechaza
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1	336	± 0.7627	Se acepta
<i>Streptococcus agalactiae</i>	2	168	± 0.2019	Se acepta
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	10.5	± 0.3668	Se acepta
<i>Enterococcus faecalis</i>	2	42	± 0.282	Se acepta
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1	336	± 0.2045	Se acepta
<i>Escherichia coli</i>	1	R	± 0.3865	Se rechaza
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	R	± 0.3859	Se rechaza
<i>Nocardia asteroides</i>	1	R	± 0.2119	Se rechaza

Tabla VI. Resultados del valor de DMS (Diferencia Mínima Significativa) para cada una de las cepas. La H_0 se acepta de acuerdo al valor de DMS.

R: Resistente.

7. DISCUSIÓN

Las infecciones reproductivas en el ganado generan pérdidas económicas para el ganadero por gastos de antibióticos, manejo y sueldos a veterinarios, sin tomar en cuenta el tiempo que se pierde desde que la vaca paré hasta que está en alta producción láctea y vuelve a gestar. La multiresistencia bacteriana complica aún más este problema, la herbolaria trata de ser una herramienta más para resolver estos problemas de salud animal, que al final son también de salud pública por la ingesta de residuos en la leche que generan alergias y apoyan la multiresistencia bacteriana.

Se estudiaron diferentes bacterias aisladas de casos de mastitis y metritis bovina, la cepa más representativa de las 12 identificadas, como se observa en los resultados (ver gráfica No. 1, resultados cualitativos), es *Staphylococcus aureus* correspondiente al 34%, seguida de *Streptococcus agalactiae* y *Enterococcus faecalis* que equivalen al 17% cada una, observando que la mayoría de las cepas fueron Gram (+) y representa el 75%. De estos Gram (+) *Staphylococcus aureus* que representó el mayor porcentaje de las cepas estudiadas, demostrando que es el patógeno más importante en este tipo de infecciones; esto concuerda con lo reportado por Vargas en 1998²⁹. Por último, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli* y *Nocardia asteroides* representan el 8% cada una del total de las cepas.

Los resultados del enfrentamiento de *Calendula officinalis* con las bacterias aisladas del ganado bovino en las pruebas cualitativas realizadas *in vitro* se llevaron a cabo con tres extractos de *Calendula officinalis*: el primero fue con extracto hidroalcohólico, el segundo un extracto acuoso y el tercero un extracto etanólico; obteniendo una mejor inhibición con el primero, ya que el 58.3 % (7/12) de las cepas fueron sensibles y el 41.7 % (5/12) fueron resistentes, encontrado un escaso efecto bactericida en las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella oxytoca*, *E coli* y *Nocardia asteroides* (ver tabla V, resultados cualitativos), por lo que determinamos que nos dio óptimos resultados al inhibir el crecimiento de los estreptococos mencionados anteriormente. Consideramos que ésta técnica no es muy confiable debido a que no podemos establecer la concentración mínima inhibitoria (CMI) y es por eso que llevamos a cabo una prueba cuantitativa usando el MTT. Con respecto al estudio cuantitativo se analizaron las tablas y gráficas para determinar la CMI en base al análisis estadístico; así como los porcentajes de crecimiento o inhibición.

La cepa 1 de *Staphylococcus aureus* muestra que hay una inhibición del 56.4% que corresponde a la concentración de 672 µg/µl (carril 1) indica que la bacteria es sensible al extracto y se consideró

como la CMI en base al análisis estadístico, sin embargo en la prueba cualitativa no observamos inhibición a esa concentración, es por ello que se utilizó un método cuantitativo el cual nos aporta datos más precisos que el anterior debido a que la técnica de MTT descrito por Mosmann ⁽³⁸⁾, el cual está basado en la conversión de la sal de tetrazolium amarilla, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) a formazan colorido (violeta) producto de las enzimas deshidrogenasas mitocondriales (succinato deshidrogenasa) en células viables (Sladowski, 1993). No obstante que las células procariotas carecen de los cuerpos mitocondriales, sus membranas celulares parece ser el sitio del transporte electrónico y de la fosforilación oxidativa. La concentración del producto colorido es medido espectrofotométricamente y es proporcional al número de células viables. Esto nos indica la cantidad de bacterias presentes, los cambios son reproducidos en este caso por un lector de ELISA por lo que es un método muy sensible, sin embargo presenta la desventaja que el formazan se precipita formando cristales y por lo tanto se produce interferencia (Satnam, 1999).

Cabe mencionar que el reactivo utilizado para la técnica de MTT es más accesible que otros como es el caso del XTT, el cuál fue utilizado en los trabajos para validar la vacuna de BCG. ⁶²

Además este método ha demostrado ser eficiente y rápido, ya que en 48 horas se obtienen los resultados comparado con otros métodos convencionales que dan resultados en una semana. ⁶³

Con respecto a la inhibición de *Staphylococcus aureus*, cepa 2 y 3 se da en un 30 % y 39.3% respectivamente (carril 2) y estadísticamente la CMI es de 336 µg/µl debido a que hubo diferencia en las lecturas de absorbancia respecto al control positivo, además el comportamiento fue el mismo que en la cepa anterior ya que no detectamos esta inhibición al observar la placa.

La cepa 4 de *Staphylococcus aureus* es resistente debido a que no presenta diferencia en ninguna de las concentraciones respecto al control positivo, el porcentaje de crecimiento en el primer carril es del 74.7% y por lo tanto no se estableció la CMI. Nosotros sugerimos para resolver la controversia de las diferencias en cuanto a la sensibilidad entre las cepas *Staphylococcus aureus* al extracto de *C. officinalis* que en próximos trabajos se realicen modificaciones en cuanto a la concentración del extracto ya que sí aumentamos ésta, el efecto de inhibición será mayor. En el caso del MTT realizar una modificación de la técnica para evitar que se forme el precipitado de formazan y no interfiera en las lecturas.

La cepa 1 de *Streptococcus agalactiae* es sensible hasta el carril 2 con una inhibición del 51.5% correspondiente a la concentración de 336 µg/µl considerada en este caso la CMI, no obstante cuando observamos la microplaca que en base al color amarillo el cual indica la inhibición de la bacteria hallamos que ésta se dio hasta el carril 4 con una concentración de 84 µg/µ, esta variación puede estar dada por las interferencias producidas por proteínas del medio, bacterias muertas, la precipitación del formazan, etc.; por lo que proponemos que en siguientes estudios se realice un cultivo en placa de cada uno de los carriles para determinar si el extracto actuó como bactericida o bacteriostático.

El porcentaje de inhibición a la concentración de 168 µg/µl de la cepa 2 de *Streptococcus agalactiae* es del 54.3 % y por lo tanto esta corresponde a la CMI, ya que presento diferencia significativa en el carril 3 comparado con el control positivo (carril 11).

En el caso del *Enterococcus faecalis* (cepa 1) presentó un 32.3 % de inhibición a la concentración de 10.5 µg/µl, considerándose ésta como la CMI, contrastando con las cepas de *Streptococcus agalactiae* esta bacteria es más resistente al extracto.

Para la cepa 2 de *Enterococcus faecalis* la CMI se determinó en el carril 5 con una concentración de 42 µg/µl con 22.4 % de inhibición determinándose en la prueba cualitativa la inhibición en el carril 4 con una concentración de 84 µg/µl.

En cuanto a la cepa de *Streptococcus pyogenes*, el porcentaje de inhibición obtenido es del 46.2 % y la CMI es de 336 µg/µl.

Respecto a *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* y *Nocardia asteroides*, mostraron resistencia al extracto de *C. officinalis* a la concentración de 672 µg/µl, determinándose los porcentajes de crecimiento: para *E. coli* del 90.3%, *K. oxytoca* del 75% y *N. asteroides* del 76.3%; en los resultados estadísticos no presentaron diferencia en ninguna de las concentraciones respecto al control positivo, por lo que los resultados se consideraron no significativos.

En un estudio *in vivo* realizado por Ma. del Carmen Espejel en el año de 2001 ⁴⁵, en el cuál dio tratamiento a vacas con retención placentaria utilizando bolos de *C. officinalis*, ella reporta que el 85% de las vacas tratadas fueron dadas de alta, lo cual nos indica que el extracto es efectivo; dado que nuestros resultados *in vitro* con las concentraciones trabajadas las cuales fueron más pequeñas,

hallamos que el extracto no es bactericida y por lo tanto algunas de las cepas de *Staphylococcus aureus* son resistentes así como *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli* y *Nocardia asteroides*.

8. CONCLUSIONES

- ☑ Se demostró el efecto antibacteriano o citotóxico de los extractos de *Calendula officinalis*, siendo el óptimo el extracto hidroalcohólico.
- ☑ Se determinaron *in vitro* las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) del extracto hidroalcohólico sobre las cepas bacterianas causantes de mastitis y metritis bovina, cumpliendo con los objetivos planteados.
- ☑ En nuestra actualidad la utilización de los extractos de *Calendula officinalis* ha tenido un incremento importante debido a sus propiedades y que gracias a esto, se han elaborado diversos productos farmacéuticos; además de ser una planta muy económica.
- ☑ La importancia de producir leche de calidad, la fitoterapia es una buena opción para ofrecer un producto que se apegue a las normas de calidad, ya que la presencia de residuos de antibióticos en la leche ha originado casos de alergia en personas y resistencia de bacterias al constante contacto con dichos residuos.

9. APÉNDICE.

9.1 Material

- Mechero bunsen
- Termómetro
- Gradilla
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Tubo estándar 0.5 del nefelómetro de Mc Farland
- Papel filtro
- Vasos de precipitado de 100, 500 y 1000 ml.
- Embudo de vidrio
- Tubos de ensayo
- Frascos pequeños con tapa
- Viales ámbar
- Matraces erlenmeyer 250, 500 ml.
- Probetas
- Pipetas 0.5, 1, 2, 5 y 10 ml.
- Cajas petri
- Micropipetas Jencons Sealpette.
- Membrana milipore (0.8, 0.45 y 0.22 μm .)
- Propipetas
- Etiquetas
- Microplacas Falcon.

9.2. Material biológico

- Cepas bacterianas
- Pétalos de flor de *Calendula officinalis* Lin.

9.3. Equipo

- Autoclave Presto Steele 21 L.
- Parrilla con agitador Nuova II Stir Plate.
- Microscopio óptico Westover Scientific.
- Lector de ELISA Hypervisión MicroRead 4 plus.
- Estufa bacteriológica Riossa.
- Refrigerador American.
- Filtro milipore Corporation.
- Bomba de vacío G.E.- Hoffman-Pinthe, modelo 0210.
- Vortex Scientific Industries, Inc. Model g-560.
- Mezcladora Incubator-Shaker serie 25.
- Balanza granataria Triple beam balance 700 series.
- Balanza analítica, Analytical Plus, modelo No. AP2105, serie No. N55854.
- Rotavapor BUCHI R-114, Waterbath B-480.

9.4. Reactivos

- Reactivos para tinción de Gram
- Etanol
- Agua destilada
- Solución salina fisiológica
- Caldo BHI
- Agar sangre
- Agar Sal y Manitol
- Agar MacConkey
- Agar BHI
- Bateria de pruebas bioquímicas primarias y secundarias (ver apéndice)
- MTT al 5mg/ml.
- Alcohol isopropílico ácido (reactivo de paro)
- Fenol al 5%
- Extractos hidroalcohólico, acuoso y etanólico de *Calendula officinalis* Lin.

TINCIÓN DE GRAM

1. Colocar una gota de agua estéril en un portaobjetos y hacer un frotis con una muestra de bacteria (tocando la colonia con el asa)
2. Secar al medio ambiente y fijar al calor del mechero.
3. Agregar cristal violeta (1 min).
4. Lavar al chorro de agua.
5. Agregar lugol (30 s).
6. Decantar y decolorar con alcohol-acetona (2-3 s).
7. Enjuagar al chorro de agua.
8. Agregar safranina. (1 min).
9. Enjuagar al chorro de agua.
10. Secar y observar al microscopio.

Bacterias G (+) se tiñen de azul o morado.

Bacterias G (-) se tiñen de rojo o rosa.

ETANOL AL 70%

Se tomaron 700 ml de etanol aforándose con agua hasta 1 L.

FENOL AL 5%

Se pesaron 5 g. de fenol y se disolvieron en 100 ml. de agua.

SOLUCIÓN SALINA FISIOLÓGICA (SSF AL 0.85%)

Se pesaron 8.5 g. de NaCl y se disolvieron en 1L. de agua.

MTT (5mg/ml)

Se pesaron 250 mg del reactivo (MTT) y se llevaron a un volumen de 50 ml de RPMI-1640 sin rojo de fenol. La solución fue filtrada con membrana milipore de 0.22 μm y conservada para su uso a una temperatura de 4 °C. ⁶⁴.

REACTIVO DE PARO

Se aforaron 1.16 ml de HCl a 100 ml con alcohol isopropílico.

MEDIOS DE CULTIVO.

Se prepararon como indica el marbete.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS PRIMARIAS Y SECUNDARIAS

Reactivo para catalasa y oxidasa.

Prueba de coagulasa, bacitracina, CAMP y optoquina.

Medios: OF (glucosa), bilis esculina, NaCl (6.5%), hidrólisis de hipurato, SIM, MIO, KIA, LIA, citratos, MR-VP, malonatos, nitratos, malonatos, carbohidratos (glucosa, lactosa, manitol).

10. GLOSARIO.

Atonía:	Falta de la fuerza o tono normal especialmente de un órgano contráctil.
Decúbito:	Posición que toman las personas o animales cuando se echan horizontalmente.
Detritus o detrito:	Resto o residuo de un cuerpo desorganizado, como tejidos separados o descompuestos.
Distocia:	Parto laborioso o difícil.
Espéculo:	Instrumento que se emplea para examinar por la reflexión luminosa ciertas cavidades del cuerpo.
Éstasis:	Detención, o retraso, o estancamiento de sangre o de otros fluidos en alguna parte del cuerpo.
Fetotomía:	Extirpación del feto.
Hato:	Porción de ganado mayor o menor.
Involución:	Uterina: retorno del útero a su tamaño normal después del parto.
Loquios:	Derrame sanguíneo, serosanguíneo o seroso sucesivamente por la vagina en las primeras semanas después del parto.
Piómetra:	Colección de pus en el útero.
Puerperio:	Periodo que transcurre desde el parto hasta que los órganos genitales y el estado general de la vaca vuelven al estado ordinario anterior de la gestación.
Salpingitis:	Inflamación de la trompa de Falopio.
Tenesmo:	Deseo continuo, doloroso e ineficaz de orinar o defecar, producido por una irritación del cuello vesical o del ano respectivamente.
Toxemia:	Presencia de toxinas en la sangre. 65, 66.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Enciclopedia Encarta.** 2005.
2. Aréchiga GH. **Mejoramiento Animal, Reproducción, Bovinos.** 2ª Edición, UNAM, México. 2001.
3. Paisley LG, Michelson WD. **Mechanisms and therapy for retained fetal membranes and uterine infections of cow: a review.** Theriogenology 1986, 25:353-380.
4. William CR. **Enfermedades del ganado vacuno lechero.** Editorial Acribia, España. 1999.
5. Geoffrey J. **Reproducción y Obstetricia Veterinaria.** 6ª Edición. Editorial Interamericana, México. 1991.
6. Carlyle T. **Patología Veterinaria.** Editorial Hemisferio Sur, Vol. 3. 1984.
7. Smith RD. **Factors Affecting Conception Rate.** Reproduction West. Virginia, June USA. 1992.
8. Manspeaker JE. **Metritis and Endometritis.** Reproduction West. Virginia, June USA. 1992.
9. Laing JA. **Fertilidad e Infertilidad en la Práctica Veterinaria.** 4ª Edición. Editorial McGraw-Hill, México. 1991.
10. **Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana.** Instituto Nacional Indigenista.
11. Blood H. **Medicina Veterinaria.** 7ª Edición. Editorial McGraw-Hill, México. 1992.
12. Peters RA. **Reproduction in Cattle.** Second Edition. Oxford Blackwell Science, USA. 1992.
13. Bretzlaff K. **Rationale for treatment of endometritis in the dairy cow.** Food Animal Practice 1987, 3:593-606.
14. Millar PG. **Esterilidad e Inseminación Artificial en el Ganado Bovino.** Kraft, Buenos Aires. 1992.
15. Ávila TS. **Conferencia: epidemiología de la mastitis en hatos pequeños.** III Congreso Nacional de Mastitis, Consejo Nacional de Mastitis, México. 2001.
16. Morales SM. **Efecto de *Calendula officinalis* en *Pseudomonas aeruginosa* evidenciado por microscopia electrónica.** 2002. Tesis de Licenciatura Q.F.B. FESC, UNAM.
17. www.cnmweb.bizland.com/publicaciones/Dr.Aguado.PDF

18. Gyles CL, Thoen CO. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. Second Edition. Editorial Iowa State University Press, USA. 1993.
19. Pompa MS. **Producción de leche de calidad**. Informe de Servicio Social. 1996. FESC, UNAM.
20. Carter GR. **Fundamentos de bacteriología y micología veterinaria**. Editorial Acribia, España. 1989.
21. www.tecnovet.com.mx/articulos/ar14nutricion.htm
22. Vargas FJ, Escalona J. **Efecto del levamisol sobre la persistencia de infecciones por *Staphylococcus aureus* durante el secado y el desarrollo de mastitis subclínica en la lactancia en vacas**. [p://pegasus.UCLA.edu/ve/cc/revista/a4n1a98/REVSECC3.htm](http://pegasus.UCLA.edu/ve/cc/revista/a4n1a98/REVSECC3.htm).
23. Castro CP. **Control de Residuos de Antibióticos en la Leche. Experiencia en Lagos de Moreno Jalisco, Congreso Nacional de Mastitis y Calidad de la Leche**. León Guanajuato, México. 1999.
24. Olson DJ. **Metritis/Endometritis: Medically Sound Treatments**. Department of CAPS, College of Veterinary Medicine, University of Minnesota, USA. September 1996.
25. Litter M. **Compendio de Farmacología**. Editorial El Ateneo, Argentina. 1992.
26. Goodman GA. **Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica**. 9ª edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana Vol 2, México. 1996.
27. **Sistema de Producción Animal I. Bovinos**. Vol 2, 1ª Reimpresión. UNAM, México. 2001.
28. Horstman LA. **Reproduction of Dairy Cattle, Normal Postpartum Physiology**. Department of Veterinary Sciences University Perdue. 1995.
29. Rugh DG, Montes JA. **Clinical approach to postpartum metritis**. *Compend Contin. Educ. Pract. Vet.* 1993 August; 15:1131.
30. Rosas VN. **Uso de prostaglandina y *Calendula officinalis* en el tratamiento de metritis aguda versus vacas tratadas con oxitetraciclina y prostaglandina (PGF2 α) en vacas Holstein Friesian en la cuanca lechera de Tizayuca, Hgo.** 2001. Tesis de Licenciatura M.V.Z. FESC, UNAM.
31. Hatez BD. **Reproducción e Inseminación Artificial en Animales**. 6ª Edición. Editorial McGraw-Hill, México. 1996.
32. Murray P, Drew W, Kobayashi G. **Microbiología Médica**. 4ª edición. Editorial Mosby, España. 2002.
33. Koneman EW, et al. **Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas Color**. 5ª Edición. Editorial Médica Panamericana, Argentina. 1999.

34. Mac Faddin JF. **Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica.** Editorial Médica Panamericana, México. 1990.
35. Rodríguez AG. **Artículo de revisión: Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*.** Salud Pública, México. 2002, 44:464-475.
36. Cruz C. **Calidad de Leche.** Editorial Altech, México. 2001.
37. Gasque RG. **Zootecnia Lechera Concreta.** 2ª Edición. Editorial Continental, México. 1987. 33.
38. Luquet. **Leche y Productos lácteos.**
39. <http://www.sportw.com/nutricion/otrosarticulos/leche.htm>
40. Hernández CJ. **Manejo Reproductivos de Bovinos Lecheros en Sistemas de Producción Intensiva.** Material de estudios para alumnos de la práctica profesional supervisada. Departamento de reproducción. FMVZ, UNAM, México. 1998.
41. Eduardo PM. **Uso de productos farmacéuticos y biológicos en la prevención y tratamiento de las principales enfermedades del bovino.** Memorias, México .2000.
42. Ruiz L. **Situación actual y prospectos de la ganadería lechera en México.** Vol. 1. Acontecer Lechero, México. 2001.
43. SAGARPA. **Situación actual y perspectivas de la producción de leche de ganado bovino.** Centro de Estadística agropecuaria. www.sagarpa.gob.mx, 2002.
44. Sundlot FS. **Ox tetracycline residues in Milk after intrauterine treatment of cows with retained fetal membranes.** Vol. 209. JAVMA, November 15. 1996.
45. Espejel MM. **Tratamiento de retención placentaria con bolos e infusión intrauterinos de *Calendula officinalis* versus bolos e infusión intrauterinos de oxitetraciclina en ganado Holstein Friesian en la cuenca lechera de Tizayuca, Hgo.** 2001. Tesis de Licenciatura Q.F.B. FESC, UNAM.
46. <http://www.paisvirtual.com/salud/medicina/plantas/formas de uso.htm>
47. Rodríguez AJ. **Elaboración de una forma farmacéutica sólida (Bolo) con extracto de *Calendula officinalis* para el tratamiento de vacas con retención placentaria.** 2002. Tesis de Licenciatura Q.F.B. FESC, UNAM.
48. **Farmacopea Homeopática de los Estados Unidos Mexicanos.** 3ª Edición. México 1998.
49. www.hoseito.com/FLORES%20SILVESTRES/Calendula%20officinalis.htm
50. Halloran K. ***Calendula officinalis* Flowers.** Organic Gardening. USA. 2000.
51. Lastra VH, Piquet GR. ***Calendula officinalis*.** Revista Cubana Farm. 1999.
52. Boucaud MY, et al. **Cytotoxic and antitumoral activity of *Calendula officinalis* extracts.** Pharmazie. 1988, 43 (3), 220-1.

53. Dumenille G, Chemli R, Balansard G. **Evaluation antibacterial properties of *Calendula officinalis***. Anales Pharmaceutiques Francaises. 1990.
54. Della LR. **The role of triterpenoids in the topical anti-inflammatory activity of *Caléndula officinalis* flowers**. Plant Med. 1994 Dec; 60 (6).
55. Tuxqui TE. **Actividad antiséptica de *Calendula officinalis* en cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans* in vitro**. La homeopatía en México. 1996.
56. Toshihiro A, et al. **Triterpene alcohols from the flowers of compositae and their anti-inflammatory effects**. Phytochemistry, 1996, 6 (43) 1255-1260.
57. Sladowski D, Steer SJ, Clothier RH. **An improved MTT assay**. Journal Immunology Methods. 1993, (157) 203-7.
58. Collins, CH, et al. **Microbiological Methods**. Seventh Edition. Butterworth-Heinemann, Gran Bretaña. 1995.
59. Breach MR. **Esterilización. Métodos y control**. Editorial El Manual Moderno, México. 1991.
60. Pérez CJ, Cruz JG, Licea VJ. **Genotoxic and anti-genotoxic properties of *Calendula officinalis* extracts in rat liver cell cultures treated with diethylnitrosamine**. Toxicology in Vitro. 2002 Jun; 16 (3): 253-8.
61. Wayne WD. **Bioestadística, Base para el análisis de las ciencias de la salud**. 4ª. Edición. Editorial Limusa Wiley, México. 2002.
62. Satnam KK, et al. **Development of a tetrazolium sale assay for rapid determination of viability of BCG vaccines**. Vaccine. 1999, (17) 2423-2528.
63. Stevens MG, Olsen SC. **Comparative analysis of using MTT and XTT in colorimetric assay for quantitating bovine neutrophil bactericidal activity**. Journal Immunology Methods. 1993, (157) 225-231.
64. Carmichael J. **Manual de Compuestos Orgánicos, Bioquímicas para Investigación y Reactivos de Diagnóstico Sigma Chemical Company**. 1995.
65. **Diccionario Terminológico de Ciencias Médicas**. 13ª edición. Editorial Salvat, México. 1994.
66. Espino FJ. **Henderson Diccionario de Términos Biológicos**. Editorial Alambra, España. 1985.