

Universidad Nacional Autónoma De Nicaragua –León.

Escuela de Ciencias Agrarias y Veterinarias.

Departamento de Veterinaria y Zootecnia.

Carrera: Técnico Superior Agropecuario.



Monografía para optar al título de Técnico Superior Agropecuario

Tema: Efecto inhibitorio del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus* spp “Eucalipto” sobre bacterias aisladas de vacas con mastitis en la ciudad de León.

Autores:

Br. José Leonel Mejía Solórzano.

Br. Marcela Jasmin Morales Reyes.

Tutores:

➤ **Byron Flores Somarriba, PhD.**

➤ **Brenda Mora Sánchez, PhD.**

12 de abril,2021.

“A LA LIBERTAD POR LA UNIVERSIDAD”

Universidad Nacional Autónoma De Nicaragua –León.

Escuela de Ciencias Agrarias y Veterinarias.

Departamento de Veterinaria y Zootecnia.

Carrera: Técnico Superior Agropecuario



Monografía para optar al título de Técnico Superior Agropecuario

Tema: Efecto inhibitorio del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus* spp “Eucalipto” sobre bacterias aisladas de vacas con mastitis en la ciudad de León.

Autores:

Br. José Leonel Mejía Solórzano.

Br. Marcela Jasmin Morales Reyes.

Tutor:

- **Byron Flores Somarriba, PhD.**
- **Brenda Mora Sánchez, PhD.**

12 de abril, 2021.

“A LA LIBERTAD POR LA UNIVERSIDAD”

Dr. BYRON FLORES SOMARRIBA, profesor adjunto del Departamento de Veterinaria y Zootecnia de la Escuela de Ciencias Agrarias y Veterinarias de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, y Dra. BRENDA MORA SÁNCHEZ, Técnico docente del Departamento de Veterinaria y Zootecnia de la Escuela de Ciencias Agrarias y Veterinarias de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, como tutores.

C E R T I F I C A N:

Que D. JOSÉ LEONEL MEJÍA SOLORZANO, y D. MARCELA JASMIN MORALES REYES, inscritos en la carrera de Técnico Superior Agropecuario han realizado bajo nuestra dirección los trabajos correspondientes a su tesis para optar al título de Técnico Superior Agropecuario titulada “Efecto inhibitorio del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus* spp “Eucalipto” sobre bacterias aisladas de vacas con mastitis en la ciudad de León”, por lo que autorizan su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que conste, firmamos el presente certificado

En León, Nicaragua a 12 de abril de 2021

Dr. Byron Flores Somarriba

Dra. Brenda Mora Sánchez

AGRADECIMIENTO.

En primer lugar, le agradecemos a nuestro padre celestial por brindarnos salud, sabiduría, fuerza y entendimiento para poder concluir nuestro trabajo de investigación.

Queremos agradecer a nuestros padres quienes han sido un pilar fundamental en nuestras vidas, por el apoyo incondicional durante este trabajo de investigación, dándoles las infinitas gracias por todos los sacrificios y consejos durante este largo camino que a pesar de los obstáculos han podido sacarnos adelante llevándonos siempre por el camino del bien.

A la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León (UNAN-León) por ser nuestra casa de estudio por un periodo de 3 años

Al Centro Veterinario de Diagnóstico e Investigación (CEVIDI) por facilitar el espacio, las instalaciones y equipos para el desarrollo de este trabajo.

A nuestro tutor Byron Flores Somarriba, PhD. por brindarnos su ayuda y asesoramiento en todo el proceso de investigación.

A nuestra cotutora, Brenda Mora Sánchez, PhD. por su apoyo y consejos brindados en la realización de este trabajo.

A Ingeniera Dayana Torres, quien brindó un granito de arena para la realización de este trabajo y a todos los maestros quienes han forjado nuestra educación, desde el inicio hasta este momento, a nuestros amigos y compañeros de clase que siempre hicieron del camino recorrido un poco más fácil con su amistad.

DEDICATORIA.

A Dios por darme la fuerza y sabiduría por ayudarme a cumplir cada una de mis metas y sueños.

Dedico de manera especial a mi mamá María Isabel Solórzano, mi papá José Leonel Mejía por su perseverancia, voluntad, consejos, motivación, pues ellos son el cimiento más importante en mi vida, por alentarme día a día a ser una mejor persona y siempre motivándome a seguir adelante.

A mis amigos, en especial a Katherine Salinas, Keyling Castro, Bertha Hernández que siempre me han apoyado incondicionalmente brindándome sus consejos y ayuda, porque han fomentado en mí, el deseo de superación y de triunfo en la vida, lo que ha contribuido a la consecución de este logro. Espero contar siempre con su valioso e incondicional apoyo.

José Leonel Mejía Solórzano.

Dedico de manera especial este trabajo a mi familia, quienes fueron un gran apoyo emocional y económico, a mi abuela Urania Mercedes Cáceres y tías quienes no dudaron de mí, alentándome siempre a seguir adelante cuando parecía que iba a rendirme.

A mis maestros quienes nunca desistieron al enseñarme, a todos y cada uno de ellos que continuaron depositando su esperanza en mí, a todos los que me apoyaron durante todo el transcurso de este largo proceso.

Marcela Jasmin Morales Reyes.

RESUMEN.

La mastitis bovina es la inflamación de la glándula mamaria que puede ser ocasionada por factores físicos, químicos, mecánicos o infecciosos. El 80% de los casos de mastitis son ocasionados por la entrada de microorganismos patógenos específicos a través de los pezones y tejidos de la ubre; los casos restantes son resultado de lesiones traumáticas, con o sin invasión de microorganismos. El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad antimicrobiana de *Eucalipto* spp contra bacterias aisladas de vacas con mastitis. Para esto, se utilizaron 10 cepas de bacterias aisladas de vacas con mastitis proporcionadas por el laboratorio de Microbiología Veterinaria Del Centro Veterinario de Diagnóstico e Investigación (CEVEDI), utilizando discos impregnados con diferentes concentraciones (200,100, 50, 25 mg/ml) del extracto hidroalcohólico de *Eucalipto* spp y la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria. Se obtuvo inhibición del crecimiento bacteriano en concentraciones por encima de 25 mg/ml del extracto, en donde se observó un halo de inhibición promedio de 7.31 mm (DE=8.15), considerando esta, como la Concentración Mínima Inhibitoria. El halo de inhibición promedio en 200 mg/ml de extracto fue de 17.00 mm (DE=8.11) sin discriminar entre el tipo de bacterias. La efectividad antimicrobiana fue más elevada en bacterias *Staphylococcus aureus* que en bacterias *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. Los resultados encontrados sugieren que el extracto hidroalcohólico de *Eucalipto globulus* L. posee potencial para su aplicabilidad en el tratamiento de mastitis bovina.

Glosario:

***Anacardium occidentale* L.:** Es un género de plantas de flor en la familia Anacardiácea, nativa de las regiones tropicales de América.

Antimicrobiano: Es una sustancia que elimina o inhibe el crecimiento de microorganismos, tales como bacterias, hongos o parásitos. Basado en ello, los siguientes pueden referirse a agentes microbianos.

Enterobacteria: Son bacterias Gram negativas que contiene más de 30 géneros y más de 100 especies que pueden tener morfología de cocos o bacilos.

Escherichia coli: Es una bacteria habitual en el intestino del ser humano y de otros animales de sangre caliente. Aunque la mayoría de las cepas son inofensivas, algunas pueden causar una grave enfermedad de transmisión alimentaria.

Gérmenes gramnegativos: En microbiología, se denominan bacterias Gram negativas aquellas que no se tiñen de azul oscuro o de violeta por la tinción de Gram.

hidroalcohólico: Se refiere a un nombre utilizado en la antigüedad a cualquier producto farmacéutico, medicinal o un remedio que esta contenido o que está mezclado o combinado el alcohol por base, puede ser un emplasto o una pomada.

Inhibitorio: Que inhibe, reprime o impide la manifestación de una reacción o conducta fisiológica.

Klebsiella pneumoniae: Es la especie de mayor relevancia clínica dentro del género bacteriano *Klebsiella*, compuesto por bacterias Gram negativas de la familia enterobacteriaceae, que desempeñan un importante papel como causa de las enfermedades infecciosas oportunistas.

Lippia graveolens: Es una planta con flor perteneciente a la familia Verbenácea. También se le conoce como yerba dulce.

Mastitis: Es una inflamación del tejido mamario.

Microorganismo: Organismo microscópico animal o vegetal.

Mycoplasma: Son los organismos más pequeños capaces de auto-reproducirse. Son bacterias desprovistas de pared celular, difíciles de cultivar.

Piper jacquem ontienum: Es un género de plantas magnoliopsidas de la familia Piperaceae económica y ecológicamente importante.

Propóleos: Son unas mezclas resinosas que obtienen las abejas de las yemas de los árboles, exudados de savia u otras fuentes vegetales y que luego procesan en la colmena como sellante de pequeños huecos (6 mm o menos), en ocasiones mezclado con cera y para barnizar todo el interior de la colmena.

Psidium guajava: Son un género de unas cien especies de árboles tropicales y árboles pequeños en la familia Myrtaceae, nativas de América.

Staphylococcus aureus: Es un tipo de bacteria con multitud de cepas diferentes. Muchas de las cepas de las bacterias del género estafilococo son bastante frecuentes. La mayoría de la gente tiene bacterias de este género viviendo sobre la piel y/o dentro de la nariz sin que les provoquen ningún problema.

Índice

I. Introducción.....	1
II. Justificación	2
III. Antecedentes.....	3
IV. Hipótesis.....	4
V. Objetivos.....	5
5.1 Objetivo general.....	5
5.2 Objetivos específicos.....	5
VI. Marco teórico	6
6.1 Definición de mastitis.....	6
6.2 Definición de mastitis ambiental:.....	6
6.3 Medidas preventivas para el control de mastitis.....	7
6.3.1 Manejo sanitario.....	7
6.3.2 Sala de ordeño:.....	7
6.4 Microorganismos causantes de la mastitis ambiental:	7
6.4.1 Bacterias involucradas en la mastitis bovina.	9
6.5 Tratamiento de la mastitis:	11
6.5.1 Tratamientos antimicrobianos:.....	11
6.6 Control de la mastitis bovina:	12
6.6.1 Principios de control de la mastitis:.....	12
6.7 fracasos comunes en los tratamientos de mastitis:.....	13
VII. <i>Eucalyptus globulus Labill.</i>.....	15
VIII Diseño metodológico.....	17
8.1 Tipo de estudio: Experimental.....	17
8.1.1 Población y muestra:.....	17
8.2 Material biológico:	17
8.2.1 Hojas de <i>Eucalyptus globulus</i> L. "eucalipto"	17
8.2.2 Obtención del extracto hidroalcohólico.	17
8.2.3 Efecto inhibitorio <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico de <i>Eucalyptus globulus</i> L. "eucalipto" en <i>Staphylococcus aureus</i> aislados de vacas con mastitis.....	18
8.3.3.1 Estandarización del inóculo bacteriano.....	18

8.3.3.2 Preparación de discos de sensibilidad.....	18
8.3.3.3 Prueba de sensibilidad bacteriana según el método modificado de	19
Difusión de Kirby Baüer.	19
8.4 Análisis estadístico de datos.	20
IX. Resultados.....	21
X. Discusión.....	22
XI. Conclusiones.	24
XII. Recomendaciones.	25
XII. Referencias bibliográficas	26
XIII. Anexos	33
Figura 1	33
Figura 2	34

I. Introducción.

La mastitis bovina es la inflamación de la glándula mamaria que puede ser ocasionada por factores físicos, químicos, mecánicos o infecciosos. El 80% de los casos de mastitis son ocasionados por la entrada de microorganismos patógenos específicos a través de los pezones y tejidos de la ubre; los casos restantes son resultado de lesiones traumáticas, con o sin invasión de microorganismos (Aranguren Parra *et al.*, 2009).

Los agentes microbianos involucrados en la mastitis son *Staphylococcus* spp, y algunos gérmenes gramnegativos, los cuales son responsables de más del 90 % de los casos clínicos y subclínicos; la mastitis por *Staphylococcus aureus*, es una forma común de mastitis bovina en todo el mundo, debido a que son comensales en la piel y mucosas, de ahí, que colonizan la piel y el canal del pezón, predisponiendo a la infección intramamaria, en su mayoría infecciones subclínica (Colorado Jaramillo *et al.*, 2018).

El tratamiento de la mastitis con antibióticos ocasiona altos costos difíciles de mantener para los pequeños productores; además, que estimula la aparición de cepas con resistencia a los antibióticos disponibles en el mercado nicaragüense, con el poder residual de algunos fármacos en la leche y sus derivados. Toda esta situación muestra la necesidad de iniciar la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas que resulten ser eficaces, de bajo costo y fácil aplicación para el tratamiento de la mastitis bovina (Máttar *et al.*, 2009).

Se han documentado el uso de extractos naturales con potencial antimicrobiano, y de estos, han sido sugerido tanto para el tratamiento de mastitis como para la desinfección de las ubres, con evaluaciones de la actividad antibacteriana de ciertas especies vegetales como: *Anacardium occidentale* L. *Lippia graveolens*, *Piper jacquem ontienum*, *Psidium guajava*, propoleos y especies de eucalipto en microorganismos causantes de mastitis en vacas lecheras. Las especies de eucalipto han sido usadas en el tratamiento de afecciones respiratorias; sin embargo, *Eucalyptus* spp es usado en el campo, preparado y aplicado en compresas para el tratamiento de la mastitis bovina (Avila *et al.*, 2018)

II. Justificación

La mastitis es un problema global que produce pérdidas directas e indirectas, con respecto al nivel de producción, calidad, descarte de vacas, costo de tratamientos, esta enfermedad es causada por *Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus aureus* y enterobacterias como *Escherichia coli* que pueden poseer alta resistencia ante los antibióticos y colonizar la glándula mamaria gracias a su capacidad de producir numerosos factores de virulencia (Quiñones, 2003)

Ante esta problemática se ven afectados el animal, el productor, la industria láctea y la salud pública; el impacto de esta enfermedad en la calidad de la leche y el riesgo para la salud humana ha aumentado el interés por conocer los agentes implicados y sus niveles de resistencia frente a los tratamientos comúnmente utilizados, así como la búsqueda de antibióticos naturales alternativos. Con este trabajo se propuso evaluar la capacidad antimicrobiana de *Eucalyptus* spp contra bacterias aisladas de vacas con mastitis, esto como un esfuerzo de proporcionar una herramienta económica para el control de esta enfermedad.

III. Antecedentes

En el 2012 Kalayou *et al.* en Etiopia, probaron el efecto antimicrobiano frente a bacterias aisladas de mastitis de extractos hidroalcohólicos de las plantas *Achyranthes aspera* (*A. aspera*) L. (Family *Asparagaceae*), *Ficus caria* (*F. caria*) (Family *Moraceae*), *Malva parviflora* (*M. parviflora*) (Family *Malvaceae*), *Vernonia species* (*V. species*) (local name *Alakit*, Family *Asteraceae*), *Solanum hastifolium* (*S. hastifolium*) (Family *Solanaceae*), *Calpurinia aurea* (*C. aurea*) (Ait) Benth (Family *Fabaceae*), *Nicotiana tabacum* (*N. tabacum*) L. (Family *Solanaceae*), *Ziziphus spina-christi* (*Z. spina-christi*) (Family *Rhamnaceae*), *Croton macrostachys* (*C. macrostachys*) (Family *Euphorbiaceae*) en concentraciones de 200 y 100 mg/ml, encontraron que todas presentaron efecto antimicrobiano (Kalayou *et al.*, 2012).

Alvarado-Aguilar *et al.*, en el 2019, Evaluó el efecto inhibitorio in vitro del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* L. sobre cepas de *Staphylococcus aureus* aislados de vacas con mastitis en el Perú, en el que obtuvieron que la concentración de 500 mg/ml fue la de mayor actividad inhibitoria con un halo promedio de 19,29 mm en la totalidad de las cepas evaluadas (Alvarado-Aguilar *et al.*, 2019).

IV. Hipótesis

Ho: El extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus* spp presenta capacidad antimicrobiana frente a bacterias aisladas de vacas con mastitis subclínica.

Hi: El extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus* spp no presenta capacidad antimicrobiana frente a bacterias aisladas de vacas con mastitis subclínica.

V. Objetivos.

5.1 Objetivo general.

Evaluar la capacidad antimicrobiana de *Eucalyptus* spp contra bacterias aisladas de vacas con mastitis.

5.2 Objetivos específicos.

1. Determinar la concentración mínima inhibitoria de extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus* spp frente a bacterias aisladas de vacas con mastitis.
2. Comparar la capacidad antimicrobiana de *Eucalyptus* spp entre bacterias Gram positivas y Gram Negativas.

VI. Marco teórico

6.1 Definición de mastitis.

Mastitis se define como la inflamación de las glándulas mamarias que generalmente se presenta como una respuesta a la invasión de microorganismos patógenos y se caracteriza por daños en el epitelio glandular, seguido por una inflamación clínica o subclínica, pudiendo presentarse con cambios patológicos localizados o generalizados y por alteraciones físicas y químicas de la leche representadas por el aumento del número de células somáticas de la leche y por alteraciones patológicas en la glándulas mamaria (Neri Melendez, 2014).

La mastitis es una de las enfermedades de mayor impacto económico para la actividad lechera, siendo la mastitis subclínica, la cual pasa fácilmente desapercibida para el productor (Enrique, 2009).

La característica de la enfermedad oculta hace que cueste tomar conciencia tanto al productor como al tambero, de la cantidad de leche que están dejando de producir sus vacas, y además, que las infecciones pueden transmitirse desde las vacas enfermas a las sanas (Glauber, 2009).

Las bacterias asociadas con las infecciones intramamarias subclínica son (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulasa negativos*, *Staphylococcus agalactiae* y *Streptococcus uberis*) (Villa-Arcila *et al.*, 2017).

6.2 Definición de mastitis ambiental:

Mastitis Ambiental: El patógeno proviene del ambiente donde se desarrolla la actividad de la vaca u ordeño. Representa la contaminación de la ubre de toda la vida del animal y son la causa primera de la mastitis con manifestaciones clínicas en granjas de bajo recuento de células somáticas (Martínez, 2011)

6.3 Medidas preventivas para el control de mastitis.

6.3.1 Manejo sanitario

- El ordeñador tiene que presentarse aseado al ordeño.
- Por cada ordeño vestir ropa limpia, de preferencia blanca, incluyéndolas botas, que únicamente sea utilizadas para este propósito.
- Lavarse y desinfectarse las manos antes de iniciar el trabajo y después de ir al baño y en cualquier momento cuando las manos estén sucias o contaminadas.
- Los mandiles se tienen que lavar y desinfectar entre un ordeño y otro; si se usan guantes lavarlos y desinfectarlos por cada vaca ordeñada.
- Evitar toser o estornudar sobre la leche (Dávila Omar, Elias, 2005)

6.3.2 Sala de ordeño:

Para prevenir la contaminación de la leche es necesario considerar el diseño y orientación de la sala de ordeño o post ordeño.

Los organismos causantes de mastitis producen no solamente formas distintas de enfermedad desde el punto de vista patológico, sino que su comportamiento epidemiológico es también distinto. Por consiguiente, no existe una metodología única que sirva para controlar a todos. Desde el punto de vista epidemiológico, algunos organismos se transmiten entre vacas fundamentalmente durante el ordeño (patógenos contagiosos: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma*); mientras que otros están diseminados en el medio ambiente y llegan a la piel del pezón en el intervalo entre ordeños (patógenos ambientales: *Streptococcus uberis*, coliformes. Otros organismos, como *Streptococcus dysgalactiae*, puede comportarse tanto como un patógeno contagioso como ambiental (Bedolla, 2019)

6.4 Microorganismos causantes de la mastitis ambiental: Los patógenos principales en este grupo son los bacilos entéricos Gramnegativos (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp.), *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, y *Enterococcus* spp. Otros microorganismos patógenos se incluyen en la clase ambiental de este tipo de infecciones. Se trata generalmente de oportunistas que invaden la glándula mamaria cuando los mecanismos de defensa están

disminuidos o cuando se introducen inadvertidamente en la glándula mamaria al realizar un tratamiento intramamario).

Este grupo de microorganismos oportunistas se incluyen a la *Pseudomona* spp., levaduras, *Prototheca* spp., *Serratia marcescens* y *Nocardia* spp. Cada uno de estos agentes posee características de cultivo, mecanismos patógenos y consecuencias clínicas singulares. La fuente de estos agentes patógenos es el entorno de la vaca. La forma de transmisión principal es del ambiente a la vaca a través de un manejo inadecuado. Algunos ejemplos incluyen la cama húmeda, terrenos sucios, ubres mojadas por la leche, preparación o limpieza inadecuada de la ubre y los pezones antes del ordeño y sistemas de estabulación que favorecen las lesiones en los pezones y la exposición de los cuartos no infectados a los patógenos ambientales que puede ocurrir en cualquier momento durante la vida de una vaca. Estas infecciones generalmente ocurren de forma esporádica. Sin embargo, se pueden producir brotes en los rebaños o en una región entera, normalmente como consecuencia de problemas con la higiene o el tratamiento. Por ejemplo, se ha producido mastitis causada por *Pseudomona aeruginosa* en brotes relacionados con la contaminación de las conducciones de goma en las salas de ordeño (Valero-Leal *et al.*, 2010).

La mastitis ocasionada por patógenos ambientales, es el principal problema que afecta a muchos hatos lecheros bien manejados que aplican un programa de control de los patógenos contagiosos de la mastitis.

Debido a que en la actualidad estos patógenos no han sido bien controlados por los métodos arriba mencionados, ahora están surgiendo como la causa más frecuente de mastitis en muchos hatos, particularmente bien manejados, hatos con bajo conteo de células somáticas

Tradicionalmente, los agentes más comunes causantes de la mastitis también han sido clasificados como patógenos principales (mayores) y menores según el grado de inflamación que estos producen en la glándula mamaria.

Los patógenos principales son definidos como los patógenos responsables, la mayoría de las veces, de las mastitis clínicas o de fuertes respuestas inflamatorias (conteos elevados de células somáticas en la leche) y comprenden al *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* los patógenos menores son definidos

como los patógenos que infectan la glándula mamaria, causando conteos moderados de células somáticas, pero en lo general no causan signos clínicos. Estas infecciones, son especialmente frecuentes, debidas sobre todo a otro *Staphylococcus* (principalmente *S. chromogenes*, *S. hyicus*, *S. epidermidis*, y *S. xylosus*) o por *Corynebacterium bovis* y *Micrococcaceae coagulasa-negativo* (H. S. Matos, 2015)

6.4.1 Bacterias involucradas en la mastitis bovina.

6.4.1.1 *Staphylococcus*: Los *Staphylococcus* son cocos Gram positivos (de 0.5 a 15 μm de diámetro) que se presentan sueltos, en parejas, en pequeñas cadenas (de 3 o 4 células) y más característicamente en grupos irregulares en forma de racimos. Son anaerobios facultativos, catalasa positiva, generalmente oxidasa negativos, no esporulados, inmóviles y generalmente no forman cápsula o tienen una limitada formación capsular. En la actualidad en el género estafilococos se reconocen 32 especies y varias subespecies, si bien sólo algunas de ellas tienen importancia desde el punto de vista clínico. Los *Staphylococcus* según produzcan o no la enzima coagulasa, se dividen en dos grandes grupos: *Staphylococcus* coagulasa positivos (ECP) y *Staphylococcus* coagulasa negativos (ECN). Existe una buena correlación entre la producción de coagulasa y la capacidad patógena de los *Staphylococcus* de tal manera que, en general, se considera que los ECP son patógenos y que los ECN no lo son. No obstante, algunas especies de ECN se han relacionado con procesos patológicos tanto en animales como en el hombre (H. Matos, 2018).

6.4.1.2 El *Staphylococcus chromogenes*: Es una especie que prevalece en la mastitis subclínica, con un impacto bien establecido en el conteo de las células somáticas. En un estudio realizado con 70 muestras de *Staphylococcus chromogenes* se determinó que todas eran susceptibles a la acción de la neomicina, gentamicina, eritromicina, enrofloxacin, penicilina y a las cefalosporinas, representadas en este estudio por la cloxacilina (Bedolla, 2019).

6.4.1.3 *Corynebacteria nonlipophilic*: Ha sido asociada con mastitis clínica y subclínica en vacas lecheras; se han identificado cuatro especies: El *Corynebacterium amycolatum*, *Corynebacterium ulceran*, *Corynebacterium pseudo tuberculosis* y el *Corynebacterium minutissimum* (Martínez, 2011).

6.4.1.4 *Mycoplasma bovis*: Induce varias manifestaciones clínicas en el ganado, como la mastitis, artritis y pulmonía; se ha extendido mundialmente, sobre todo en Europa y América del Norte, produciendo grandes pérdidas (Nicholas, 2010).

6.4.1.5 *Streptococcus agalactiae*: Es considerado una de las mayores causas de infecciones intramamarias bovinas. Es un patógeno muy contagioso de la glándula mamaria, donde puede sobrevivir por largos períodos de tiempo; esta bacteria es considerada una de las mayores causantes de infecciones intramamario bovina, particularmente en América del Norte (Narváez., 2012)

6.4.1.6 *Streptococcus uberis*: Es la bacteria clasificada tradicionalmente como ambiental más importante a la que se le atribuye más pérdidas ocasionadas por mastitis. Esta bacteria tiene importancia tanto en la fase de lactación como en el periodo seco y también en preparto ocasionando infecciones intramamarias (Clavijo *et al.*, 2002).

6.4.1.7 *Streptococcus dysgalactia*: La mastitis causada por patógenos medioambientales es un gran problema que afecta a los hatos lecheros. De entre los patógenos medioambientales, el *Streptococcus dysgalactiae* ha sido frecuentemente aislado de las infecciones intramamarias durante la lactación y el período seco (Núñez D *et al.*, 2008).

6.4.1.8 *Streptococcus dysgalactiae*: Es una de las especies bacterianas más importantes aislada en la mastitis bovina. El de la especie hemolítica, es un patógeno muy común en la mastitis clínica y subclínica.

La prueba serológica de Lance field a la bacteria *Streptococcus dysgalactiae*, del grupo C, la identifica como uno de los patógenos más comunes de mastitis bovina.

Este patógeno es muy capaz de sobrevivir en la boca, vagina y piel de los animales saludables que pastan. Debido a su situación medioambiental, los métodos de higiene normales y la terapia del antibiótico son menos eficaces previniendo las infecciones por *Streptococcus dysgalactiae* que las infecciones por otro patógeno contagioso a pérdidas económicas más grandes en la industria de la leche (Andresen S, 2001).

6.4.1.9 *Escherichia coli*: La mastitis medioambiental es causada por bacterias coliformes. La mayoría de las bacterias coliformes son clasificadas como *Escherichia coli* (*E. coli*). La mastitis ocasionada por la *E. coli* es normalmente esporádica y las señales clínicas varían desde muy severa, incluso formas fatales, a mastitis apacible, donde las vacas tienen solo señales locales en la ubre (Rodríguez-Angeles, 2002).

6.4.1.10 *Arcanobacterium pyogenes*: Es un habitante común de los tractos respiratorios superiores, urogenitales y el gastrointestinal de muchas especies animales domésticas. Sin embargo, una herida física o microbiana a la ubre puede ocasionar una variedad de infección supurativa de tipo piogénico, como la mastitis en las vacas y cabras lecheras (Ruiz Gil *et al.*, 2016).

6.5 Tratamiento de la mastitis: La mastitis subclínica bovina es la causa más común para el uso de antibióticos antibacterianos en el ganado de la industria lechera. La terapia antibacteriana de enfermedades de tipo bacteriano en el ganado, se ha relacionado como un catalizador para la resistencia de las bacterias aisladas de los animales tratados, y otros animales del hato, y de los alimentos derivados del ganado vacuno para consumo humano. Adicionalmente, el uso antibacteriano se ha sugerido como una fuerza selectiva determinando la ecología bacteriana de mastitis bovina

La organización mundial de la salud (OMS) aconseja el uso prudente de los antibióticos, pues su uso indiscriminado puede promover la resistencia de cepas bacterianas en la cadena alimenticia. Ahora, la terapia de la vaca seca es parte de un sistema de dirección total recomendado para reducir el nivel de infecciones intramamarias y prevenir nuevas infecciones durante el periodo seco.

La mayor consecuencia, del abuso de los antibióticos, incluye el desarrollo de resistencia antibiótica en la flora bacteriana de los animales y las poblaciones humanas, con un aumento del riesgo de residuos antibióticos en la carne y productos de la leche. Por consiguiente, algunos países han adoptado el uso selectivo de la terapia de la vaca seca, en ciertas vacas o algunos cuartos mamarios (Richardet *et al.*, 2016).

6.5.1 Tratamientos antimicrobianos: El fármaco ideal en la terapéutica de la mastitis debe presentar las siguientes características: tener un espectro

apropiado, alcanzar concentraciones plasmáticas del antimicrobiano sin afectar otros sistemas, ser altamente liposoluble y unirse poco a proteínas plasmáticas.

Todo tratamiento para mastitis debe basarse en la evidencia, es decir, la eficacia de cada producto y la duración del tratamiento deben demostrarse a través de estudios científicos (Zendejas Aguilar, 2018).

6.6 Control de la mastitis bovina: Los antisépticos y desinfectantes compuestos por amonio cuaternario tienen una gama amplia de aplicaciones veterinarias y juegan un papel importante en control de enfermedades infecciosas en los animales. En la industria lechera se usan normalmente para la desinfección del equipo de ordeña y en la desinfección de las ubres para prevenir la mastitis infecciosa. Se ha demostrado que la desinfección de los pezones después de ordeñar reduce la incidencia de la mastitis, especialmente la causada por el *Staphylococcus aureus*. Se ha considerado por consiguiente que la desinfección de las ubres es un componente importante en el control de la mastitis.

En un establo fijo, para evitar la diseminación de los agentes patógenos de la mastitis, las vacas deben seguir un orden fijo de la ordeña, determinado por la salud de las ubres. Las vacas sanas se ordeñan invariablemente al inicio, después las vacas sospechosas de enfermedad, y luego las que tienen problemas de mastitis. Obviamente, los animales en tratamiento serán ordeñados al final (Gómez-Quispe *et al.*, 2015).

6.6.1 Principios de control de la mastitis:

- ✚ Eliminar las infecciones existentes.
- ✚ Prevenir las infecciones nuevas.
- ✚ Controlar el estado de salud de las ubres.
- ✚ Desechar las vacas infectadas crónicamente.
- ✚ Mantener un ambiente limpio y apropiado.
- ✚ Tener un buen registro de datos.
- ✚ Controlar el estado de salud de las ubres.
- ✚ Revisión periódica del programa de manejo de la salud de la ubre.
- ✚ Definir los objetivos del estado de salud de la ubre.(Arciniega, 2019)

6.6.1.1 Desinfección de los pezones: La desinfección del pezón post-ordeño es especialmente efectiva contra los patógenos contagiosos *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*.

Durante el ordeño se puede transmitir cualquier tipo de patógenos causantes de mastitis, sin embargo, esos dos patógenos en particular, se transmiten de vaca a vaca durante el ordeño. La desinfección del pezón post-ordeño es menos efectiva en reducir la tasa de nuevas infecciones por patógenos ambientales tales como los coliformes y especies de *Streptococcus* diferentes a *Streptococcus agalactiae*. El control de los patógenos ambientales requiere prácticas de manejo tales como mantener limpias a las vacas, medio ambiente seco, buena higiene antes del ordeño, incluyendo la desinfección de los pezones antes del ordeño, un secado completo de los pezones; y usando máquinas de ordeño que funcionen adecuadamente. Los ordeñadores deberán continuar desinfectando los pezones post-ordeño de manera rutinaria como procedimiento del ordeño, aun si se ha eliminado *Streptococcus agalactiae* y los conteos de células somáticas son bajos (Kruze, 1998).

6.6.1.1.1 Pre-ordeña: Se debe de hacer un pre-ordeño con un vaso especial, que tenga una cubierta o una coladera negra u oscura dentro. Una buena pre-ordeña en el vaso oscura ayudará a evitar la diseminación de agentes patógenos (García Castro *et al.*, 2019).

6.7 Fracasos comunes en los tratamientos de mastitis: En la década de los 60's y 70's el énfasis en el tratamiento de la mastitis fue mediante el uso de preparados intramamario contra bacterias Gram positivas. La eficacia esperada superaba el 75% de los casos al primer tratamiento. Sin embargo, si se consideran las pruebas bacteriológicas y los residuos, la eficacia es mucho menor, sobre todo porque a menudo no se aplican antimicrobianos en la dosis y durante el tiempo necesarios, sobre todo para microorganismos que generan más resistencias y son más invasivos como *Streptococcus uberis* y *Staphylococcus aureus*, para lograr máxima eficacia, en virtud de la exigencia del mercado de regresar lo más pronto posible.

Actualmente, la administración de sustancias para el tratamiento de mastitis, se realiza frecuentemente mediante la infusión Intramamario con antibióticos, la fácil aplicación ha provocado un uso indiscriminado de estos productos en la

práctica veterinaria, provocando que las bacterias se vuelvan resistentes a fármacos, de aquí surge la importancia de encontrar alternativas eficientes(Zendejas Aguilar, 2018).

VII. *Eucalyptus*.

El eucalipto consta de un Tronco de forma redondo y grueso, que mide 2 m de diámetro y con tendencias a experimentar una torsión espiral, con una corteza de color blanquecina, plateado azulado-pruinosa, lisa de color gris que se desprende en grandes tiras, se mantienen colgados por un periodo de tiempo en los árboles, constituido por una raíz pivotante, en terrenos sueltos que alcanza hasta los 50 cm de profundidad. Las raíces laterales son pocos desarrolladas, después se extienden superficialmente, las hojas juveniles son opuestas, sensibles de base cordada de 8-15 cm de longitud y 4-8 cm de anchura, las flores son auxiliares y en grupos de 2-3 de hasta 3 cm de diámetro, con numerosas estambres de color blanco que florecen los meses de septiembre y octubre y el fruto es una cápsula campaniforme de color glauco y cubierta de un blanquecino de 1.4 – 2.4 de diámetro(Ortega & Antonio, 2016)

Eucalyptus spp es un género de árboles de la familia Myrtaceae, caracterizado por ser de rápido crecimiento, empleado en plantaciones forestales para la industria papelera y maderera. (González-Guiñez *et al.*, 2016)

Eucalyptus spp es una especie ampliamente utilizada no solo por la medicina tradicional, sino reconocida por diferentes farmacopeas y se le ha demostrado el efecto broncodilatador y expectorante a su aceite esencial, constituido fundamentalmente por 1,8 cineol, es una especie medicinal antigripal. En su composición posee abundantes mucílagos que sirven como demulcentes aliviando la tos. Preparados a base de flores o partes aéreas de esta especie se emplean popularmente como diurético, antiartrítico, diaforético, sedante, tónico cardiaco y antiinflamatorio, así como en resfriados, faringitis, bronquitis, flebitis, contiene aceites esenciales y vitamina C entre otros componentes. La infusión de las flores secas y de las hojas, es considerada un buen remedio para las afecciones de las vías respiratorias altas, anticatarral y eficaz contra los resfriados gracias a su acción sudorífica(López Barrera *et al.*, 2016).

La actividad bactericida y anti fúngica de estas sustancias está estrechamente relacionada con los fenoles y mono terpenos que poseen, debido a que son capaces de tener una interacción directa con el citoplasma del patógeno o bien, gracias a su hidrofobicidad, pueden incorporarse a los lípidos de la membrana celular bacteriana, en donde ocurre una fuga de iones y otros compuestos de la

bacteria ,los efectos antimicrobianos de los aceites esenciales de eucalipto están relacionados con su composición y efectos citotóxicos, que causan daño a la membrana celular(Bakkali *et al.*, 2008).

VIII Diseño metodológico.

8.1 Tipo de estudio: Experimental.

8.1.1 Población y muestra: La muestra fue cuantificada por el resultado de la interacción de 10 cepas de bacterias aisladas de vacas con mastitis, sometida a 4 concentraciones de extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus* spp. "eucalipto" (200 mg/ml, 100 mg/ml, 50 mg/ml y 25 mg/ml).

Las 10 cepas de bacterias (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp) aisladas de vacas con mastitis fueron proporcionadas por el laboratorio de microbiología veterinaria del Centro Veterinario de Diagnóstico e Investigación (CEVEDI) en la Escuela de Ciencias Agrarias y Veterinarias de UNAN León. Estas cepas se obtuvieron de vacas con mastitis procedentes de 4 fincas del municipio de León y perteneciente a la Asociación de Ganaderos de León (ASOGAL), las bacterias habían sido almacenadas en caldo Infusión Cerebro Corazón (ICC) con 10% de glicerol a una temperatura de -20°C.

8.2 Material biológico:

8.2.1 Hojas de *Eucalyptus* spp . "eucalipto"

Hojas de *Eucalyptus* spp. "eucalipto" fueron colectadas de árboles del municipio de la Paz Centro-León, el cual está situado 109 metros sobre el Nivel del mar (msnm), las ramas fueron colectadas de árboles a una altura de 3 metros con respecto al suelo. En todos los casos poseían un color uniforme y estaban libres de presencia de musgos, de las ramas se aislaron las hojas, para su posterior tratamiento en la obtención del extracto hidroalcohólico.

8.2.2 Obtención del extracto hidroalcohólico.

Se utilizó la metodología descrita por Barreto y Campal, 2001 y de Paula y Martíns 2000.

- ✓ Se recolectaron 50kg de hojas de *Eucalyptus* spp L eucalipto.
- ✓ La materia vegetal fue limpiada manualmente con agua destilada para la liberación de sustancias extrañas.
- ✓ Posteriormente se secaron a temperatura ambiente bajo sombra por un periodo no menor a siete días.
- ✓ Las hojas fueron trituradas en una licuadora hasta obtener un polvo fino.

- ✓ 20 g de polvo fino fueron mezclados con 100ml de etanol al 80% v-v durante 7 días a temperatura ambiente.
- ✓ Transcurrido el tiempo de maceración se hizo el filtrado y posterior centrifugado para obtener solo el sobrenadante libre de residuos.
- ✓ El filtrado se distribuyó en tubos de ensayo esterilizados para facilitar la evaporación total del alcohol.
- ✓ El extracto crudo obtenido fue transferido en un frasco para ser esterilizado a 120 °C y 27 psi, por 15 minutos, el producto se guardó en refrigeración, protegiéndolo de la luz solar, hasta su utilización.

8.2.3 Efecto inhibitorio *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus* spp. "eucalipto" en *Staphylococcus aureus* aislados de vacas con mastitis.

8.3.3.1 Estandarización del inóculo bacteriano.

Consistió en la reactivación de las cepas en estudio de bacterias aisladas de vacas con mastitis, previamente almacenada a -20 °C en caldo Infusión Cerebro Corazón con 20% de glicerol, las cepas se inocularon en agar Sangre de Carnero al 5% y Mc Conkey para ser incubadas a 37°C por 24 hrs. A partir de las colonias, se prepararon suspensiones bacterianas con una turbidez igual al tubo No 0.5 del nefelómetro de Mc Farland, para obtener una concentración equivalente a 1.5×10^8 ufc/ml, de modo que se trabajó con una biomasa estándar en todos los ensayos.

8.3.3.2 Preparación de discos de sensibilidad.

Se utilizó papel Whatman N°01, del cual, se obtuvo discos de 5 mm de diámetro con ayuda de un perforador. Los discos se colocaron dentro de viales y fueron esterilizados en Autoclave (120 °C y 27 psi, por 15 minutos), se dejó secar en horno a 60°C por 24 horas. Posteriormente, los discos se embebieron en las diferentes concentraciones (200, 100, 50, y 25 mg/ml) del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus* spp "eucalipto" y se dejó en reposo por 5 minutos, se colocaron en una placa Petri estéril para permitir su secado por 10 minutos y luego realizar la prueba de sensibilidad.

8.3.3.3 Prueba de sensibilidad bacteriana según el método modificado de Difusión de Kirby Baüer.

8.3.3.1.1 Siembra del inóculo:

En placas servidas con aproximadamente 10 ml de agar Müller Hinton y puestas a control de esterilidad por 24 horas, se procedió a sembrar superficialmente el inóculo bacteriano estandarizado (0.5 Mc Farland) con un hisopo embebido en la suspensión bacteriana, utilizando un estriado convencional, la placa con el agar ya sembrado se dejó secar por espacio de 5 Minutos.

8.3.3.3.2 Exposición del inóculo al extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus* spp "eucalipto".

Los discos impregnados en las cuatro concentraciones del extracto hidroalcohólico de eucalipto, fueron colocados en la placa con el agar ya sembrado a una distancia de 15-20mm, a favor de las manecillas del reloj (de mayor a menor concentración). También se colocó un disco control embebido en etanol a 80% (solvente empleado) en el centro de la placa. Posteriormente, las placas se llevaron a incubación a 37°C/24horas. Transcurrido el tiempo se midieron los halos de inhibición (mm), registrando la medida de los diámetros para cada una de las cepas.

8.3.3.4 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) en leche.

Se utilizó en el método de dilución en tubos descritos por *Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)* con la diferencia que el caldo enriquecido fue sustituido por leche entera ultra pasteurizada (*Clinical and Laboratory Standards Institute & Weinstein, 2018*), con el fin evaluar el efecto de los componentes de la leche sobre la capacidad antimicrobiana del extracto, para esto, se colocaron en un tubo de ensayo estéril, 2ml de leche y 2ml del extracto de eucalipto (200 mg/ml), de esta mezcla se tomaron 2ml y se transfirieron a un tubo con 2 ml de leche, este paso se realizó en 6 tubos más, de tal forma que en el primer tubo se tenía una concentración 1:2 (100 mg/ml) del extracto y 1/256 (0.78 mg/ml) en el tubo 8. Se agregaron 200 µl de suspensión bacteriana al 0.5 McFarland (1.5 x 10⁸ UFC/ml) a los tubos del 1 al 8. Además, se utilizó un control positivo que solo contenía leche con la suspensión bacteriana y control negativo que contenía solo

leche como control de esterilidad. Este ensayo fue replicado para 2 cepas bacterianas diferentes, se incubaron a 37 °C por 24 horas, posterior a la incubación se realizó la siembra 100 µl de cada mezcla en placas con TSA para el recuento de UFC, se incubaron nuevamente a 37 °C por 24 horas, posteriormente, se realizó el conteo de colonias multiplicando el número por 10 para expresarlas como UFC.

8.4 Análisis estadístico de datos.

Los valores de efectividad para las diferentes cepas bacterianas, se presentaron en números absolutos, mientras que, los halos de inhibición y la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se presentaron con media aritmética. Se utilizó la prueba *T de Student* para la comparación de las medias de los halos de inhibición en mm, entre bacterias Gram Positivas y Gram Negativas, además se aplicó el análisis de correlación de *Pearson* entre la concentración del extracto y el diámetro de los halos de inhibición, todo esto asumiendo distribución normal de los datos según la prueba de Shapiro Wilk.

IX. Resultados.

Se obtuvo inhibición del crecimiento bacteriano en concentraciones por encima de 25 mg/ml del extracto, en donde se observó un halo de inhibición promedio de 7.31 mm (DE=8.15), considerando esta, como la Concentración Mínima Inhibitoria.

El halo de inhibición promedio en 200 mg/ml de extracto fue de 17.00 mm (DE=8.11) sin discriminar entre el tipo de bacterias.

Cuando se comparó la capacidad antimicrobiana del extracto entre bacterias, se observó que en bacterias Gram Positivas el halo promedio de inhibición para la concentración de 25 mg/dl fue de 11.87mm, mientras que en bacterias Gram Negativas no existió inhibición para esta concentración, ya que la CMI para Gram Negativas fue de 100 mg/ml. Para la concentración de 200 mg/ml del extracto se obtuvo un halo de 21.62 mm (DE=5.01) para bacterias Gram Positivas y de solo 9.6mm (DE=6.50) para bacterias Gram negativas, revelando diferencias significativas con $p=0.0013$ según la prueba T de *Student* para muestras independientes

Para la concentración de 100 mg/ml del extracto se obtuvo un halo 18mm (DE=3.8) en bacterias Gram Positivas, un valor significativamente mayor ($p=0.0010$) respecto a los 7.8 mm (DE=4.44) obtenidos como promedio en bacterias Gram Negativas. En 50 mg/ml de extracto se encontró 13.75 mm (DE=7,70) en Gram Positivas, mientras que, en Gram Negativas no se obtuvo inhibición ($p=0.0024$), **(Ver Figura 2)**.

En la comparación del efecto antimicrobiano entre *Staphylococcus aureus* y otras especies de *Staphylococcus*, se observó un resultado similar, obteniendo un promedio del halo de 20.75mm para *S. aureus* y de 22.50 para *Staphylococcus* spp, para la concentración de 200 mg/ml del extracto de *Eucalipto globulus*. La comparación entre bacterias Gram Negativos mostró un promedio del halo de 10.00 mm para *Klebsiella* spp y de 9.00 mm para *Escherichia coli* ($p<0.05$), en una concentración de 200 mg/ml, (tabla 1).

El análisis de correlación lineal simple entre la concentración del extracto y el diámetro de los halos de inhibición reflejó un $R^2=0.779$ **(Ver figura 1)**.

X. Discusión

En este trabajo se obtuvo una CMI de 25 mg/ml del extracto de *Eucalyptus spp.* Este es un valor bajo en comparación con el estudio realizado por Mordmuang *et al.*, quienes encontraron una CMI de 200 mg/ml del extracto *Rhodomyrtus tormentosa* (Mordmuang *et al.*, 2019), por lo que comprueba que es un trabajo prometedor, ya que se requeriría poca cantidad de extracto para obtener un efecto antimicrobiano.

En el presente estudio se observa que después de 100 mg/ml del extracto de *Eucalyptus spp* ya no se obtiene inhibición para la bacteria Gram-negativa pero si en bacterias Gram Positivas, este resultado concuerda con lo encontrado en otro estudio (Montero-Recalde *et al.*, 2019), en el que se observó que en la prueba de sensibilidad antimicrobiana del aceite esencial de eucalipto fue más eficaces para la bacteria Gram positiva como *Staphylococcus aureus*.

La comparación de capacidad antimicrobiana del extracto entre bacterias Gram Positivas y Gram Negativas mostró diferencias significativas en todas las concentraciones, esto es un hallazgo diferente al resultado obtenido por otros investigadores (Montero-Recalde *et al.*, 2019) que observaron similitud en los halos de inhibición para ambos grupos bacterianos. La diferencia observada en este trabajo se puede atribuir a que las bacterias Gram-positivas poseen una capa de péptido glucano que facilita la absorción de la solución hidroalcohólica, mientras que la bacteria Gram-negativa posee en su pared en la parte externa una membrana lipídica hidrofóbica que dificulta el mecanismo de absorción del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* (de Tejada *et al.*, 2012).

La comparación de los halos de inhibición entre *S. aureus* y *Staphylococcus spp*, no mostró diferencias significativas, esto difiere de lo reportados para antibiótico usados en los dos grupos de bacterias, los que refieren encontrar mayor resistencia a Levofloxacin, Eritromicina, Gentamicina, trimetopril/sulfametaxazoles en bacterias diferente de *Staphylococcus aureus* (De Vecchi *et al.*, 2018), esto es un hallazgo importante ya que demuestra que el uso de tratamiento natural como Eucalipto puede ser empleado en amplio espectro para bacterias Gram positivas.

Se observó la relación que existe entre la concentración de *Eucalyptus* spp y los halos de inhibición presentes en los sensidiscos que fueron impregnados en las diferentes concentraciones de *Eucalyptus* spp, se observó una clara disminución de los diámetros de los halos de inhibición a medida que disminuye la concentración de *Eucalyptus* spp se obtuvo una correlación donde se pudo observar un valor de $R^2= 77$ lo cual significa que se puede predecir el tamaño del halo con un 77 % basado en las concentraciones de *Eucalyptus* spp. Este resultado demuestra la consistencia en el efecto antimicrobiano del extracto, principalmente en bacteria Gram Positivas, **(Ver figura 1)**

XI. Conclusiones.

1- Se acepta la Ho: El extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus* spp presenta capacidad antimicrobiana frente a bacterias aisladas de vacas con mastitis subclínica.

2- El extracto hidroalcohólico de Eucalipto mostró una baja Concentración Mínima Inhibitorio frente bacterias aisladas de vacas con mastitis.

3- La efectividad antimicrobiana fue más elevada en bacterias *Staphylococcus aureus* que en bacterias *E. coli* y *Klebsiella* spp.

XII. Recomendaciones.

- Evaluar la toxicidad de extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus* spp para considerar su aplicación *in vivo*.
- Tomar en cuenta la aplicación del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus* spp de forma tópica como ungüento en las tetas para la desinflación de esta. La concentración mínima inhibitoria que se obtuvo en la dilución 1:4096 que equivale a 0.048 mg/ml= 48 mg/ml.

XII. Referencias bibliográficas

- Alvarado-Aguilar, J., Vásquez-Montenegro, V., Vergara-Espinoza, M., & Cruz-López, C. Y. S. (2019). Efecto del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* L. sobre *Staphylococcus aureus*: *Revista Experiencia en Medicina del Hospital Regional Lambayeque*, 5(3), 119-125. <https://doi.org/10.37065/rem.v5i3.359>
- Andresen S, H. (2001). Mastitis: Prevención y Control. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 12(2), 55-64.
- Aranguren Parra, A. J., López Ortega, A. A., Mendoza, C. A., & Delgado, N. (2009). Efecto de la mastitis clínica y subclínica sobre la concentración plasmática de metabolitos, proteínas totales y albúmina en hembras bovinas. *Zootecnia Tropical*, 27(1), 057-064.
- Avila, A. L. V., Fontanills, Y. R., Campos, C., Maure, O. B., & Trujillo, M. M. (2018). *Propiedades fitoquímicas y antibacterianas de Piper auritum Kunth*. 14.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446-475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Bedolla, C. (2019). *ETIOLOGÍA DE LA MASTITIS BOVINA*. <https://bmeditores.mx/ganaderia/articulos/ganado-de-leche/manejo/etiologia-de-la-mastitis-bovina-2064>
- Clavijo, A., Meléndez, B., Clavijo, M., Godoy, A., & Santander, J. (2002). Efecto del sistema de explotación sobre la aparición de mastitis caprina en dos fincas del estado Falcón, sus agentes etiológicos y la resistencia a antimicrobianos. *Zootecnia Tropical*, 20(3), 383-395.

- Clinical and Laboratory Standards Institute, & Weinstein, M. P. (2018). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically* (10th ed.). Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Colorado Jaramillo, J., Echeverri ZuLuaga, J. J., Olivera Angel, M., López-Herrera, Al., Colorado Jaramillo, J., Echeverri ZuLuaga, J. J., Olivera Angel, M., & López-Herrera, Al. (2018). Microorganisms isolated in bacteriological culture from milk samples from clinically healthy holstein cows. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 13(1), 31-41. <https://doi.org/10.21615/cesmvz.13.1.3>
- de Tejada, G. M., Sánchez-Gómez, S., Kowalski, I., Kaconis, Y., Andrä, J., Schürholz, T., Hornef, M., Dupont, A., Garidel, P., Gutschmann, T., David, S. A., & Brandenburg, K. (2012). Bacterial cell wall compounds as promising targets of antimicrobial agents I. Antimicrobial peptides and lipopolyamines. *Current drug targets*, 13(9), 1121-1130.
- De Vecchi, E., George, D. A., Romanò, C. L., Pregliasco, F. E., Mattina, R., & Drago, L. (2018). Antibiotic sensitivities of coagulase-negative staphylococci and *Staphylococcus aureus* in hip and knee periprosthetic joint infections: Does this differ if patients meet the International Consensus Meeting Criteria? *Infection and Drug Resistance*, 11, 539-546. <https://doi.org/10.2147/IDR.S151271>
- Enrique, A. M. R. (2009). *PRESENTADO POR EL BACHILLER*. 52.
- García Castro, F. E., Zúñiga López, A., Flórez Castañeda, D. C., & Cubides Cárdenas, J. A. (2019). Niveles de ruido durante el ordeño de lecherías con sistemas mecánicos del trópico alto colombiano y su efecto en la calidad de la leche y el bienestar animal. *Revista de Investigaciones*

- Veterinarias del Perú*, 30(2), 691-698.
<https://doi.org/10.15381/rivep.v30i2.14642>
- Glauber, C. (2009). *Manejo del parto en vacas lecheras: Un desafío indispensable*. <https://www.engormix.com/ganaderia-leche/articulos/manejo-parto-vacas-lecheras-t28166.htm>
- Gómez-González, J. F., & Sánchez-Duque, J. A. (2015). *Perfil microbiológico y resistencia bacteriana en una unidad de cuidados intensivos de Pereira, Colombia, 2015*. 7.
- Gómez-Quispe, O. E., Santivañez-Ballón, C. S., Arauco-Villar, F., Espezua-Flores, O. H., & Manrique-Meza, J. (2015). Criterios de interpretación para California Mastitis Test en el diagnóstico de mastitis subclínica en bovinos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 26(1), 86-95.
<https://doi.org/10.15381/rivep.v26i1.10912>
- González-Guiñez, R., Silva-Aguayo, G., Urbina-Parra, A., & Gerding-González, M. (2016). ACEITE ESENCIAL DE *Eucalyptus globulus* Labill Y *Eucalyptus nitens* H. Deane & Maiden (MYRTACEAE) PARA EL CONTROL DE *Sitophilus zeamais* Motschulsky. *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, 32(3), 204-216.
<https://doi.org/10.4067/S0719-38902016005000005>
- Kalayou, S., Haileselassie, M., Gebre-Egziabher, G., Tiku'e, T., Sahle, S., Taddele, H., & Ghezu, M. (2012). In-vitro antimicrobial activity screening of some ethnoveterinary medicinal plants traditionally used against mastitis, wound and gastrointestinal tract complication in Tigray Region, Ethiopia. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(7), 516-522.
[https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60088-4](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60088-4)

- Kruze, J. (1998). La rutina de ordeño y su rol en los programas de control de mastitis bovina. *Archivos de medicina veterinaria*, 30(2), 07-16. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X1998000200001>
- López Barrera, A. J., Miranda Martínez, M., Bello Alarcón, A., & García Simón, G. (2016). Actividad expectorante y toxicológica de una formulación elaborada a partir de *Eucalyptus globulus* Labill, *Borago officinalis* L, Y *Sambucus Nigra* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21(4), 1-9.
- Martínez, E. (2011). *TEMA: Prevalencia de mastitis subclínica y condiciones de manejos en las fincas asociadas al centro de acopio lechero Tecuaname, La Paz Centro en los meses de Octubre—Noviembre del 2011*. 55.
- Matos, H. (2018). “PREVALENCIA DE MASTITIS SUBCLÍNICA, CAUSADA POR *Escherichia coli*, EN VACAS DE DIFERENTES LACTACIONES, EN LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL CALLQUI GRANDE HUANCAMELICA”.
- Matos, H. S. (2015). “PREVALENCIA DE MASTITIS SUBCLÍNICA, CAUSADA POR *Escherichia coli*, EN VACAS DE DIFERENTES LACTACIONES, EN LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL CALLQUI GRANDE HUANCAMELICA.
- Máttar, S., Calderón, A., Sotelo, D., Sierra, M., & Tordecilla, G. (2009). Detección de Antibióticos en Leches: Un Problema de Salud Pública. *Revista de Salud Pública*, 11, 579-590. <https://doi.org/10.1590/S0124-00642009000400009>
- Montero-Recalde, M., Morocho-Núñez, M. J., Avilés-Esquivel, D., Carrasco-Cando, Á., & Erazo-Gutierrez, R. (2019). Eficacia antimicrobiana del aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus* spp) sobre cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* subsp. *Aureus*. *Revista de Investigaciones*

- Veterinarias del Perú*, 30(2), 932-938.
<https://doi.org/10.15381/rivep.v30i2.16099>
- Mordmuang, A., Brouillette, E., Voravuthikunchai, S. P., & Malouin, F. (2019). Evaluation of a *Rhodomyrtus tomentosa* ethanolic extract for its therapeutic potential on *Staphylococcus aureus* infections using in vitro and in vivo models of mastitis. *Veterinary Research*, 50(1), 49.
<https://doi.org/10.1186/s13567-019-0664-9>
- Narváez., S. (2012). *Identificación de agentes bacterianos implicados en mastitis subclínica y perfil de resistencia en vacas que abastecen los centros de acopio Tecuaname y El Sauce en el departamento de León. Septiembre* 2011.
<http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/bitstream/123456789/5929/1/221118.pdf>
- Neri Melendez, S. (2014). *MASTITIS EN GANADO LECHERO BOVINO*.
<http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/handle/123456789/7196>
- Nicholas, R. (2010). *Implicación, diagnóstico y control de los micoplasmas en el Complejo de la Enfermedad Respiratoria Bovina*. 6.
- Núñez D, C., Morales Salinas, E., Martínez Maya, J. J., & Hernández A, L. (2008). Detección de mastitis bovina subclínica por micoplasmosis mediante ELISA indirecta y aislamiento. *Veterinaria México*, 39(2), 161-171.
- Ordeño limpio—Repositorio Institucional Universidad Centroamericana*. (s. f.). Recuperado 25 de noviembre de 2019, de <http://repositorio.uca.edu.ni/2241/>

- Ortega, V. y, & Antonio, R. (2016). Science and environment in eucalyptus acclimatization in the Valley of Mexico through the press, 1869-1880. *Historia y Sociedad*, 30, 237-264. <https://doi.org/10.15446/hys.n30.53809>
- Quiñones, R. (2003). *Evaluación epizootiológica y económica de la mastitis bovina en rebaños lecheros especializados de la provincia de Cienfuegos*. <http://infolactea.com/wp-content/uploads/2015/03/539.pdf>
- Richardet, M., Castro, S., Tirante, L., Vissio, C., & Larriestra, A. J. (2016). Magnitud y variación de la mastitis clínica y sus costos asociados en rodeos lecheros de Argentina. *Archivos de medicina veterinaria*, 48(2), 153-158. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2016000200004>
- Rodríguez-Angeles, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli. *Salud Pública de México*, 44(5), 464-475.
- Ruiz Gil, A. K., Peña Rodríguez, J., & Remón Díaz, D. (2016). Mastitis bovina en Cuba. Artículo de revisión. *Revista de Producción Animal*, 28(2-3), 39-50.
- Valero-Leal, K., Valbuena, E., Chacón, F., Olivares, Y., Castro, G., & Briñez, W. (2010). Patógenos contagiosos y ambientales aislados de cuartos mamarios con mastitis subclínica de alto riesgo en tres fincas del estado Zulia. *Revista Científica*, 20(5), 498-505.
- Villa-Arcila, N. A., Duque-Madrid, P. C., Lasso-Rojas, L., Sánchez-Arias, S., & Ceballos-Márquez, A. (2017). Etiología de las infecciones intramamarias subclínica al secado y postparto en vacas lecheras en Caldas, Colombia. *Revista Científica*, XXVII(4), 227-334.
- Zendejas Aguilar, E. (2018). *Mastitis, problema número 1 en ganado lechero: Manejo, Tratamiento y Control*. Ganaderia.com.

<https://www.ganaderia.com/micrositio/Bio-Zoo-S.A-de-C.V./Mastitis,-problema-numero-1-en-ganado-lechero:-Manejo,-Tratamiento-y-Control>

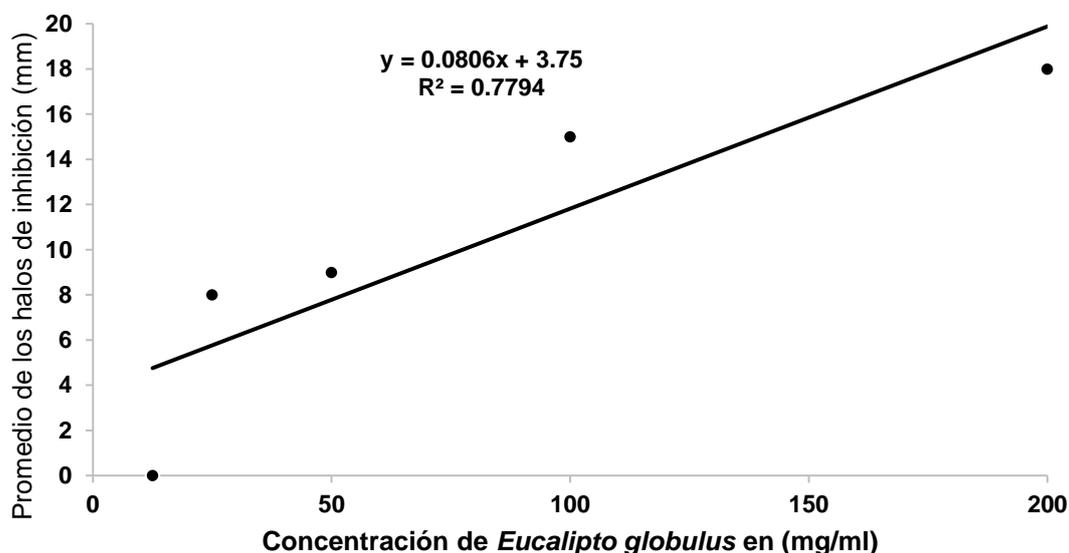
XIII. Anexos

Medidas de los halos de sensibilidad registradas en (mm) del extracto

Hidroalcoholico de eucalipto.

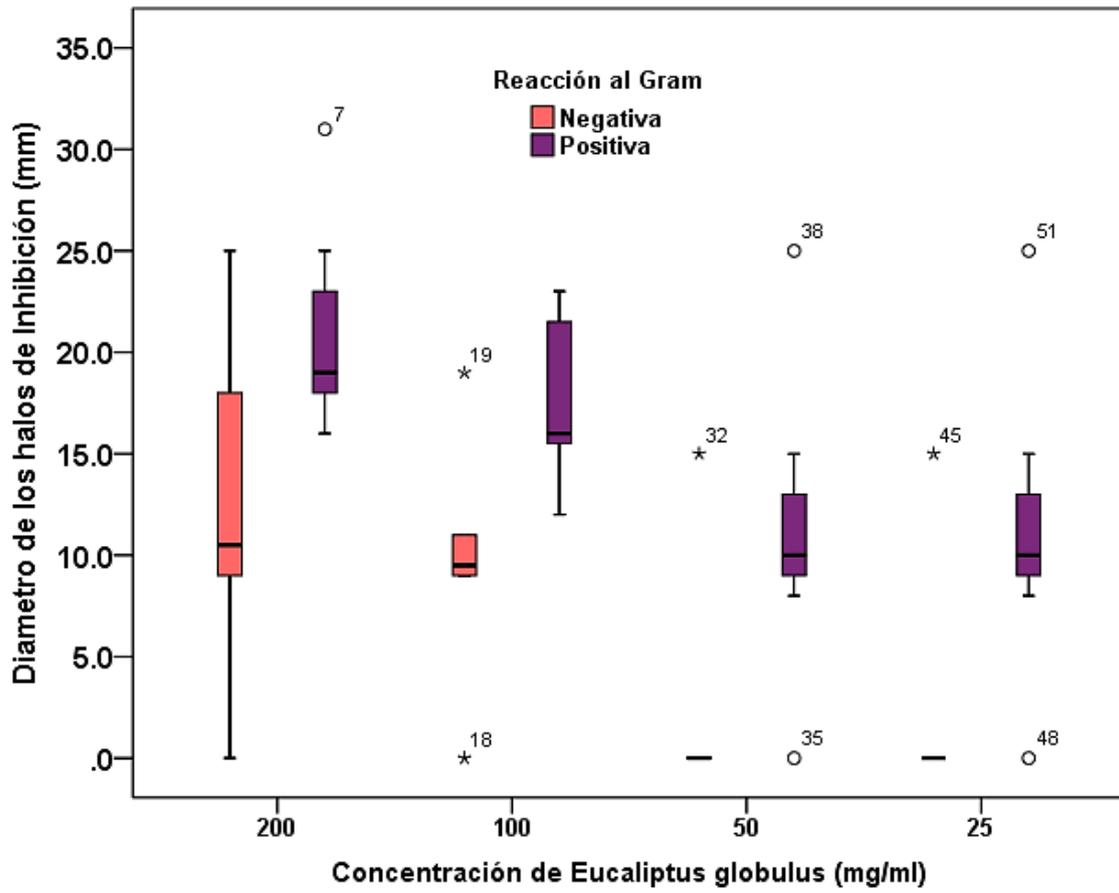
Bacterias	Concentración del extracto de <i>Eucalipto globulus</i>					
	200 mg/ml	100 mg/ml	50 mg/ml	25 mg/ml	12.5 mg/ml	6.75 mg/ml
<i>Sthaphylococcus aureus</i>	31.00	22.00	10.00	10.00	0.00	0.00
<i>Sthaphylococcus aureus</i>	16.00	15.00	10.00	8.00	0.00	0.00
<i>Sthaphylococcus aureus</i>	18.00	12.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Sthaphylococcus aureus</i>	18.00	16.00	9.00	10.00	9.00	9.00
Promedio	20.75	16.25	7.25	7.00	2.25	2.25
Desviación Estándar	6.90	4.19	4.86	4.76	4.50	4.50
<i>Sthaphylococcus spp</i>	19.00	16.00	22.00	11.00	0.00	0.00
<i>Sthaphylococcus spp</i>	21.00	23.00	21.00	25.00	0.00	0.00
<i>Sthaphylococcus spp</i>	25.00	21.00	19.00	16.00	0.00	0.00
<i>Sthaphylococcus spp</i>	25.00	19.00	19.00	15.00	0.00	0.00
Promedio	22.50	19.75	20.25	16.75	0.00	0.00
Desviación Estándar	3.00	2.99	1.50	5.91	0.00	0.00
<i>Klebsiella spp</i>	18.00	11.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Klebsiella spp</i>	12.00	9.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Klebsiella spp</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Promedio	10.00	6.67	0.00	0.00	0.00	0.00
Desviación Estándar	9.17	5.86	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Escherichia coli</i>	9.00	10.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Escherichia coli</i>	9.00	9.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Promedio	9.00	9.50	0.00	0.00	0.00	0.00
Desviación Estándar	0.00	0.71	0.00	0.00	0.00	0.00
Total	17.00	14.08	8.46	7.31	1.00	1.00
Desviación Estándar	8.11	6.47	9.12	8.15	3.00	3.00

Figura 1



Capacidad antimicrobiana de *Eucalipto globulus* expresada en halos de inhibición por concentración

Figura 2



Diámetros de halos de inhibición en *Staphylococcus aureus*

