



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

ACTIVIDAD *in vitro* DEL EXTRACTO DE LIMÓN
(*Citrus aurantifolia*) SOBRE LOS FENOTIPOS
ORSA/MRSA DE *Staphylococcus aureus*,
AISLADOS DE HATOS LECHEROS DE
PRODUCCIÓN FAMILIAR

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:
MARÍA ANDREA RAMÍREZ MENDIOLA

ASESORES:
VALENTE VELÁZQUEZ ORDOÑEZ
BENJAMÍN VALLADARES CARRANZA
ABDEL-FATTAH MOHAMED SALEM



TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO

ABRIL, 2022

Actividad *in vitro* del extracto de Limón (*Citrus aurantifolia*) sobre los fenotipos ORSA/MRSA de *Staphylococcus aureus*, aislados de hatos lecheros de producción familiar

por

María Andrea Ramírez Mendiola

Tesis presentada para obtener el grado de

Médico Veterinario Zootecnista

en la

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

Toluca, Estado de México. Abril, 2022

Índice general

1. Introducción	1
2. Revisión de la Literatura	5
2.1. Sistemas de producción lechera en México	5
2.2. Impacto de la mastitis bovina en la producción lechera y su riesgo para la salud pública	7
2.3. Biología del <i>Staphylococcus aureus</i>	9
2.4. Resistencia de <i>Staphylococcus aureus</i> a los antibióticos β -lactámicos	9
2.4.1. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana	12
2.5. Medicina alternativa tradicional	13
2.5.1. Utilización de extractos vegetales	15
2.6. Producción de cítricos en México	15
2.6.1. Limón Mexicano (<i>Citrus aurantifolia</i>)	17
2.7. Uso de extractos herbolarios de <i>Citrus aurantifolia</i> como antimicrobiano	19
3. Justificación	23
4. Hipótesis	25
5. Objetivos	27

6. Material	29
6.1. Material Biológico	29
6.2. Material de Muestreo	29
6.3. Material de Laboratorio	30
7. Método	33
7.1. Población de estudio	33
7.2. Obtención de las muestras	33
7.3. Aislamiento e identificación microbiológica	34
7.4. Sensibilidad <i>in vitro</i> a la oxacilina	34
7.5. Susceptibilidad <i>in vitro</i> de <i>S. aureus</i> a los antibióticos	35
7.6. Confirmación de la resistencia a la Oxacilina	36
7.7. Determinación del fenotipo MRSA	36
7.8. Preparación de los extractos de <i>Citrus aurantifolia</i>	37
7.9. Sensibilidad <i>in vitro</i> al extracto crudo de <i>Citrus aurantifolia</i>	39
7.10. Evaluación de resultados	40
8. Límite de Espacio	41
9. Límite de Tiempo	43
10. Resultados	45
11. Discusión	57
12. Conclusiones	67
13. Sugerencias para investigaciones futuras	69

Bibliografía	71
Anexos	87
Anexo 1. Sensibilidad <i>in vitro</i> del <i>Staphylococcus aureus</i> a los Antrimicrobianos en aislamientos de vacas lecheras	89
Anexo 2. Distribución de la resistencia <i>in vitro</i> de <i>Staphylococcus aureus</i> a los antibióticos β -lactámicos	91
Anexo 3. Comparación de la Sensibilidad de las cepas OSSA de <i>S. aureus</i> aisladas a los extractos alcohólico y acuoso obtenidos a partir de hoja de <i>Citrus aurantifolia</i>	93
Anexo 4. Comparación de la Sensibilidad de las cepas ORSA/MRSA de <i>S. aureus</i> a los extractos alcohólico y acuoso obtenidos a partir de hoja de <i>Citrus aurantifolia</i>	95
Anexo 5. Comparación de la Sensibilidad de las cepas OSSA de <i>S. aureus</i> aisladas a los extractos alcohólico y acuoso obtenidos a partir de cáscara de <i>Citrus aurantifolia</i>	97
Anexo 6. Comparación de la Sensibilidad de las cepas ORSA/MRSA de <i>S. aureus</i> a los extractos alcohólico y acuoso obtenidos a partir de cáscara de <i>Citrus aurantifolia</i>	99
Anexo 7. Distribución total de la Sensibilidad de las cepas de <i>S. aureus</i> analizadas a los extractos alcohólico y acuoso obtenidos a partir de hoja de <i>Citrus aurantifolia</i>	101
Anexo 8. Distribución total de la Sensibilidad de las cepas de <i>S. aureus</i>	

analizadas a los extractos alcohólico y acuoso obtenidos a partir de cáscara de *Citrus aurantifolia* 103

Anexo 9. Comparación total de las Distribuciones de Sensibilidad de las cepas de *S. aureus* analizadas a los extractos alcohólico y acuoso obtenidos a partir de hoja y cáscara de *Citrus aurantifolia* 105

**Actividad *in vitro* del extracto de Limón (*Citrus aurantifolia*)
sobre los fenotipos ORSA/MRSA de *Staphylococcus aureus*,
aislados de hatos lecheros de producción familiar**

por

María Andrea Ramírez Mendiola

Resumen

Un sistema de producción lechero predominante en México es el de tipo familiar, que aportan cerca del 30 % de la leche nacional. Dentro de los sistemas de producción lechera se tienen problemas zoonosarios que afectan el rendimiento y calidad láctea. Tal es el caso de la mastitis, la cual es una enfermedad infecciosa que sufre el ganado lechero y, por tanto, tiene un gran impacto en la salud pública. El agente causal primordial de dicha enfermedad es el *Staphylococcus aureus*, el cual debido a diversos factores ha adquirido notable resistencia a los antimicrobianos, por lo que es necesario buscar alternativas de tratamiento y control. Por ello, en este trabajo se evaluó el efecto antimicrobiano *in vitro* de los extractos crudos obtenidos de la cáscara y hoja del limón *Citrus aurantifolia* contra cepas de *Staphylococcus aureus* aislados de vacas con mastitis subclínica en un hato lechero familiar. Para ello se realizó un muestreo a una unidad de producción lechera de tipo familiar en el Valle de Toluca, Estado de México. En total se obtuvieron 140 muestras de leche a partir de muestras individuales obtenidas de cada cuarto glandular de un total de 35 vacas en línea de ordeño, de las cuales se logró aislar e identificar 30 cepas de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). A cada una de las cepas identificadas se les realizó una prueba de sensibilidad *in vitro* antimicrobiana contra Oxacilina (1 μ g), Penicilina (10UI), Amoxicilina/Ac. Clavulánico (20/10 μ g), Cefoxitina (30 μ g) y Vancomicina (30 μ g) mediante el método de difusión en discos, y los resultados fueron comparados con cepas control de *S. aureus* ATCC 29213 (sensible), ATCC 25923 y ATCC 43300 (resistente). Con base en las pruebas realizadas, se obtuvieron los aislamientos de *Staphylococcus aureus* sensibles a Oxacilina (OSSA) y los resistentes a Oxacilina (ORSA), los cuales para su confirmación se incubaron simultáneamente a 35 y 42°C durante 24 horas. La determinación del fenotipo MRSA fue basada en el Método de Tamizado en Placa (Oxacillin Screen Plate) en agar Müller-Hinton, utilizando diferentes concentraciones de Oxacilina: 2, 4 y 6 μ g/mL. Para la elaboración de los extractos crudos de limón, se realizó la recolección de material vegetal (tanto hojas como cascara) de *Citrus aurantifolia* en Zitácuaro, Michoacán, durante Febrero a Marzo de 2016. Dos tipos de extractos crudos fueron elaborados: alcohólico y acuoso (haciendo uso de hoja y cáscara del limón, respectivamente). Una vez obtenidos dichos extractos, se realizó la prueba de sensibilidad *in vitro* frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas, utilizando concentraciones de 10-50 μ L. Como

resultado, se obtuvo una baja frecuencia de infección por *S. aureus* (21.4%) en el hato lechero muestreado en el Valle de Toluca. Al evaluar la resistencia in vitro de *S. aureus* a los antibióticos β -lactámicos, se observó una amplia proporción para la Penicilina (93.3%), así como una amplia proporción de sensibilidad para Amoxicilina/Ac. Clavulánico (70%), Oxacilina (80%), Cefoxitina (70%) y Vancomicina (60%). Los antibiotipos ORSA/MRSA mostraron sensibilidad a mayor dilución de los extractos, obteniéndose un rango de 6 a 8 mm en la dilución de 10 μ L y un rango de 13 a 20 mm para la dilución de 50 μ L en el extracto alcohólico de hoja; mientras que para el extracto acuoso de hoja se observaron medidas de 0mm en la dilución de 10 μ L y un rango de 10 a 13 mm en la dilución de 50 μ L. Así mismo, para los extractos de cáscara, se obtuvo ausencia de inhibición en la concentración de 10 μ L tanto para el extracto alcohólico como para el acuoso y un rango de 9 a 12 mm para los aislamientos evaluados en la concentración de 50 μ L para los extractos alcohólicos y un rango de 11 a 14 mm a las concentraciones de 50 μ L en el extracto acuoso. La confirmación de la presencia de los antibiotipos ORSA Y ORSA/MRSA representa un riesgo permanente de infección en los hatos lecheros y su potencial riesgo a la salud pública. De los resultados obtenidos en esta investigación, se puede concluir que los extractos demostraron buenos niveles de actividad antimicrobiana contra las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de vacas lecheras con mastitis subclínica en un hato lechero.

PALABRAS CLAVE: Mastitis; *Staphylococcus aureus*; extracto vegetal; alcohólico; acuoso; *Citrus aurantifolia*; ORSA/MRSA.

Capítulo 1

Introducción

México es un país que se destaca por su vocación Agropecuaria. Privilegiado por sus recursos naturales y su clima, ofrece condiciones ideales donde se desarrollan casi todas las especies animales con propósitos productivos, dentro de las cuales están las vacas lecheras. En lo que a la actividad económica agropecuaria respecta, es preponderante la producción de leche, debido a las demandas para abastecer a una población en crecimiento, que en la actualidad se estima en 120,000,000 de habitantes. Para ello, existen cuencas lecheras de suma importancia, como La Laguna en Torreón, Coahuila, o Tizayuca en el estado de Hidalgo, así como algunas otras en los estados de Jalisco y Querétaro. Así mismo, se suman un sinnúmero de explotaciones familiares a lo largo y ancho del país, donde estas últimas representan cerca del 30 % de la producción de leche en México (Arriaga *et al.*, 2000).

La producción láctea en México es deficitaria desde los años 80, década en que se vio disminuido el hato lechero nacional. Esto ha originado que para tratar de cubrir la demanda, se tenga que importar leche líquida y en polvo, tanto para consumo humano, como para la industria de derivados de leche.

Existen múltiples causas que generan una disminución de producción láctea, entre las cuales se encuentran problemas zoonosarios en las prácticas de manejo. Un ejemplo de

ello es la constante presencia de Mastitis, la cual es una enfermedad infecciosa de gran importancia sanitaria y económica que sufre el ganado lechero (Geron-Muñoz *et al.*, 2002). El agente patógeno principal de dicha enfermedad es el *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (Chaffer & Rimbaud, 2005); y el padecimiento resultante afecta considerablemente la salud de la glándula mamaria, lo que resulta en una disminución en la producción láctea y deterioro en la calidad de la producción, representando un riesgo potencial a la salud pública por la posible contaminación de la leche y sus productos derivados (Manjarrez *et al.*, 2008).

La Mastitis afecta tanto a las grandes cuencas lecheras, como a las pequeñas explotaciones familiares. La prevalencia de dicha enfermedad se ha atribuido a las deficientes condiciones higiénico-sanitarias, lo cual ha contribuido a la aparición de esta enfermedad y al uso frecuente de la terapia antimicrobiana, que se ha venido aplicando en forma empírica, al desconocerse en la mayoría de los casos el agente causal y su patrón de sensibilidad a los antimicrobianos (Faria *et al.*, 2005). Este problema es acentuado debido a que, en la actualidad, un gran número de antibióticos comerciales causan resistencia debido a múltiples factores (Zafalon *et al.*, 2007). Estudios anteriores han demostrado que el *S. aureus* puede desarrollar resistencia a los compuestos antimicrobianos más comúnmente utilizados, tal como la Penicilina (Hernández *et al.*, 1991). El término “meticilina resistente” aplicado a las cepas bacterianas – *S. aureus* en este caso – implica resistencia a todas las penicilinas (Pahissa, 1997). El *S. aureus* Meticilina resistente (MRSA, por sus siglas en inglés) es causante de mastitis subclínica en vacas productoras de leche y representa un problema potencial de salud pública (Lagunas, 2002).

Al contemplar este panorama tan pesimista para poder combatir esta enfermedad infecciosa, que ha rebasado por su resistencia las alternativas de control y combate con productos como agentes antibacterianos y antibióticos comerciales, nos dedicamos a la búsqueda de otras alternativas para disminuir de manera óptima y sin riesgo para el hato

lechero nacional, la presencia de este problema.

Esta tesis presenta los resultados de un proyecto de investigación en el que se explora el desarrollo de métodos naturales alternativos para controlar las infecciones. Este estudio propone tomar un enfoque fitoterapéutico, ya que las plantas medicinales y aromáticas (PMA) son conocidas por su actividad antibacteriana contra diferentes agentes patógenos. Dicha virtud las convierte en un elemento terapéutico por excelencia en la medicina tradicional, pero también ha sido la base de la medicina moderna, y la generación de nuevas estructuras químicas para el desarrollo de nuevos fármacos (Baskaran *et al.*, 2009; Mubarack *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2005).

Con la finalidad de estudiar la efectividad de los extractos vegetales naturales para el tratamiento de infecciones, es necesario realizar estudios *in vitro*. En particular, este método permite la evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto de *Citrus aurantifolia* sobre las cepas ORSA/MRSA del *Staphylococcus aureus*. El presente estudio pretende realizar una exploración sistemática de la actividad antibacteriana de los extractos de *Citrus aurantifolia* sobre cepas bacterianas que causan la mastitis, principalmente en explotaciones familiares y que son Oxacilina y Meticilina resistentes. El protocolo de evaluación que se propone requiere la realización de estudios *in vitro* de sensibilidad antibacteriana por el método de difusión en placa, tanto para compuestos antibacterianos comúnmente utilizados, como para el extracto de *Citrus aurantifolia*.

El resto de esta tesis se ha estructurado de la siguiente manera. En el Capítulo 2 se presenta una revisión de la literatura sobre la producción lechera en México y sus problemas más frecuentes, así como el impacto que tiene la mastitis en la producción lechera y en la salud pública, la resistencia antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* como principal agente causal de mastitis, la utilización de la medicina tradicional como alternativa en el tratamiento de enfermedades y por último, las propiedades antimicrobianas del limón (*Citrus aurantifolia*). En el Capítulo 3 se presentan los argumentos que justifican la necesidad del estudio que

concierno a esta tesis. En el Capítulo 4 se presentan las hipótesis del proyecto de investigación, seguido por los objetivos, los cuales se presentan en el Capítulo 5. En el Capítulo 6 se presenta un resumen del material requerido para las pruebas de sensibilidad, y en el Capítulo 7 se da una descripción detallada del método utilizado. Los Capítulos 8 y 9 detallan las limitaciones espaciales y temporales, respectivamente, de las campanas de muestreo y colecta de materia prima para la elaboración de los extractos vegetales. Los resultados de los experimentos realizados como parte de este proyecto de investigación son reportados a detalle en el Capítulo 10, seguidos por la discusión de las implicaciones de dichos resultados en el Capítulo 11. Finalmente, el Capítulo 12 ofrece las conclusiones de esta tesis, y una breve discusión de las observaciones y sugerencias para futuras investigaciones es presentada en el Capítulo 13.

Capítulo 2

Revisión de la Literatura

2.1. Sistemas de producción lechera en México

La producción láctea en México se ha visto aumentada debido al crecimiento de la población que exige mayor producción para satisfacer sus necesidades alimenticias (SAGARPA, 2012). La producción lechera se divide en tres diferentes sistemas de producción: la lechería intensiva, la tropical y la familiar (FIRA, 2001). Estos tres tipos de sistemas de producción varían de acuerdo a su grado de tecnificación, y la forma en cómo se desarrolla la actividad (Arriaga *et al.*, 2000).

La lechería intensiva es un sistema altamente tecnificado, con procesos de producción mecanizados tanto en producción de forrajes de calidad como en ordeño y el manejo de la leche. Este sistema aporta un 25 % a la producción nacional y contribuye con más del 80 % de la leche pasteurizada que se consume en el país. La lechería tropical, extensiva y de doble propósito, está caracterizada por la ordeña estacional de los animales recién paridos que muestran mayor temperamento lechero (Cuevas, 2005). La lechería familiar se encuentra conformada por pequeñas explotaciones de tipo estabulado o semiestabulado, en las cuales se manejan entre 3 y 30 vacas que son atendidas por los integrantes de una misma familia productora, utilizando sistemas tradicionales de producción, y su alimentación se basa en

pastoreo o en el suministro de forrajes o esquilmos provenientes de cultivos del mismo productor.

El sistema de lechería familiar se caracteriza por la falta de asistencia técnica, bajo nivel sanitario en sus prácticas de manejo y prevalencia de mastitis que afecta la calidad sanitaria de la leche. Sin embargo, se estima que cerca del 30% de la leche en México proviene de explotaciones de este tipo (Arriaga *et al.*, 2000). La composición racial del hato es predominantemente raza Holstein, pero también incluye Pardo Suizo Americano y cruza en menor proporción (Cuevas, 2005; SAGARPA, 2012).

Los sistemas campesinos de producción de leche tienen una gran importancia económica, ya que la venta de leche representa la principal fuente de ingresos para las familias productoras, que en ocasiones son complementados con ingresos generados por medio de otras actividades, ya sea dentro de la unidad de producción o fuera de esta. La lechería campesina ha estado ligada a la producción de maíz, pero debido a la crisis del grano, la producción de leche se ha convertido en su principal ingreso. A la fecha, la producción de leche sigue representando una opción económicamente viable para este tipo de productores del altiplano central mexicano (Espinoza *et al.*, 2005).

No obstante, los sistemas de producción lechera familiar tienen un bajo o nulo desarrollo tecnológico ya que aún se utilizan tecnología y procedimientos productivos atrasados. Es decir, la ordeña aún se realiza manualmente, la alimentación de los hatos se basa en el uso de forrajes de baja calidad, son alojados en instalaciones rústicas y la presencia de componentes tecnológicos está limitada a las opciones promovidas por instituciones gubernamentales. Mas aún, los mecanismos de comercialización se encuentran sujetos a empresas externas o locales dedicadas a la producción de quesos en forma artesanal (Antúnez, 2000; FIRA, 2001).

El rezago – tanto tecnológico como económico – al que las unidades de producción lechera familiar han estado sujetas, ha dado pie a la que problemas zoonosarios tal como la contaminación de la leche por *S. aureus* aún prevalezca. Este problema en particular se debe a diversos factores que ponen en riesgo la salud de la glándula mamaria y provocan la aparición de la mastitis. Dichos factores pueden incluir condiciones de la vaca, tal como su estado nutricional o el posparto, pero también practicas inadecuadas de ordeños, equipo de ordeño en mal estado o mal manejo del mismo, la falta de educación entre los productores acerca de la enfermedad y condiciones inadecuadas de los establos, entre varios otros. La combinación de estos factores hace que la posibilidad de contaminación de la leche incremente considerablemente (Waage, 1997).

2.2. Impacto de la mastitis bovina en la producción lechera y su riesgo para la salud pública

Independientemente de su causa, la mastitis es el término que se utiliza para referirse a la inflamación del parénquima de la glándula mamaria. Este proceso se caracteriza por varios cambios físicos y químicos en la leche, así como alteraciones patológicas en el tejido glandular. Los cambios más importantes que se producen en la leche incluyen la modificación del color, presencia de coágulos y un gran número de leucocitos. Estas manifestaciones pueden pasar inadvertidas, o pueden presentarse de manera muy severa (Radostits *et al.*, 2002; Wolter, 2002).

La mastitis es un problema que afecta considerablemente la salud de la glándula mamaria, y que resulta en una disminución en la producción láctea del 4 al 30% de leche y deterioro en la calidad de la producción. Pero además de sus consecuencias en lo que a la producción láctea respecta, también representa un riesgo potencial a la salud pública debido a la posible contaminación de la leche y sus productos, además de incrementar los costos

del cuidado de la salud del hato y un desecho prematuro de animales (Bedolla & Ponce de León, 2008; Velázquez *et al.*, 2005). Desde el punto de vista de la agroindustria, la mastitis bovina ha sido identificada como una de las enfermedades más costosas de la producción lechera a nivel mundial (López *et al.*, 2006; Miranda *et al.*, 2008).

En México existen numerosos reportes acerca de la incidencia de mastitis subclínica (Gerlach *et al.*, 2009). Sin embargo, este problema no es exclusivo de nuestro país. La mastitis se encuentra ampliamente diseminada en los hatos lecheros en muchos países del mundo. En el ámbito de la medicina veterinaria, se distinguen dos formas de presentación de mastitis: la clínica y la subclínica. La mastitis clínica se acompaña por signos visibles que incluyen cambio en la coloración de la leche e inflamación de la glándula mamaria, fiebre y en algunos casos severos anorexia y muerte. Por otra parte, la mastitis subclínica puede llegar a pasar desapercibida, y su diagnóstico precisa el uso de técnicas de laboratorio como es el conteo de células somáticas (Ortiz & Vera, 2006; Shoshani *et al.*, 2000).

Dentro de los agentes infecciosos que causan la mastitis, se encuentra *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), que es el agente patógeno contagioso más importante asociado con la mastitis (Miranda *et al.*, 2008). La mastitis por *S. aureus* ocasiona un aumento considerable en la producción de leucocitos y células somáticas en la leche, que llega a ser mayor a 10^6 cels/ml, con un aumento predominante de polimorfonucleares (Leitner *et al.*, 2003).

Durante el proceso de infección en la glándula mamaria por *S. aureus*, se desarrolla un proceso inflamatorio, posterior a la colonización de la bacteria, lo que daña la actividad secretora del acino glandular; esto se debe a que la infección puede dar pie a una degeneración vacuolar de las células epiteliales, úlceras en el conducto excretor, microabscesos y abscesos, e incluso necrosis del tejido glandular (Kluytamns *et al.*, 1997).

Cabe reiterar que es sumamente importante mantener la salud de la glándula mamaria en las vacas de los hatos lecheros, para obtener buena calidad e inocuidad de la leche al

evitar la contaminación microbiológica del producto y sus derivados por agentes patógenos de origen animal, ya que esto constituye un riesgo para la salud pública al ocasionar enfermedades transmitidas por los alimentos (Gajadhar & Allen, 2004).

2.3. Biología del *Staphylococcus aureus*

El *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) pertenece a la familia *Staphylococcaceae*, observados por primera vez por los padres de la microbiología, Robert Koch y Louis Pasteur. Hacia 1880, fue Alexander Ogston quien acuñó el término *Staphylococcus*, el cual se deriva del griego *staphyle* = racimo y *kokkos* = granos, y él mismo fue quien descubrió *S. aureus*.

S. aureus es un coco Gram-positivo (de 0.5 a 1.5 μm de diámetro), que se agrupa en racimos debido a su capacidad para dividirse en tres planos, es aerobio y anaerobio facultativo, no presenta movilidad, y no presenta capsula. Es capaz de crecer hasta en soluciones acuosas con un 20% de sal común; por esto puede crecer en agua de mar. Es un agente catalasa y coagulasa positivo. Es bastante resistente a la desecación, la congelación y al calor (Fuello, 2005). Muestra hemólisis en medios con sangre. Su característica bioquímica más importante es la fermentación de varios azúcares, entre ellos, el manitol para producir ácido láctico. La principal característica que diferencia a *S. aureus* de los demás estafilococos es la producción de la enzima coagulasa que coagula el plasma citratado (García *et al.*, 2005).

2.4. Resistencia de *Staphylococcus aureus* a los antibióticos β -lactámicos

Debido a la prevalencia de *S. aureus* como causante de mastitis clínica y subclínica, es necesario el empleo de antibióticos capaces de eliminar la infección. Sin embargo, con el

paso del tiempo, la inadecuada dosificación y el uso indiscriminado de los antibióticos han dado pie a un amplio desarrollo de cepas resistentes, debido a la incapacidad del antibiótico para alcanzar niveles terapéuticos en el sitio de la lesión que eliminen al agente causal. A la fecha, se han observado cepas de *S. aureus* resistente y multi-resistente (Bustos *et al.*, 2006; ?).

De acuerdo con Hendrikson (2008), en los últimos años la resistencia antimicrobiana es un problema cada vez más importante entre varios patógenos bacterianos causales de infección tanto en animales como en seres humanos.

Los medicamentos comúnmente usados para el tratamiento de mastitis son los β -lactámicos, aminoglucósidos, macrólidos y lincosamidas. Los agentes antimicrobianos β -lactámicos, que incluyen las penicilinas y las cefalosporinas, afectan la pared celular bacteriana produciendo lisis a la bacteria (Gentilini *et al.*, 2000). La antibioterapia con los β -lactámicos se considera a partir de los diferentes grupos clasificados en su desarrollo generacional como:

- 1.- Primera generación: Penicilina G, Penicilina V, Feneticilina y las resistentes a las Penicilinas, como Metecilina, Nafcilina, Oxacilina, Dicloxacilina y Flucloxicilina.
- 2.- Segunda generación o de amplio espectro: Ampicilina, Amoxicilina y Hetacilina.
- 3.- Tercera generación de amplio espectro mejorado: Ticarcilina, Carbencilina y Bacampicilina.
- 4.- Cuarta generación o aminopenicilinas: Mezclocilina, Piperacilina y Azlicilina (Sumano & Camberos, 2007).

El *S. aureus* puede desarrollar resistencia a las penicilinas a través de la producción de enzimas, como las β -lactamasas, que hidrolizan a las penicilinas simples y ampicilinas de amplio espectro (Hernández *et al.*, 1991). Este tipo de resistencia apareció al principio de la década de 1950 y se continuó rápidamente con la resistencia a los antibióticos macrólidos,

aminoglucósidos y tetraciclinas (Davis *et al.*, 1996). Las bacterias se hacen o son resistentes mediante la producción de β -lactamasas, enzimas que atacan el núcleo β -lactámico. Estas lactamasas pueden ser específicas contra cefalosporinas, contra penicilinas o contra ambas (Lagunas, 2002).

El término “meticilina resistente” implica resistencia a todas las penicilinas resistentes a la penicilinasasa (Meticilina, Nafcilina, Oxacilina, Cloxacilina y Dicloxacilina), y esencialmente, al resto de los antibióticos β -lactámicos. Así mismo, la mayoría de cepas son también resistentes a la Eritromicina, Clindamicina, Tetraciclina y aminoglucósidos (Pahissa, 1997).

El incremento exponencial de la resistencia a los antibióticos por parte de las cepas de *S. aureus*, particularmente en las multiresistencias a Oxacilina y Meticilina (ORSA/MRSA) en las vacas lecheras, pueden contribuir a incrementar la preocupación humana por cepas MRSA de origen bovino aisladas en humanos (Lagunas *et al.*, 2003; Lohet *et al.*, 2009). Debido a su alta resistencia a la Meticilina, se les denomina *S. aureus* Meticilina Resistente (MRSA, por sus siglas en inglés), mismas que son causantes de brotes de infección hospitalaria. Estas cepas se identificaron por primera vez en Inglaterra en 1961, dos años después de la introducción de la Meticilina. Las cepas MRSA ingresan al medio hospitalario a través de pacientes, visitantes o trabajadores asistenciales. Aunque los pacientes hospitalarios constituyen el reservorio fundamental con altas tasas de prevalencia, el personal asistencial colonizado por cepas MRSA se puede convertir en fuente importante de infección para los pacientes más susceptibles (Londoño *et al.*, 2006).

Las cepas ORSA/MRSA son generalmente resistentes a otras familias de antibióticos (macrólidos, lincosamidas y aminoglucósidos), por lo que desde la aparición de estas bacterias multiresistentes, los glucopeptidos (en particular la vancomicina) se han convertido en las drogas de elección, y muchas veces la única opción terapéutica (Velázquez *et al.*, 2002).

Actualmente, las cepas de *S. aureus* Oxacilina/Meticilina resistentes (ORSA/MRSA) son consideradas un problema serio de salud humana a nivel mundial por el desarrollo de infecciones intrahospitalarias causantes de septicemias, neumonía, artritis, infecciones de tejidos blandos y aparato urinario, con un alto grado de morbilidad y mortalidad al desarrollar cuadros clínicos graves (Lee, 2003). Así mismo, el *S. aureus* puede causar intoxicaciones por cepas productoras de enterotoxinas por consumo de leche y sus derivados de origen alimentario (Lamprell *et al.*, 2004).

2.4.1. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana

Las pruebas para determinar el antibiótico más adecuado para el tratamiento eficaz de una enfermedad dada pueden llevarse a cabo a través del aislamiento obtenido de casos clínicos. Sin embargo, estas pruebas que se llevan a cabo *in vitro* no pueden contemplar varios factores que pueden afectar la actividad antibacteriana *in vivo*. Se dispone de varias pruebas de laboratorio para la determinación de la susceptibilidad antibacteriana, incluyendo la dilución en caldo, la difusión en discos, el gradiente de agar y algunos métodos automatizados (Quinn *et al.*, 2005).

Difusión en agar con discos

Este método se basa en la inhibición del crecimiento de la bacteria alrededor de un disco cargado con un antimicrobiano que difunde en un medio sólido. La técnica consiste en la siembra de una bacteria en la superficie de una placa con un medio de cultivo, sobre el que se depositan unos discos de papel cargados con una cantidad precisa de antibiótico, que difunde casi instantáneamente a través del agar, formándose un gradiente de concentración del mismo alrededor del disco. Posteriormente, la muestra se incuba a 37°C durante 18 horas (Prants, 2005).

El microorganismo crece en la superficie de la placa, pero alrededor de los discos se forman unos halos de inhibición más o menos grandes, dependiendo de la mayor o menor sensibilidad de la bacteria a cada antibiótico. Se mide el diámetro del halo (expresado en milímetros) y se contrasta con las tablas que correlacionan los diámetros con la sensibilidad. En la técnica de difusión se trabaja con puntos de corte basados en dos medidas, un diámetro menor del halo de inhibición, por debajo del cual el microorganismo es resistente (R), y un diámetro mayor, por encima del cual es sensible (S), entre ambos diámetros la sensibilidad se considera intermedia o indeterminada (I) (Prants, 2005).

2.5. Medicina alternativa tradicional

A lo largo de milenios, las plantas han sido ampliamente utilizadas para curar enfermedades y son estos conocimientos empíricos los que han impulsado a la comunidad científica a investigar los compuestos responsables de la actividad biológica, ya que constituyen un elemento terapéutico por excelencia en la medicina tradicional y popular (Sánchez *et al.*, 2012).

Las plantas medicinales y aromáticas (PMA) son bien conocidas por tener actividad antibacteriana contra diferentes agentes patógenos. Mas aún, el estudio de las plantas medicinales ha sido fundamental en el desarrollo de la medicina moderna (González *et al.*, 2004), ya que estas han sido y seguirán siendo una alternativa para la búsqueda de nuevas estructuras químicas que sirvan de base en el desarrollo de nuevos fármacos (Oliveira *et al.*, 2005; Schlaepfer & Mendoza-Espinoza, 2010).

La OMS (2002) define a las plantas medicinales como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos. En México, existen

cerca de 30,000 especies vegetales de las cuales en 1997 el Instituto Indigenista reportó que 3,000 tienen usos medicinales. Esto representa el 10 % del total de la riqueza florística del país (Aguilar, 2001). El uso de plantas empleadas en la medicina tradicional mexicana, indica que aproximadamente el 78 % de las plantas que prescriben los médicos tradicionales se emplean para tratar enfermedades cardiovasculares, infecciones respiratorias y de la piel, así como desordenes gastrointestinales, dolor y diabetes (Lozoya, 1999).

Es necesario entonces, hacer esfuerzos para evitar la pérdida definitiva del conocimiento tradicional sobre plantas medicinales; no solo para preservar esta herencia cultural, sino también para registrar la información sobre ciertas especies útiles, que podrían ser relevantes para el desarrollo de nuevas fuentes de medicamentos y de otros beneficios para la humanidad, contribuyendo, al mismo tiempo, a proteger la biodiversidad (Katewa *et al.*, 2004).

La investigación sobre el uso de plantas medicinales forma parte de la etnobotánica, que ha sido definida como el estudio de las interrelaciones entre los grupos humanos y las plantas (Gómez, 2002; Martin, 2001). Por su naturaleza interdisciplinaria, esta disciplina abarca muchas áreas, incluyendo: botánica, química, medicina, farmacología, toxicología, nutrición, agronomía, ecología, sociología, antropología, lingüística, historia y arqueología, entre otras; esto permite un amplio rango de enfoques y aplicaciones (Martin, 2001).

Se estima que únicamente alrededor de un 5 % de las especies han sido sometidas a la validación química, farmacológica y biomédica, lo cual marca un campo de estudio importante (Schlaepfer & Mendoza-Espinoza, 2010). Así mismo, el uso terapéutico de los fitocompuestos requiere de una valoración químico-farmacológica y terapéutica para obtener fitofármacos con potencial para aplicaciones reales como terapéuticos (OMS, 2002).

2.5.1. Utilización de extractos vegetales

El uso de compuestos naturales obtenidos de las plantas data de mucho tiempo atrás (Shiva Ramayoni, 2007). Un sinnúmero de extractos de plantas se han utilizado desde hace siglos (o quizás incluso milenios) para el tratamiento de un gran número de procesos patológicos.

A menudo, los extractos naturales deben su actividad biológica al sinergismo entre los diversos compuestos presentes en ellos, ya que éstos por separado poseen menor actividad que cuando se encuentran juntos. Así mismo, se ha postulado que la toxicidad de los extractos es reducida cuando se encuentran todos sus compuestos que cuando se encuentran purificados (Martínez, 2007).

En este sentido, se han desarrollado alternativas naturales, entre las cuales se encuentra el uso de extractos vegetales, con los que se han obtenido resultados prometedores en diversos ámbitos, tal como la agricultura y la medicina. Además, los extractos vegetales tienen las ventajas de poseer un origen biológico, ser biodegradables y manifestar un mínimo impacto negativo sobre la salud humana y el medio ambiente (Barrera & Bautista, 2008). Diversos estudios han demostrado la actividad antimicrobiana de diferentes extractos de plantas, tanto *in vitro* como *in vivo* (Garduño *et al.*, 2010).

2.6. Producción de cítricos en México

La citricultura mexicana aporta el 15 % de la producción mundial. En naranja, México ocupa el cuarto lugar después de Brasil, Estados Unidos y China, y es el productor número uno de limón mexicano y persa. Del total de la superficie plantada de frutales en el país, los cítricos representan el 44 %. En México, los cítricos se cultivan en 23 estados de la República generando una producción de 5.5 millones de toneladas. De la producción nacional, alrededor de un 15 % se destina a la industria, a partir de lo cual se estima que aproximadamente

unas 189,750 toneladas de cáscara se desperdician en la industria cada año. Los estados que destacan por su producción son: Baja California Sur, Campeche, Colima, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Nuevo León, Oaxaca, Quintana Roo, Puebla, San Luis Potosí, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán (SAGARPA, 2009).

México está ubicado en el primer lugar mundial en la producción de limones y limas. En el escenario de los frutales en México, el cultivo del limón mexicano es uno de los principales frutales dentro de los 112 reportados por el Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta (SIACON), después de la naranja sin clasificar y la naranja Valencia. Los principales estados productores de limón mexicano son Colima, Michoacán y Oaxaca; En el 2003, Guerrero fue la única entidad federativa productora de limón real (SAGARPA, 2009). En México, según el Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), actualmente Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER), se reportan 4 tipos de limón:

- a) Limón mexicano o agrio (*C. aurantifolia*); Es el limón de uso común, de coloración verde, tamaño mediano, con semillas.
- b) Limón persa (*C. latifolia*); Este es un limón sin semillas, se utiliza principalmente para decorar platillos.
- c) Limón italiano (*C. lemon*)
- d) Limón real (*C. limon*)

Sólo México, Brasil, Egipto y Perú producen limón mexicano. Dadas sus condiciones climáticas, México dispone de limón durante todo el año, acentuando su producción en el periodo comprendido de mayo a octubre.

2.6.1. Limón Mexicano (*Citrus aurantifolia*)

La lima, también conocida como limón criollo, limón agrio o limón mexicano (Francis, 2016), es originaria del sureste de Asia, especialmente en el oriente de la India, y fue introducida por los españoles en las islas del Caribe y México (SAGARPA, 2005). El limón es el fruto de un árbol que pertenece a la familia de las Rutáceas y cuyo nombre científico es *Citrus aurantifolia* (*C. aurantifolia*). Este es un árbol pequeño, muy ramificado, de entre 4 y 5 m de altura, con un tronco torcido y ramas provistas de espinas (Lota *et al.*, 2002).

Las hojas son más anchas en la punta y en el centro que en la base, el soporte de la hoja es un poco alado. Sus flores son pequeñas, solitarias y blancas. Los frutos son pequeños, de 3 a 6cm de largo, y de color verde amarillento cuando maduros. La pulpa es abundante, muy ácida y las semillas son de color blanco y pequeñas. Siendo una planta originaria de la India y sureste asiático, principalmente habita en climas cálido y semicálido, además de semiseco y templado, en un rango de altitudes que abarca desde el nivel del mar hasta los 2600m. Adaptada a distintos hábitats, es cultivada en huertos familiares, asociada con vegetación circundante de bosque tropical caducifolio, subcaducifolio y perennifolio, matorral xerófilo, pastizal, bosque mesófilo de montaña y bosque mixto de pino-encino (Osuna *et al.*, 2005).

Etnobotánica

Los principales países productores de *C. aurantifolia* son Brasil, México, Jamaica, Haití, Martinica, Kenia, India, Estados Unidos y Egipto (Frutos Tropicales, 2016). En México, los cítricos ocupan el 40 % de la superficie de producción frutícola desde Colima hasta Oaxaca; asimismo, se han identificado varias especies de limón: ácidas y dulces. Dentro de las ácidas se encuentra el limón mexicano y el limón persa (*Citrus latifolia*), ocupando el 80 y 20 %, respectivamente, de la superficie nacional plantada de limones (SAGARPA, 2005).

El limón es ampliamente utilizado en la industria alimenticia. De hecho, uno de los principales subproductos es el aceite esencial que es utilizado como potenciador de sabor en alimentos y bebidas, además de ser ingrediente indispensable en los perfumes y en la industria farmacéutica para enmascarar sabores desagradables de algunos medicamentos (Lota *et al.*, 2002). Cabe mencionar que, en México, el aceite esencial es el principal subproducto de exportación (SAGARPA, 2005).

Información Fitofarmacológica

C. aurantifolia es un árbol frutal y medicinal, del que se han demostrado sus propiedades antibacterianas principalmente, tanto de las hojas, tallo y fruto, como de su aceite esencial.

Cuadro 2-1: Información farmacológica de *Citrus aurantifolia*.

Extracto, compuesto o parte de la planta utilizada	Actividad biológica	Modelo biológico
Acuoso de hoja	Antibacteriana	<i>Staphylococcus aureus</i>
Acuoso del fruto	Antibacteriana	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i>
Acuoso del tallo y raíz	Antibacteriana	<i>Staphylococcus aureus</i>
Aceite esencial	Antibacteriana	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Shigella sonnei</i>
Ácido cítrico	Antiinfecciosa	

Fuente: Osuna *et al.* (2005).

Este árbol ha sido ampliamente estudiado, y de él se han aislado los siguientes compuestos: Ácidos (cáprico, coprílico, decanóico, fórmico, hidrocianico, isovalérico, laúrico, mirístico, nonanóico, oxálico, esteárico); Alcoholes (decil, dodecil, ergosterol, etílico, metil antralinato, nolil, fenetil, Pirocatecol); Aldehidos (acetaldehído, benzaldehído, isovaleraldehído); Monoterpenos (borneol, decanal, furfural, carveno, citral), Flavonoides

(quercetina); Saponinas; Aceite: limoneno; Otros compuestos: triptamina: quinolina; carvona, cresol, guayacol, esperidina, narcotina, noradrenalina; Proteina: tiramina. (Osuna *et al.*, 2005).

En el endocarpio solo se han detectado: Ácidos Orgánicos (cítrico, málico).

En la corteza se ha aislado: Aceites (limoneno, linalol, nerol).

En las hojas se han identificado: Alcaloides; Aceite esencial (limoneno, linalol, nerol).

Flavonoides (hesperidosido) y Flavón (diomosido).

En su aceite esencial: Cumarina: α -bergapteno; Monoterpeno: iso- γ -geraniol.

(Osuna *et al.*, 2005)

En general, los cítricos han sido objeto de una multitud de estudios químicos para identificar los compuestos presentes en la planta, así como para evaluar la actividad farmacológica de algunos de sus extractos o compuestos (Sandoval, 2011).

2.7. Uso de extractos herbolarios de

Citrus aurantifolia como antimicrobiano

En vista de que muchas cepas bacterianas desarrollaron una gran resistencia a los antibióticos sintéticos, se ha optado por implementar el uso de plantas y extractos vegetales para tratar problemas clínicos. Por lo tanto, ha habido un creciente interés en investigar fuentes alternativas de compuestos antimicrobianos, especialmente provenientes de productos naturales como aceites esenciales (AE) y extractos de plantas, en un intento por descubrir nuevas clases químicas de drogas que ofrezcan posibles soluciones a estos problemas (Ho *et al.*, 2001).

Estudios previos han demostrado que los Aceites Esenciales (AE) poseen propiedades

antibacterianas y se han proyectado como fuentes potenciales de nuevos compuestos antimicrobianos. Crucialmente, algunos de estos muestran actividad inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus*.

Una característica importante de los aceites esenciales y sus componentes es su hidrofobicidad, pues esta permite crear particiones con los lípidos de la membrana celular de bacterias y mitocondrias, distorsionando las estructuras de las células para hacerlas más permeables (Ho *et al.*, 2001).

En la mayoría de los estudios, las bacterias Gram-positivas tienden a ser más resistentes a los aceites esenciales que las bacterias Gram-negativas. Sin embargo, la investigación sobre las propiedades antimicrobianas de *C. aurantifolia* es todavía escasa. Por tanto, todavía resta mucho por descubrir acerca de la actividad antimicrobiana de *C. aurantifolia* contra una amplia gama de microorganismos como bacterias, levaduras y hongos (Solórzano y Miranda, 2012).

Los aceites esenciales de cítricos, los cuales son extraídos a partir de la cascara de los frutos, están dentro de los productos más utilizados en el mundo (Bousdia *et al.*, 2009). Los flavonoides han demostrado actividad antimicrobiana en varios estudios (Tim Cuchine & Lamb, 2005). Se ha encontrado que los cítricos pueden ser usados para inhibir las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como las levaduras, mohos y bacterias causantes de intoxicación alimentaria, pero aún falta por hacer en lo que a la evaluación de su potencial respecta (Deans & Ritche, 1987).

Sin embargo, hay suficiente evidencia de que los compuestos obtenidos de la familia de los cítricos, incluidos los del limón *Citrus aurantifolia*, han demostrado tener un efecto potencial antimicrobiano (Burt, 2001; Dugo & Di Giacomo, 2002).

Por ejemplo, un estudio chileno reciente se centró en la evaluación del uso popular de las plantas medicinales, donde el principal objeto de estudio es la composición química de los aceites esenciales y el análisis antimicrobiano de varias plantas que crecen en Chile y Perú, incluyendo *Citrus aurantifolia* (Benites *et al.*, 2011). En particular, este estudio reporta el potencial uso de cascaras de frutas con alta capacidad antioxidante y antimicrobiana como ingredientes en la industria alimentara y farmacéutica (fitofármacos). En otro estudio independiente, se demostró que la cáscara de bergamota, perteneciente a los cítricos, contiene aceites esenciales que son una fuente potencial de antimicrobianos naturales (Mandalari *et al.*, 2007). En otro estudio, Nogata *et al.* (2006), logró determinar que hay una alta concentración de distintos flavonas y flavonoides presentes tanto en la corteza de los árboles de cítricos como en los frutos, incluyendo las cáscaras.

En resumen, existe una amplia gama de triterpenos altamente oxigenados, en las familias Rutaceae y Meliaceae, que reciben el nombre de Limonoides. Estos compuestos han sido ampliamente estudiados y se han comprobado una extensa gama de actividades tales como anticancerígenas, anti-maláricas, insecticidas, antimicrobianas, e incluso antivirales con aplicaciones contra el VIH (Roy & Sarag, 2006).

Capítulo 3

Justificación

Debido a que muchas cepas bacterianas han desarrollado una gran resistencia a los antibióticos, se han tenido que investigar nuevos compuestos para poder obtener alternativas de tratamiento de infecciones causadas por estas. Tal es el caso de *Staphylococcus aureus*, el cual tiene gran importancia para la salud pública por su gran resistencia tanto en animales como en humanos, así como su fácil diseminación y la resistencia a factores ambientales como altos niveles de salinidad, temperaturas altamente elevadas o bajas, y condiciones de humedad.

En este sentido, el *S. aureus* ORSA/MRSA representa un gran problema en la actualidad debido a las dificultades para controlar sus brotes, lo que ha causado grandes problemas en los hatos lecheros a nivel mundial. Por esta y otras razones, se ha optado por regresar al uso de las plantas como elementos promotores de nuevas sustancias químicas con propiedades antimicrobianas, que pudieran ser utilizadas como futuros medicamentos para hacer frente a las demandas que surgen a raíz de estos problemas.

En México, los cítricos representan el 44 % del total de la superficie plantada de frutales en el país. Sin embargo, a pesar de todos los posibles usos y beneficios de estos compuestos, las cáscaras continúan siendo un material de desecho en, por ejemplo, la industria de jugos,

así como también las hojas al momento de la poda de estos árboles frutales, desperdiciándose así gran cantidad de estos biocompuestos.

El tratamiento de diferentes enfermedades, incluidas las de etiología infecciosa, constituyen en la actualidad un desafío en la medicina, y la utilización de sustancias naturales se ofrece como una alternativa de tratamiento frente a la resistencia bacteriana ocasionada por el uso indiscriminado de antibióticos sintéticos, lo cual ha dado pie a que las infecciones bacterianas se conviertan en un problema de salud importante en todo el mundo.

Esta tesis se desarrolla en este preámbulo, y en ella se sostiene que es preciso investigar y experimentar con la fitoterapia. Particularmente interesante es el caso de *Citrus aurantifolia* que, por sus propiedades antimicrobianas, nos brinda la oportunidad de desarrollar nuevos conocimientos, y proponer nuevas alternativas para la producción de tratamientos de origen vegetal.

Como ya se ha mencionado, existen estudios sobre la familia de los cítricos donde se ha determinado su actividad como hierbas aromáticas antimicrobianas. Por tanto, los fitocompuestos presentes en los extractos de *Citrus aurantifolia* estudiados como parte de esta tesis pueden ofrecer una alternativa en el control del ciclo de infección y contaminación de los productos de origen animal.

Capítulo 4

Hipótesis

Las propiedades, así como los niveles de efectividad de los extractos de origen vegetal, varían de acuerdo con el método de extracción utilizado.

En esta tesis, se produjeron extractos crudos alcohólico y acuoso obtenidos de la cáscara y hoja de limón (*Citrus aurantifolia*) con la finalidad de analizar las diferencias en la actividad antimicrobiana *in vitro* sobre los aislamientos de *Staphylococcus aureus* ORSA/MRSA obtenidos de vacas de un hato lechero familiar, mostrando un incremento de la actividad antimicrobiana los extractos de cascara de limón en comparación con los extractos de hoja de limón.

Capítulo 5

Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto antimicrobiano *in vitro* de los extractos crudos obtenidos de la cáscara y hoja del limón *Citrus aurantifolia* contra cepas de *Staphylococcus aureus* aislados de vacas con mastitis subclínica en un hato lechero familiar.

Objetivos específicos

1. Realizar un estudio sistemático de las diferencias en la sensibilidad *in vitro* de los extractos crudos acuoso y alcohólico de *Citrus aurantifolia* obtenidos de hoja y cáscara.
2. Evaluar la actividad *in vitro* de los extractos crudos obtenidos de *Citrus aurantifolia* contra cepas de *Staphylococcus aureus* ORSA/MRSA.

Capítulo 6

Material

6.1. Material Biológico

30 cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas a partir de muestras de leche de vaca de una unidad de producción lechera de tipo familiar localizada en el Valle de Toluca.

Cepas de referencia:

- Cepa de *Staphylococcus aureus* sensible [ATCC 29213]
- Cepa de *Staphylococcus aureus* intermedia [ATCC 25923]
- Cepa de *Staphylococcus aureus* resistente [ATCC 43300]

6.2. Material de Muestreo

- Bolsas con refrigerante
- Termo de poliuretano
- Desinfectante yodado 500 ppm
- Etiquetas autoadheribles

- Hojas de registro
- Gradilla metálica
- Marcador
- Guantes de látex
- Torundas con alcohol etílico al 70 %
- Toallas desechables
- Tubos de ensayo de 20 x 125 mm con tapón de rosca.
- Bolsas de plástico con cierre hermético

6.3. Material de Laboratorio

a) Medios de cultivo

- Agar Base de Gelosa Sangre (Bioxon)
- Agar Vogel Johnson (Bioxon)
- Agar Sal y Manitol (Bioxon)
- Agar triple Azúcar y Hierro TSI (Bioxon)
- Caldo Müller-Hinton (Bioxon)
- Agar Müller-Hinton (Bioxon)
- Cloruro de sodio (Baker)
- Telurito de Potasio (Sigma Chemical)

b) Cristalería

- Cajas de Petri de vidrio de 15 x 100 mm

- Porta objetos de 26 x 62 mm
- Tubos de ensayo con tapón de rosca de 13 x 100 mm

c) Equipo

- Asa bacteriológica de nicromel de 10 μL .
- Autoclave
- Balanza analítica (Ohaus)
- Balanza granataria 2.610 g (Ohaus)
- Baño María de 0 a 80°C
- Estufa bacteriológica (Riossa)
- Gradillas metálicas
- Mecheros Bunsen de alta temperatura
- Microscopio óptico (Carl-Zeiss)
- Micropipetas de 0.5-10.5, 5.0-50, 20.0-200, 200-1000 μL
- Refrigerador (Nieto)
- Vortex (Thermolyne / Maxi min II)

d) Reactivos y sustancias

- Agua destilada
- Clorhidrato de oxacilina (Sigma, Chemical)
- Tren de tinción de Gram
- Unidiscos de Penicilina (10 UI), Amoxicilina/Ácido clavulánico (20/10 μg), Cefoxitina (30 μg) Vancomicina (30 μg) y Oxacilina (1 μg) (BBL-Becton Dickinson; Loveton Circle Sparks, USA)
- Unidiscos de papel filtro Whatman 40 estériles

Capítulo 7

Método

7.1. Población de estudio

El estudio se realizó en una unidad de producción lechera semi-intensiva, similar a las descritas para el tipo familiar, localizada en el Valle de Toluca (Manjarrez *et al.*, 2008). Específicamente, la unidad de producción se localiza en las coordenadas 19°24'50.8"N, 99°41'10.4"W. Esta unidad está caracterizada por un tamaño de hato de 35 vacas en línea de ordeño, con un nivel de producción de 15 litros/vaca/día. El manejo del ganado es semi-tecnificado con pastoreo y suplementación con concentrado. El ordeño es automatizado, con dos ordeños por día.

7.2. Obtención de las muestras

Durante la ordeña, se obtuvieron 140 muestras de leche a partir de muestras individuales obtenidas de cada cuarto glandular, de cada vaca en la línea de ordeño. Las muestras se extrajeron mediante ordeño manual, y la leche fue depositada en tubos de ensayo de plástico estériles, obteniéndose un volumen de 10 a 15 mL. Los tubos se depositaron en una hielera y se mantuvieron a una temperatura de alrededor de 4°C hasta el momento de su análisis

microbiológico en laboratorio.

7.3. Aislamiento e identificación microbiológica

En el laboratorio, las muestras de leche se incubaron en baño María a una temperatura de 37°C por 15 minutos. Posteriormente se agitaron con un vortex por 15 segundos, con la finalidad de homogeneizar las muestras (NMS, 2005).

A partir de las muestras incubadas, se tomó una muestra de 0.01 ml de leche y se inoculó en placas de agar sal manitol a una temperatura de 37°C durante 24 horas. Posteriormente, se observaron las Unidades Formadoras de Colonias (UFC), describiéndose las características observadas con un Color: blanco grisáceo, amarillo doradas o cremosas, Diámetro: de 1-2 mm, Forma: convexa, Fermentación de manitol: positivo o negativo (García *et al.*, 2005).

A continuación, se realizaron las pruebas de tinción de Gram, coagulasa en tubo, fermentación anaerobia de manitol, catalasa en placa, maltosa y trealosa.

7.4. Sensibilidad *in vitro* a la oxacilina

Se empleó el método de Kirby-Bauer modificado, de acuerdo al procedimiento descrito por National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2001). Se seleccionaron 4 o 5 colonias bien aisladas de igual morfología de la placa de cultivo, las cuales fueron depositadas en 2 a 3 ml aproximadamente caldo Infusión Cerebro-Corazón (BHI, por sus siglas en inglés), tocando la parte superior de cada colonia seleccionadas de una placa de cultivo no selectivo que no sobrepasen las 18 a 24 horas de incubación.

Inmediatamente, la suspensión debe ser ajustada al Estándar 0.5 de McFarland, lo que es

equivalente a una densidad celular de aproximadamente 10^8 UFC/mL. Se ajustó la turbidez del inóculo por comparación visual con el estándar, para lo cual se observaron los tubos contra un fondo blanco con una línea negra como contraste.

Dentro de los 15 minutos después de haber ajustado el inóculo, se sembraron las placas de Müller-Hinton con ayuda de un hisopo estéril de algodón, el cual se humedeció con la suspensión y se distribuyó uniformemente en toda la superficie del medio. Una vez hecho esto, se dejó a una temperatura ambiente durante 5 minutos y transcurrido el tiempo se depositaron los discos de Oxacilina ($1\mu\text{g}$). Los halos de inhibición expresados en mm se compararon con el estándar establecido con los valores de referencia (NCCLS, 2000). Los antibiotipos identificados se consideraron como OSSA (*Staphylococcus aureus* sensible a oxacilina) y ORSA (*Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina).

7.5. Susceptibilidad *in vitro* de *S. aureus* a los antibióticos

La prueba de sensibilidad *in vitro* para los antibióticos β -lactámicos se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2001). Para ello se seleccionaron 4 o 5 colonias bien aisladas de igual morfología de la placa de cultivo, las cuales fueron depositadas en 2 a 3 ml aproximadamente de caldo Müller-Hinton. El inóculo se suspendió en el medio de cultivo. Los tubos de cultivo se incubaron a 37°C durante 3 a 5 horas. El inóculo se ajustó a una concentración aproximada de 10^8 UFC/mL, equivalente al Estándar 0.5 de McFarland. Se tomó el inóculo con un hisopo de algodón ligeramente humedecido, evitando el exceso mediante la rotación en las paredes del tubo, y se distribuyó uniformemente en las placas de agar Müller-Hinton. El medio se dejó reposar a una temperatura ambiente durante 5 minutos. Una vez hecho esto, se depositaron cada uno de los discos de Penicilina (10UI), Amoxicilina/Ácido clavulánico (20/10 μg), Cefoxitina (30 μg), Vancomicina (30 μg) y Oxacilina (1 μg), y se incubaron a una temperatura de 37°C por 24 horas. Los halos de inhibición se estimaron

para determinar la sensibilidad de los aislamientos de *Staphylococcus aureus* considerados como resistentes, intermedios y sensibles a los antibióticos.

Como controles de la prueba, se utilizaron las cepas de *S. aureus* ATCC 29213, ATCC 25923 y ATCC 43300.

Para caracterizar la resistencia de *S. aureus* a la Meticilina, se emplearon los unidiscos de Oxacilina (1 μ g), Cefoxitina (30 μ g) y Amoxicilina/Ácido clavulánico (20/10 μ g) (CLSI, 2012).

7.6. Confirmación de la resistencia a la Oxacilina

La resistencia a la Oxacilina se confirmó mediante el método de difusión en discos, también conocido como Método Kirby-Bauer. Los unidiscos de Oxacilina (1 μ g) se colocaron sobre la superficie de las placas, y las cepas de estudio se sembraron por duplicado, incubándose simultáneamente a 35° y 42°C durante 24 horas. Posteriormente, se midieron los halos de inhibición del crecimiento de ambas placas y se consideraron Oxacilina resistentes aquellas cepas que mostraron una diferencia mayor a 4 mm de diámetro entre los halos de inhibición de las 2 temperaturas.

7.7. Determinación del fenotipo MRSA

La determinación del fenotipo MRSA fue basada en el Método de Tamizado en Placa (Oxacilina Screen Plate) en agar Müller-Hinton, comúnmente utilizado para la detección de cepas ORSA/MRSA. Siguiendo el protocolo descrito por Palavecino (2002), cada cepa de trabajo se suspendió e inoculó en 1mL de caldo Müller-Hinton durante 4 horas a 37°C. Cada cultivo se inoculó por duplicado, depositando aproximadamente 10 μ L en placas de Agar Müller-Hinton adicionadas con 4% de NaCl (sal común), a las cuales se les agregó las diferentes concentraciones de Oxacilina: 2, 4 y 6 μ g/mL. Una vez hecho esto, se incubaron

por 24 horas a 37°C. Para esta prueba, se consideraron como positivas a ORSA/MRSA aquellas cepas que toleraron concentraciones de 6µg/mL de Oxacilina (CEQA, 1998). Las cepas ATCC 29213 (sensible) y ATCC 43300 (resistente) se emplearon como controles positivos.

El diámetro de las zonas de inhibición se determinó al finalizar un periodo de 24 horas de incubación a 37°C, y fueron comparadas con los valores establecidos por (NCCLS, 2000) para determinar el fenotipo de resistencia, intermedio y con sensibilidad a los antibióticos para el género *Staphylococcus spp*:

Cuadro 7-1: Valores de referencia a la sensibilidad *in vitro* de *S. aureus*.

Antibióticos	Halos de inhibición expresados en mm		
	Sensible	Intermedia	Resistente
PENICILINA	≥29 mm	-	≤ 28 mm
AMOX/AC. CLAV	≥20 mm	-	≤ 19 mm
OXACILINA	≥13 mm	11-12 mm	≤ 10 mm
CEFOXITINA	≥18 mm	15-17 mm	≤ 14 mm
VANCOMICINA	≥17 mm	15-16 mm	≤ 13 mm

Fuente: NCCLS (2000).

7.8. Preparación de los extractos de *Citrus aurantifolia*

Obtención de la materia vegetal

La recolección del material vegetal del limón (*Citrus aurantifolia*) fue llevada a cabo en la localidad de San Felipe los Alzati, perteneciente al municipio de Zitácuaro, Michoacán, con ubicación satelital en las coordenadas: 19°29' 23.5"N, 100°22' 3.6"W. La recolección se realizó durante los meses de Febrero - Marzo en el año 2016. En total, se obtuvieron 10 kg

de limones y 3 kg de hojas frescas del limón, perteneciente a la familia *Citrus aurantifolia*, para la realización del estudio.

Preparación de la muestra

Limones

Los limones de *C. aurantifolia*, fueron lavados con agua corriente y posteriormente se pelaron para la utilización de la cáscara. Estas fueron depositadas en bolsas de plástico estériles, mismas que fueron debidamente pesadas para obtener así la cantidad exacta de kg de cáscara fresca. Posteriormente, estas fueron transportadas en termo refrigerante para su posterior utilización en el laboratorio. Una vez en el laboratorio, las cáscaras fueron sometidas a un proceso de deshidratación en horno a una temperatura de 37°C, mismo que tomó varios días. Una vez desecadas las cascaras, estas fueron molidas.

Hojas de limón

Las hojas de limón se lavaron de igual forma con agua corriente. Posteriormente, estas fueron empacadas en bolsas de plástico estériles y conservadas en un termo refrigerante para su posterior utilización. Al igual que las cascaras, estas se sometieron a un proceso de deshidratación en horno a 37 ° C durante varios días; una vez desecadas las hojas, estas se molieron.

Preparación de los extractos crudos

Extractos alcohólicos de hoja y cascara de limón

Se prepararon soluciones utilizando 12.5 g de soluto en 100 ml de solvente, donde se utilizó una mezcla de agua destilada, etanol y metanol a una proporción 8:1:1 respectivamente. La

mezcla se depositó en frascos de plástico blanco y se agitó en forma circular manualmente 50 veces aproximadamente. Posterior a esto, se dejó reposar 48 horas. Transcurrido dicho tiempo, la mezcla se sometió a baño María por 1 hora a una temperatura de 30°C. Posteriormente, el extracto se filtró utilizando papel filtro.

Extractos acuosos de hoja y cascara de limón

Nuevamente, se prepararon soluciones con 12.5 g de soluto compuesto de materia seca tanto de hoja como cascara por separado, en 100 ml de solvente, compuesto de agua destilada y acetona a una proporción de 7:3 respectivamente. La mezcla fue depositada en frascos de plástico blanco y se agitó manualmente en forma circular 50 veces aproximadamente. Posterior a ello, la mezcla se dejó reposar 48 horas; al finalizar el periodo de reposo, se sometió a baño María por 1 hora a 30°C. Finalmente, se filtró el extracto utilizando papel filtro.

7.9. Sensibilidad in vitro al extracto crudo de *Citrus aurantifolia*

El estudio de la sensibilidad de las cepas de *S. aureus* ORSA/MRSA obtenidas de vacas lecheras a los extractos de *C. aurantifolia* requiere de una comparación sistemática con las siguientes 3 cepas control: ATCC 25923, ATCC 29213 y ATCC 43300. Tanto las cepas aisladas como las de control fueron sometidas al ensayo in vitro de inhibición ante los extractos alcohólico y acuoso de hoja y cáscara de *Citrus aurantifolia*.

La actividad antimicrobiana de los extractos de *C. aurantifolia* contra los patógenos clínicos de prueba se determinó por medio del método estandarizado de difusión en disco, también conocido como Método Kirby-Bauer. Como parte del análisis, se utilizó la porción acuosa obtenida de la preparación de los extractos. En lo que a las bacterias patógenas respecta, fue necesario preparar suspensiones celulares de turbidez equivalente al Estándar

0.5 de la escala McFarland (108 UFC/ml), a partir de las cuales se sembraron los patógenos en cajas Petri con agar Müller-Hinton de manera homogénea. Para lograr esto, se usaron discos de papel filtro (Papel Whatman no. 4) de 6mm de diámetro, impregnados con 10, 20, 30, 40, 50 μ l de las muestras, los cuales fueron colocados sobre la superficie del agar. Como control negativo de actividad, se utilizó un disco impregnado con agua destilada. Las cajas se incubaron a 37°C durante 24 y 48 h. Zonas claras de inhibición alrededor de los discos indicaron actividad antimicrobiana. La determinación se llevó a cabo por triplicado, con la finalidad de descartar errores en la preparación de las muestras.

7.10. Evaluación de resultados

Los resultados fueron evaluados mediante estadística descriptiva a partir de los cuadros de datos que se encuentran mas adelante. La prueba de sensibilidad *in vitro* fué evaluada mediante el estadístico de Chi-cuadrada (χ^2) al comparar los halos de inhibición desarrollados por los extractos obtenidos de las hojas y la cáscara del limón mexicano (*Citrus aurantifolia*).

Capítulo 8

Límite de Espacio

El estudio reportado en esta tesis está basado en la recolección de material biológico realizado en una unidad de producción lechera de tipo familiar ubicada en el Valle de Toluca, con coordenadas 19°24'50.8" N, 99°41'10.4" W.

La recolección del material vegetal requerido para la elaboración de los extractos de limón (*Citrus aurantifolia*) fue llevada a cabo en la localidad de San Felipe los Alzati, perteneciente al municipio de Zitácuaro, Michoacán, con ubicación satelital en las coordenadas: 19°29' 23.5" N, 100°22' 3.6" W.

Los procedimientos de laboratorio se realizaron en laboratorios ubicados en el área de Salud Pública e Inocuidad Alimentaria y Toxicología, del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México, misma que se ubica en el KM 15.5 de la carretera Panamericana Toluca-Atlacomulco.

Capítulo 9

Límite de Tiempo

La presente investigación se realizó durante el periodo de Septiembre del 2015 a Septiembre del 2016, apegandose al siguiente cronograma:

Actividad realizada	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep
Muestreo de vacas lecheras	X												
Aislamiento e identificación bacteriana	X	X											
Susceptibilidad <i>in vitro</i> de los antibióticos β -lactámicos		X	X										
Determinación del fenotipo MRSA				X	X								
Recolección de material vegetal						X	X						
Preparación de los extractos de <i>Citrus aurantifolia</i>							X	X					
Sensibilidad <i>in vitro</i> a los extractos crudos de <i>Citrus aurantifolia</i>									X	X	X		
Integración de información											X	X	
Investigación de tesis concluida													X

Capítulo 10

Resultados

La frecuencia de aislamientos de *Staphylococcus aureus* a partir de las muestras obtenidas (n=140) del total de vacas en línea de producción fue del 21.4 % (30/140).

Del total de aislamientos obtenidos de *Staphylococcus aureus* (n=30), 24 de ellos (80 %) fueron identificados como OSSA y 5 (16.7%) como ORSA, además de una cepa MRSA de campo (3.3%). La sensibilidad a los antibióticos β -lactámicos y al glicopéptido de la Vancomicina fueron evaluados en el estudio para identificar el patrón de sensibilidad in vitro de la Oxacilina.

En el Cuadro 10-1 se muestra la distribución de la sensibilidad antimicrobiana, la cual fue la siguiente: 93.3% de resistencia a Penicilina, seguida de Cefoxitina 30%, de igual forma Amoxicilina/Ac. Clavulánico 30% y Oxacilina 20%. El antibiotipo ORSA/MRSA se identificó a partir de las cepas resistentes a la Oxacilina, Penicilina, Amoxicilina/Ac. clavulánico y Cefoxitina. Se identificaron 12/30 (40%) aislamientos de *S. aureus* como resistentes a la Vancomicina (VARSA). Se identificaron los aislamientos asociados al antibiotipo ORSA/MRSA, donde se obtuvieron 6/30 (20%) aislamientos de *S. aureus* evaluados a partir de resistencia a Oxacilina, Penicilina, Cefoxitina y Amoxicilina/Ac. Clavulánico. Los aislamientos de ORSA/MRSA se caracterizaron finalmente como

antibiotipo MRSA, confirmado mediante la Prueba de Tamizado (Screen Agar MRSA) a 42°C (ver Anexo 1).

Los halos de inhibición de la prueba de sensibilidad in vitro a los antibióticos β -lactámicos y al glicopéptido (Vancomicina), se observan en el Cuadro 10-3.

Los valores de la media obtenidos en los halos de inhibición al comparar los aislamientos de *Staphylococcus aureus* para los diferentes antibióticos fueron: Penicilina 20 ± 5.4 ; Amoxicilina/Ac. Clavulánico 24.8 ± 5.4 ; Oxacilina 14.6 ± 9.7 , Cefoxitina 19.8 ± 8.6 , y Vancomicina 14.4 ± 3.8 . Las cepas resistentes fueron identificadas a partir de los halos de inhibición para los antibióticos evaluados de acuerdo con el siguiente criterio: ≤ 10 mm para Oxacilina; ≤ 28 mm para Penicilina; ≤ 19 mm para Amoxicilina/Ac. Clavulánico; ≤ 14 mm para Cefoxitina y ≤ 13 mm para Vancomicina (ver Anexo 2).

La distribución de la sensibilidad in vitro del *S. aureus* para el antibiotipo ORSA se observa en el Cuadro 10-4. Los halos de inhibición mostrados para los antibióticos evaluados fueron: Oxacilina 6.5 ± 3.6 ; Amoxicilina/Acido. Clavulánico 15.3 ± 2.6 ; Cefoxitina 12.2 ± 1.6 ; Penicilina 19.5 ± 4.6 y Vancomicina 10.8 ± 1.3 .

Al comparar la sensibilidad de las cepas de control ATCC 43300 y ATCC 29213, la sensibilidad a la Vancomicina fue de 8 mm para la primera y 12 mm para la segunda. Al evaluar la sensibilidad in vitro de los extractos alcohólico y acuoso respectivamente de cáscara y hoja de limón de *Citrus aurantifolia* (Cuadro 10-5), sobre las cepas de control de *S. aureus* ATCC 43300, ATCC 29213 y ATCC 25923, se observó que al aumentar la concentración de los extractos incrementó la sensibilidad ($50 \mu\text{L}$), mostrando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los compuestos alcohólico y acuoso.

Al comparar la sensibilidad *in vitro* de *S. aureus* OSSA con los extractos crudos alcohólicos y acuosos obtenidos de las hojas y las cáscaras (Anexos 3 y 5), se determinó que al usar la menor concentración considerada en este estudio ($10\mu\text{L}$), se observaron halos de inhibición de 8.4 ± 1.3 mm, en comparación con los valores obtenidos a concentraciones mayores ($50\mu\text{L}$) con 14.9 ± 1.2 mm en los extractos alcohólicos de hoja, mostrando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con respecto a los halos de inhibición obtenidos para los extractos crudos acuosos (ver Anexo 7). Estos resultados se han resumido en los Cuadros 10-6 y 10-8.

Al evaluar la sensibilidad *in vitro* de *S. aureus* ORSA frente a los extractos crudos alcohólicos y acuosos obtenidos de las hojas y las cáscaras (Anexos 4 y 6), también se observó una menor actividad de los extractos acuosos sobre los aislamientos de *S. aureus* donde a concentraciones de $50\mu\text{L}$ de los extractos mostraron los halos de inhibición mayores, habiendo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los extractos alcohólicos y acuosos (ver Cuadro 10-6 y 10-8).

Los antibiotipos ORSA/MRSA fueron caracterizados como MRSA. Estos mostraron sensibilidad a mayor dilución de los extractos, obteniéndose un rango de 6 a 8 mm en la dilución de $10\mu\text{L}$ y un rango de 13 a 20 mm para la dilución de $50\mu\text{L}$ en el extracto alcohólico de hoja. Mientras tanto, para el extracto acuoso de hoja se observan medidas de 0 mm en la dilución de $10\mu\text{L}$ y un rango de 10 a 13 mm en la dilución de $50\mu\text{L}$ (ver Anexo 4).

De los caracterizados como MRSA, mostraron sensibilidad los extractos crudos a mayor concentración en los discos impregnados con los extractos, obteniéndose ausencia de inhibición en la concentración de $10\mu\text{L}$ y un rango de 9 a 12 mm para los aislamientos evaluados en la concentración de $50\mu\text{L}$ para los extractos alcohólicos obtenidos de la cáscara del limón. Mientras tanto, para el extracto acuoso de cáscara se observó ausencia de inhibición a la concentración de $10\mu\text{L}$, obteniéndose un rango de 11 a 14 mm entre los

aislamientos sometidos a la prueba de sensibilidad in vitro a las concentraciones de 50 μ L (ver Anexos 6 y 8).

Cuadro 10-1: *Sensibilidad in vitro de Staphylococcus aureus a los antibióticos β -lactámicos*

ANTIBIÓTICO	SENSIBLES		INTERMEDIAS		RESISTENTES	
	No.	%	No.	%	No.	%
PENICILINA	2	6.7 %	0	0 %	28	93.3 %
AMOX/AC. CLAV	21	70.0 %	0	0 %	9	30.0 %
OXACILINA	20	66.7 %	4	13.3 %	6	20.0 %
CEFOXITINA	19	63.3 %	2	6.7 %	9	30.0 %
VANCOMICINA	13	43.3 %	5	16.7 %	12	40.0 %

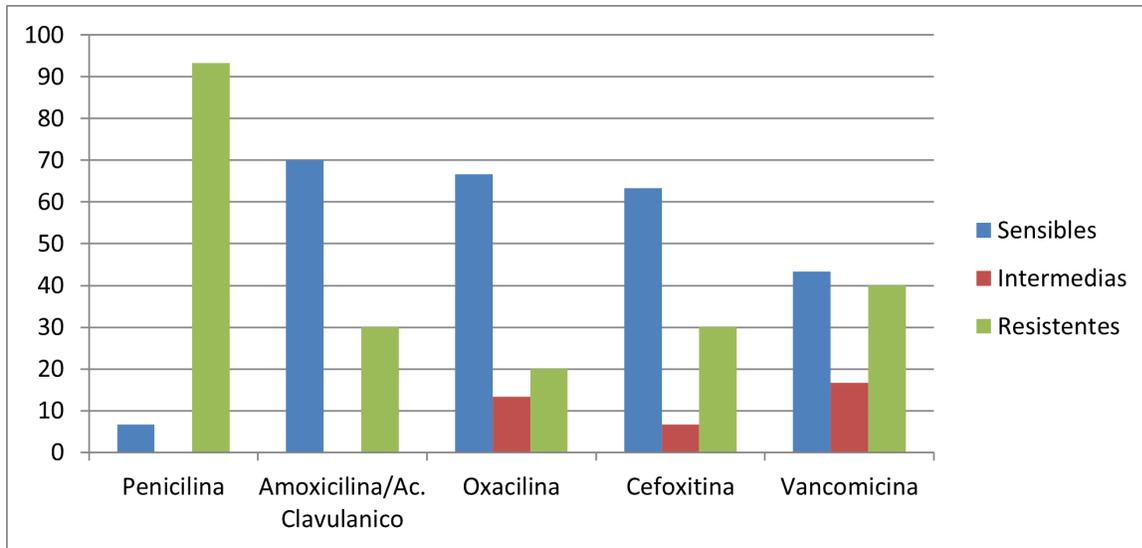


Figura 10-1: *Sensibilidad in vitro de Staphylococcus aureus a los antibióticos β -lactámicos*

Se realizó la prueba estadística de Chi-cuadrada (χ^2) a los diferentes conjuntos de mediciones obtenidas para las diferentes cepas, observándose los siguientes valores:

Cuadro 10-2: *Significancia estadística de las pruebas de Chi-cuadrada (χ^2).*

Tipo de cepa	χ^2	Valor p
Cepas resistentes	41.806	0.00001
Cepas intermedias	10.2027	0.037147
Cepas sensibles	33.3333	0.00001

Los resultados son significativos para $p < 0.05$.

Cuadro 10-3: *Distribución de la sensibilidad in vitro de Staphylococcus aureus (n=30).*

Cepas Aisladas - Halo de inhibición (en mm)					
ANTIBIÓTICO	RANGO	SENSIBLE	INTERMEDIAS	RESISTENTE	$\bar{X} \pm D.E.$
PENICILINA	29 - 10	29.0 \pm 7.0	-	19.4 \pm 6.8	20.0 \pm 5.4
AMOX/AC. CLAVUL	50 - 6	31.1 \pm 16.8	-	13.9 \pm 7.2	24.8 \pm 11.5
OXACILINA	35 - 0	21.0 \pm 11.5	11.5 \pm 2.8	4.3 \pm 3.1	14.6 \pm 9.7
CEFOXITINA	38 - 8	26.1 \pm 13.8	17.0 \pm 3.0	11.4 \pm 5.8	19.8 \pm 8.6
VANCOMICINA	23 - 8	18.4 \pm 9.3	15.4 \pm 5.6	11.0 \pm 5.6	14.4 \pm 3.8

Cepas Control - Halo de inhibición (en mm)					
ANTIBIÓTICO		ATCC 29213	ATCC 25923	ATCC 43300	
PENICILINA		18	20	10	
AMOX/AC. CLAVUL		10	9	6	
OXACILINA		22	0	0	
CEFOXITINA		13	10	8	
VANCOMICINA		12	10	8	

Cuadro 10-4: *Distribución de la resistencia y multiresistencia in vitro en el antibiograma ORSA/MRSA en los aislamientos Staphylococcus aureus.*

Cepas aisladas	Halos de inhibición (en mm)				
	OXACILINA	AMOXICILINA/ AC. CLAVULÁNICO	CEFOXITINA	PENICILINA	VANCOMICINA
15 b	6	15	12	21	12
12 d	8	16	10	23	10
20	10	19	14	25	10
25	6	13	10	12	10
18 a	9	17	11	19	13
MRSA cepa de campo	0	12	10	17	10
\bar{X} =	6.5	15.3	12.2	19.5	10.8
$D.E.$ =	3.6	2.6	1.6	4.6	1.3
Cepas control					
ATCC 43300	0	6	8	10	8
ATCC 29213	22	10	13	18	12
ATCC 25923	0	9	10	20	10

Cuadro 10-5: Comparación de la sensibilidad de las cepas de control de *S. aureus* a los extractos alcohólico y acuoso de *Citrus aurantifolia* obtenidos a partir de **hoja** y **cáscara**.

CEPAS CONTROL	Extractos crudos de Hojas de <i>Citrus aurantifolia</i>											
	Extracto alcohólico (μL)						Extracto acuoso (μL)					
	10	20	30	40	50	$\bar{X} \pm D.E.$	10	20	30	40	50	$\bar{X} \pm D.E.$
ATCC 43300	6	9	11	12	13	10.2 ± 2.8	0	0	7	8	10	5.0 ± 4.7
ATCC 29213	7	10	12	13	14	11.2 ± 2.8	0	0	7	9	11	5.4 ± 5.1
ATCC 25923	8	11	12	14	15	12.0 ± 2.7	0	0	8	10	12	6.0 ± 5.7
\bar{X}	7	10	11.7	13	14		0	0	7.3	9	11	

CEPAS CONTROL	Extractos crudos de Cáscara de <i>Citrus aurantifolia</i>											
	Extracto alcohólico (μL)						Extracto acuoso (μL)					
	10	20	30	40	50	$\bar{X} \pm D.E.$	10	20	30	40	50	$\bar{X} \pm D.E.$
ATCC 43300	0	0	8	10	11	5.8 ± 5.4	0	0	7	9	11	5.4 ± 5.1
ATCC 29213	0	0	10	11	12	6.6 ± 6.1	0	0	8	10	12	6.0 ± 5.7
ATCC 25923	0	0	11	12	13	7.2 ± 6.6	0	0	9	11	12	6.4 ± 5.9
\bar{X}	0	0	9.7	11	12		0	0	8	10	11.7	

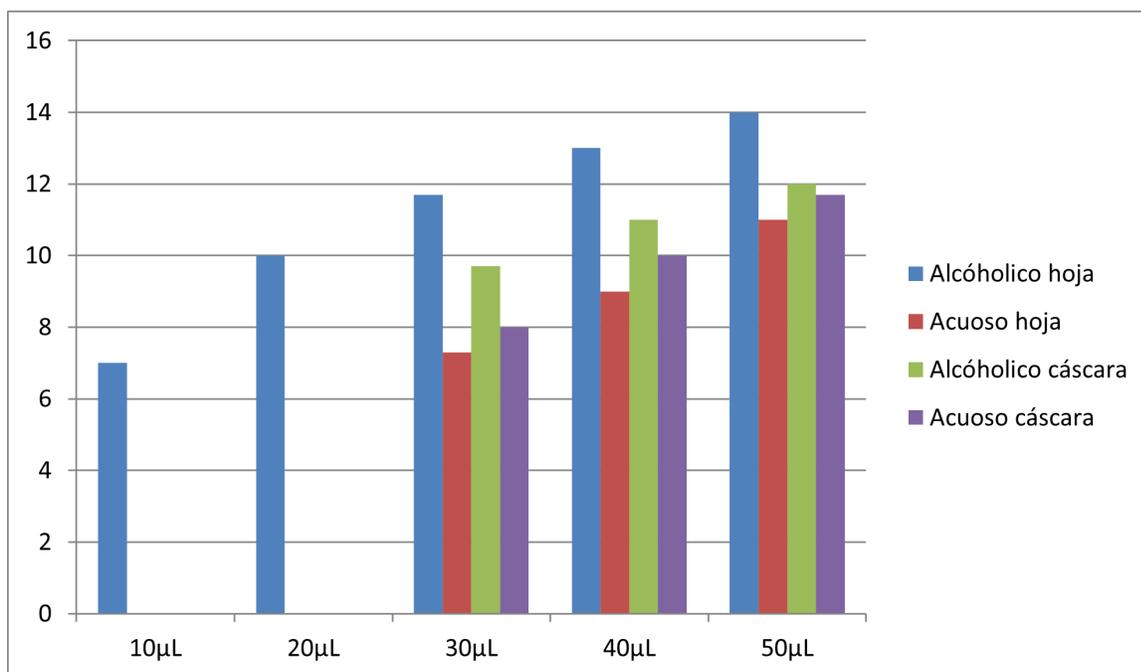


Figura 10-2: Comparación de la sensibilidad de las cepas de control de *S. aureus* a los extractos alcohólico y acuoso de *Citrus aurantifolia* obtenidos a partir de **hoja** y **cáscara**. En el eje horizontal se ve la cantidad de extracto utilizado; en el eje vertical se observa la sensibilidad (en mm) de las diferentes cepas.

Cuadro 10-6: Comparación de la sensibilidad *in vitro* de las cepas OSSA y ORSA/MRSA de *S. aureus* aisladas a los extractos alcohólico y acuoso del *Citrus aurantifolia* obtenidos a partir de **hoja**.

	Extracto alcohólico de hoja (µL)					Extracto acuoso de hoja (µL)				
	10	20	30	40	50	10	20	30	40	50
Sensibilidad OSSA	8.4 ± 1.3	10.3 ± 1.2	11.9 ± 1.5	13.3 ± 1.4	14.9 ± 1.2	0.0 ± 0.0	6.3 ± 2.8	8.4 ± 0.8	9.8 ± 0.7	11.3 ± 1.0
Sensibilidad ORSA/MRSA	7.3 ± 0.8	10.7 ± 1.2	12.5 ± 2.7	13.8 ± 2.6	15.5 ± 2.6	0.0 ± 0.0	5.0 ± 3.9	8.2 ± 1.2	9.8 ± 0.8	11.2 ± 1.2

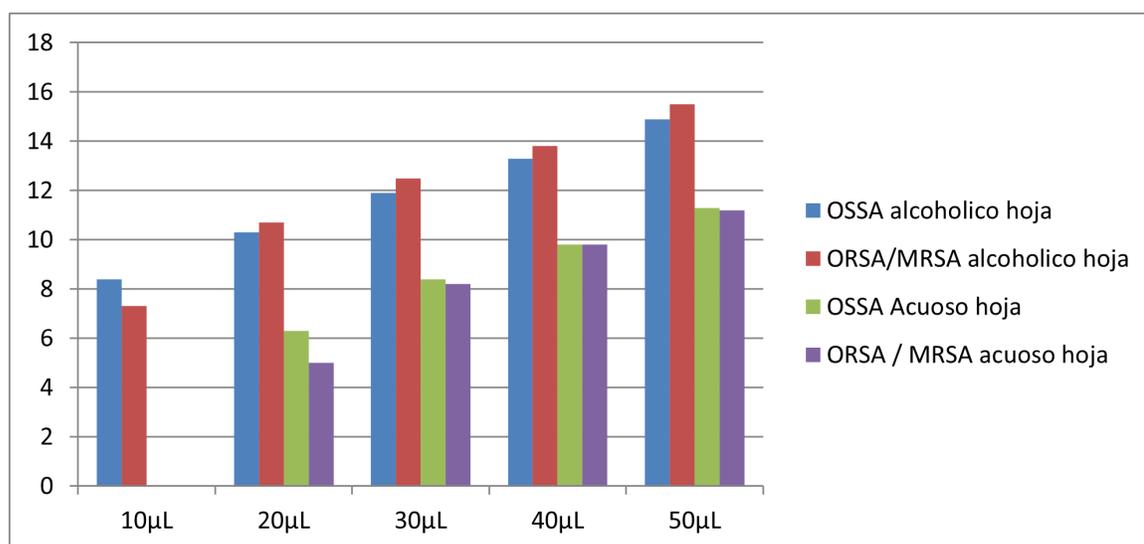


Figura 10-3: Comparación de la sensibilidad *in vitro* de las cepas OSSA y ORSA/MRSA de *S. aureus* aisladas a los extractos alcohólico y acuoso del *Citrus aurantifolia* obtenidos a partir de **hoja**. En el eje horizontal se ve la cantidad de extracto utilizado; en el eje vertical se observa la sensibilidad (en mm) de las diferentes cepas.

Además, se realizó el cálculo del coeficiente de correlación de Pearson para comparar los resultados obtenidos en la prueba de la sensibilidad *in vitro* a los extractos alcohólico y acuoso de hoja y cáscara de *Citrus aurantifolia*, tanto de las cepas OSSA como ORSA/MRSA de *S. aureus* aisladas, observándose lo siguiente:

Cuadro 10-7: Comparación de los coeficientes de correlación de Pearson de las distribuciones de la sensibilidad a los extractos acuosos y alcohólicos obtenidos a partir de **hoja** de *Citrus aurantifolia*.

Cepa	Extracto	Coef. de correlación (R=)
OSSA	Alcohólico	0.9986
ORSA/MRSA	Alcohólico	0.9810
OSSA	Acuoso	0.9366
ORSA/MRSA	Acuoso	0.9629

Cuadro 10-8: Comparación de la sensibilidad *in vitro* de las cepas OSSA y ORSA/MRSA de *S. aureus* aisladas a los extractos alcohólico y acuoso obtenidos a partir de **cáscara** de *Citrus aurantifolia*.

	Extracto alcohólico de cáscara (μL)					Extracto acuoso de cáscara (μL)				
	10	20	30	40	50	10	20	30	40	50
Sensibilidad OSSA	0.0 ± 0.0	7.8 ± 2.7	9.9 ± 1.3	11.3 ± 1.1	12.7 ± 0.9	0.0 ± 0.0	4.4 ± 3.6	8.3 ± 1.8	10.4 ± 1.7	12.4 ± 1.3
Sensibilidad ORSA/MRSA	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	7.8 ± 1.2	9.2 ± 1.0	10.3 ± 1.0	0.0 ± 0.0	7.2 ± 3.5	10.3 ± 1.8	12.0 ± 1.1	13.0 ± 1.0

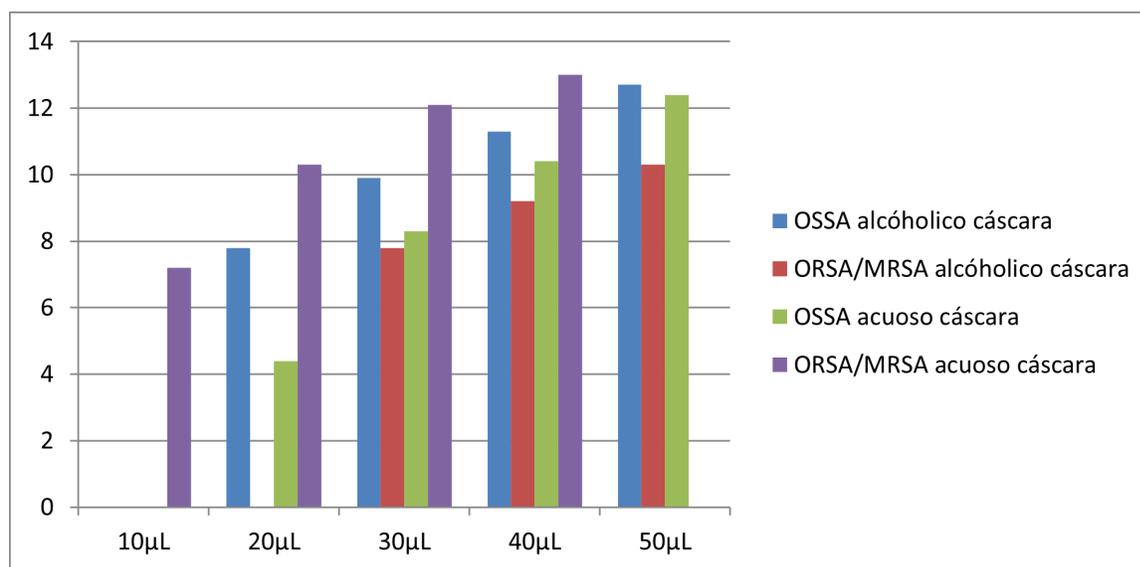


Figura 10-4: Comparación de la sensibilidad *in vitro* de las cepas OSSA y ORSA/MRSA de *S. aureus* aisladas a los extractos alcohólico y acuoso obtenidos a partir de **cáscara** de *Citrus aurantifolia*. En el eje horizontal se ve la cantidad de extracto utilizado; en el eje vertical se observa la sensibilidad (en mm) de las diferentes cepas.

Cuadro 10-9: *Comparación de los coeficientes de correlación de Pearson de las distribuciones de la sensibilidad a los extractos acuosos y alcohólicos obtenidos a partir de cáscara de Citrus aurantifolia.*

Cepa	Extracto	Coef. de correlación (R=)
OSSA	Alcohólico	0.9136
ORSA/MRSA	Alcohólico	0.9307
OSSA	Acuoso	0.9833
ORSA/MRSA	Acuoso	0.9300

Capítulo 11

Discusión

El estudio de investigación en el que se basa esta tesis demostró el efecto antimicrobiano *in vitro* de los extractos crudos acuoso y alcohólico de la cáscara y hoja de limón (*Citrus aurantifolia*), sobre aislamientos de *Staphylococcus aureus* obtenidos de vacas con mastitis subclínica en un hato lechero familiar del Valle de Toluca. La frecuencia de aislamiento del *Staphylococcus aureus* en el hato fue de 21.4%, que es similar a la reportada por Talavera & Barcenas (1992), con una prevalencia de *S. aureus* del 20 al 25% en hatos lecheros de producción familiar en el Valle de Toluca.

Se denota la importancia del *S. aureus* sobre la salud de la glándula mamaria, al obtener la identificación del antibiotipo ORSA/MRSA relacionado con la infección por cepas de *S. aureus* MRSA (López, 2014), lo cual indica un riesgo importante a la salud pública (Lagunas *et al.*, 2003). Particularmente, debido a la amplia distribución de las unidades de producción lechera de tipo familiar en el Valle de Toluca donde el sistema es prevalente. La agroindustria lechera familiar promueve la creación de empleos, en ocasiones para familias completas, lo cual promueve el desarrollo económico de la región (Bernal *et al.*, 2007). Sin embargo, como se ha corroborado con este estudio, en este tipo de producción existe una alta prevalencia de mastitis relacionado con el manejo e higiene del hato (Manjarrez *et al.*,

2008).

No obstante, dada la prevalencia de la mastitis subclínica en explotaciones de tipo familiar, tal como la que fue objeto de este proyecto de tesis, se considera que el nivel de infección de *S. aureus* en la unidad de producción lechera estudiada es bajo, ya que si se incrementara la infección, se estaría comprometiendo la salud de la glándula mamaria y la productividad del hato lechero, generando pérdidas económicas importantes y riesgos a la salud animal e inocuidad alimentaria de la leche (Giannechini *et al.*, 2002).

Wattiaux (2013) estima que un hato lechero en apariencia sano puede llegar a desarrollar mastitis subclínica en algún momento de su producción entre 15 y 45 % de sus vacas, lo que reduciría hasta un 35 % su producción total dependiendo el grado de inflamación. La mastitis se considera una de las enfermedades de mayor impacto a la industria lechera, ocasionando pérdidas económicas importantes no solo en nuestro país, sino también en el resto del mundo Bedolla & Ponce de León (2008). Se estima que la mastitis representa el 70 % de los gastos totales para los ganaderos lecheros, resultando en una pérdida de billones de dólares cada año (Bradley & Green, 2001; Dos Santos *et al.*, 2002).

Por ejemplo, Romero (2004) ha estimado que los costos de mastitis en Estados Unidos son de alrededor de 107 a 180 dólares por vaca, y en total, las pérdidas anuales a causa de la mastitis han sido estimadas entre 1.5 a 2 billones de dólares americanos (Biesenkamp-Uhe *et al.*, 2007), lo que equivale al 11 % de la producción de leche total en dicho país. Muchos de los costos se atribuyen a la reducida producción de leche, la leche descartada, los reemplazos de vaca por año, y los costos obvios de los tratamientos médicos veterinarios (Nash *et al.*, 2003).

Debido a la prevalencia de *S. aureus* como causante de mastitis subclínica, es necesario el empleo de antibióticos capaces de eliminar la infección, pero con el paso del tiempo y por la

inadecuada dosificación, estos patógenos tienden a mostrar *in vivo* un amplio desarrollo de cepas resistentes, debido a la incapacidad del antibiótico para alcanzar niveles terapéuticos en el sitio de la lesión (Enríquez, 1999).

Actualmente, la resistencia del *S. aureus* en los hatos lecheros a nivel mundial constituye una alarma sanitaria al identificar cepas ORSA relacionadas con la MRSA (López, 2014). Preocupantemente, las cepas de *S. aureus* tienen un amplio rango de resistencia a los diferentes tipos de antibióticos, y se han encontrado cepas resistentes y multiresistentes relacionadas con las cepas MRSA provenientes de animales de producción (López *et al.*, 2011). En general, la adquisición de esta resistencia a los antibióticos β -lactámicos se atribuye principalmente al intercambio de manera horizontal de genes (Bustos *et al.*, 2006).

El uso indiscriminado de los antibióticos β -lactámicos en el tratamiento de la mastitis ha provocado la aparición de cepas de *S. aureus* resistente y multiresistente, como es el caso de las cepas *S. aureus* resistentes a la Meticilina (MRSA) en vacas lecheras (De Oliveira *et al.*, 2000).

Esto constituye una emergencia epidemiológica en salud pública veterinaria, por la posible transmisión al hombre de cepas MRSA de origen animal portadoras de resistencia a los antibióticos β -lactámicos y multiresistencia a otros antibióticos, la cual puede ser diseminada a través de la contaminación de la leche y sus derivados (Lee, 2003; Velázquez *et al.*, 2005). La creciente prevalencia de cepas de MRSA es un problema de control adicional a la infección en medicina humana y veterinaria (Kmal *et al.*, 2013).

En lo que a esta tesis respecta, la identificación de aislamientos asociados al antibiotipo ORSA permitió su caracterización para ser considerados como ORSA/MRSA. Entre dichos aislamientos, se puede identificar presuntivamente el antibiotipo MRSA, el cual es necesario identificar mediante pruebas moleculares para la detección del gen *mecA* para

su confirmación debido a que algunos aislamientos del antibiotipo ORSA/MRSA pueden producir grandes cantidades de β -lactamasa que interfieren con la caracterización de las cepas BORSA (López *et al.*, 2011).

Las cepas de *Staphylococcus aureus* MRSA poseen resistencia a todas las Penicilinas resistentes a la penicilinas (Meticilina, Nafcilina, Oxacilina, Cloxacilina y Dicloxacilina) y, esencialmente, al resto de los antibióticos β -lactámicos. Así mismo, la mayoría de las cepas también son resistentes a la Eritromicina, Clindamicina, Tetraciclinas y aminoglucósidos (Pahissa, 1997).

Los antibiotipos MRSA se confirmaron mediante la prueba del método de difusión de la Oxacilina en agar Müller-Hinton a temperaturas de 35° y 42°C (Hernández *et al.*, 1991; Russi *et al.*, 2008). Cabe resaltar que en esta prueba la temperatura de 42°C produce la inhibición de la PBP 2^a en aquellas cepas que portan el gen *mecA*, por lo cual los resultados de la prueba se consideraron como positivos para aquellas cepas que tuvieron una diferencia de los halos de inhibición ≥ 4 mm en ambas temperaturas (Russi *et al.*, 2008).

Crucialmente, la detección de cepas con el antibiotipo ORSA/MRSA establece un factor de riesgo por la amplificación de la infección a la población humana (Lagunas, 2002; Velázquez *et al.*, 2005).

La importancia de MRSA radica en que este tipo de cepas son los principales agentes causales de brotes hospitalarios, particularmente en unidades de quemados o quirúrgicas, donde la presencia de heridas profundas y dispositivos médicos tales como catéteres proporcionan entornos propicios para su crecimiento (Shinefield & Ruff, 2009).

Dada la importancia de *S. aureus* como agente causal de mastitis bovina y el uso generalizado de los antibióticos intramamarios en esta especie, no es sorprendente que

los primeros aislamientos de MRSA en los animales fueran encontrados directamente en la leche de las vacas infectadas (Lee, 2003). Sin embargo, esto solo enfatiza el hecho de que esto representa un problema potencial de salud pública, debido a que la posibilidad de que se infecte el personal que maneja el hato, o que se disemine entre el resto de la población animal, es muy real (Lagunas, 2002). El primer caso de transmisión directa de MRSA de vacas con mastitis subclínica al hombre fue documentada por Kaszanyitzky *et al.* (2007); estudios como este serán más comunes en el futuro si no se toman las medidas necesarias para contener la transmisión de estas cepas.

El problema para algunas especies bacterianas es tan crítico que existen pocas opciones de tratamiento. Estas bacterias han sido consideradas un factor de riesgo para la salud pública por la posible transmisión al hombre de cepas resistentes a través del consumo de productos lácteos no pasteurizados (Faria *et al.*, 2005).

Actualmente, las cepas de *S. aureus* Oxacilina/Meticilina resistentes (ORSA/MRSA) ya constituyen un problema serio de salud humana a nivel mundial, debido al desarrollo de infecciones intrahospitalarias causantes de septicemias, neumonías, artritis, infecciones de tejidos blandos y aparato urinario, con un alto grado de morbilidad y mortalidad al desarrollar cuadros clínicos graves (Lee, 2003). El incremento de la prevalencia de MRSA implica un serio problema terapéutico en el ambiente hospitalario (Brody *et al.*, 2008).

Anteriormente, ya se ha propuesto que ciertas plantas utilizadas en la medicina tradicional como remedios locales para algunos padecimientos en la población humana, realmente presentan una alternativa viable a los medicamentos sintéticos (OMS, 2002). Lo que se postula en esta tesis es que el alcance del uso de este tipo de alternativas naturales puede, e incluso debe, extenderse al ámbito veterinario.

A partir de las plantas empíricamente catalogadas como medicinales, los científicos han logrado aislar, caracterizar y evaluar compuestos con actividad farmacológica, de los cuales algunos se han desarrollado como fármacos para el tratamiento de diferentes enfermedades (Sánchez *et al.*, 2012).

El uso del limón se ha reportado en la etnobotánica de ciertas regiones del país como alternativa para el tratamiento de presión arterial alta, la salud mental, problemas respiratorios, artritis y reumatismo (Saidan *et al.*, 2004).

En cuanto a lo que los usos tradicionales respecta, las hojas han sido utilizadas para el tratamiento de enfermedades de la piel y como agente antiinflamatorio. Por otro lado, el té preparado del jugo, cáscaras u hojas es recomendado como expectorante, y como alivio para la gripe y el resfriado. Mas aún, el limón previene el escorbuto debido a que es una excelente fuente de vitamina C (Piccinelli *et al.*, 2008).

En lo que a el tratamiento, prevención y control de mastitis causada por *Staphylococcus aureus* y otros patógenos respecta, se ha recurrido a la medicina tradicional basada principalmente en plantas y sus compuestos para la búsqueda de alternativas, ya que dichos compuestos son fundamentales para el desarrollo de la medicina moderna (González *et al.*, 2004).

En particular, el potencial de los cítricos para su uso en la producción de extractos vegetales medicinales, también ha atraído considerable atención. En la cáscara, la corteza de las semillas y en las hojas de los cítricos, se encuentran glándulas que secretan las esencias características, también llamadas aceites esenciales (Baraona & Sancho, 1998). Debido a la importancia de estos, se han realizado numerosas investigaciones con el objetivo de identificar la composición química, así como las posibles actividades antimicrobianas de los aceites esenciales de cortezas de diferentes especies de cítricos. Los aceites esenciales

de cítricos han sido reconocidos debido a su amplio espectro de actividades biológicas, tales como antimicrobiano, antioxidante, antiinflamatorio y ansiolítico (Chutia *et al.*, 2009; Rehman, 2006). Estas propiedades antimicrobianas han demostrado crear un ámbito de especial interés para su aplicación en la industria alimentaria, para uso veterinario (Fuselli *et al.*, 2008; Imran *et al.*, 2013; Roussenova, 2011), la medicina humana (Oliveira *et al.*, 2014; Yin *et al.*, 2012) y plantas para la producción agrícola (Badawy & Abdelgaleil, 2014).

En un estudio para determinar la actividad antibacteriana frente a cepas Gram negativas y Gram positivas, una variedad de extractos de cáscaras de cítricos fueron evaluados. Entre las pruebas realizadas, está la efectividad del limón frente a *E. coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* y *S. aureus* ATCC 25923, observándose un halo de inhibición de $14 \pm 0.6\text{mm}$ y $10 \pm 0.3\text{mm}$ para *E. coli*, y frente a *S. aureus* ATCC 25923 se observó un halo de inhibición de $13 \pm 0.5\text{mm}$ (Benites *et al.*, 2011), cuyo valor concuerda con los rangos obtenidos en los halos de inhibición en el estudio realizado como parte de esta tesis, basado en extractos de cáscara de *Citrus aurantifolia* sobre *Staphylococcus aureus*.

Rodríguez *et al.* (2000) y Aibinu *et al.* (2007) también realizaron investigaciones donde determinan que la potencia de la fruta se ve reforzada por el tipo de disolvente que se usa, lo que indica que hay algunos ingredientes activos que no serían liberados excepto cuando la fruta se mezcle con un determinado disolvente.

Esto concuerda con un informe de Taylor (2004), en el que se establece que, tradicionalmente, el agua es el disolvente universal utilizado para preparar las hierbas. Sin embargo, algunos de los componentes activos presentes en las plantas no son solubles en agua y, por lo tanto, simplemente preparar un té caliente con la planta, o incluso hirviendo la planta en agua caliente, no basta para extraer estos componentes activos. Por este motivo, el estudio que se presenta en esta tesis se dio a la tarea de comparar de igual forma tanto extractos acuosos como alcohólicos, y tanto de hoja como de cáscara de *Citrus aurantifolia*.

Sin embargo, cabe mencionar que un estudio detallado de la composición química de los diferentes tipos de extractos no está dentro del alcance de este proyecto de investigación. Por tanto, no se cuenta con suficiente información como para garantizar que cierto disolvente es mejor para extraer la mayor cantidad de compuestos, ya que varía la extracción de acuerdo a su naturaleza. Claramente, este ámbito requiere de una investigación más detallada, lo cual es una de las recomendaciones de esta tesis para futuras investigaciones en este tema.

Existen algunos ejemplos de estudios realizados por otros autores, en los que se busca detectar los compuestos responsables de diversas actividades; en este caso, la actividad antimicrobiana. Dichos estudios señalan que existen fitocompuestos naturales, como los fenólicos y terpenoides, que han sido ampliamente utilizados debido a sus fuertes propiedades antimicrobianas contra los patógenos transmitidos por los alimentos y por lo tanto se pueden aplicar como nuevos conservantes en la industria alimentaria (Friedman *et al.*, 2002). De igual manera, los flavonoides han demostrado actividad antimicrobiana en varios estudios (Tim Cuchine & Lamb, 2005) y también se ha encontrado que los aceites esenciales de cítricos sirven para inhibir las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como las levaduras, y mohos (Deans & Ritche, 1987).

Muchos investigadores se han dado a la tarea de probar la actividad antibacteriana de extractos elaborados con cítricos, con los cuales su objeto de estudio es la obtención y análisis de aceites esenciales. En estos estudios se han obtenido resultados variables en cuanto a su efecto antibacteriano, pues respecto a la sensibilidad diferencial de las bacterias – Gram(+) y Gram(–) – contra los aceites esenciales, algunos estudios (Burt, 2001; Smith-Palmer *et al.*, 2001) sugieren una sensibilidad mayor en bacterias Gram(+) debido a la relativa impermeabilidad de la membrana externa en bacterias Gram(–), y otros (Fisher & Phillips, 2006; Tassou *et al.*, 2000) donde los resultados de sensibilidad son similares tanto en bacterias Gram(+) y Gram(–).

El incremento de la resistencia a los antibióticos β -lactámicos es una clara invitación al desarrollo de nuevas alternativas de control, dentro de las cuales se puede optar por la herbolaria, teniendo como antecedentes el uso de esta en la medicina tradicional para múltiples padecimientos humanos. Sin embargo, esta también puede utilizarse en la medicina veterinaria, como fuente natural de tratamientos para diversas enfermedades, como es el caso de la mastitis bovina, que tiene gran impacto a nivel mundial.

Capítulo 12

Conclusiones

Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, se concluye que:

Existe una baja frecuencia de infección por *S. aureus* (21.4 %) en el hato lechero de producción familiar muestreado en el Valle de Toluca.

En las pruebas de resistencia *in vitro* de *S. aureus* a los antibióticos β -lactámicos se observó una amplia proporción de resistencia a la Penicilina (93.3 %), así como una amplia proporción de sensibilidad para la Amoxicilina/Ac. Clavulánico (70 %), Oxacilina (80 %), Cefoxitina (70 %) y Vancomicina (60 %).

Las pruebas de identificación revelaron la presencia de los Antibiotipos de *S. aureus*: ORSA y ORSA/MRSA.

La confirmación de la presencia de los antibiotipos ORSA y ORSA/MRSA representan un riesgo permanente de infección en los hatos lecheros y su potencial riesgo a la salud pública.

De los resultados obtenidos en esta investigación, se puede afirmar que los extractos revelaron excelentes niveles de actividad antimicrobiana contra las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de vacas lecheras con mastitis subclínica en un hato lechero.

En general, se observó mayor actividad *in vitro* del extracto crudo alcohólico obtenido de hoja de *Citrus aurantifolia* en comparación con el extracto crudo acuoso frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ORSA/MRSA. Sin embargo, en el caso de los extractos de cáscara de *Citrus aurantifolia* fue a la inversa, observándose mayor actividad *in vitro* con el extracto crudo acuoso sobre los aislamientos de *Staphylococcus aureus* ORSA/MRSA.

Capítulo 13

Sugerencias para investigaciones futuras

Con base en lo observado durante la realización de este proyecto de investigación, se sugiere trabajar en la purificación de los extractos con el fin de lograr identificar los compuestos químicos que resultan en la acción antimicrobiana, y poder así lograr obtener los fitocompuestos que servirán como alternativa en el control y prevención de la mastitis causada por *S. aureus*.

De igual forma, aún falta mayor trabajo de investigación para evaluar detalladamente sus pros y contras durante el uso *in vivo* de estos extractos, pues representa una alternativa que podría garantizar un uso en la ganadería orgánica, y que garantizaría una mayor inocuidad alimentaria.

Finalmente, también se recomienda la realización de las pruebas de crecimiento mínimo inhibitorio (MIC) de ambos extractos, tanto de hoja como de cascara en las dos formas estudiadas.

Bibliografía

Aguilar, A. (2001): Plantas Medicinales del Centro de México. Guías de México desconocido. México 145-147.

Aibinu, I.E., Akinsulire, O.R., Adenipekun, T., Adelowotan, T., and Odugbemi, T. (2007): In vitro antimicrobial activity of crude extracts from plants *bryophyllum pinnatum* and *kalanchoe crenata*. *Afr. J. Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, CAM 4 (3): 338 - 344 www.africanethnomedicines.net

Antúñez P.C. (2000): La ganadería lechera mexicana. Situación actual y necesidades de investigación. Instituto de recursos genéticos y productividad. Especialidad Ganadera. Colegio de posgraduados en Ciencias Agrícolas. Montecillo, Texcoco, México. Pp.15-21.

Arriaga, C.J., Albarrán, P.B., García, M.A., Espinoza, O.A., Castelán, O.O. (2000): Investigación y desarrollo participativo de estrategias de alimentación apropiadas para sistemas de producción de leche en pequeña escala. 6° coloquio de investigación en Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de México, 40-43.

Badawy, M.E.I., Abdelgaleil, S.A.M., (2014): Composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Egyptian plants against plant pathogenic bacteria and fungi, *Ind. Crops Prod.*, 52:776-782.

Bajpai, V.K., Baek, K.H., Kang, S.C., (2012): Control of Salmonella in foods by using essential oils: A review, *Food Res. Int.*, 45:722-734.

Baraona M., y Sancho E. (1998): Cítricos I. Fruticultura Especial II. Pp:15-23.

- Barrera, L. y S. Bautista. (2008): Actividad antifúngica de polvos, extractos y fracciones de *Cestrum Nocturnum* L. sobre el crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. *Revista Mexicana de Fitopatología* 26 (1): 27-31
- Baskaran SA, Kazmer GW, Hinckley L, Andrew SM, Venkitanarayanan K. (2009): Antibacterial effect of plant-derived antimicrobials on major bacterial mastitis pathogens in vitro. *J Dairy Sci*; 92:1423-9. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2008-1384>.
- Bedolla, C.C., Ponce de Leon, M.E.R. (2008): Perdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina en le industria lechera. *REDVET. Revista electrónica de Veterinaria* 1695-7504. Volumen IX, Número 4.
- Benites Víñchez J, Díaz García R, López Vivar J, Gajardo Solari S, Kusch Fuschlocher F, Rojas Arredondo M. (2011): Actividad antioxidante y antibacteriana de seis cáscaras de frutos del oasis de Pica. *BIOFARBO*, 19(1): 1-77
- Bernal M.L.R., Rojas G.M.A., Vázquez F.C., Espinoza O.A., Estrada F.J., Castelan O.O.A. (2007): Deteriminación de la calidad fisicoquímica de la leche cruda producida en sistemas campesinos en dos regions del Estado de México. *Vet. Mex.* 38 (4): 395-407.
- Biesenkamp-Uhe, C., Li, Y., Hehnen, H. R., Sachse, K. y Kaltenboeck, B. (2007): Therapeutic *Chlamydomyces abortus* and *C. pecorum* Vaccination Transiently Reduces Bovine Mastitis Associated with *Chlamydomyces* Infection. *Infection and Immunity*. Vol. 75 (2): 870-877.
- Bousdia, N., Vian, M., Ferhat, M., Meklati, B., & Chemat, F. (2009): A new process for extraction of essential oil from Citrus peel: Microwave hydrodiffusion and gravity. *Journal of Food Engineering*, 90, 409-413.
- Bradley, J. y Green, M. J. (2001): Adaptation of *Escherichia coli* to the Bovine Mammary Gland *Journal of Clinical Microbiology*. 39:1845 -1849.
- Brody, T., Yavatkar, A.S., Lin, Y., Ross, J., Kuzin, A., Kundu, M., Fann, Y., Odenwald,

- W.F. (2008): Horizontal Gene Transfers Link a Human MRSA Pathogen to Contagious Bovine Mastitis Bacteria. PLoS ONE, 3(8):1-8.
- Burt, S. (2004): Essential Oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. International Journal of Food Microbiology. 94: 223-253.
- Bustos, M.J.A., Hamdan, P.A., Gutierrez, C.M. (2006): Staphylococcus aureus: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. Rev Biomed., 17: 287-305.
- CEQA [Canadian External Quality Assessment] (1998): Guidelines for the Testing and Reporting of Antimicrobial Susceptibilities of Meticillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) and Commentary on Meticilin Resistant Coagulase Negative Staphylococci (MR-CNS): <http://www.phacaspc.gc.ca/publicat/ceqa-pceeq/mrsa98-eng.php>. (08 de Febrero 2016)
- Chaffer, M., Rimbaud, E. (2005): Epidemiología, prevención y control de la mastitis por S. aureus en vacas lecheras. En Rodriguez, V.R., Enfermedades de importancia económica en producción animal. Ed. Mac Graw Hill Interamericana, México, D.F.
- Chutia, M., Bhuyan, P.D., Pathak M.G., Sharma T.C., Boruah P. (2009): Antifungal activity and chemical composition of Citrus reticulate Blanco essential oil against phytopathogens from North East India, Food Sci. Technol., 42:777-780.
- CLSI [Clinical and Laboratory Standards Institute] (2012): Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-second. Informational Supplement M100-S22. CLSI, Wayne, PA, USA.
- Cohen. (1982): The Staphylococci bacteriophage typing of Staphylococcus aureus. Wiley-interscience. London pp. 431-441.
- Cowan M. (1999): Plants products as antimicrobial agents. Clin. Microbiol; 12(4):564-582.

- Cuevas, O.S. (2005): Situación y perspectivas de la producción intensiva de leche. En: Cavalloti VB, Hernández MM, Reyes CR editores. Ganadería, Sustentabilidad y Desarrollo rural. 1st ed. México: Impresos América. México; pp 15-19.
- Cuny C., Friedrich A., Kozytska S., Layer F., Nübel U., Ohisen K., Strommenger B., Walther B., Wieler L., Witte W. (2010): Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) indifferent animal species. *Int. J. Med Microbiol.*, 300:109-117.
- Davis, D.B., Dulbecco, R., Eisen, N.H., Ginsberg, S.H. (1996): Tratado de microbiología. 4^a ed., Masson, España.
- De Olivera, A.P., Watts, J.L., Salmon, S.A., Arestrup, F.M. (2000): Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from Bovine Mastitis in Europe and the United States. *J Dairy Sci.*, 83:855-862.
- Deans, S.G., & Ritche, G. (1987): Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology*. 5, 165-180.
- Dos Santos, J. N., Netto dos Santos, K. R., Gentilini, E., Sordelli, D., de Freire Bastos, M. C. (2002): Phenotypic and genetic characterisation of bacteriocin-producing strains of *Staphylococcus aureus* involved in bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*. 85: 133 -144.
- Dugo, G. y Di Giacomo, A. (2002): *The Genus Citrus*, Taylor & Francis Publishing. p.201-317.
- Enríquez, G.E. (1999): Frecuencia de aislamientos de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina obtenidas de vacas con mastitis subclínica en el Valle de Toluca. Tesis de licenciatura, FMVZ-UAEM., Toluca, México.
- Espinoza, O.A., Alvarez, M.A., Del Valle, M., Chauvete, M. (2005): La economía de los sistemas campesinos de producción de leche en el estado de Mexico. *Tec Pecu Méx* 43 (1): 39-56.

- Faria, R.J., Valero-Leal, K., D'Pool, G., Garcia, U.A., Allara, C.M. (2005): Sensibilidad a los agentes antimicrobianos de algunos patógenos mastitogénicos aislados de leche de cuartos de bovinos mestizos doble propósito. *Revista Científica*, 15 (3): 227-234.
- FIRA [Fideicomisos Instituidos en Relación a la Agricultura] (2001): Tendencias y oportunidades de desarrollo de la red leche en México. Boletín informativo. No. 317. Vol. XXXIII. México.
- Fisher, K., Phillips, C., (2006): The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems, *J. Appl. Microbiol.*, 101(6):1232-1240.
- Fisher, K., Phillips, C., (2008): Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? Review, *Trends Food Sci. Tech.*, 19:156-164.
- Francis, J. (2016): *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle. Recuperado el día 22/03/16 en: <http://www.fs.fed.us/global/iitf/pdf/shrubs/Citrus%20aurantifolia.pdf>.
- Friedman, M., Henika, P.R. and Mandrell, R.E. (2002): Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. *J. Food. Prod.* 65, 1545-1560.
- Frutos Tropicales. Lima (*Citrus aurantifolia*. Familia. Rutáceas): Recuperado el día 05/03/16 en: <http://www.mercadosmunicipales.es/uploads/frutas/Lima.pdf>.
- Fuello, M.J. (2005): Frecuencia y tipos de toxinas superantígenos en *Staphylococcus aureus* de diferentes antígenos: relacionados con tipos genéticos. Tesis doctoral. Universidad de Oviedo.
- Fuselli, S.R., García, S.B., Eguaras, M.J., Fritz, R., (2008): Chemical composition and antimicrobial activity of Citrus essences on honeybee bacterial pathogen *Paenibacillus*

larvae, the causal agent of American foulbrood, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 24:2067-2072.

Gajadhar, A.A., Allen, J.R. (2004): Factors contributing to the public health and economic importance of waterborne zoonotic parasites. *Veterinary Parasitology*, 126:3-1.

García, G.A.M., Tapia, R. R. (2011): Detección de las cepas de *Staphylococcus aureus* Oxacilina resistentes (ORSA), en unidades de producción lechera de tipo familiar. Tesis de licenciatura de la FMVZ-UAEM.

García GA (2013): Identificación del fenotipo y genotipo capsular 5 y 8 de *Staphylococcus aureus* y su capacidad de sobrevivencia intracelular en neutrófilos de vacas lecheras. Tesis de Maestra en ciencias agropecuarias y recursos naturales, FMVZ-UAEM., Toluca, México.

García, S., Acevedo, C.A., Bennani (2005): Técnicas para la detección de *Staphylococcus aureus* resistente a metaciclina en el laboratorio de microbiología clínica. Asociación Española de Farmaceuticos Analistas Modesto Lafuente, 3-28010 Madrid Actualidades.

Garduño, C.; Barrera, L., Rios, Y. (2010): Evaluation of the fungicidal activity of leaves powders and extracts of fifteen mexican plants against *Fusarium oxysporum* f. sp. *gadioli* (Massey) Snyder and Hansen. *Plant Pathology Journal* 9: 103- 111.

Gentilini, E., Denamiel, G., Llorente, P., Godaly, S., Rebuelto, M., De Gregorio, O. (2000): Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitis in Argentina. *J Dairy Sci.*, 83:1224-1227.

Gerlach, B.F., Ayala, A.F., Denogean, B.F., Moreno, M.S., Gerlach, B.L. (2009): Incidencia y costo de la mastitis en un establo del municipio de Santa Ana, Sonora. *Revista Mexicana de Agronegocios* 13(024): 794-796.

Geron-Muñoz, M., Tonhati, H., Duarte, J., Oliveira, J., Muñoz-Berrocal, M., Jurado-Gómez, M. (2002): Factors affecting somatic cell counts and their relations with milk and milk constituent yield in buffaloes. *J. Dairy Sci.* 85, 2885-2889.

- Giannechini, R., Concha, C., Rivero, R., Delucci, I., Moreno López, J. (2002): Occurrence of Clinical and Sub-Clinical Mastitis in Dairy Herds in the West Littoral Region in Uruguay. *Acta Vet. Scand.* 43:221-230.
- Gil, D.M. (2000): Staphylococcus aureus: Microbiología y aspectos moleculares de la Resistencia a meticilina. *Rev. Chil. Infect.*, 17(2): 145-152.
- Gómez V.A. (2002): Plant use knowledge of the Winikina Warao: The case for questionnaires in ethnobotany. *Econ. Bot.* 56:231-242.
- González, E. M., Lopez, E.L.I., González, E. M.S., Tena, F.J.A. (2004): Plantas medicinales del Estado de Durango y zonas aledañas. I.P.N, Durango. 205 p.
- Hendrikson, R.S., Mevius, D.J., Schroeter, A., Teale, C., Meunier, D., Butaye, P., Francisco, A., Utinane, A., Amado, A., Moreno, M., Greko, C., Stark, K., Berghold, C., Myllyniemi, A.L., Wasyl, D., Sunde, M., Aarestrup, F.M. (2008): Prevalence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens isolated from cattle in different European countries: 2002-2004. *Acta Vet Scand.*, 50 (28):1-10.
- Hernández, A. *et al.* (2007): Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades poscosecha hortofrutícolas. *Fitotecnica mexicana*; 30(2): 119-123.
- Hernández, A.L., Chavez, A.E., Perez, D.M. (1991): Sensibilidad Antimicrobiana y producción de β -lactamasa en Staphylococcus aureus y Staphylococcus coagulasa negativa aislados de mastitis bovina. *Vet. Mex.*, 22(4): 290-294.
- Ho, K.Y., Tsai, C.C., Huang, H.S., Chen, C.P., Lin, T.C., Lin, C.C. (2001): Antimicrobial activity of tannin components from Vaccinium vitis-ideae L. *J Pharmacol* 53:187-91.
- Aibinu, I., Tayo Adenipekun, Toyin Adelowotan, Tolu Ogunsanya and Tolu Odugbemi (2007): Evaluation of the antimicrobial properties of different parts of citrus aurantifolia (lime fruit) as used locally. *Afr. J. Trad. CAM* 4 (2): 185-190

- Imran, K., Saeed, M., Randhawa, M.A., Rizwan Sharif, H., (2013): Extraction and applications of Grapefruit (*Citrus paradise*) peel oil against *E. coli*, *Pak. J. Nut.*, 12(6):534-537.
- Kaszanyitzky, E.J., Jánosi, S., Somogyi, P., Dán, A., Graaf-van Bloois, L., Duijkeren, E., Wagenaar, J.A. (2007): MRSA Transmission Between Cows and Humans. *Emerging Infectious Diseases*. 13(4):630-632.
- Katewa, S., Chaudhary, B., Jain, A. (2004): Folk herbal medicines from tribal area of Rajasthan, India. *J. Ethnopharmacol.* 92: 41-46.
- Kluytams, J., Belkum, V.A., Verbrugh, H. (1997): Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: Epidemiology, Underlying Mechanisms, and Associated Risks. *Clinical microbiology reviews*, 10 (3): 505-520.
- Kmal, R., Bayoumi, M., Abd El Aal, S., (2013): MRSA detection in raw milk, some dairy products and hands of dairy workers in Egypt, a mini survey. *Food control* 33: 49-53
- Lachman, J., Pronek, D., Hejtmánková, A., Dudjak, J., Pivec, V., Faitová, K., (2003): Total polyphenol and main flavonoid antioxidants in different onion (*Allium cepa* L.) varieties. *Am Soc Hort Sci.* 2003; 30: 142-147.
- Lagunas, B.S. (2002): Detección del gen *mecA* en *Staphylococcus aureus* meticilina resistente por el método de reacción en cadena de la polimerasa en muestras de leche de vacas lecheras. Tesis de licenciatura, FMVZ-UAEM., Toluca, México.
- Lagunas, B.S., Velázquez, V.O., Vazquez, C.J. (2003): Detection of the *mec A* gene in strains of *Staphylococcus aureus* methicilin resisten isolated from milk samples of dairy cows through the polymerase chain rection (PCR): XI International Congress in animal Hygiene Vol. I. Mexico city; 189-192.
- Lamprell, H., Villard, L., Chamba, J.F., Beuvier, E., Borges, E., Maurin, F., Mazerolles, G., Noel, Y., Kodjo, A. (2004): Identification and biotyping of coagulase positive *Staphylococci*

- (CPS) in ripened French raw milk cheeses and their in vitro ability to produce enterotoxins. *Rev. Med. Vet.* 155(2): 92-96.
- Lee, J.H. (2003): Meticillin (Oxacillin)- Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Major Food Animals and Their Potential Transmission to Humans. *American Society for Microbiology*, 69(11):6489-6494.
- Leitner, G., Krifucks, O., Glickman, A., Younis, A., Saran, A. (2003): *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis: virulence, antibody production and protection from challenge in a mouse model. *Immunology and Medical Microbiology* 35:99-106.
- Lohet, J.V., Percival, S.L., Woods, E.J., Williams, N.J., Cochrane, A. (2009): Silver resistance in MRSA isolated from wound and nasal sources in humans and animals. *International Wound Journal*; 6(1):32-38.
- Londoño, J.F., Ortiz, G.M., Gaviria, N.A. (2006): Prevalencia de *Staphylococcus aureus* resistente a meticiclina en personal de la unidad de terapia intensiva de la Clínica Universitaria Bolivariana, Medellín 2004. *Infection*; 10(3): 160-166.
- López, J.M., Higuera, R.J., Ochoa, Z.A., Chassin, N.O., Valdez, A.J., Bravo, P.A., Baizabal, A.B. (2006): Caracterización molecular de aislamientos de *Staphylococcus* spp. asociados a mastitis bovina en Tarímbaro, Michoacán, México. *Téc Pecu Mex*;44(1):96-106.
- López, V.M., Velázquez, O.V., Alonso, F.M.U., Díaz, Z.S., Pulido, G.G. (2011): Identificación de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (ORSA/MRSA) y con resistencia borderline (BORSA) aisladas de vacas lecheras en el Valle de Toluca. XXXV Congreso Nacional de Buiatría.
- López, V.M. (2011): Caracterización de los antibiogramas oxacilina/meticilina resistentes en cepas de *S. aureus* aislados de vacas lecheras en producción familiar del Valle de Toluca. Tesis de licenciatura de la FMVZ-UAEM, Toluca, Estado de México.

- López, V.M. (2014): Variación genética del antibiograma meticilina resistente de aislamientos de *S. aureus* origen bovino en el Valle de Toluca. Tesis de Maestra en ciencias agropecuarias y recursos naturales, FMVZ-UAEM., Toluca, México.
- Lota, M., De Roca, D., Camille, F., Casanova, J. (2002): Volatile components of peel and leaf oils of lemon and lime species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 796-805.
- Lozoya, X. (1999): Two decades of Mexican ethnobotany and research in plant drugs. Research Unit in Pharmacology of Natural Products, National Center, Mexican Institute of Social Security, Mexico city Ciba Foundation symposium 185:130-152.
- Ma, Y., Ye, X., Hao, Y., Xu, G., Liu, D. (2008): Ultrasound-assisted extraction of Hesperidin from pummelo (*Citrus reticulata*) peel. *Ultrasonics Sonochemistry* 2008; 15: 227 -232.
- Mandalari, G., Bennett, R.N., Bisignano, G., Trombetta, D., Saija, A., Faulds, C.B., Gasson, M.J., Narbad, A. (2007): Antimicrobial activity of flavonoids extracted from bergamot (*Citrus bergamia* Risso) peel, a byproduct of the essential oil industry. *Journal of applied microbiology*, 103(6):142-154.
- Manjarrez, L.A.M., Díaz, Z.S., Salazar, G.F., Valladares, C.B., Gutiérrez, C.A.C., Barbabosa, P.A., Talavera, R.M., Uxúa, A.F.M., Velázquez, O.V. (2012): Identificación de biotipos de *Staphylococcus aureus* en vacas lecheras de producción familiar con mastitis subclínica en la región centro-este del Estado de México. *Rev. Mex. Cienc. Pecu.*
- Manjarrez, L.A.M., Velázquez, O.V., Alonso, M.U., Díaz, Z.S., Lagunas, B.S., Valladares, C.B., Saltijeral, O.J. (2008): Niveles de infección producidos por *Staphylococcus aureus* en hatos lecheros del Estado de México. Reunión Nacional de Investigación Pecuaria, Yucatán, México.
- Martin, G. (2001): *Etnobotánica: Manual de métodos*. Nordan-Comunidad. Montevideo, Uruguay. 240 pp.

- Martínez, C. (2007): Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento. Universidad Autónoma de Barcelona, Facultad de Veterinaria. Tesis Doctoral.
- Mendoza, T.C.A., Velazquez, T.R., Mercado, D.L., Ballon, E.J., Maguiña, V.C. (2003): Susceptibilidad antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* sensible, con sensibilidad BORDELIN y resistente a la meticilina. *Rev. Med. Hered*, 14(4):181-185.
- Miranda, M.R.E., Rojas, T.V., Segura, C.R. *et al.* (2008): Prevalence of pathogens associated with bovine mastitis in bulk tank milk in Mexico. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v.1149, p.300-302.
- Mubarack, H.M., Doss, A., Dhanabalan, R., Venkataswamy, R. (2011): Activity of some selected medicinal plant extracts against bovine mastitis pathogens. *J. Anim. Vet. Adv.* 10:738-41. <http://dx.doi.org/10.3923/javaa.2011.738.741>.
- Nash, D. L., Rogers, G.W., Cooper, J. B., Hargrove, G.L., Keown, J. F. (2003): Heritability of Intramammary Infections at First Parturition and Relationships with Sire Transmitting Abilities for Somatic Cell Score, Udder Type Traits, Productive Life, and Protein Yield. *J. Dairy Sci.* 86:2684-2695.
- NCCLS [National Committee for Clinical Laboratory Standards] (2000): Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard M7-A5.. NCCLS, Wayne, Pa.
- NCCLS [National Committee for Clinical Laboratory Standards] (2001): Development of in vitro susceptibility testing and quality control parameters. Approved guideline, 2nd ed. NCCLS document M23- A2. NCCLS, Wayne, Pa.
- NMS [National Mastitis Council] (2005): Laboratory handbook on Bovine Mastitis. Madison, Wisconsin. National Mastitis Council Inc; USA
- Nogata, Y., Sakamoto, K., Shiratsuchi, H., Ishii, T., Yano, M., Ohta, M. (2006): Flavonoid Composition of fruit tissues of citrus species. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 70(1), 178-192.

- Oliveira, M. A., Velázquez, D., Bermúdez, A. (2005): La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: Una revisión de sus objetivos actuales. *Interciencia*, 30:453-459
- Oliveira, A.C.S., Rabelo, M.Z.J., Bispo Reis Di Iorio, F., Pereira, C.A., Cardoso, A.O., (2014): The antimicrobial effects of *Citrus limonum* and *Citrus aurantium* essential oils on multi-species biofilms, *Braz. Oral Res.*, 28(1):22-27.
- OMS [Organización Mundial de la Salud] (2002): *Informe Mundial de la Salud 2002: reducir los riesgos y promover una vida de salud* (p.248): Ginebra: Organización Mundial de la Salud.
- Onyeagba, R.A., Ugbogu, O.C., Okeke, C.U., Iroakasi, O. (2004): Studies on the antimicrobial effects of garlic (*Allium sativum* Linn), ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and lime (*Citrus aurantifolia* Linn): *Afr. J. Biotechnology*, Vol.3(10),552-554.
- Ortiz, Z.C., & Vera, A.R. (2006): Recuento de células somáticas en hatos lecheros de diferente nivel tecnológico en Arequipa. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 17(2):104-107.
- Osuna Torres, L., Tapia perez, M. E., Aguilar Contreras, A. (2005): Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales. Estudio etnobotánico, fitoquímico y farmacológico. Universidad de Barcelona. Barcelona, España.
- Pahissa, A.B. (1997): Infección por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina. Ejemplo de la complejidad actual de los hospitales. *Med. Clinica*, 108 (11):419-420.
- Palavecino, E. (2002): Recomendaciones del National Committee for Clinical Laboratory Standards para el estudio de susceptibilidad en microorganismos fastidiosos y en microorganismos que presentan mecanismos de Resistencia difíciles de detectar. *Rev. Chil. Infectol.* V. 19, supl. 2. Santiago 129-134.
- Piccinelli, A., Mesa, M., Armenteros, D. et.al. (2008): HPLC-PDA-MS and NMR characterization of C-glycosyl flavones in a hydroalcoholic extract of *Citrus aurantifolia*

- leaves with antiplatelet activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56: 1574-1581.
- Prants, G., (2005): *Microbiología Clínica*, Editorial Médica Panamericana, Primera Edición, Buenos Aires: Madrid, Pág. 48.
- Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E. *et al.* (2005): *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas*. Porto Alegre: Artmed, 2005. 512p.
- Radostits, O.M., Gay, C.C., Blood, D.C., Hinchcliff, K.W. (2002): *Medicina Veterinaria. Mastitis Bovina*. Edit. Mcgraw-hill. 9o Edición. Vol 1. Madrid, España. pp 728, 810.
- Rehman, Z., (2006): Citrus peel extract: A natural source of antioxidant. *Food Chem.*, 99:450-454.
- Remedios populares (2016): Limón. Recuperado el día 22/02/16 en: <http://www.remediospopulares.com/limon.html> Revisado el 20 de Febrero de 2016.
- Romero, A. T. (2004): Situación actual de la mastitis en México. Dpto. Producción Animal, FMVZ-UNAM. México, D.F. pp.122-134.
- Roussenova, N., (2011): Antibacterial activity of essential oils against the etiological agent of American fowlbrood disease (*Paenibacillus larvae*), *Bulg. J. Vet. Med.*, 14(1):17-24.
- Roy, A. y Saraf, S. (2006): Limonoids: Overview of Significant Bioactive Triterpenes Distributed in Plants Kingdom. *Biol. Pharm. Bull.* 29(2) 191-201.
- Russi, N.B., Bantar, C., Calvino, L.F. (2008): Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis in Argentine dairy herds. *Revista Argentina de Microbiologia*, 40:116-119.
- SAGARPA [Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación] (2005): Plan Rector Sistema Nacional Limón Mexicano.

- SAGARPA [Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación de México] (2009): Portal oficial - [http:// www.sagarpa.gob.mx](http://www.sagarpa.gob.mx)
- SAGARPA [Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación] (2012): Situación actual y perspectivas de la producción de la leche en México. Edición económica. México.
- Sánchez, N., Bu Wong, M., Pérez, H., Lara, G., Scull, I. (2012): Efecto del zumo de *Morinda citrifolia* L. (noni) en modelos de analgesia *Revista Cubana de Plantas Medicinales*.17(3):213-222. [Citado 1 Marzo 2016].
- Saran, A. y Chaffer, M. (2000): Mastitis y calidad de leche. *Inter-Médica*. Buenos Aires. pp.11-25, 133-135.
- Schlaepfer, L., Mendoza-Espinoza, J.A. (2010): Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas.*, Academia de Biología Humana, Colegio de Ciencia y Tecnología, Universidad Autónoma de la Ciudad de México., Volumen 41(4): Pp. 18-27.
- Shinefield, H. R., Ruff, N. L. (2009): Staphylococcal Infections: A Historical Perspective. *Infectious Disease Clinics of North America*, 23(1), 1-15.
- Shiva Ramayoni, C. (2007): Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento. (tesis doctoral): Universidad Autónoma de Barcelona 2007.
- Shoshani, E., G. Leitner, B. Hanochi, A. Saran, N.Y. Shpigel, and A. Berman, 2000: Mammary infection with *Staphylococcus aureus* in cows: progress from inoculation to chronic infection and its detection. *J. Dairy Res.* 67, 155-169.
- Smith-Palmer, A., Stewart, J., Fyfe, L. (2001): The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiology*, 18: 463-470.

- Solórzano, F., Miranda, M.G. (2012) Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents, *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 23, no. 2, pp. 136-141.
- Steel, R.G.D., Torrie, J.H. (1990): *Bioestadística: Principios y procedimientos*. 2a ed. México: McGraw-Hill.
- Sumano, L.H., Camberos, O.L. (2007): *Farmacología Veterinaria*. Mc Graw Hill, México.
- Talavera, R.M., Barcenas, C.R. (1992): Prevalencia de mastitis subclínica en explotaciones lecheras familiares de Toluca. Tesis de Licenciatura de FMVZ-UAEM, Toluca, Estado de México.
- Tassou, C., Koutsoumanis, K., Nychas, G.J.E., (2000): Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil, *Food Res. Int.*, 33(3):273-280.
- Taylor, L. (2004): *The healing power of Rainforest Herbs*, NY. Sq. one publishers Inc. Available on <http://www.rain-tree.com/prepmethod.htm>
- Tim Cushnie, T.P., & Lamb, A. (2005): Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26,343-356.
- Velázquez, J., Lizaraso, F., Wong, W., Alfaro, C., Veliz, J. (2002): Vigilancia de la resistencia de *Staphylococcus aureus* a la oxacilina-vancomicina y patrones de corresponsencia. http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/spmi/vol15_N4/vigilancia_resistencia_staphylococcus.htm (17 de Febrero del 2014)
- Velázquez, O.V., Lagunas, B.S., Gutiérrez, G.B., Talavera, R.M., Alonso, F.M., Saltijeral, O.J. (2005): *Staphylococcus aureus* methicillin resistant strain (MRSA) minimum inhibitory enrofloxacin concentration in *Staphylococcus aureus* isolations obtained from cows with subclinical mastitis in family dairy farms [abstract]. *Inter Soc Anim Hygiene Cong. ISAH - Warsaw, Poland*. 1:338.

- Waage, S. (1997): Comparison of two regimens for the treatment of clinical bovine mastitis caused by bacteria sensitive to penicillin. *Vet Rec* 141, 616-620.
- Wattiaux, M.A. (2013): Mastitis: prevención y detección”. En: *Esenciales Lecheras*. Instituto Babcock para la Investigación y Desarrollo Internacional de la Industria Lechera, Universidad de Wisconsin-Madison. Madison, WI, USA. pp. 93-96. http://babcock.wisc.edu/sites/default/files/de/es/de_24.es.pdf
- Wolter, W., Castañeda, V.H., Kloppert, B., Zchoeck, M. (2002): Instituto Estatal de Investigaciones de Hesse, I.E.I. Hesse, Marburgerstrasse 54 D-35396 Giessen Germany, Universidad de Guadalajara Centro Universitario de Ciencias Biologicas y Agropecuarias. Depto. De Salud Pública. Carretera Guadalajara-Nogales. Zapopan, Jalisco, México.
- Yin, X., Gyles, C.L., Gong, J., (2012): Grapefruit juice and its constituents augment the effect of low pH on inhibition of survival and adherence to intestinal epithelial cells of *S. enterica* serovar typhimurium PT193. *Int. J. Food Microbiol.*, 158:232-238.
- Zafalon, L.F., Nader Filho, A., Oliveira, J.V., Resende, F.D. (2007): Subclínical mastitis caused by *Staphylococcus aureus* : cost benefit analysis of antibiotic therapy in lactating cows. *Arq Bras Med Vet Zoo*; 59: 577-85 <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352007000300005>

Anexos

Anexo 1

Sensibilidad *in vitro* del *Stapylococcus aureus* a los Antrimicrobianos en aislamientos de vacas lecheras

Sensibilidad in vitro del Staphylococcus aureus a los Antrimicrobianos en aislamientos de vacas lecheras

CEPA	OXACILINA	AMOXICILINA/ AC. CLAVULÁNICO	CEFOXITINA	PENICILINA	VANCOMICINA
ATCC 43300	0	6	8	10	8
ATCC 29213	22	10	13	18	12
ATCC 25923	0	9	10	20	10
MRSA	0	12	10	17	10
5 d	13	22	13	20	13
7 d	11	22	10	15	16
11 b	14	20	19	20	17
12 d	8	16	10	23	10
15 b	6	10	12	5	12
18 a	9	17	11	19	13
19 c	11	17	14	17	12
20	10	9	11	5	10
25	6	13	10	12	10
27 a	14	18	13	20	12
37	11	34	26	4	15
38	13	34	24	16	12
39	18	26	21	23	18
41	23	40	26	27	17
42	19	25	18	16	23
43	17	22	19	13	20
44	26	36	28	20	10
45	33	50	36	27	17
46	18	22	24	24	17
47	18	37	26	22	18
48	24	17	33	18	17
49	21	24	17	26	13
51	17	26	21	28	15
52	13	36	32	25	15
53	12	24	22	23	18
54	29	45	30	26	17
55	35	47	38	29	16
56	20	24	24	16	17
57	25	38	29	20	22
PROMEDIO (\bar{X})	16.5	26.1	20.9	19.2	15.1
DESV. ESTAN. (D.E.)	8.1	11.1	8.4	6.7	3.6

Sensibles
 Intermedias
 Resistentes

Anexo 2

Distribución de la resistencia *in vitro*
de *Staphylococcus aureus* a los
antibióticos β -lactámicos

Distribución de la resistencia in vitro de Staphylococcus aureus a los antibióticos β -lactámicos

Cepas	OXACILINA			AMOX./AC. CLAV.			CEFOXITINA			PENICILINA			VANCOMICINA		
	Sensible (≥ 13 mm)	Intermedia (11-12 mm)	Resistente (≤ 10 mm)	Sensible (≥ 20 mm)	Resistente (≤ 19 mm)	Sensible (≥ 18 mm)	Intermedia (15-17 mm)	Resistente (≤ 14 mm)	Sensible (≥ 29 mm)	Resistente (≤ 28 mm)	Sensible (≥ 17 mm)	Intermedia (15-16 mm)	Resistente (≤ 13 mm)		
ATCC 43300	-	-	0	-	6	-	-	8	-	10	-	-	8		
ATCC 29213	22	-	-	-	10	-	-	13	-	18	-	-	12		
ATCC 25923	-	-	0	-	9	-	-	10	-	20	-	-	10		
MRSA	-	-	0	-	10	-	-	10	-	10	-	-	9		
Cepas de campo															
5 d	13	-	-	22	-	-	-	13	-	20	-	-	13		
7 d	-	11	-	22	-	-	-	10	-	15	-	-	-		
11 b	14	-	-	20	-	19	-	-	-	20	17	-	-		
12 d	-	-	8	-	16	-	-	10	-	23	-	-	10		
15 b	-	-	6	-	15	-	-	12	-	21	-	-	12		
18 a	-	-	9	-	17	-	-	11	-	19	-	-	13		
19 c	-	11	-	-	17	-	-	14	-	17	19	-	-		
20	-	-	10	-	19	-	-	14	-	25	-	-	10		
25	-	-	0	-	13	-	-	10	-	12	-	-	10		
27 a	14	-	-	-	18	-	-	13	-	20	-	-	12		
37	-	11	-	34	-	26	-	-	-	10	-	-	12		
38	13	-	-	34	-	24	-	-	-	16	-	-	12		
39	18	-	-	26	-	21	-	-	-	23	-	-	-		
41	23	-	-	40	-	26	-	-	-	27	17	-	-		
42	19	-	-	25	-	18	-	-	-	16	23	-	-		
43	17	-	-	22	-	19	-	-	-	13	20	-	-		
44	26	-	-	36	-	28	-	-	-	20	-	-	10		
45	33	-	-	50	-	36	-	-	-	27	17	-	-		
46	18	-	-	22	-	24	-	-	-	24	17	-	-		
47	18	-	-	37	-	26	-	-	-	22	18	-	-		
48	24	-	-	-	17	33	-	-	-	18	17	-	-		
49	21	-	-	24	-	-	17	-	-	26	-	-	13		
51	17	-	-	26	-	21	-	-	29	-	-	15	-		
52	13	-	-	36	-	32	-	-	-	25	-	15	-		
53	-	12	-	24	-	22	-	-	-	23	18	-	-		
54	29	-	-	45	-	30	-	-	-	26	17	-	-		
55	35	-	-	47	-	38	-	-	29	-	-	16	-		
56	20	-	-	24	-	24	-	-	-	16	17	-	-		
57	25	-	-	38	-	29	-	-	-	20	22	-	-		
PROMEDIO (\bar{X})	20.6	11.3	4.1	31.1	13.9	26.1	17.0	11.4	29.0	19.4	18.4	15.4	11.0		
DESV. ESTAN. (D.E.)	11.2	3.7	2.7	16.8	7.2	13.8	3.0	5.8	7.0	6.8	9.3	5.6	5.6		

Anexo 3

Comparación de la Sensibilidad de las cepas OSSA de *S. aureus* aisladas a los extractos alcohólico y acuoso obtenidos a partir de hoja de *Citrus aurantifolia*

Comparación de la Sensibilidad de las cepas OSSA de *S. aureus* aisladas a los extractos
 94 alcohólico y acuoso obtenidos a partir de hoja de *Citrus aurantifolia*

Cepa	Extracto alcohólico de hoja (μL)						Extracto acuoso de hoja (μL)				
	10	20	30	40	50		10	20	30	40	50
5 d	7	10	13	14	15	0	7	8	9	12	
7 d	9	11	13	14	15	0	8	9	10	12	
11 b	8	10	12	14	15	0	6	8	11	12	
19 c	8	10	12	14	15	0	8	9	10	13	
27 a	6	7	11	12	15	0	8	9	10	12	
37	8	9	10	12	15	0	8	10	12	14	
38	7	8	10	12	14	0	7	8	9	10	
39	10	12	14	15	16	0	8	9	10	11	
41	10	11	12	14	15	0	7	8	9	10	
42	9	10	12	13	14	0	7	8	10	11	
43	8	10	12	13	15	0	8	9	10	12	
44	10	11	12	13	15	0	8	9	10	11	
45	8	9	10	12	15	0	7	8	9	10	
46	10	11	13	14	16	0	7	9	10	11	
47	10	11	12	14	15	0	7	8	10	12	
48	10	11	12	13	14	0	8	9	10	11	
49	9	10	11	12	14	0	8	9	10	12	
51	10	11	12	14	15	0	8	9	10	11	
52	10	12	13	15	16	0	7	8	9	10	
53	9	10	12	13	15	0	8	9	10	11	
54	8	10	11	12	14	0	8	9	10	12	
55	10	12	13	14	15	0	7	9	10	12	
56	8	9	10	12	15	0	7	8	9	10	
57	10	11	12	13	14	0	7	8	10	11	
$\bar{X} \pm D.E.$	8.4 ± 1.3	10.3 ± 1.2	11.9 ± 1.5	13.3 ± 1.4	14.9 ± 1.2	-	6.3 ± 2.8	8.4 ± 0.8	9.8 ± 0.7	11.3 ± 1.0	

Del total de cepas de *S. aureus* aisladas, 80% (24/30) fueron clasificadas como OSSA.

Anexo 4

Comparación de la Sensibilidad de las cepas ORSA/MRSA de *S. aureus* a los extractos alcohólico y acuoso obtenidos a partir de hoja de *Citrus aurantifolia*

Comparación de la Sensibilidad de las cepas ORSA/MRSA de *S. aureus* a los extractos
 96 alcohólico y acuoso obtenidos a partir de hoja de *Citrus aurantifolia*

Cepa	Extracto alcohólico de hoja (μL)					Extracto acuoso de hoja (μL)				
	10	20	30	40	50	10	20	30	40	50
MRSA Cepa de campo	8	10	11	12	13	0	0	7	10	11
12 d	8	10	11	12	13	0	0	7	10	11
15 b	7	13	18	19	20	0	7	8	9	10
18 a	7	10	11	13	17	0	8	9	10	12
20	8	10	11	13	14	0	8	10	11	13
25	6	10	12	13	14	0	0	7	10	11
$\bar{X} \pm D.E.$	7.3 ± 0.8	10.7 ± 1.2	12.5 ± 2.7	13.8 ± 2.6	15.5 ± 2.6	-	5.0 ± 3.9	8.2 ± 1.2	9.8 ± 0.8	11.2 ± 1.2

Del total de cepas de *S. aureus* aisladas, 20% (6/30) fueron clasificadas como ORSA/MRSA.

Anexo 5

Comparación de la Sensibilidad de las cepas OSSA de *S. aureus* aisladas a los extractos alcohólico y acuoso obtenidos a partir de cáscara de *Citrus aurantifolia*

Comparación de la Sensibilidad de las cepas OSSA de *S. aureus* aisladas a los extractos
98 alcohólico y acuoso obtenidos a partir de cáscara de *Citrus aurantifolia*

Cepa	Extracto alcohólico de hoja (μL)					Extracto acuoso de hoja (μL)				
	10	20	30	40	50	10	20	30	40	50
5 d	0	0	10	12	14	0	10	11	12	13
7 d	0	8	10	11	13	0	0	6	8	10
11 b	0	7	9	10	11	0	6	7	9	12
19 c	0	8	9	10	11	0	0	7	8	10
27 a	0	0	8	10	12	0	0	9	10	12
37	0	7	9	10	12	0	0	6	8	11
38	0	8	9	11	13	0	7	9	12	13
39	0	10	11	12	13	0	0	6	9	11
41	0	9	10	11	13	0	6	8	10	14
42	0	10	11	12	13	0	0	6	8	11
43	0	8	10	11	12	0	0	7	9	12
44	0	7	8	10	12	0	0	6	10	12
45	0	7	9	11	13	0	7	11	13	14
46	0	7	8	10	12	0	7	10	11	13
47	0	8	9	10	12	0	0	7	9	12
48	0	7	8	10	12	0	10	12	13	14
49	0	8	10	12	13	0	8	10	13	15
51	0	10	11	12	13	0	7	9	11	13
52	0	10	12	13	14	0	6	7	10	12
53	0	10	12	13	14	0	7	8	10	11
54	0	9	10	11	12	0	7	9	11	12
55	0	10	11	12	13	0	6	10	12	14
56	0	10	12	13	14	0	6	9	11	12
57	0	10	11	13	14	0	6	8	12	14
$\bar{X} \pm D.E.$	-	7.8 ± 2.7	9.9 ± 1.3	11.3 ± 1.1	12.7 ± 0.9	-	4.4 ± 3.6	8.3 ± 1.8	10.4 ± 1.7	12.4 ± 1.3

Del total de cepas de *S. aureus* aisladas, 80% (24/30) fueron clasificadas como OSSA.

Anexo 6

Comparación de la Sensibilidad de las cepas ORSA/MRSA de *S. aureus* a los extractos alcohólico y acuoso obtenidos a partir de cáscara de *Citrus aurantifolia*

*Comparación de la Sensibilidad de las cepas ORSA/MRSA de S. aureus a los extractos
100 alcohólico y acuoso obtenidos a partir de cáscara de Citrus aurantifolia*

Cepa	Extracto alcohólico de hoja (μL)					Extracto acuoso de hoja (μL)				
	10	20	30	40	50	10	20	30	40	50
MRSA Cepa de campo	0	0	10	11	12	0	0	7	10	11
12 d	0	0	7	8	9	0	8	10	12	13
15 b	0	0	8	9	10	0	9	12	13	14
18 a	0	0	8	9	10	0	9	11	12	13
20	0	0	7	9	10	0	9	11	13	14
25	0	0	7	9	11	0	8	11	12	13
$\bar{X} \pm D.E.$	-	-	7.8 ± 1.2	9.2 ± 1.0	10.3 ± 1.0	-	7.2 ± 3.5	10.3 ± 1.8	12.0 ± 1.1	13.0 ± 1.1

Del total de cepas de *S. aureus* aisladas, 20% (6/30) fueron clasificadas como ORSA/MRSA.

Anexo 7

Distribución total de la Sensibilidad
de las cepas de *S. aureus* analizadas a
los extractos alcohólico y acuoso
obtenidos a partir de hoja de *Citrus
aurantifolia*

Anexo 8

Distribución total de la Sensibilidad
de las cepas de *S. aureus* analizadas a
los extractos alcohólico y acuoso
obtenidos a partir de cáscara de
Citrus aurantifolia

*Distribución total de la Sensibilidad de las cepas de S. aureus analizadas a los extractos
104 alcohólico y acuoso obtenidos a partir de cáscara de Citrus aurantifolia*

Cepa	Extracto alcohólico de hoja (μL)					Extracto acuoso de hoja (μL)				
	10	20	30	40	50	10	20	30	40	50
ATCC 43300	0	0	8	10	11	0	0	7	9	11
ATCC 29213	0	8	10	11	12	0	0	8	10	12
ATCC 25923	0	0	11	12	13	0	0	9	11	12
MRSA Cepa de campo	0	0	10	11	12	0	0	7	10	12
5 d	0	0	10	12	14	0	10	11	12	13
7 d	0	8	10	11	13	0	0	6	8	10
11 b	0	7	9	10	11	0	6	7	9	12
12 d	0	0	7	8	9	0	8	10	12	13
15 b	0	0	8	9	10	0	9	12	13	14
18 a	0	0	8	9	10	0	9	11	12	13
19 c	0	8	9	10	11	0	0	7	8	10
20	0	0	7	9	10	0	9	11	13	14
25	0	0	7	9	11	0	0	10	12	13
27 a	0	0	8	10	12	0	8	9	10	12
37	0	7	9	10	12	0	6	7	8	11
38	0	8	9	11	13	0	7	9	12	13
39	0	10	11	12	13	0	7	8	9	11
41	0	9	10	11	13	0	6	8	10	14
42	0	10	11	12	13	0	6	7	8	11
43	0	8	10	11	12	0	7	8	10	12
44	0	7	8	10	12	0	7	9	10	12
45	0	7	9	11	13	0	7	11	13	14
46	0	7	8	10	12	0	7	10	11	13
47	0	8	9	10	12	0	8	9	10	12
48	0	7	8	10	12	0	10	12	13	14
49	0	8	10	12	13	0	8	10	13	15
51	0	10	11	12	13	0	7	9	11	13
52	0	10	12	13	14	0	6	7	10	12
53	0	10	12	13	14	0	7	8	10	11
54	0	9	10	11	12	0	7	9	11	12
55	0	10	11	12	13	0	6	10	12	14
56	0	10	12	13	14	0	6	9	11	12
57	0	10	11	13	14	0	6	8	12	14
$\bar{X} \pm D.E.$	-	5.7 ± 4.2	9.5 ± 1.5	10.8 ± 1.3	12.2 ± 1.3	-	5.8 ± 3.2	8.9 ± 1.6	10.7 ± 1.6	12.5 ± 1.3

Anexo 9

Comparación total de las
Distribuciones de Sensibilidad de las
cepas de *S. aureus* analizadas a los
extractos alcohólico y acuoso
obtenidos a partir de hoja y cáscara
de *Citrus aurantifolia*

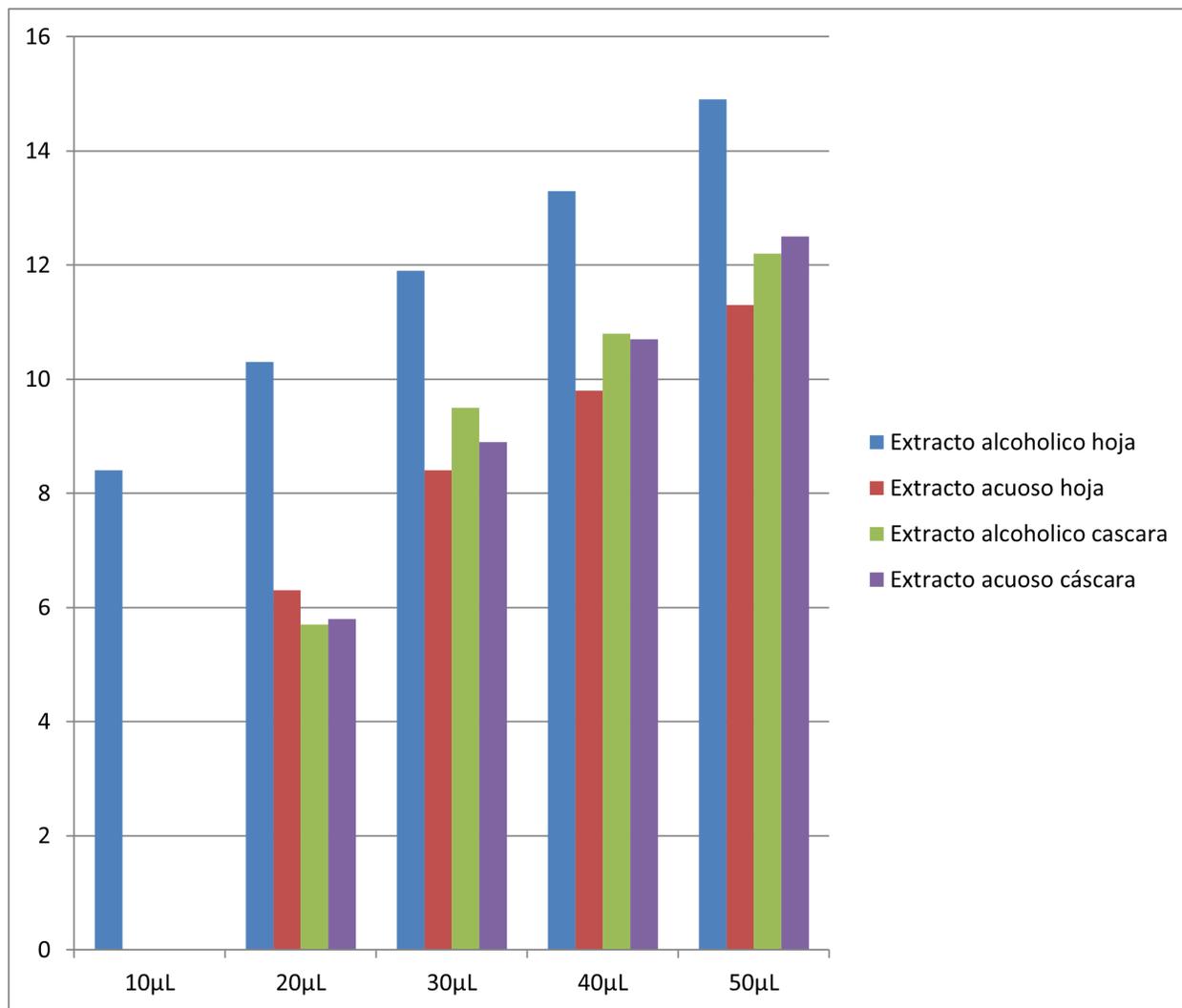


Figura 9-1: *Comparación total de las Distribuciones de Sensibilidad de las cepas de S. aureus analizadas a los extractos alcohólico y acuoso obtenidos a partir de hoja y cáscara de Citrus aurantifolia. En el eje horizontal se ve la cantidad de extracto utilizado (en µL); en el eje vertical se observa la sensibilidad (en mm).*