



UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLÍVAR
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS RECURSOS
NATURALES Y DEL AMBIENTE
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TEMA:

**“EVALUACIÓN IN VITRO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA
DEL ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO ROJO (*Thymus zygis*)
MEDIANTE LA TÉCNICA DE KIRBY-BAUER EN STAPHYLOCOCCUS
AUREUS AISLADA DE MASTITIS BOVINA”**

Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Médico Veterinario y Zootecnista, otorgado por la Universidad Estatal de Bolívar a través de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente. Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

AUTOR:

ANGEL MAURICIO CHÁVEZ MORALES

DIRECTOR:

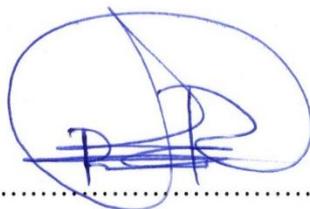
DR. EDISON RIVELIÑO RAMÓN CURAY M.Sc.

Guaranda – Ecuador

2022

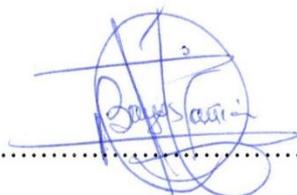
**EVALUACIÓN IN VITRO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL
ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO ROJO (*Thymus Zygis*) MEDIANTE LA
TÉCNICA DE KIRBY-BAUER EN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* AISLADO
DE MASTITIS BOVINA.**

REVISADO Y APROBADO POR LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL.



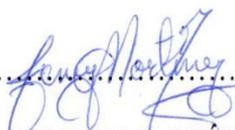
Dr. EDISON RIVELIÑO RAMÓN. M.Sc.

DIRECTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.



Ing. FAVIÁN BAYAS MOREJÓN Ph.D.

ÁREA DE BIOMETRÍA.



Dra. JENNY MARTÍNEZ MOREIRA MSC
ÁREA DE REDACCIÓN TÉCNICA

CERTIFICACIÓN DE AUTORÍA.

Yo, Ángel Mauricio Chávez Morales con CI. 0605395789 autor, declaro que el trabajo aquí escrito es de mi autoría, este documento no ha sido previamente presentado por ningún grado o calificación profesional; que las referencias bibliográficas que se incluyen han sido consultadas con sus respectivos autores.

La Universidad Estatal de Bolívar puede hacer uso de los derechos de publicación correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedades Intelectual, por su Reglamento y Normativa Institucional Vigente.



ANGEL MAURICIO CHÁVEZ MORALES

C.I.0605395789.

AUTOR.



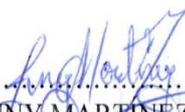
Dr. EDISON RIVELIÑO RAMÓN C. M.Sc.

DIRECTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.



Ing. FAVIÁN BAYAS MOREJÓN Ph.D.

ÁREA DE BIOMETRÍA.



Dra. JENNY MARTÍNEZ MOREIRA MSC

ÁREA DE REDACCIÓN TÉCNICA



20220201002P01666

DECLARACION JURAMENTADA
OTORGA: ÁNGEL MAURICIO CHÁVEZ MORALES
CUANTIA: INDETERMINADA
DI 2 COPIAS



En la ciudad de Guaranda, provincia Bolívar, República del Ecuador, hoy día martes uno de noviembre de dos mil veintidós, ante mí DOCTOR HERNÁN RAMIRO CRIOLLO ARCOS, NOTARIO SEGUNDO DE ESTE CANTÓN, comparece el señor Ángel Mauricio Chávez Morales, por sus propios derechos. El compareciente es de nacionalidad ecuatoriana, mayor de edad, de estado civil soltero, domiciliado en la calle Cinco de Junio y Chimborazo, cantón Riobamba, provincia Chimborazo y de tránsito por esta ciudad; con celular número: cero nueve ocho tres cero dos seis uno siete cero, correo electrónico: angchavez@mailles.ueb.edu.ec; a quien de conocerlo doy fe en virtud de haberme exhibido su cédula de ciudadanía en base a la que procedo a obtener su certificado electrónico de datos de identidad ciudadana, del Registro Civil, mismo que agrego a esta escritura como documento habilitante; bien instruido por mí el Notario en el objeto y resultados de esta escritura de Declaración Juramentada que a celebrarla procede, libre y voluntariamente.- En efecto juramentado que fue en legal forma previa las advertencias de la gravedad del juramento, de las penas de perjurio y de la obligación que tiene de decir la verdad con claridad y exactitud, declara lo siguiente: “Que previo a la obtención del Título de Médico Veterinario y Zootecnista, otorgado por la Universidad Estatal de Bolívar, a través de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente, de la escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, manifiesto que los criterios e ideas emitidas en el presente Proyecto de investigación Titulado: “EVALUACIÓN IN VITRO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO ROJO (*Thymus Zygis*) MEDIANTE LA TÉCNICA DE KIRBY-BAUER EN STAPHYLOCOCCUS AUREUS AISLADO DE MASTITIS BOVINA”, es de mi exclusiva responsabilidad en calidad de autor, además autorizo a la Universidad Estatal de Bolívar hacer uso de todos los contenidos que me pertenece o parte de los que contiene esta obra, con fines estrictamente académicos o de investigación, es todo cuanto tengo que decir en honor a la verdad”. Hasta aquí la declaración juramentada que junto con los documentos anexos y habilitantes que se incorpora queda elevada a escritura pública con todo el valor legal, y que el compareciente acepta en todas y cada una de sus partes, para la celebración de la presente escritura se observaron los preceptos y requisitos previstos en la Ley Notarial; y, leída que le fue al compareciente por mí el Notario, se ratifica y firma conmigo en unidad de acto quedando incorporada en el Protocolo de esta Notaría, de todo cuanto DOY FE.

Ángel Mauricio Chávez Morales
C.C. 0605395789

DR. HERNÁN RAMIRO CRIOLLO ARCOS
NOTARIO SEGUNDO DE CANTÓN GUARANDA
Se otorgó ante mí y en fe de ello
confiero ésta ^{primera}..... copia
certificada, firmada y sellada en
Guaranda, 01 de ^{Noviembre} del 20.22

Dr. Hernán Criollo Arcos
NOTARIO SEGUNDO DEL CANTÓN GUARANDA

CERTIFICADO DIGITAL DE DATOS DE IDENTIDAD



Número único de identificación: 0605395789

Nombres del ciudadano: CHAVEZ MORALES ANGEL MAURICIO

Condición del cedulado: CIUDADANO

Lugar de nacimiento: ECUADOR/CHIMBORAZO/RIOBAMBA/VELOZ

Fecha de nacimiento: 23 DE DICIEMBRE DE 1995

Nacionalidad: ECUATORIANA

Sexo: HOMBRE

Instrucción: BACHILLERATO

Profesión: BACH. EN CIENCIAS

Estado Civil: SOLTERO

Cónyuge: No Registra

Fecha de Matrimonio: No Registra

Datos del Padre: CHAVEZ HARO ANGEL RODOLFO

Nacionalidad: ECUATORIANA

Datos de la Madre: MORALES HIDALGO OLFA DALINDA

Nacionalidad: ECUATORIANA

Fecha de expedición: 21 DE MARZO DE 2019

Condición de donante: SI DONANTE

Información certificada a la fecha: 1 DE NOVIEMBRE DE 2022

Emisor: HERNAN RAMIRO CRIOLLO ARCOS - BOLIVAR-GUARANDA-NT 2 - BOLIVAR - GUARANDA



Handwritten signature



F. Alvear

Ing. Fernando Alvear C.
Director General del Registro Civil, Identificación y Cedulación
Documento firmado electrónicamente



REPÚBLICA DEL ECUADOR
 DIRECCIÓN GENERAL DE REGISTRO CIVIL, IDENTIFICACIÓN Y CEDULACIÓN
 N. 060539578-9



CÉDULA DE CIUDADANÍA
 APELLIDOS Y NOMBRES: CHAVEZ MORALES ANGEL MAURICIO
 LUGAR DE NACIMIENTO: CHIRIBORAZO VELOZ
 FECHA DE NACIMIENTO: 1985-12-23
 NACIONALIDAD: ECUATORIANA
 SEXO: HOMBRE
 ESTADO CIVIL: SOLTERO



EDUCACIÓN: BACHILLERATO
 PROFESIÓN / OCUPACIÓN: BACHILL EN CIENCIAS
 E33422242

APELLIDOS Y NOMBRES DEL PADRE: CHAVEZ HARO ANGEL RODOLFO
 APELLIDOS Y NOMBRES DE LA MADRE: MORALES HIDALGO OLGA DALINDA

LUGAR Y FECHA DE EXPEDICIÓN: RIOSANBA 2019-02-21
 FECHA DE EXPIRACIÓN: 2029-02-21





REPÚBLICA DEL ECUADOR
 CERTIFICADO DE VOTACIÓN, DUPLICADO
 EXENCIÓN O PAGO DE MULTA



7561922



Handwritten signature





Factura: 001-002-000033760



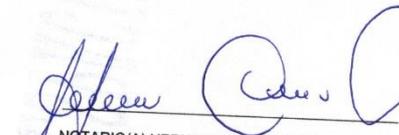
20220201002P01666

NOTARIO(A) HERNAN RAMIRO CRIOLLO ARCOS

NOTARÍA SEGUNDA DEL CANTON GUARANDA

EXTRACTO

Escritura N°:	20220201002P01666						
ACTO O CONTRATO:							
DECLARACIÓN JURAMENTADA PERSONA NATURAL							
FECHA DE OTORGAMIENTO:	1 DE NOVIEMBRE DEL 2022, (11:57)						
OTORGANTES							
OTORGADO POR							
Persona	Nombres/Razón social	Tipo interviniente	Documento de identidad	No. Identificación	Nacionalidad	Calidad	Persona que le representa
Natural	CHAVEZ MORALES ANGEL MAURICIO	POR SUS PROPIOS DERECHOS	CÉDULA	0605395789	ECUATORIANA	COMPARECIENTE	
A FAVOR DE							
Persona	Nombres/Razón social	Tipo interviniente	Documento de identidad	No. Identificación	Nacionalidad	Calidad	Persona que representa
UBICACIÓN							
Provincia		Cantón		Parroquia			
BOLIVAR		GUARANDA		ANGEL POLIVIO CHAVEZ			
DESCRIPCIÓN DOCUMENTO:							
OBJETO/OBSERVACIONES:							
CUANTÍA DEL ACTO O CONTRATO:	INDETERMINADA						


 NOTARIO(A) HERNAN RAMIRO CRIOLLO ARCOS
 NOTARÍA SEGUNDA DEL CANTÓN GUARANDA



URKUND

Documento: [Actividad Antimicrobiana Tomillo Argen Mauricio Chavez Morales.docx](#) (D:148327548)

Presentado: 2022-10-31 10:54 (-05:00)

Presentado por: inghaves@males.ueb.edu.ec

Recibido: enviemo.ueb@analisis.urkund.com

Mensaje: [Fwd: Morales antimicrobianos](#)

9% de estas 42 paginas, se componen de texto presente en 5 fuentes.

Lista de fuentes Bloques

Categoría	Enlace/nombre de archivo
	UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLIVAR / D145651723
	UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLIVAR / D148915004
	UNIVERSIDAD DE CUENCA / D16599638
	ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO / D13030217
	Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE / D78943305
	UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE / D109369039
	https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/dspace/handle/0000054574/8091335/2013.pdf?sequence=1&isAllowed=y

1 Advertencias

Compartir

UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLIVAR FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS RECURSOS NATURALES Y DEL AMBIENTE ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TEMA:

Evaluación in vitro de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de Tomillo (*Thymus zygis*) mediante la técnica de Kirby-Bauer en *Staphylococcus aureus* aislada de Mastitis bovina"

Proyecto de investigación, previo a la obtención del título de Médico, Veterinario y Zootecnista, otorgado por la Universidad Estatal de Bolívar a través de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente, Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

AUTOR:

ANGEL MAURICIO CHAVEZ MORALES

DIRECTOR DR. EDISON RIVELINO RAMON CURAY M.Sc.

Guaranda - Ecuador 2022

EVALUACIÓN IN VITRO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO (*Thymus zygis*) MEDIANTE LA TÉCNICA DE KIRBY-BAUER EN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* AISLADOS DE MASTITIS BOVINA

REVISADO Y APROBADO POR LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL

DEDICATORIA

Esta tesis va dedicada con mucho cariño a mi mamita Dalinda mujer que día a día luchó para darme lo mejor siempre, además de fuerte y trabajadora, es quien me inculcó buenos valores, sin usted y su apoyo incondicional y fundamental no podría ser esto posible esto es para nosotros mamita hermosa.

A mí papá Ángel por apoyarme durante el proceso de formación académica aportando valores y consejos que permitieron cumplir este sueño.

A ti Saharita Belén por ser quien en las buenas y malas siempre está a mi lado además por formar parte de este gran sueño que ahora se convierte un sueño mutuo con un solo propósito en la vida el cual es llegar a ser grandes profesionales haciendo lo que nos gusta, juntos, se que lo lograremos.

Para mis amigos y familiares quienes de una manera u otra aportaron para este proceso de formación académica.

AGRADECIMIENTO

En primera instancia agradezco a Dios por darme vida y salud para culminar una meta propuesta.

A la Universidad Estatal de Bolívar y todos los docentes quienes formaron parte de mi educación durante el transcurso de la carrera.

A mi director el Dr. Rivelino Ramón quien me apoyo en el momento más importante de mi carrera, por haberme dado la oportunidad de realizar esta investigación, quien con mucha entrega me orientó en el desarrollo de este trabajo investigativo.

A la Dra. Jenny Martínez y al Dr. Favian Bayas por toda su paciencia y enseñanzas quienes me supieron apoyar en cada uno de los pasos dentro del proceso de investigación.

A Ing. Angélica Tigre, por permitirme el uso de las instalaciones para el procesamiento de las muestras y desarrollo de la investigación en el laboratorio general de la facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Estatal de Bolívar.

A mis amigos y familiares que supieron estar en diferentes momentos de mi vida brindándome su apoyo incondicional.

Gracias por cada una de sus consejos y enseñanzas

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CONTENIDO	PAG.
1. INTRODUCCIÓN.	1
2. PROBLEMA	2
3. MARCO TEÓRICO	3
3.1. La Glándula Mamaria.....	3
3.1.1. Anatomía de la Glándula Mamaria	3
3.1.1.1. Sistema de apoyo.....	3
3.1.1.2. Sistema secretor	3
3.1.1.3. Sistema de conductos para almacenamiento y transporte de leche.....	4
3.1.1.4. Pezón, canal del pezón	4
3.1.1.5. Sistema sanguíneo, linfático y nervioso.....	4
3.1.1.6. Mecanismos de defensa de la glándula mamaria	5
3.1.2. Mecanismos físicos	5
3.1.2.1. Respuesta celular.....	5
3.1.2.2. Mecanismos de defensa no celulares	5
3.2. La Mastitis.....	6
3.2.1. Generalidades	6
3.2.2. Clasificación de la Mastitis	7
3.2.2.1. Mastitis Subclínica.....	7
3.2.2.2. Mastitis Clínica	8
3.2.3. Etiología de la mastitis	9
3.2.3.1. Bacterias.....	10
3.2.3.2. Hongos	13

3.2.3.3. Virus	14
3.2.3.4. Algas.....	14
3.2.4. Detección de mastitis	14
3.2.4.1. Técnicas de diagnóstico	14
3.2.5. Terapéutica de la mastitis bovina.....	18
3.3. Fitoterapia.....	19
3.3.1. Aceites esenciales.....	19
3.3.1.1. Actividad Antimicrobiana de los Aceites Esenciales.....	20
3.4. Tomillo (<i>Thimus zygis</i>).....	20
3.4.1. Nomenclatura del Tomillo	21
3.4.2. Características y Principales Componentes	21
3.4.3. Composición química	22
3.4.4. Propiedades antimicrobianas del <i>Thymus zygis</i>	22
3.4.5. Efectos secundarios.....	22
4. MARCO METODOLÓGICO.....	23
4.1. Materiales	23
4.1.1. Lugar de investigación	23
4.1.2. Situación Geográfica del lugar de investigación.....	23
4.1.3. Zona de vida	24
4.1.4. Material Experimental.....	24
6.1.4.1. Indumentaria de laboratorio.	24
6.1.4.2. Equipos de laboratorio	24
6.1.4.3. Materiales de laboratorio	25
6.1.4.4. Reactivos.....	25
6.1.4.5. Materiales de oficina.....	26

6.2. Métodos.....	26
6.2.1. Factores en estudio.....	26
6.2.2. Tratamientos.....	27
6.2.3. Especificaciones del experimento	27
6.2.4. Tipo de diseño	27
6.2.5. Métodos de evaluación.....	28
6.2.6. Procedimiento.	30
6.2.6.1. Obtención del aceite esencial de tomillo.....	30
6.2.6.2. Aislamiento e identificación de <i>Staphylococcus aureus</i>	30
6.2.6.3. Establecimiento de la susceptibilidad del <i>Staphylococcus aureus</i>	33
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	36
5.1. Aislamiento e identificación.....	36
5.1.1. Ocurrencia por raza.	36
5.1.2. Aislamiento de la cepa bacteriana.	38
5.1.3. Identificación del <i>Staphylococcus aureus</i> aislados de mastitis bovina.	39
5.2. Análisis del Aceite Esencial del tomillo (<i>Thymus zygis</i>).	41
5.3. Análisis del efecto antimicrobiano del Aceite esencial del tomillo al 75%, 50% y 25% frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	42
5.3.1. Análisis de la comparación de las medias con la prueba de Tukey al 5% del efecto antimicrobiano del aceite esencial del tomillo al 25, 50 y 75%.....	42
5.4. Análisis de la susceptibilidad antimicrobiana del antibiótico Eritromicina frente a <i>Staphylococcus aureus</i> aislados de mastitis bovina.	45
5.5. Análisis de concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial del Tomillo, frente a <i>Staphylococcus aureus</i> aislados de mastitis bovina.	46
5.5.1. Análisis de la comparación de las medias con la prueba de Tukey al 5% del efecto antimicrobiano del aceite esencial del tomillo al 5, 7 y 10%	47

5.6. Análisis de la susceptibilidad antimicrobiana de la CMI a las concentraciones del 5, 7 y 10 % del aceite esencial del tomillo.	49
6. COMPROBACIÓN DE HIPÓTESIS.	52
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.	53
7.1. CONCLUSIONES.	53
7.2. RECOMENDACIONES.	54
BIBLIOGRAFÍA.	55

ÍNDICE DE TABLAS

N° de tabla	PAG.
Tabla 1 Taxonomía del <i>Staphylococcus aureus</i>	10
Tabla 2 Interpretación de CMT (California Mastitis Test)	16
Tabla 3 Nomenclatura del Tomillo.	21
Tabla 4 Especificaciones del lugar donde se realizará la investigación.....	23
Tabla 5 Situación Geográfica del lugar de investigación.....	23
Tabla 6 Distribución de factores en estudio y su interacción (tratamientos).	27
Tabla 7 Características del experimento.	27
Tabla 8 Análisis de Varianza (ADEVA)	28
Tabla 9 Escala general de sensibilidad de un fitofármaco	35
Tabla 12 Frecuencia y porcentajes de casos según la raza.	36
Tabla 10 Tasa de prevalencia de la mastitis en el hato lechero.	38
Tabla 11 Frecuencia y porcentaje de <i>S. aureus</i> aislados de mastitis bovina.	39
Tabla 13 Análisis Físicoquímico del aceite esencial del tomillo (<i>Thymus zygis</i>). .41	
Tabla 14 Análisis de varianza del efecto de los tratamientos sobre el <i>S. aureus</i> . .42	
Tabla 15 Comparación de medias de los tratamientos, Tukey a el 5%.....	43
Tabla 16 Categorías interpretativas de la Eritromicina frente a <i>S. aureus</i>	45
Tabla 17 Frecuencia y porcentaje del análisis de la susceptibilidad antimicrobiana de la Eritromicina frente a <i>Staphylococcus aureus</i> aislados de mastitis bovina.	45
Tabla 18 Análisis de varianza (DBCA) de la CMI.	47
Tabla 19 Comparación de medias de los tratamientos, Tukey a el 5%.....	47
Tabla 20 Escala de la susceptibilidad del aceite esencial del tomillo.	49

ÍNDICE DE FIGURAS

N° de Figura	PAG.
Figura 1 Diagrama de flujo para el aislamiento e identificación del <i>S. aureus</i> aislados de mastitis bovina.....	33
Figura 2 Diagrama de flujo para el análisis de la susceptibilidad del <i>S. aureus</i> aislados de mastitis bovina.....	35
Figura 3 Diagnóstico de mastitis mediante CMT en la finca “Edith”.	38
Figura 4 Porcentajes de ocurrencias del <i>S. aureus</i> aislados de mastitis bovina.	40
Figura 5 Casuística de mastitis según la raza del animal.....	37
Figura 6 Efecto de los tratamientos sobre el <i>S. aureus</i> aislados de mastitis bovina.....	43
Figura 7 Actividad Antimicrobiana del aceite esencial del tomillo.....	44
Figura 8 Análisis de la susceptibilidad de la Eritromicina frente a <i>S. aureus</i> aislados de mastitis bovina.....	46
Figura 9. Efecto de los tratamientos sobre el <i>S. aureus</i> aislados de mastitis bovina.	48
Figura 10 Halos de inhibición de la CMI del aceite esencial del tomillo frente a cepas de <i>S. aureus</i> causante de mastitis bovina.	50
Figura 11 Porcentaje de la escala de sensibilidad del aceite esencial del tomillo frente a <i>S. aureus</i> aislados de mastitis bovina.....	51

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación ha sido evaluar in vitro la actividad antimicrobiana del aceite esencial de tomillo (*Thymus zygis*) mediante la técnica de kirby-bauer sobre *Staphylococcus aureus* que se aislaron e identificaron a partir de leche que resultó positiva a mastitis mediante la prueba del CMT en la finca “Edith” ubicada en la provincia de Chimborazo en el cantón Penipe entre las parroquias La Candelaria y Releche esta patología se presentó con una tasa de prevalencia del 48.33%, de un total de 60 vacas testeadas, resultando 29 animales positivas al diagnóstico, de los cuales, 20 vacas exhibieron mastitis causadas por *Staphylococcus aureus* dicho patógeno representó el 68.96%, del total de los agentes que se lograron identificar, además se pudo estratificar la presentación de dicha enfermedad en donde se exhibió que aquellos animales de raza Holstein expresaron el 65.6% (n=19) de casuística, seguido de aquellos animales de raza Jersey los cuales representaron el 24.12% (n=7) de ocurrencia y presentación clínica de la enfermedad, y por ultimo, la menor ocurrencia de la patología antes mencionada se observó en animales de raza Brown Swiss en donde se apreció el 10,28% (n=3) de casos clínicos. En el análisis de la actividad antimicrobiana del aceite esencial del tomillo se logró observar que el mejor promedio lo presentó el T3 (75%) con una media de 64.45 mm, siguiéndoles el T2 (50%) con una media de 54.95 mm y finalmente el menor promedio lo presentó el T1 (25%) con una media de 37.05 mm, versus a el T4: Eritromicina 15µg que presentó una media de 19.90 mm. En el análisis de la susceptibilidad antimicrobiana de la Eritromicina frente a *Staphylococcus aureus*, según los puntos de corte establecidos por CLSI, el 95% de los aislados exhibieron resistencia intermedia y solo el 5% demostraron ser sensibles, La concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial para *Staphylococcus aureus* causante de mastitis bovina se encontró en una concentración del 7 % de aceite esencial del tomillo, ya que presentó un promedio de 9.85 mm de diámetro del halo de inhibición, superando la escala de la sensibilidad nula (-) < 8 mm.

Palabras claves: mastitis, leche, bacteria, *Staphylococcus aureus*, Tomillo, Aceite esencial, Eritromicina.

SUMMARY

The objective of this research was to evaluate in vitro the antimicrobial activity of thyme essential oil (*Thymus zygis*) using the kirby-bauer technique on *Staphylococcus aureus* that were isolated and identified from milk that tested positive for mastitis using the CMT test at the "Edith" farm located in the province of Chimborazo in the Penipe canton between the parishes of La Candelaria and Releche, this pathology occurred with a prevalence rate of 48.33% of a total of 60 cows tested, resulting in 29 animals positive at diagnosis, of which 20 cows exhibited mastitis caused by *Staphylococcus aureus*, this pathogen represented 68.96% of the total agents of mastitis. 96% of the total of the agents that were identified, it was also possible to stratify the presentation of this disease, where it was shown that those animals of Holstein breed expressed 65.6% (n=19) of cases, followed by those animals of Jersey breed which represented 24.12% (n=7) of occurrence and clinical presentation of the disease, and finally, the lowest occurrence of the aforementioned pathology was observed in animals of Brown Swiss breed where 10.28% (n=3) of clinical cases were observed. In the analysis of the antimicrobial activity of thyme essential oil, it was observed that the best average was presented by T3 (75%) with an average of 64.45 mm, followed by T2 (50%) with an average of 54.95 mm and finally the lowest average was presented by T1 (25%) with an average of 37.05 mm, versus T4: Erythromycin 15µg which presented an average of 19.90 mm. In the analysis of the antimicrobial susceptibility of Erythromycin against *Staphylococcus aureus*, according to the cut-off points established by CLSI, 95% of the isolates exhibited intermediate resistance and only 5% proved to be sensitive. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the essential oil for *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis was found at a concentration of 7% of thyme essential oil, since it presented an average of 9.85 mm of halo diameter. 85 mm of inhibition halo diameter, exceeding the scale of null sensitivity (-) < 8 mm.

Key words: mastitis, milk, bacteria, *Staphylococcus aureus*, Thyme, Essential oil, Erythromycin.

CAPITULO I

1. INTRODUCCIÓN

La mastitis bovina es una de las patologías de mayor incidencia en vacas lecheras, dado que su etiología multifactorial representa una de las mayores dificultades para su erradicación en los hatos. La inflamación de la glándula mamaria y sus anexos han sido responsables de los mayores impactos productivos y económicos a nivel mundial en el área pecuaria, debido a los altos costos de producción que desencadena esta enfermedad y al descarte prematuro de individuos de alta producción que han extralimitado la cronicidad de su cuadro clínico. Además, el uso indiscriminado de antibióticos como medidas terapéuticas para la mastitis bovina a complicando por completo la situación (Honghong *et al.*, 2021).

El auge global de la multiresistencia a los antibióticos y los crecientes cuadros de mastitis bovina en los hatos lecheros ha sobrepasado las posibilidades de desarrollo de nuevos agentes farmacológicos, poniéndolos a estos en desventaja frente al control de dicha patología. No obstante, las especies vegetales todavía ofrecen una alternativa capaz de contrarrestar esta problemática (Borne *et al.*, 2019).

En la actualidad la fitoterapéutica ha sido capaz de demostrar propiedades de interés farmacológico de muchas plantas, entre este amplio listado se ha considerado al *Thymus zygis* por su múltiples beneficios, Debido a lo antes mencionado en el presente trabajo investigativo se; Evaluó in vitro la actividad antimicrobiana del aceite esencial del Tomillo rojo (*Thymus zygis*) mediante la técnica de Kirby-Bauer en *Staphylococcus aureus aislada* de Mastitis bovina, a fin de poder plantear nuevas alternativas terapéuticas naturales que permitan contrarrestar la resistencia a los antibióticos y por ende disminuir los índices de mastitis bovina (Rodríguez, Zárate, & Sánchez, 2017).

Objetivamente se propuso; Obtener el aceite esencial de tomillo mediante la técnica de arrastre por vapor. Aislar e identificar bioquímicamente a partir cultivo en agar la cepa bacteriana *Staphylococcus aureus* a partir de muestras de leche positiva a mastitis bovina. Establecer la sensibilidad y resistencia de *Staphylococcus aureus* causantes de la mastitis subclínica bovina ante el aceite esencial del *Thymus zygis*.

CAPITULO II

2. PROBLEMA

La mastitis bovina es una de las principales patologías con mayor repercusión productiva y económica en los hatos lecheros de todo el mundo. O'Neill (2016) y World Bank Group (2017) mencionaron que; para el año 2050 la resistencia a los antimicrobianos será un desafío de relevancia para la salud pública mundial, ya que, causará 300 millones de muertes humanas, quince pérdidas financieras de \$100 billones y una caída del 11% en la producción ganadera, afectando en mayor medida a países en vías de desarrollo.

En estudios realizados en el Ecuador por Requelme & Bonifaz, (2011) evidenciaron que existe una alta prevalencia e incidencia de la Mastitis en hatos lecheros, esto debido principalmente a que existe una inadecuada aplicación de las buenas prácticas de ordeño, ausencia de higiene en la rutina del ordeño, mal funcionamiento de los equipos de ordeño, mal manejo de los desinfectante y selladores y la no identificación del agente causal. Todo esto a contribuido directamente a un mal diagnóstico, propiciando así la aplicación de una terapéutica inadecuada, que a desencadenado el uso indiscriminado de antibióticos, lo que con el paso del tiempo ha generado el desarrollo de resistencias farmacológicas a los antimicrobianos por parte de los agentes etiológicos en cuestión.

Sumado a esto el nudo crítico más relevante en la provincia de Chimborazo es el establecido número de trabajo investigativos que existen, donde Vayas, (2021) proporcionaron datos sobre la prevalencia de Mastitis Bovina (29.61%) durante tres años, siendo una enfermedad que repercute económicamente con una perdida de \$ 2928 en promedio con lo anterior mencionado, se ha visto la necesidad de potencializar e incentivar el hallazgo de nuevas alternativas fitoterapéuticas y fitofarmacológicas que reduzcan el impacto clínico y productivo que esta enfermedad produce.

CAPITULO III

3. MARCO TEÓRICO

3.1. La Glándula Mamaria

La glándula mamaria es una glándula secretora modificada, su procedencia es del ectodermo. Con respecto a la vaca hay dos glándulas que se colocan a ambos lados de la porción longitudinal en la zona inguinal. Ambas glándulas permanecen separadas medialmente por una porción de tejido conectivo de sostén. Cada glándula está conformada por un cuerpo y dos apéndices, además de dos cuartos; uno anterior y uno trasero. No obstante, un surco separa a ambos. La orientación anatómica de los espacios anterior y posterior otorgan una barrera natural de protección en caso de transmisión entre cuartos de posibles infecciones intramamarias (Boeris *et al.*, 2016).

3.1.1. Anatomía de la Glándula Mamaria

3.1.1.1. Sistema de apoyo

Se encuentra comprendido por; ligamento suspensorio medial que posee dos ramas y se sitúan medialmente, este actúa como un amortiguador y se adapta a los cambios de tamaño y peso de la ubre cuando hay producción de leche y por la edad; tendón sínfisario o subpélvico que surge de la sínfisis pélvica, las fibras de este ligamento contribuyen directamente a la formación del aparato suspensorio lateral. El ligamento lateral, el cual con sus dos ramas conforman el sostén de la ubre desde la región lateral hasta el piso de la ubre (Jingao *et al.*, 2020).

3.1.1.2. Sistema secretor

Comprendido por las células epiteliales y mioepiteliales que en conjunto forman el alvéolo con su respectiva cisterna, que son los encargados de la formación láctea (Zambrano & Marques, 2008). En cuanto a los cambios que tienen lugar en la composición de la leche debido a una infección intramamaria podemos mencionar resumidamente, una disminución en el contenido de lactosa, graso y caseína (Buldain, 2021).

3.1.1.3. Sistema de conductos para almacenamiento y transporte de leche

Intervienen en el paso de la leche hacia el exterior cuando existe el estímulo necesario por medio de la vía aferente de los nervios sensitivos situados en la piel del pezón, Intervienen en el paso de la leche hacia el exterior cuando existe el estímulo necesario por medio de la vía aferente de los nervios sensitivos situados en la piel del pezón, mismos que responden tanto a la succión como a la presión de la glándula mamaria (Dufour *et al.*, 2019). No obstante, la mastitis subclínica no es tan evidente, porque tanto el animal como su producto pueden parecer de aspecto normal y no obstante, presenta un aumento de microorganismos y células blancas en la leche, siendo elementos comunes en la disminución de la producción y calidad

3.1.1.4. Pezón, canal del pezón

El cual actúa como un sistema de defensa físico y de protección de la ubre, con sus estructuras específicas como la roseta de Fussegber y el tapón de quitina, estos se completan para formar un acceso limitado hacia el ambiente intramamario, generalmente cuando la vaca no se encuentra en producción (Boeris, Meglia, & Genero, 2016).

3.1.1.5. Sistema sanguíneo, linfático y nervioso

Estos le confieren la funcionalidad completa a la ubre, esta se nutre de importantes arterias como la rama posterior de la cuadrificación de las arterias iliacas, que a su vez forman las arterias mamarias anterior y posterior; un sistema linfático integrado por un nódulo linfático específico de la glándula mamaria, la inervación está mediada por el nervio inguinal. El plexo mesentérico caudal, estos son los nervios que se asocian con las arterias, ellos no inervan los alvéolos, los nervios sensoriales se encuentran en los pezones y la piel. Estos son críticos para iniciar la vía aferente (vía neural) del reflejo de eyección de la leche. No hay inervación parasimpática de la glándula. Esto es similar a otras glándulas cutáneas. Además, no hay inervación del sistema secretor. Las células mioepiteliales no son inervadas, estas no se contraen en respuesta a inervación, sino más bien tiende a contraerse en respuesta a una hormona que se transmite por la sangre, la oxitocina ((Paredes, 2019).

3.1.1.6. Mecanismos de defensa de la glándula mamaria

La glándula mamaria cuenta con mecanismos físicos, celulares, humorales, enzimáticos, y químicos que la protegen de una manera u otra. Estos mecanismos de defensa le permiten a la glándula mamaria ser resistente a la invasión microbiana, inhibiendo su crecimiento, destruyendo y eliminando los microorganismos, a su vez le permite neutralizar las toxinas y resistir la lesión tisular durante la inflamación (McDougall *et al.*, 2022).

3.1.2. Mecanismos físicos

Pezón y canal del pezón; esta estructura y los tejidos asociados proporcionan la primera barrera de defensa de tipo física a los patógenos. El sistema de conductos está dividido en tres partes; canal estriado, roseta de Furstenberg y cisterna de pezones (Doehring *et al.*, 2019).

3.1.2.1. Respuesta celular

Está mediada por los macrófagos y las células epiteliales las cuales liberan citocinas y quimiocinas que activan la llegada de los neutrófilos, los cuales se reclutan y cumplen funciones como fagocitosis, muerte intracelular y apoptosis, esto ocurre cuando las barreras físicas de defensa no intervienen en la prevención de las infecciones intramamarias (Wolter *et al.*, 2019).

3.1.2.2. Mecanismos de defensa no celulares

Se lleva a cabo por un número variable de sustancias que impiden el desarrollo de la infección intramamaria, entre ellas tenemos a las inmunoglobulinas, especialmente a las Ig opsonizadoras IgM e IgG₂ en la vaca, la cual posibilita una fagocitosis eficiente de los microorganismos por los neutrófilos. Las Ig no opsonizadoras IgG₁ e IgA la cual en vacas tienen otras funciones beneficiosas, como la neutralización de toxinas bacterianas, además otras sustancias como lactoferrinas y proteínas antimicrobianas, que impiden la multiplicación de los patógenos adhiriendo sustancias a la pared celular del microorganismo, también las citocinas regulan la actividad de las células implicadas en las respuestas inmunitarias específicas (Wolter *et al.*, 2019).

3.2. La Mastitis

3.2.1. Generalidades

La producción de leche de calidad es la misión primordial de una explotación lechera. En donde la integridad de la ubre es necesaria para maximizar la producción de leche en cantidad y calidad además de mantener la rentabilidad de la explotación. Es una de las principales enfermedades y la que más afecta a las vacas lecheras, ocasionando importantes consecuencias en la producción y reproducción (Rojas, 2018)

La mastitis es la inflamación establecida del parénquima de las glándulas mamarias, es una patología multietiológica, que afecta principalmente a las vacas lecheras de alta productividad, es causada generalmente por bacterias que invaden la ubre, se multiplican y producen toxinas que son dañinas para el tejido mamario. Esta enfermedad es cosmopolita, encontrándose distribuida por todo el mundo, predisuelta por un sinnúmero de factores como el manejo la sanidad individual o del hato, el ambiente donde se ha establecido el sistema productivo lechero, microorganismos causantes, etc. (Adrade *et al.*, 2017).

La mastitis es una de las enfermedades de mayor impacto económico para la actividad lechera. Esta se puede clasificar de acuerdo con el grado de inflamación de la ubre y las alteraciones presentes en; clínica y subclínica. La mastitis subclínica, pasa fácilmente desapercibida para el productor, es la causante de la mayor parte de las pérdidas. Alrededor del 70% de las pérdidas atribuibles a mastitis están dadas por la disminución en la producción de leche. El resto se debe a descarte de leche por anomalías notorias o residuos de antibióticos, gastos en medicamentos, honorarios veterinarios, trabajo extra, pérdida de valor genético por eliminación en los costos de reemplazo (Rainard *et al.*, 2017).

Por la posición anatómica del sistema mamario de la vaca, esta se ve predisuelta a que factores externos puedan influir al desarrollo de una infección intramamaria. Cuando un patógeno logra colonizar la glándula mamaria este puede ocasionar un sinnúmero de alteraciones inflamatorias y puede dar origen a una mastitis (Reyes & J, 2018). La deficiente higiene en el proceso de ordeño, equipos de ordeñadora en malas condiciones, abrasiones en la epidermis y dermis del pezón, patogenicidad

de los microorganismos presentes en el hato lechero, todo ello predispone a que la vaca pueda presentar un proceso de mastitis (Reyes & Bedolla, 2018).

Básicamente los mecanismos de defensa son suficientes cuando existe la invasión de un patógeno, esto se ve condicionado cuando el animal entra en un estado temporal o permanente de inmunodepresión, por lo general esto ocurre en el periodo de postparto inmediato, interpretando de esta manera que el establecimiento de la mastitis ocurre por la interacción entre la patogenicidad de microorganismo invasor y el estado fisiológico de la vaca y las prácticas de manejo que esta reciba (Martínez *et al.*, 2017).

Con respecto a las alteraciones en las características físico químicas y organolépticas de la leche de ubres con mastitis, es evidente una disminución en el contenido de lactosa, caseína, grasa butirosa, sólidos no grasos, sólidos totales, calcio, fósforo y potasio; y además se ve precedido por incremento en la concentración de inmunoglobulinas, cloruro de sodio, carbonato de sodio, minerales trazas, ácidos grasos libres y enzimas como plasmina, lactasa y lipasa, además de un aumento del pH (Mara *et al.*, 2022).

3.2.2. Clasificación de la Mastitis

La mastitis puede ser clasificada bajo muchos criterios, pero desde el punto de vista clínico se debe considerar siempre el grado de inflamación y la signología que se pueda encontrar a nivel de la ubre, o a su vez en las alteraciones evidentes en las características físicas macroscópicas de la leche al momento del ordeño, En términos generales se clasifica en: “Mastitis Clínica” y “Mastitis Subclínica” presente en las vacas lecheras (Nickerson *et al.*, 2020).

3.2.2.1. Mastitis Subclínica

Es el proceso inflamatorio específico, este nos indica que algo está sucediendo en el ambiente intramamario, no indica precisamente que se ha establecido una infección o colonización de microorganismos patógenos, este tipo de mastitis se considera que es la que más pérdidas económicas produce por disminución de la producción láctea y las alteraciones físico-químicas y organolépticas en la leche, además este tipo de mastitis es de complejo diagnóstico, ya que requiere de técnicas

y métodos con mayor especificidad y sensibilidad que permitan evaluar el grado de inflamación que se encuentra de base (Singh *et al.*, 2021).

La mastitis subclínica es considerada silente, ya que no manifiesta sinología a nivel mamario, tampoco existen alteraciones específicas en la leche, este tipo de mastitis se caracteriza por un aumento del recuento de células somáticas (RCS), rutinariamente en campo los casos de mastitis subclínica no son detectados oportunamente, estos casos terminan agudizando su cuadro inflamatorio y aumentando sus alteraciones histológicas en ubre y de la composición de leche (Quevedo, 2018).

3.2.2.2. Mastitis Clínica

La fisiopatología de la mastitis clínica inicia cuando existe una disminución abrupta de la producción de leche, también se puede evidenciar alteraciones macroscópicas en la leche, como grumos o dilución de la misma, además de existir alteraciones a nivel mamario, elevado recuento de células somáticas debido al reclutamiento de neutrófilos y otras células de la línea blanca. En este tipo de mastitis específicamente se pueden hallar fácilmente los puntos cardinales de la inflamación como; el tumor, rubor, calor y dolor. Además del signo de Virchow el cual indica disfunción de la glándula mamaria (Scherpenzeel *et al.*, 2018).

Este tipo de mastitis es fácil de diagnosticar, ya que tiene sinología específica, además de que se puede hacer hincapié al uso de métodos diagnósticos que nos permitan evaluar el grado de afectación del sistema mamario, el agente causal en cuestión, y las pérdidas económicas importantes las cuales son producto de la baja producción de la vaca con esta enfermedad, las alteraciones físico-químicas y organolépticas de la leche, por contenido de trazas como la presencia de antibióticos utilizados en el tratamiento de la mastitis, leches de calidad relativamente muy baja, descarte prematuro de animales de alta producción, etc. (Guio *et al.*, 2016).

3.2.2.2.1. Clasificación de la Mastitis Clínica

Esta se puede clasificar de acuerdo a la severidad de la sinología de base y se clasifica de forma, subaguda, aguda y crónica, en donde en la forma subaguda la percepción de las alteraciones tanto en la anatomía, fisiología y en leche son apenas notables, no siendo así en la forma aguda ya que las alteraciones tanto en las

características de la leche como a nivel de la anatomía y fisiología del sistema mamario son perceptiblemente evidentes, además es requerido saber que en aquellos animales que presenten cronicidad en su cuadro clínico ya existe un compromiso del estado general del paciente a más de las alteraciones específicas de la mastitis a nivel de las glándulas mamarias y características de la leche (Mara *et al.*, 2022).

La presentación específica de un cuadro de mastitis clínica esta en dependencia de muchos factores, principalmente factores; etiológicos como los relacionados al microorganismo que la puede ocasionar, su resistencia o susceptibilidad a la terapéutica aplicada, factores del huésped, su respuesta inmunológica o la activación de los mecanismos de defensa, factores en la aplicación de drogas para su terapéutica y su interacción con el huésped, y el microorganismo patógeno, factores relacionados con el manejo individual de la vaca y del hato lechero (Angles, 2018).

3.2.3. Etiología de la mastitis

La etiología de la mastitis es condicionada por muchos factores puede ser de carácter infeccioso, traumático o tóxico. Sin embargo, las bacterias son las principales involucradas en el desarrollo de esta patología, puesto que el ambiente intramamario es un medio enriquecido y favorable para el crecimiento y multiplicación de estos microorganismos, los cuales disponen de patogenicidad suficiente para causar daño en el parénquima de la glándula mamaria. Hasta la fecha se han identificado alrededor de 200 especies, subespecies y serovares microbianos que afectan la sanidad del sistema mamario. Las técnicas microbiológicas han permitido determinación y precisión para la identificación de muchos microorganismos patógenos de la mastitis. Clásicamente estos microorganismos causantes de infección intramamaria o mastitis han sido divididos en patógenos contagiosos y ambientales (Suarez *et al.*, 2019).

Los patógenos ambientales a diferencia de los contagiosos son transmitidos entre las ordeñas por el ambiente que sirve como fuente primaria para estos organismos. Los patógenos principales en este grupo son los bacilos entéricos Gram-negativos (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*), *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus*

uberis, y *Enterococcus spp.* La mastitis ocasionada por patógenos ambientales es el principal problema que afecta a muchos hatos lecheros bien manejados, que aplican un programa de control de los patógenos contagiosos de la mastitis (Zhong *et al.*, 2020).

3.2.3.1. Bacterias

Entre todos los patógenos infecciosos que causan mastitis las bacterias son las causantes de la mayor parte de infecciones intramamarias. Las principales bacterias que ocasionan mastitis son; *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia colia*, *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium pyogenes*, *Pseudomonas aureoginosa*, *Mycoplasma bovis*, etc. (Jingao *et al.*, 2020).

3.2.3.1.1. *Staphylococcus aureus*

3.2.3.1.2. Taxonomía del *Staphylococcus aureus*

Tabla 1 Taxonomía del *Staphylococcus aureus*.

Reino:	Bacteria
Clase:	Bacillo
Orden:	Bacillales
Familia:	Staphylococcaceae
Género:	<i>Staphylococcus</i>
Especie:	<i>Staphylococcus aureus</i>
Nombre binomial:	<i>Staphylococcus aureus</i>

Fuente: Mucuci *et al.*, (2020).

3.2.3.1.3. Características del *Staphylococcus aureus*

El *Staphylococcus aureus* es el microorganismo más frecuente aislado de casos de mastitis bovina en los hatos lecheros, la particularidad característica patogénica de este microorganismo determina que no sea efectivamente controlado por las medidas preventivas y curativas tradicionales, presentándose de una manera crónica, que en muchas ocasiones, tiende a dañar el tejido mamario.

El *Staphylococcus aureus* se caracteriza por la presencia de múltiples factores de virulencia, algunos de los cuales están relacionados con la gravedad de la infección intramamaria desarrollada en el huésped (Buldain *et al.*, 2020).

3.2.3.1.4. Características de la estructura del *Staphylococcus aureus*.

3.2.3.1.4.1. Polisacáridos capsulares

Staphylococcus aureus produce polisacáridos capsulares, se ha demostrado que los polisacáridos capsulares confieren resistencia a la fagocitosis por neutrófilos polimorfonucleares, y esta considerado dentro de la primera línea de defensa de la glándula mamaria frente a patógenos invasores. La relevancia de los polisacáridos capsulares como candidatos para generar la respuesta protectora ha sido resaltada en los últimos años en varios estudios. Los anticuerpos que estén dirigidos contra los polisacáridos capsulares tienen un efecto protector ya que estos son capaces de opsonizar cepas capsuladas de *Staphylococcus aureus* favoreciendo a su fagocitosis (Niedziela *et al.*, 2020).

3.2.3.1.4.2. Biofilm

Los biofilms se define como comunidades de microorganismo que crecen en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo (I. Lasa, 2005). En la gran mayoría de las cepas de *Staphylococcus aureus* son capaces de producir biofilm, el cual consiste en comunidades de células bacterianas adheridas a un sustrato, a una interfase o entre si. Estas están contenidas en una matriz polimérica extracelular. Exhiben un fenotipo alterado en cuanto a su crecimiento, expresión génica y producción de proteínas. La fase inicial de formación de biofilm involucra dos etapas; en la primera fase comprende la unión de las células a la superficie, lo cual es facilitado por adhesinas que están asociadas a la pared celular. La segunda fase se caracteriza por la multiplicación celular y la formación de una estructura madura compuesta por muchas capas de células que están conectadas entre sí por polisacáridos extracelulares.

El desarrollo de un biofilm bacteriano está limitado por la disponibilidad de paso de los nutrientes para las bacterias a través del biofilm, también por factores ambientales como el pH, la perfusión de oxígeno, las fuentes de carbono y la osmolaridad. El biofilm alcanza una masa o volumen crítica, llega a un equilibrio

dinámico en el cual las capas más externas se escapan de aquel y colonizan otras superficies. Esta particularidad les otorga una ventaja contra sus contrapartes planctónicas (INS, 2017)

3.2.3.1.4.3. Proteína de unión a fibronectina

Una vez que el microorganismo invasor alcanza la glándula mamaria, este microorganismo debe superar la acción expulsiva del ordeño frecuente, es por ello que la adherencia, la supervivencia y la multiplicación del *Staphylococcus aureus* en el epitelio mamario son eventos tempranos decisivos en la patogénesis de la infección. Estas proteínas se encuentran ancladas a la membrana de la pared celular del *Staphylococcus aureus*, a pesar de la presencia de numerosas adhesinas la patogénesis esta relacionada con la expresión de proteínas de superficie de unión a fibronectina (Krukowski *et al.*, 2020).

3.2.3.1.4.4. Clumpig factor (proteína de unión a fibrinógeno).

Es uno de los factores de virulencia del *Staphylococcus aureus*, considerado el receptor de fibrinógeno de superficie celular, denominado también factor de agregación, lo cual se encuentra en la mayoría de las cepas del *Staphylococcus aureus*, su nombre se debe a que interactúa con el fibrinógeno plasmático lo que conduce a una aglomeración instantánea de las células bacterianas (Vargas *et al.*, 2018).

3.2.3.1.4.5. Toxina alfa

Es una proteína tóxica para un amplio rango de células de mamífero, particularmente eritrocitos, su función principal es convertir el tejido del huésped en nutrientes para las bacterias que la expresa. Estas toxinas se unen a la membrana de las células blancas en su forma monomérica y luego se oligomeriza para formar poro heptaméricos. La toxicidad celular se alcanza rápidamente debido a la destrucción de la membrana plasmática, la pérdida de iones celulares y la liberación de compuestos tóxicos a través de los poros (Soto *et al.*, 2020).

3.2.3.1.4.6. Toxina beta

Es una exoproteína hemolítica que hidroliza la esfingomielin presente en la membrana plasmática, lo cual resulta en un incremento de la permeabilidad con

pérdida progresiva de la carga de la superficie celular, lo cual tiene esta toxina un papel importante en la patogénesis de la infección mamaria, la cual actúa sobre los neutrófilos y linfocitos, específicamente linfocitos T proliferativos (Jácome, 2022).

3.2.3.1.5. Características microbiológicas

Las especies del género *Staphylococcus* son cocos grampositivos de 0.5 a 1.5 μm de diámetro, que suelen agruparse formando racimos irregulares debido a la tendencia a dividirse en más de un plano; menos frecuente en apariencia solos, en parejas, tétradas o cadenas cortas. El término *Staphylococcus* (deriva del griego staphylé, que significa “racimos de uvas”) proviene del cirujano escocés Sir Alexander Ogston (Micuci *et al.*, 2020).

3.2.3.1.6. Morfología macroscópica

Para la respectiva apreciación del patógeno debemos contar con un cultivo de la cepa en estudio en una placa Petri, el cual nos permite observar las características de las colonias, en medios no selectivos la colonia se presenta de 1 a 3 mm de diámetro, lisas, levemente elevadas, de bordes enteros, levemente convexas y generalmente pigmentadas con un color que puede ir desde el amarillo al crema. Cuando se los aísla en agar sangre de oveja se puede observar una zona de β -hemólisis de las colonias presentes en el agar (Bezdekova *et al.*, 2020).

3.2.3.1.7. Resistencia a β -lactámicos

Existen variados mecanismos que median resistencia a β -lactámicos, la producción de β -lactamasa inactiva ciertos antimicrobianos de esta familia por medio de la hidrólisis del anillo β -lactámico. El producto de la hidrólisis carece de actividad antibacteriana. Una parte de la enzima que se produce es excretada al medio externo y parte permanece adherida a la membrana celular (Seija, 2018).

3.2.3.2. Hongos

Los hongos son poco frecuentes, pero podemos encontrar como causantes de mastitis subclínicas y clínicas a los siguientes; *Aspergillus fumigatus*, *Trichosporum cutaneum*, *Geotrichum candidum*, *Nocardia asteroid*, *Candida crusei*, *Cryptococcus neoformans*, etc. (Jagielski *et al.*, 2019).

3.2.3.3. Virus

No hay una base científica fuerte que permita conocer la virulencia y el modo de acción de este tipo de patógenos y su influencia en el desarrollo de la mastitis, pero se ha podido observar que hay cierta relación con virus como; *Adeno virus*, *Herpes virus*, *Rota virus*, *Reo virus*, *Mammilitis virus*, *Parainfluenza virus*, etc. (Martínez *et al.*, 2018).

3.2.3.4. Algas

Se ha podido encontrar un solo genero de alga que es capaz de ocasionar alteraciones en la glándula mamaria y este es; *Prothoteca zopfii*, *Prothoteca wickerhamii*, etc. (Jagielski *et al.*, 2019).

3.2.4. Detección de mastitis

La mastitis generalmente se detecta en base a la examinación física de la ubre y la inspección de la leche, cuando hay grumos o coágulos en la leche o cualquier otra anomalía en el color o la consistencia de la leche, hay que determinar las principales causas de esta alteración (Sing *et al.*, 2021).

El método más común de detección de mastitis es la observación de signos inflamatorios visuales en la ubre, como tumor, rubor, calor o dolor. Este método de examinación física es extremadamente inadecuado porque en el momento de la detección, la gravedad de la enfermedad es aguda o crónica, ocasionando que la infección intramamaria se encuentre en una etapa más avanzada, complicando la aplicación de la terapéutica, y a su vez de los diferentes métodos preventivos para la mastitis bovina (Viguié *et al.* 2019).

3.2.4.1. Técnicas de diagnóstico

Es indispensable saber que para que exista un correcto diagnóstico de la mastitis se debe utilizar técnicas que nos permitan saber la positividad o negatividad de posibles casos dentro de nuestro hato lechero (Colak *et al.*, 2008)

Para que un criterio clínico sea suficientemente aceptado se requiere de la aplicación de técnicas que confieran buena especificidad y sensibilidad a la hora de realizar el estudio diagnóstico, en donde, la sensibilidad de un estudio en mastitis se refiere a la probabilidad de que la prueba identifique como positivo la cantidad

más pequeña o mínima de la porción alterada de un metabolito. Y la especificidad de un estudio de mastitis se refiere a la probabilidad de que cuando no hay enfermedad, la prueba a la hora de detectar alteraciones en distintos metabolitos celulares, pueda declarar la muestra como negativa (Wolter *et al.*, 2019)

3.2.4.1.1. Recuento de células somáticas

Las células somáticas están compuestas predominantemente por células de la línea blanca junto con pocas células epiteliales y mioepiteliales. Las células que se encuentran normalmente en una glándula mamaria no infectada constituyen neutrófilos (1-11%), macrófagos (66-88%), linfocitos (10-27%) y células epiteliales (2-5%)

Los macrófagos juegan un papel importante en la protección de la glándula mamaria y son la primera línea de defensa inmunitaria. Cuando hay colonización en la glándula mamaria por bacterias, los macrófagos inician una respuesta inflamatoria, liberando quimiotácticos que atraen a los polimorfonucleares, estos se reclutan y se acumulan en la leche. Los leucocitos polimorfonucleares fagocitan a las bacterias y las lisan intracelularmente (Lehew & Dechow, 2021)

Se requiere hacer énfasis que la meta ideal en cualquier granja lechera es descartar la incidencia de mastitis clínica y subclínica. El 85% de las vacas deben tener un recuento de células somáticas (RCS) <250 000 por mL, para que no sea definida como una infección intramamaria. La sensibilidad de este examen diagnóstico es solo alrededor del 73-89% además confiere una especificidad correspondiente del 75-85% (Lehew & Dechow, 2021).

3.2.4.1.2. California Mastitis Test (CMT)

El fundamento de esta técnica es evidenciar cambios en las características de la leche como la viscosidad una vez que se añade el reactivo de CMT que contiene detergente y Bromocresol púrpura. El detergente actúa rompiendo la membrana celular de las células somáticas y el ácido nucleico conforma una matriz a modo de gel con restos celulares, este proceso toma el nombre de gelificación. De tal forma que esta gelificación es proporcional al tamaño del recuento total de células somáticas (RCS) (Swinkels *et al.*, 2020).

Tabla 2 Interpretación de CMT (California Mastitis Test)

Puntuación CMT	Interpretación	Reacción Visible	Recuento total de Células
0	Negativo	Leche fluida y normal	< 200 000 0 – 25% de neutrófilos
T	Traza	Precipitación leve	150 000 – 500 000 30 – 40 % de neutrófilos
1	Débilmente positivo	Precipitación definida, pero sin gelificación.	400 000 – 1 500 000 60% de neutrófilos
2	Positivo	Gelificación	800 000 – 5 000 000 70% de neutrófilos
3	Fuertemente positivo	Viscosidad aumentada considerablemente, gel cohesivo	>5 000 000 80% de neutrófilos

Fuente: Aytekin *et al.*, (2018).

3.2.4.1.3. Cultivo e identificación de bacterias

Existe un sinnúmero de técnicas para la identificación y caracterización de bacterias causantes de mastitis, metodológicamente estas varían desde una técnica sencilla hasta una avanzada que es bastante actual. Cada técnica tiene problemas específicos dependientes de un lote a otro, de un laboratorio a otro y de reactivos a variaciones de reactivos. A veces, los resultados tienen la posibilidad de interpretarse de diferentes maneras. Por consiguiente, es de suma importancia y exigencia llevar a cabo buenas prácticas de laboratorio con la mayor responsabilidad posible (Jiménez Velásquez *et al.*, 2020)

Cultivo de microbios, todavía es el estudio clínico estándar primordial en el procedimiento de diagnóstico, en el cual las bacterias presentes en la matriz leche se siembran en placas Petri de agar. No obstante, la especificidad es relativamente baja, lo que puede ocasionar la interpretación de falsos positivos. Se fundamenta en detectar la bacteria culpable de ocasionar mastitis. El método ideal se acomoda

conforme el tipo de organismo, la metodología de muestreo y los métodos de laboratorio (Sánchez & Marchán, 2018).

El agar sangre (5%), es el medio más frecuente, permite crecer a la mayoría de los microorganismos patógenos aeróbicos causantes de la mastitis. La adición de esculina o toxina β estafilocócica facilita la identificación de los estreptococos. Las muestras de la mastitis clínica se colocan a menudo en medio de MacConkey, que selecciona las bacterias Gram negativas y facilita el diagnóstico de la mastitis por coliformes. Las especies de *Mycoplasma* no crecerán en agar sangre y exigen medios especiales y condiciones de incubación potenciadas con dióxido de carbono (CO₂) (Bradford, 2010).

Para la identificación bacteriana se estima referentemente los procedimientos moleculares y metabólicos específicos de un patógeno en cuestión, estos permiten evidenciar la identidad bacteriana por factores inherentes específicos de cada especie, si bien su utilización no es mundial debido a su coste alto y al nivel de especialización que limita su establecimiento, sin embargo en la actualidad el desarrollo de esta metodología esta en auge, debido a la necesidad de identificar específicamente el agente causal de la mastitis para, discernir en la terapéutica indicada (McDougall *et al.*, 2022).

3.2.4.1.4. Prueba de Susceptibilidad

Este estudio clínico ha sido desarrollado con el tiempo debido a la necesidad de establecer conciencia en el uso correcto de antibióticos para tratar mastitis, y otras enfermedades de origen bacteriano, ya que este estudio diagnóstico nos permite principalmente la observación tanto cualitativa como cuantitativa de la sensibilidad o la resistencia de una cepa en cuestión a un determinado antibiótico, y la concentración mínima que requiere este para inhibir su crecimiento (Erkmen, 2021).

La prueba de difusión de disco de Kirby-Bauer consiste básicamente en evaluar el tamaño del espacio alrededor de un pequeño disco de papel filtro impregnado con un antibiótico específico a una determinada concentración, en un medio de cultivo (Müeller Hinton) previamente sembrado con una cepa bacteriana, este espacio, también llamado halo de inhibición, es creado por la inhibición en el crecimiento

de la bacteria en estudio dado por el mecanismo de acción del antibiótico utilizado, y este se puede medir en términos de distancia, pudiendo medir su radio o su diámetro (Singh, Chandra, Kaur, Narang, & Kumar Gupta, 2018).

3.2.4.1.5. Concentración mínima inhibitoria

La concentración mínima inhibitoria (CMI) es la concentración en su mínima expresión o la cantidad más baja requerida de un fármaco en estudio en una composición, que confiera la inhibición del crecimiento de una cepa bacteriana. Cuantitativamente es de mucha utilidad esta metodología, ya que nos permite saber específicamente el grado de resistencia a un antibiótico o a su vez la susceptibilidad por parte de una cepa bacteriana en cuestión, básicamente midiendo las áreas formadas por la inhibición en su crecimiento (Katzung, 2017).

3.2.5. Terapéutica de la mastitis bovina

Básicamente la terapéutica antibiótica es administrada con la posibilidad de que los costos altos en aplicarla sean compensados una vez que se haya eliminado la infección intramamaria y la producción regrese a sus niveles basales.

Es de suma importancia considerar que en aquellos casos crónicos antes de establecer una terapéutica para el control de la mastitis, sea necesario inicialmente identificar con certeza el microorganismo patógeno que es responsable del proceso inflamatorio, ya que muchos de ellos al producir una alteración localizada, específica y por su interacción con el medicamento, tiendan a producir endotoxinas y una liberación masiva de lipopolisacáridos de membrana, afectando directamente al estado general del paciente, predisponiéndolo así a un shock endotóxico bacteriano. Para ello se ve necesario la transfusión intravenosa de líquidos hipertónicos que ayuden a la disminución del grado de inflamación (Almasi *et al.*, 2021).

Para poder administrar un antibiótico específico, además de tener en cuenta el tipo de patógeno que está causando la mastitis, es requerido que sepamos el mecanismo de acción del medicamento que vamos administrar, ya que esto favorecerá en la eliminación del microorganismo en cuestión. Básicamente los antibióticos para tratar la mastitis se clasifican en base a su mecanismo de acción, en bacteriostáticos y bactericidas (Pascal *et al.*, 2021).

Los agentes antimicrobianos bacteriostáticos y su mecanismo de acción están relacionados con la inhibición de la síntesis proteica de la bacteria interviniendo en procesos fundamentales de nutrición, metabolismo y respiración del germen provocando su muerte. Mientras que los agentes antibióticos bactericidas actúan inhibiendo a nivel de la síntesis de la pared celular y los mecanismos de reparación de esta, limitando así funciones vitales referentes a la membrana celular como la respiración, multiplicación y nutrición (Pascal *et al.*, 2021).

3.3. Fitoterapia

Desde tiempos remotos el hombre ha recurrido al uso de especímenes vegetativos para mitigar sus dolencias, reducir síntomas y prevenir enfermedades, ya que era uno de los pocos recursos disponibles en la medicina. A través del tiempo estas terapias llegaron a formar parte de lo que conocemos actualmente como medicina tradicional o autóctona (Delgado, 2020).

La fitoterapia se basa en el uso de especies vegetales capaces de proporcionar favorables beneficios curativos. Debido a esto, durante muchos años se ha tratado de profundizar el conocimiento de las propiedades medicinales que aportan dichas plantas a fin de crear productos alternativos que contrarresten la resistencia de muchos microorganismos hacia los fármacos comúnmente suministrados en las diferentes patologías (Delgado, 2020).

3.3.1. Aceites esenciales

Los aceites esenciales son líquidos aromáticos o mezclas complejas conformados por compuestos volátiles que son extraídos a partir de material vegetativo. Dichos aceites pueden ser únicamente aislados por medios físicos tales como el prensado o la destilación y están dispuestos por la derivación de tres principales vías biosintéticas; la vía del mevalonato misma que se encarga de conducir sesquiterpenos, la vía del metil-eritritol que conduce a los mono y diterpenos y finalmente la vía del ácido shikímico precursora de los fenilpropanos. No obstante, cabe destacar que los aceites esenciales están conformados por un sinnúmero de sustancias individuales capaces de cumplir con funciones muy complejas (Micucci *et al.*, 2020).

3.3.1.1. Actividad Antimicrobiana de los Aceites Esenciales

Esta actividad se puede definir como aquella que a través del empleo de diferentes sustancias destruyen a microorganismos patógenos o que inhiben su proliferación y desarrollo. Las plantas y hierbas comprenden los principales antimicrobianos naturales. Su efectividad frente a microorganismos patógenos se atribuye generalmente a sus compuestos fenólicos mismos que se encuentran presentes en los diversos extractos o aceites esenciales (Sayeed *et al.*, 2020).

Existe cierta dificultad en la identificación de los compuestos con mayor actividad antimicrobiana presentes en los aceites esenciales, ya que, al ser estas mezclas complejas pueden abarcar hasta 45 componentes diferentes. Sin embargo, dichos compuestos activos se dividen en cuatro grupos principales por su estructura química; terpenos, terpenoides, fenilpropenos y otros compuestos que le confieren un sinnúmero de actividades biológicas.

Gran parte de los estudios realizados al modo de acción antimicrobiano de los compuestos de aceites esenciales se han ejecutado en bacterias, donde se determinó que las bacterias Gram negativas son menos susceptibles que las bacterias Gram positivas, esto debido a que la membrana de las bacterias Gram negativas contiene lipopolisacáridos hidrófilos que actúan como una barrera protectora sobre macromoléculas y compuestos hidrófobos como los que se encuentran en los aceites esenciales (Soriano, 2022).

3.4. Tomillo (*Thimus zygis*)

El tomillo es catalogado como una planta arbustiva de propiedades aromáticas, la cual alcanza una estatura promedio de 13 cm a 15 cm, sus tallos son geoméricamente con cuatro lados, de estructura leñosa que tiende a tener muchas ramas que terminan en una hoja ovoide pequeña, generalmente es estacional.

Tiene un sinnúmero de propiedades, dentro de las cuales se contemplan las antibacterianas, antirreumáticas, calmante, expectorante, además como antihistamínica ayuda a el alivio del prurito ocasionado por picaduras de insectos, también dolores menorreicos, y como cicatrizante (Agexport, 2020).

3.4.1. Nomenclatura del Tomillo

Tabla 3 Nomenclatura del Tomillo.

Reino	Plantae.
Subreino	Traqueobionta (plantas vasculares).
Súper división	<i>Mentheae</i>
División	<i>Spermathophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i> (dicotiledóneas).
Subclase	<i>Asteridae.</i>
Orden	<i>Lamiales</i>
Genero	<i>Thymus</i>
Especie	<i>zygis</i>
NC	<i>Thymus zygis</i>

Fuente: Rodríguez *et al.*, (2021)

3.4.2. Características y Principales Componentes

- **Hojas:** Posee hojas de forma lineal, con una longitud aproximada de entre 4 y 8 mm, solo pediceleadas, sin forma ciliar, de forma opuesta con el peciolo volteados hacia abajo. La vitamina A es uno de los componentes de mayor relevancia fitofarmacológica que conforman las hojas, esta se encuentra presente como β -caroteno en cantidades de 14.000 UI/gr. Dicho compuesto orgánico actúa sobre las membranas mucosas reforzándolas y previniendo la aparición de infecciones. Asimismo, podemos encontrar a la vitamina C en cantidades de 359.4 mg/100 gr la cual aporta efectos antitumorales e inclusive una acción inmunosupresora. (Agexport, 2020)
- **Tallo:** El tallo es característico, ya que es de forma cuadrangular fuertemente leñoso con descamación en el cambio de estación, esta es enriquecido con componentes de importancia fitofarmacológica, ya que lo que más posee de importante son resinas y aceites.
- **Flores:** Las flores son de color rosado con blanco, la cantidad foliar esta agrupada en las extremidades de las ramas, estructuralmente tiene los cálices que

presentan tres dientes el labio superior, cortos e iguales, las corolas son largas, con el labio superior erguido. (Pizzorno & Murray, 2020)

3.4.3. Composición química

En innumerables estudios se ha podido demostrar que dentro de su composición química los principales componentes de importancia son el aceite esencial y los flavonoides. El aceite esencial (1,0-2,5%) conformado por fenoles monoterpénicos, excepcionalmente el timol, carvacrol, p-cimeno, gammaterpineno, limoneno, borneol y linalol compuestos que se han determinado mediante refracción y espectrofotometría. Aunque es necesario tener en cuenta el aceite esencial es variable en su composición según la estación anual además del lugar de la cosecha y la especie vegetal de la cual se extrae el aceite esencial (Pizzorno & Murray, 2020).

3.4.4. Propiedades antimicrobianas del *Thymus zygis*

Dentro de los diferentes estudios que se han realizado se ha demostrado que el *Thymus zygis* posee múltiples propiedades, como; antioxidantes, antifúngicas, anticancerígenas antiespasmódica. Por otra parte, una de sus propiedades de mayor interés fitoterapéutico son sus propiedades antibacterianas, en donde se menciona que el *Thymus zygis* muestra amplias actividades antimicrobianas, inhibiendo bacterias Gram positivas y Gram negativas siendo *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* las que presentan mayor susceptibilidad. Hongos como *Candida albicans*. (Ramírez Heredia, 2022)

3.4.5. Efectos secundarios

La razón principal por la que los aceites esenciales son empleados como posibles agentes fitofarmacológicos se debe a su baja toxicidad hacia los mamíferos y otras especies. Sin embargo, estos deben emplearse bajo precaución ya que determinados componentes a dosis elevadas pueden ocasionar efectos adversos. La planta de tomillo y sus derivados esencialmente son seguros para su consumo, es necesario saber que los extractos etanólicos y aceites esenciales de esta relacionados con el origen de efectos tóxicos en personas, pudiendo provocar efectos teratógenos y residualidad expresiva en leche (Pérez *et al.*, 2019).

CAPITULO IV

4. MARCO METODOLÓGICO

4.1. MATERIALES

4.1.1. Lugar de investigación

La presente investigación se realizó en la finca “Edith”, ubicada en la provincia de Chimborazo, en el Cantón Penipe, en la parroquia La Candelaria, referencialmente la finca está ubicada a una distancia de 1 km de la vía a la parroquia Releche.

Tabla 4 Especificaciones del lugar donde se realizará la investigación

País	Ecuador
Provincia	Chimborazo
Cantón	Penipe
Parroquia	La Candelaria
Sector	1 km vía a la parroquia Releche.

Fuente: Gad municipal de Penipe (2022).

4.1.2. Situación Geográfica del lugar de investigación

Tabla 5 Situación Geográfica del lugar de investigación

Parámetros Geográficos de	
Altitud	2500 msnm
Latitud	1°37'35.1"S
Longitud	78°30'32.4"W
Temperatura máxima	22° C
Temperatura mínima	9° C
Temperatura media anual	15°-22° C
Precipitación media anual	1000-2000 mm
Humedad relativa (%)	70%

Fuente: Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (2021).

4.1.3. Zona de vida

La Canderlaria está considerada como un ecosistema compuesto de páramo de alta montaña que se clasifica dentro del neotrópico, con altitudes sobre el nivel del mar desde los 3000 m.s.n.m. hasta los 4200 m.s.n.m. la expresión de la flora coexiste vegetación abierta que está ubicada entre la franja del bosque cerrado de subpáramo o franja altoandina y las nieves perpetuas considerado también como superparamo (Holdridge, 1971).

4.1.4. Material Experimental.

- 20 cepas de *Staphylococcus aureus*.
- Aceite esencial de tomillo.

6.1.4.1. Indumentaria de laboratorio.

- Mandil
- Mascarillas
- Cofia desechable
- Guantes Estériles

6.1.4.2. Equipos de laboratorio

- Estufa (Biobase, BOV-V30F, China)
- Balanza analítica (OHAUS, Scout Pro SP 2001, China)
- Incubadora (Mettler, Alemania)
- Cámara de flujo laminar (Biobase, BBS-H1800, China)
- Agitador vórtex (DLAB, MX-S, China)
- Microscopio convencional (Amscope, USA)
- Centrífuga (BEILI CENTRIFUGE, DT5-6A (3), China)
- Microondas (Indurama, MWI-28VL, Ecuador).
- Micropipetas 10-100 ul. (DLAB, YM5D077650, China)
- Micropipetas 0.1-1 mL. (TOPSCIEN, S01N809, Germany)

- Vacutainer (Vacutech, Lot. 01610049, Ecuador)

6.1.4.3. Materiales de laboratorio

- Puntas de micropipetas
- Tubos de ensayo.
- Tubos Eppendorf.
- Gradillas para tubos.
- Cajas Petri
- Mechero de Bunzen
- Regla Milimétrica
- Hojas de registro
- Hisopos estériles
- Discos de papel filtro de celulosa (Oxoid, lot: 3337882)
- Asas de platino para siembra.
- Toallas estériles
- Empaques para autoclave
- Papel de autoclave
- Cinta testigo de autoclave

6.1.4.4. Reactivos

- Agar Mueller Hinton (Difco, Lot:0294294, USA)
- Agua peptona (Acumedia, Lot. 107596^a, USA).
- Agar Base Sangre (Difco, Lot.0237250, USA)
- Discos de antibiótico de Estreptomicina 15µg (Oxoid, lot: 33380421)
- Aceite Esencial de Tomillo (*Thymus zygis*) (Aromalab®, Lote:84280, España)
- Solución Fisiológica.

- Alcohol 70 y 90 vol.
- Dimetilsulfóxido 99% (Loba Chemie, A359352102, India).

6.1.4.5. Materiales de oficina

- Hojas de papel Bond
- Computadora
- Impresora
- Esferográficos y cuadernillo de apuntes
- Cámara fotográfica
- Libreta

6.2. Métodos

6.2.1. Factores en estudio

Según Montero *et al.*, (2018) consideran que el aceite esencial del tomillo (*Thymus zygis*) tiene actividad antimicrobiana a una concentración mínima inhibitoria del 1%, teniendo así un efecto bactericida sobre cepas de *Staphylococcus aureus*; además. Zeghad & Merghem, (2013) informan que al utilizar el aceite esencial del tomillo (*Thymus zygis*) a una concentración del 30 %, se obtuvo halos de inhibición de 10 mm y 15 mm ; un punto importante que hay que considerar es lo que menciona Hammer *et al.*, (1999) que la composición del aceite esencial y de los extractos del tomillo spp, cambia según la variedad de la especie vegetal, la zona ecológica y condiciones climáticas. Tomando como referencia los Investigaciones previamente citados se pone en consideración el desarrollo del principal objetivo planteado en esta investigación el cual es “Evaluar in vitro la actividad antimicrobiana del aceite esencial de tomillo (*Thymus zygis*) mediante la técnica de Kirby-Bauer en *Staphylococcus aureus* aislados de Mastitis bovina”, esto a distintas concentraciones del extracto vegetal.

Factor A

- a1 cepa de *Staphylococcus aureus*

Factor B

- b1: Aceite esencial de Tomillo (*Thymus zygis*) al 25%
- b2: Aceite esencial de Tomillo (*Thymus zygis*) al 50%
- b3: Aceite esencial de Tomillo (*Thymus zygis*) al 75%
- b4: Disco de antibiótico Eritromicina (15µg) (Testigo).

6.2.2. Tratamientos

Tabla 6 Distribución de factores en estudio y su interacción (tratamientos).

TRATAMIENTO	CÓDIGO	DESCRIPCIÓN
1	a1b1	Aceite esencial al 25% + Cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> .
2	a1b2	Aceite esencial al 50% + Cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> .
3	a1b3	Aceite esencial al 75% + Cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> .
4	a4b4	Disco de Eritromicina 15µg (testigo) + Cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> .

Elaborador por: Chávez (2022)

6.2.3. Especificaciones del experimento

Tabla 7 Características del experimento.

Tratamientos	4
Repeticiones	20
Número de Unidades experimentales (aislados)	20
Número total de análisis	80

Elaborador por: Chávez (2022)

6.2.4. Tipo de diseño

- Diseño de bloques completamente al azar (DBCA):

El siguiente modelo matemático; $Y_{ij} = \mu + Y_{BLOQUES} + t_i + t_j + \epsilon_{ij}$

- Prueba de Tukey 5%, como comparativa entre las medias de los tratamientos.

Tabla 8 Análisis de Varianza (ADEVA)

Fuentes de variación	Grados de libertad
Total (t*r) -1	79
Tratamientos (t-1)	3
Bloques (repeticiones -1)	19
Error experimental (t-1) (t-r)	57

Elaborador por: Chávez (2022).

6.2.5. Métodos de evaluación.

- **Prevalencias de la mastitis.**

La prevalencia de la mastitis en la finca “Edith” se determinó con la siguiente fórmula;

$$\text{Prevalencia} = \frac{\text{Casos positivos}}{\text{Población total}} * 100$$

también se consideró la prevalencia en el cuarto mamario afectado, y los aislados que se determinaron de las muestras obtenidas.

- **Tipo de aislado**

El *Staphylococcus aureus*, es uno de los patógenos causantes de mastitis con mayor prevalencia en los hatos lecheros por ello se consideró el uso de esta especie bacteriana ya que tiene una gran variedad de genes resistentes:

- **Parámetros de caracterización bioquímica**

Los parámetros de caracterización bioquímica del *Staphylococcus aureus*, son los siguientes:

Pruebas de catalasa: la enzima catalasa descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, el procedimiento es colocar una gota de peróxido de hidrógeno al 3 % sobre un portaobjeto y luego se trasfiere una porción de colonia sobre la sustancia, la interpretación de resultados es el desprendimiento de burbujas que se considera como positivos.

Prueba de oxidasa: consiste en la oxidación de la cepa de bacteriana, en una tira reactiva donde es de importancia que la cepa bacteriana en estudio sea positiva.

Tinción de Gram: es prueba se realiza mediante la adición de un colorante a el material de estudio donde nos permita la observación de las características morfológicas visibles de la bacteria.

Patrón de hemolisis: es el patrón donde la cepa bacteriana interactúa con el agar sangre, los marcadores de resultados pueden ser una: alfa hemolisis y beta hemolisis.

Pruebas de coagulasa: El *Staphylococcus aureus* posee dos tipos de coagulasa una que es endocoagulasa o coagulasa ligada (Clumping factor), que está unida a la pared celular y actúa sobre el fibrinógeno provocando la formación de un coágulo o grumos en el plasma.

También tiene un exocoagulasa o coagulasa libre que actúa mediante la activación de un complejo CRF que producirá un coagulo de fibrina. Estos métodos se realizaron en lámina o tubo que consiste en colocar unos 0.5 ml de plasma en tubo, posteriormente se siembra la cepa bacteriana.

Prueba de salinidad y fermentación del manitol: el *Staphylococcus aureus* crece en un medio con alta concentración de sal y fermenta el manitol lo que produce ácidos provocando un cambio en el pH y dar un viraje en la coloración de rojo a un color amarillo

- **Concentración del aceite**

Es una variable de tipo dependiente, indica la dosis proporcional de soluto (elementos fitofarmacológicos con acción bactericida) disuelta en una determinada cantidad de solvente; su indicador de medición es determinado por las concentraciones del Aceite esencial de *Thymus zygis* al 75%, 50%, 25%.

- **Sensibilidad**

Es una variable de tipo Independiente, lo que nos permite establecer la capacidad de ser susceptible de un microorganismo frente a un fármaco a partir de la exposición a una concentración generalizada; indiscutiblemente podemos evidenciar su ocurrencia mediante la medición de los Halos de inhibición; en donde: > 8 mm (+) (Duraffourd *et al.*, 1897).

- **Resistencia**

Es una variable de tipo independiente y básicamente nos ayuda a definir la facultad que tienen ciertos microorganismos patógenos de tolerar la interacción farmacocinética y farmacodinamia de un medicamento aplicado con el fin de inhibir su crecimiento o multiplicación o a su vez eliminarlo, el indicador de medición es; Halo de inhibición (mm) Resistente (+) ≤ 8 mm (Boua *et al.*, 2011).

6.2.6. Procedimiento

6.2.6.1. Obtención del aceite esencial de tomillo mediante la técnica de arrastre por vapor.

El aceite esencial del tomillo (*Thymus zygis*), fue obtenida en una empresa (aromalab®) que se dedica a la producción y venta de aceites esenciales obtenidos por arrastre de vapor, donde por medio de la ficha técnica nos proporciona los datos necesarios como; densidad (Densímetro @ 20°C g.cm-3) con resultados de 0,920 “A”, Ph (Potenciómetro @20°C) con valor de 3.47 “A”, Grados Alcohólicos (Alcoholímetro @20°C) con valor de 57,00 “A”, Índice de refracción (Refractómetro @20°C) valor de 1.501 “A”, a cada valor se le designa una letra “A” que está considerado como “ACEPTABLE” dentro de los parámetros expresados.

6.2.6.2. Aislamiento e identificación de *Staphylococcus aureus*

- **Muestreo de las vacas positivas**

Las vacas fueron muestreadas en la finca “Edith” la que está ubicada en la Provincia de Chimborazo, en la ciudad de Riobamba, en el Cantón Penipe, perteneciente a la parroquia la Candelaria. Se identificó mediante el examen clínico de la ubre para la obtención de signos característicos de inflamación, además se recurrió a la aplicación de los métodos diagnósticos de California Mastitis Test (CMT), en vacas que fueron identificadas con alteración en la leche, para su análisis se procedió a higienizar el pezón con una solución bactericida que generalmente fue con compuestos a base de yodo y peróxido de hidrógeno, posteriormente se secó el pezón tratando de quitar el excedente, por consiguiente se procedió a la desinfección con alcohol y se dejó secar, para garantizar la inocuidad de la muestra,

pisteramente se procedió a la recolección de 5 a 10 mL de leche positiva a mastitis en tubos estéril, seguido se etiqueto el tubo con el numero de la vaca y el cuarto. finalmente se debe almacenar a una temperatura de 4° a 10° centígrados para su posterior análisis en el laboratorio.

- **Enriquecimiento de la muestra**

Una vez se recepto la muestra en el laboratorio y llenada la hoja de registro de laboratorio, se procedió a preparar agua peptonada, donde según las indicaciones del fabricante recomienda suspender 20 g. en 1 litro de agua destilada, la cual se procedió a ebulir y posteriormente se autoclave a una temperatura de 121 ° centígrados por un lapso de 15 minutos mínimo, luego el broth estéril se distribuyo en una relación de 9 mL en tubos de ensayo de tapa rosca, al agua peptonada se le añadió 1000 µL de leche, luego se etiqueto y finalmente se sello los tubos con una película de petrifilm, luego se introdujo en la incubadora a una temperatura de 37°C por 24 horas.

- **Preparación del medio selectivo y diferencial**

Dentro de la investigación se consideró el medio Sal Manitol, el cual es un cultivo selectivo y diferencial, el cual contiene factores de crecimientos e inhibición como; el extracto de carne, la peptona de carne y la tripteína como fuente de carbono, nitrógeno vitaminas y minerales que promueven el desarrollo de microbiono, el manitol es el hidrato de carbono fermentable, los estafilococos coagulasa positivo se visualizan como colonias amarillas rodeadas de una zona del mismo color, para su preparación se suspendió 111 gr de polvo en 1 litro de agua destiladas, se llevo a ebullición durante 1 o 2 minutos para disolución total, se esterilizo en un autoclave a 121 °C durante 15 minutos, se enfrió y se distribuyo de 15 a 20 mL en placas de Petri estériles.

- **Siembra de la muestra**

La muestra que fue previamente enriquecida, posteriormente se realizó el cultivo, donde una ves ya listos los agares específicos, se procedió a colocar 100 µL de dicha muestra, se rotulo con dicho código procedente, sellado de la caja y enviado a la incubadora por 24 horas a 37 ° C. posteriormente se realiza la resiembra de las

cepas aisladas, hasta que se obtuvo un cultivo homogéneo y lo mas puro, dichos procedimiento se realizó en el agar Sal Manitol.

- **Identificación del *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina**

Para la identificación de las cepas bacterianas principalmente se realizó por medio de un proceso de generación de un perfil el cual comprende; desde la morfología de las colonias presente en el medio específico, tinción de Gram, y pruebas bioquímicas continuación, se detalla cada de las pruebas.

La morfología de la colonia del *Staphylococcus aureus*, son observadas como colonias lisas, brillantes y convexas, poseen las colonias un endopigmento color amarillo naranja a blanco porcelana o un color dorado, tiene un diámetro de 0.5 a 1.5 micras, agrupadas como células únicas, en pares, tétrada o cadenas cortas en forma de racimos de uvas, las cuales son bacterias no móviles, no esporuladas, no poseen cápsula y son anaerobias facultivas (García Estrella, 2014).

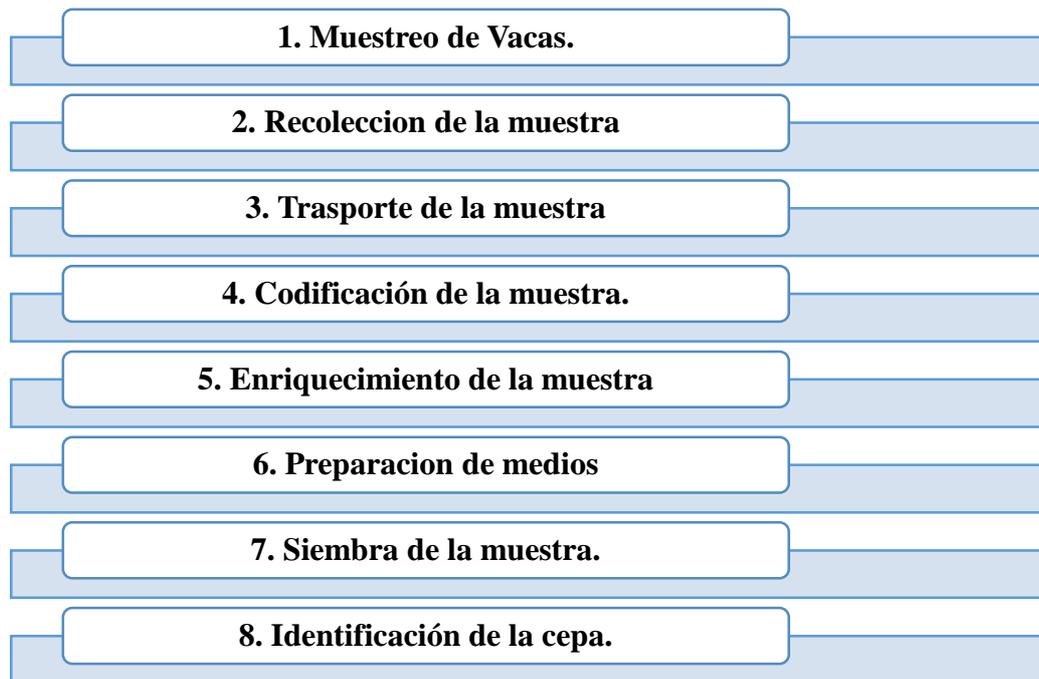
Las pruebas bioquímicas son aquellas que ponen en evidencia la existencia de una enzima o rutas metabólicos determinados, a continuación, se detalla cada unas:

Prueba de Catalasa: la enzima catalasa descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, el procedimiento se realizó con colocar una gota de peróxido de hidrogeno al 3 % sobre un portaobjeto y luego se trasfiere una porción de colonia sobre la sustancia, la interpretación de resultados es el desprendimiento de burbujas que se consideró como positivos (García Estrella, 2014).

Prueba de Coagulasa: El *Staphylococcus aureus* posee dos tipos de coagulasa una que es endocoagulasa o coagulasa ligada (Clumping factor), que está unida a la pared celular que actúa sobre el fibrinógeno provocando la formación de un coágulo o grumos en el plasma. También tiene un exocoagulasa o coagulasa libre que actúa mediante la activación de un complejo CRF que producirá un coagulo de fibrina. Este método se realizó en lámina o tubo que consiste en colocar unos 0.5 ml de plasma en tubo, posteriormente se siembra la cepa bacteriana y se incuba por 24 horas a 37 °C, después del tiempo establecido se presenta la formación de un coagulo en el plasma (Seija V. , 2019).

La fermentación del manitol: el *Staphylococcus aureus* crece en un medio con alta concentración de sal y fermenta el manitol lo que produce ácidos provocando un cambio en el pH y dar un viraje en la coloración de rojo a un color amarillo (Pharmacopeia, 2008).

Figura 1 Diagrama de flujo para el aislamiento e identificación del *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina.



Elaborado: Chávez (2022)

6.2.6.3. Establecimiento de la sensibilidad y resistencia de *Staphylococcus aureus*

El establecimiento de la sensibilidad y resistencias del *Staphylococcus aureus* a las concentraciones establecidas del aceite esencial del tomillo, se realizó con los siguientes procesos;

- **Inoculación en caja Petri**

Se preparo el medio Agar Mueller Hinton aproximadamente 15 a 20 mL en cada caja Petri, donde se realizó la siembra de las cepas bacterianas para su antibiograma, a partir del cultivo en fase exponencial de crecimiento, se preparó una suspensión en agua salina 0.9% hasta una turbidez de 0.5 en la escala McFarland, correspondiendo 1.5 UFC/mL para su posterior análisis de susceptibilidad.

- **Dilución del aceite esencial del tomillo**

la dilución del aceite esencial del Tomillo para el estudio se realizó de la siguiente manera;

- El 25 % se tomó 250µl de aceite esencial más 750 µL de dimetilsulfóxido.
- Para el 50 % se tomó 500µl de aceite esencial más 500 µl de dimetilsulfóxido.
- El 75 % se tomó 750µL de aceite esencial más 250 µL de dimetilsulfóxido.

Para el análisis de la CMI (concentración mínima inhibitoria) del aceite esencial se consideró las concentraciones del 5, 7 y 10 %, la cual se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente, donde se tomó 50, 70 y 100 µL de aceite esencial de tomillo respectivamente con una adición de dimetilsulfóxido a una relación de 950, 930 y 900 µL respectivamente.

- **Actividad antimicrobiana mediante el método de Kirby Bauer (Difusión disco -placa)**

Posteriormente, con la utilización de un hisopo estéril se realizó la siembra en placas de Müller Hinton Agar de forma homogénea, para lograr que la cepa bacteriana logre cubrir todo el agar de la caja Petri, posteriormente los discos impregnados con la solución que contiene el aceite esencial a dicha concentración de estudio se procedió;

- **Aplicación de los discos de inhibición**

Con la ayuda de una pinza estéril, los discos fueron colocados sobre la superficie del agar, todos los discos de papel filtro de celulosa fueron previamente sumergidos en cada uno de los aceites esenciales previamente diluidos, con una relación de 20 discos por cada concentración del aceite esencial, así también se probó como el control discos de Eritromicina de 15µg para dar cumplimiento al diseño experimental que se planteo.

Una vez colocados los discos de antibióticos y con el aceite esencial se procedió a incubar por 24 horas a 37° centígrados, los cuales posteriormente se tomó la medida del diámetro del halo de inhibición.

- **Medición de los halos de inhibición**

Posteriormente a la espera de 24 horas de incubación se procedió a la toma del diámetro del halo de inhibición, con la ayuda de un calibrador de vernier, el cual considerando que dicho valor del diámetro se le restara los 6 mm que corresponde a el papel filtro de celulosa del disco con dicha concentración, finalmente, se tabulo y se realizó el análisis estadístico para su interpretación.

Tabla 9 Escala general de sensibilidad de un fitofármaco

Inhibición	Diámetro del halo de inhibición (mm)
Nula (-)	(-) ≤ 8 mm
Sensible (+)	(+) > 8 mm ≤ 14 mm
Muy Sensible (++)	(++) > 14 mm ≤ 20 mm
Sumamente Sensible (+++)	> 20 mm

Fuente: Duraffourd *et al.*, (1897).

Figura 2 Diagrama de flujo para el análisis de la susceptibilidad del *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina.



Elaborado: Chávez (2022).

CAPITULO V

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Aislamiento e identificación

5.1.1. Ocurrencia por raza

Tabla 10 Frecuencia y porcentajes de casos según la raza.

No.	Código	Raza					
		Holstein	Jersey	Brown Swiss			
1	SA001PI	1					
2	SA004PI	1					
3	SA004PD		1				
4	SAR001PI	1					
5	SAR002AD				1		
6	SAR003AI	1					
7	SAR004PI		1				
8	SAR004PD	1					
9	SAR005AD	1					
10	SAR006PD		1				
11	SAR007AI	1					
12	SAR008PI	1					
13	SAR008PD				1		
14	AT001PD	1					
15	AT001AD	1					
16	AT002AI	1					
17	AT002PD	1					
18	AT003AI		1				
19	AT004PD	1					
20	AT005PI		1				
21	SAZ001PI	1					
22	SAZ002D				1		
23	SAZ004AD		1				
24	SAZ005PD	1					
25	SAZ009PI	1					
26	SAZ010AD	1					
27	SAZ011PD	1					
28	SAZ018AD		1				
29	SAZ022AI	1					
Total		19	65.6%	7	24.12%	3	10.28%

Elaborado por: Chávez (2022).

Análisis: La tabla 12 exhibe que de un número total de 60 animales muestreados de la raza Holstein, Jersey y Brown Swiss, 29 animales se presentaron como positivos a dicha patología mediante el California Mastitis Test (CMT), se calculó la frecuencia y porcentajes de los animales que presentaron mastitis según su raza, se evidenció que en la finca “Edith”; la raza Holstein expresó el mayor número de casos con el 65.6 % (n=19) de los animales positivos, seguido de la raza Jersey con un 24.12 % (n=7) y finalmente, la raza Brown Swiss expresó la menor casuística con el 10.78 % (n=3) de mastitis. En la figura 5. Podemos ver los porcentajes de la presencia de mastitis según la raza del animal.

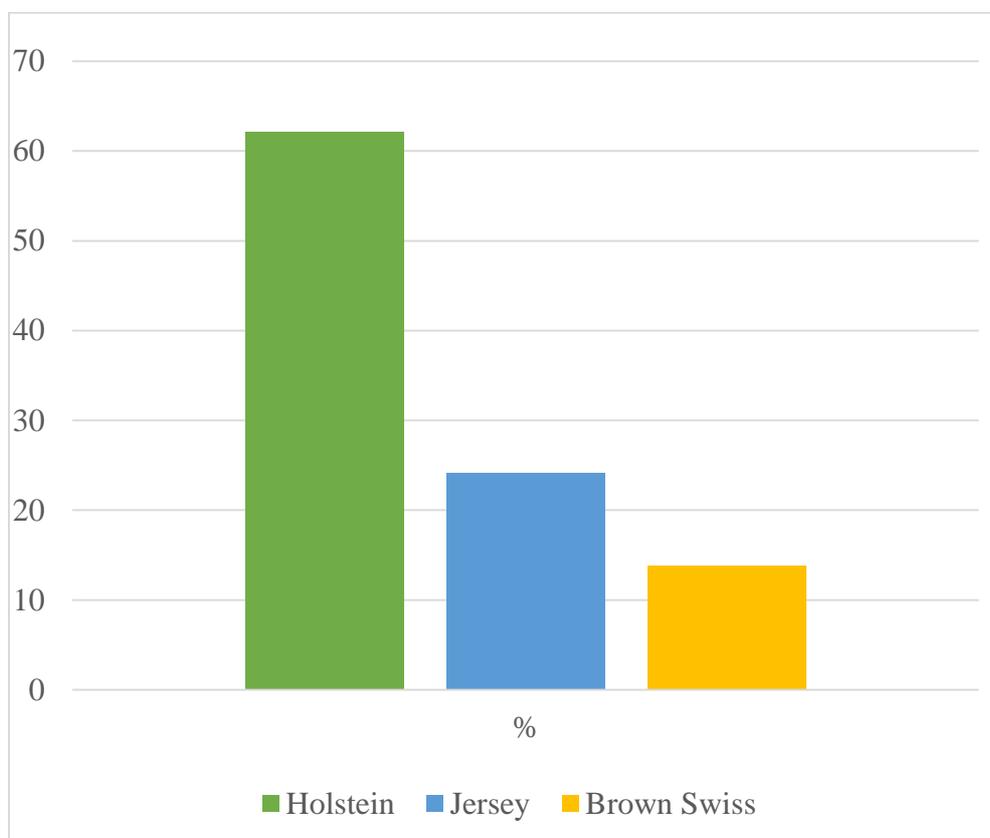


Figura 3 Casuística de mastitis según la raza del animal.
Elaborado por: Chávez (2022).

Discusión: Según Vidales *et al*, (2017) en su investigación de la asociación del ordeño y componente racial con la prevalencia de mastitis clínica, obtuvo que la raza Holstein presentó la mayor prevalencia de mastitis clínica con un máximo de 26 %, versus a las otras razas y sus cruces, los cuales obtuvieron baja prevalencia de mastitis clínica, comparativamente con los resultados obtenidos en la presente investigación la raza Holstein obtuvo la mayor prevalencia de mastitis bovina.

5.1.2. Aislamiento de la cepa bacteriana

Dentro del aislamiento también se determinó la tasa de prevalencia de la mastitis bovina presente en el hato leche de la finca “Edith”.

Tabla 11 Tasa de prevalencia de la mastitis en el hato lechero.

Población total	60
Número de casos	29
Tasa de prevalencia %	48.33

Elaborador por: Chávez (2022)

Análisis: En la finca “Edith” se evidenció una tasa de prevalencia del 48.33% de mastitis bovina, es decir que 29 animales fueron diagnosticados como positivos a mastitis en diferentes grados de cronicidad mediante la prueba de CMT, de los cuales se obtuvo una muestra de 10 mL de leche. En la figura 3. podemos ver la reacción del CMT con la leche que presentó elevados recuentos de células somáticas en la finca “Edith”.



Figura 4 Diagnóstico de mastitis mediante CMT en la finca “Edith”.
Fuente: Chávez (2022).

Discusión: En el trabajo de Suarez, (2007), en TUNSHI FCO- ESPOCH provincia de Chimborazo logro alcanzar en 120 días de trabajo una tasa de prevalencia del 39.21%, mientras que (MAGAP) ministerios de Agricultura Ganadería, Acuacultura y Pesca (2015), en 6 meses de trabajo realizado por CMT en vacas en producción de leche en la provincia de Chimborazo de la parroquia Quimiag presentó tasa de prevalencia del 46.87 %, mientras que Cuzco, (2015) obtuvo un 40 % de prevalencia en el cantón guano de la provincia de Chimborazo. También Agrocalidad. (2015) recopila datos de mastitis bovina en la provincia de Chimborazo en diferentes cantones mediante el método de CMT con una prevalencia del 42.60 %, donde se concuerda con los encontrado en la presente investigación ya que se obtuvo el 48.33% de prevalencia de mastitis bovina, donde se consideró mastitis clínicas y mastitis subclínica presente en el hato lechero.

5.1.3. Identificación del *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina

La identificación se realizó por medio de análisis fenotípico y pruebas bioquímicas para el hallazgo de *Staphylococcus aureus* presente en leche positiva a mastitis bovina.

Tabla 12 Frecuencia y porcentaje de *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina.

Bacterias	Frecuencias	%
<i>Staphylococcus aureus</i>	20	68.96
Otras.	9	31.04

Elaborador por: Chávez (2022)

Análisis: Dentro de 29 muestras recolectas el 68.96 % (n=20) presentaron características confirmatorias para *Staphylococcus aureus* y el 31.04 % (n=9) presentaron otras características microbiológicas no diagnosticas y de nula importancia en esta investigación, como bacilos Gram negativos y bacilos Gram positivos.

En la figura 4. se puede observar los porcentajes de ocurrencias del *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina.

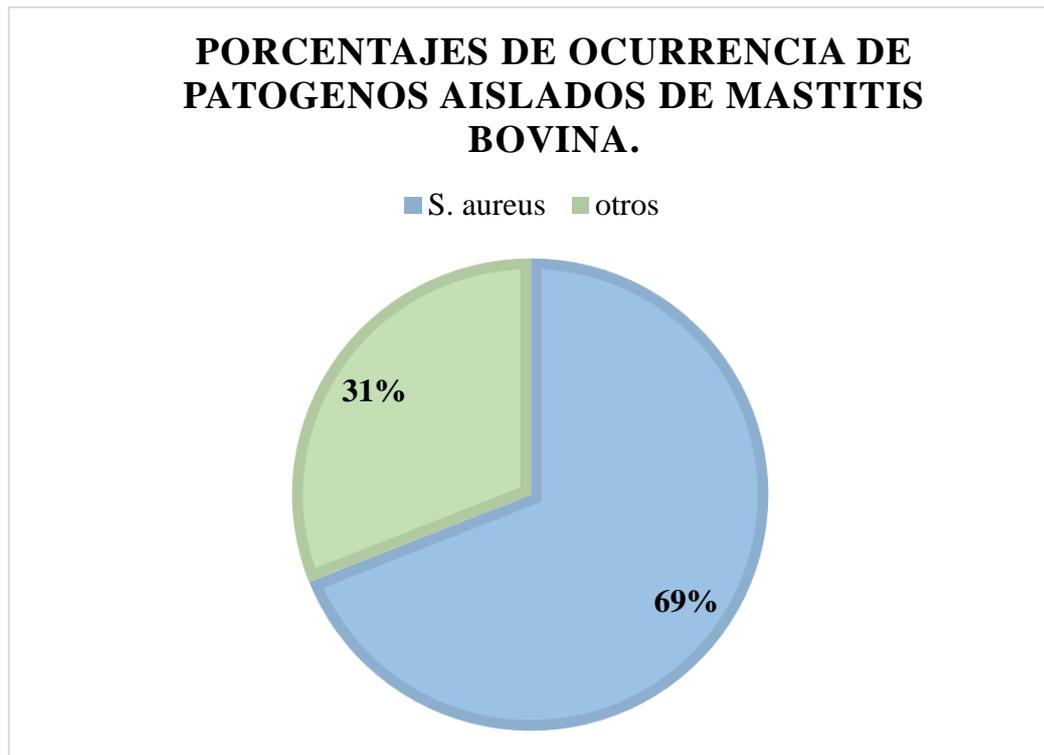


Figura 5 Porcentajes de ocurrencias del *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina.

Fuente: Chávez (2022).

Discusión: Guzñay, (2016) en su investigación donde analizó muestras de 16 vacas con mastitis bovina, de las cuales registró 48 agentes causales mediante pruebas microbiológicas y observación en el microscopio, reportando que la mayor cantidad de aislados fueron del género de *Staphylococcus spp.* con el 60.42 % del total de aislados, también Maldonado *et al*, (2022) reportó que de 14 vacas con mastitis bovina se aisló el 51.4 % de *Staphylococcus aureus* a lo cual, concluyó que este alto valor se debe a que esta bacteria se presenta en la mayoría de explotaciones lecheras con un alto índice de contagio, ya que se disemina principalmente en las actividades realizadas durante el ordeño, así mismo Yarder, (2017) señala que la diseminación de mastitis bovina producida por agentes contagiosos es debido a protocolos línea de ordeño mal establecidos. Añadiendo a esto Gamboa *et al*, (2014) manifiesta que en su mayoría de las bacterias de carácter contagioso que causan esta patología son Gram positivas como el claro ejemplo del *Staphylococcus aureus* la cual puede encontrarse en un 75 % mas que otras bacterias, por ende, se consideró relativos los datos encontrados en la investigación ya que el 60 % fueron *Staphylococcus aureus* causantes de mastitis.

5.2. Análisis del Aceite Esencial del tomillo (*Thymus zygis*)

El aceite esencial que se logró extraer fue analizado en la empresa Aromalab®,

Tabla 13 Análisis Físicoquímico del aceite esencial del tomillo (*Thymus zygis*).

Parámetro	Método de análisis	Especificaciones (criterio de aceptación)		Resultados	A: Aceptable R: rechazado
		Mínimo	Máximo		
Densidad	Densímetro @20°C g. cm-3	0.890	0.950	0.920	A
pH	Potenciómetro @20°C	3.440	3.500	3.470	A
Grados Alcohólicos	Alcoholímetro @20°C	56.970	57.030	57.000	A
Índice de refracción	Refractómetro @20°C	1.471	1.531	1.501	A
Solubilidad	Sensorial- Visual.	No: Agua Si: Aceite			A

Fuente: Aromalab (2022).

Análisis: El análisis físicoquímico del aceite esencial del tomillo fue realizado por la empresa Aromalab la cual brinda seguridad ya que remite certificación profesional, de los parámetros establecidos, obteniendo que estos son aceptables al tratarse de un aceite esencial de un extracto vegetal. Ya que, según la Real Farmacopea Española, el índice de refracción que un fluido debe tener para considerarse un aceite no debe superar 1.54, y una densidad máxima de 0.96, los valores obtenidos en el aceite del tomillo son aceptables para su uso en la investigación.

Luengo, (2006) menciona que en los extractos de tomillo dentro de su composición química se destacan los flavonoides, timol y carvacol, etc. Los cuales son compuestos volátiles que le confieren innumerables propiedades farmacológicas, así como propiedades antimicrobianas.

5.3. Análisis del efecto antimicrobiano del Aceite esencial del tomillo al 75%, 50% y 25% frente a *Staphylococcus aureus*

La actividad antimicrobiana se realizó según lo establecido por el método de Kirby Bauer, con la escala de 0.5 Macfarlán para *Staphylococcus aureus* causantes de mastitis.

Tabla 14 Análisis de varianza (DBCA) del efecto de los tratamientos sobre el *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina.

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F. Valor	Pr. > F.
Tratamiento.	3	23343.73	7781.24	499.18	<.0001**
Repeticiones	19	622.13	32.74	2.10	0.0163*
Error	57	888.512	15.58		
Total	79	24854.38			CV: 8.95%

** : Diferencias estadística sumamente significativa; * : Diferencias estadística significativa; CV: Coeficiente de variación.

Elaborador por: Chávez (2022)

Análisis: En la tabla 14 podemos ver el análisis de varianza del DBCA, donde la prueba de Fisher nos indica; En lo que concierne a repeticiones o bloques se evidenció un efecto estadístico significativo, es decir que las unidades experimentales (20 aislados de *Staphylococcus aureus*) se comportaron diferente, mientras que a nivel de tratamientos se evidenció diferencias estadísticas altamente significativa es decir que a dichas concentraciones del aceite esencia del tomillo (75%, 50%, 25% y Testigo) se observó un distinto efecto inhibitorio, con un coeficiente de variación del 8.95% dándonos veracidad y aceptabilidad de los datos en la investigación, y finalmente con un R^2 de 0.96 confirmando lo antes mencionado.

5.3.1. Análisis de la comparación de las medias con la prueba de Tukey al 5% del efecto antimicrobiano del aceite esencial del tomillo al 25, 50 y 75%.

La prueba de Tukey al 5% nos expresa, el comportamiento de los tratamientos planteados (T3:75%, T2:50%, T1:25% y Testigo “T4”), frente a los 20 aislados de *Staphylococcus aureus* causante de mastitis bovina.

Tabla 15 Comparación de medias de los tratamientos, Tukey a el 5%.

Tratamiento	Media	N	Tukey agrupación.
3 (75% Acei. Tomi.)	64.45	20	A
2 (50% Acei. Tomi.)	54.95	20	B
1 (25% Acei. Tomi.)	37.05	20	C
4 (Eri. 15µg)	19.90	20	D

Acei. Tomi.: aceite esencial de tomillo, *Eri.:* eritromicina.

Elaborado por: Chávez (2022).

Análisis: En el análisis de la prueba de Tukey al 5%, se evidenció que las medias son estadísticamente diferentes, donde el mayor promedio lo exhibió el T3 (75% de Aceite Esencial de Tomillo) con 64.45 mm de diámetro de halo de inhibición, siguiéndole el T2 (50% de Aceite Esencial de Tomillo) con una media de 54.95 mm de diámetro de halo de inhibición. Posteriormente el T1 (25% de Aceite Esencial de Tomillo) con una media de 37.05 mm de diámetro. Y finalmente el T4 (15µg de Eritromicina) con un promedio de 19.90 mm de diámetro de halo de inhibición, observando que el T1 supera a el tratamiento T4 en promedios de los halos de inhibición.

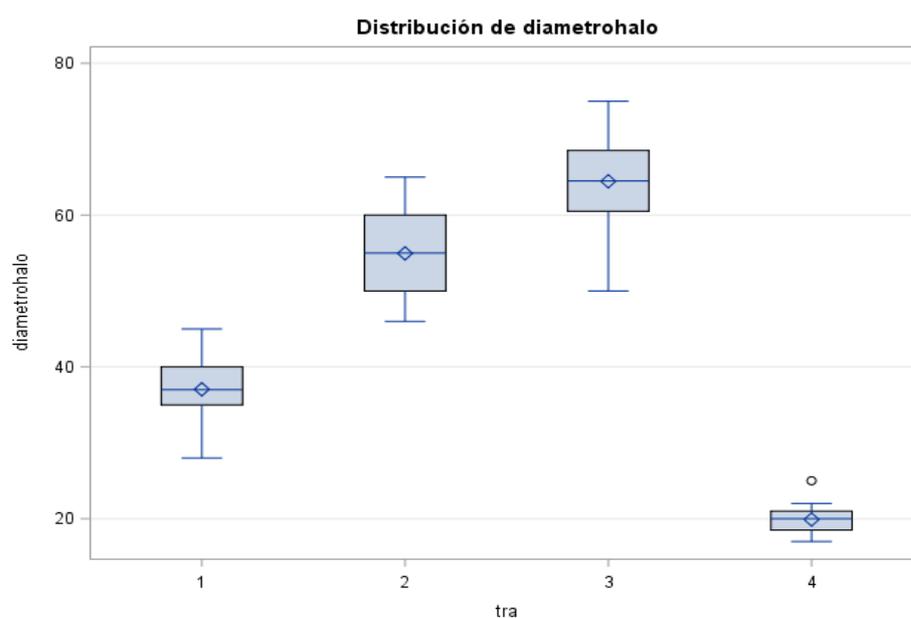


Figura 6 Efecto de los tratamientos sobre el *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina.

Fuente: SAS (2022).

Discusión: Montero *et al*, (2018), en su investigación donde probó la eficacia antimicrobiana del aceite esencial de tomillo sobre cepas de *Staphylococcus aureus* concluyó que las concentraciones del 30, 50, 70 y 90 % no pudieron ser determinantes en la sensibilidad ya que el crecimiento bacteriano en placa quedó totalmente inhibido, concordando con los resultados obtenidos en la presente investigación, ya que al momento de aplicar los 4 discos con las diferentes concentraciones propuestas la inhibición observada en el crecimiento bacteriano fue de toda la placa, para ello, se estableció colocar un solo disco al 25%, 50 % y 75% de concentración por cultivo.

Ramos *et al*, (2019) en su investigación menciona que al analizar la actividad antimicrobiana del aceite esencial del tomillo a el 25%, 50% y 100% encontró resultados de 11.6, 17.6 y 22 mm de diámetro de halo de inhibición respectivamente, en cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, infiriendo que dichos resultados no pueden ser comparativos con la presente investigación ya que no hay reportes del uso de aceite esencia del tomillo en cepas de *Staphylococcus aureus* de tipo silvestre causantes de mastitis bovina.

Ramos *et al*, (2019) y Zeghad *et al*, (2013) en sus investigaciones donde utilizaron concentraciones del 30 % sobre *Staphylococcus aureus* obtuvieron diámetros de halos de inhibición de 10 -15 mm en promedio respectivamente, lo que de manera comparativa son valores inferiores a los obtenidos en la presente investigación.

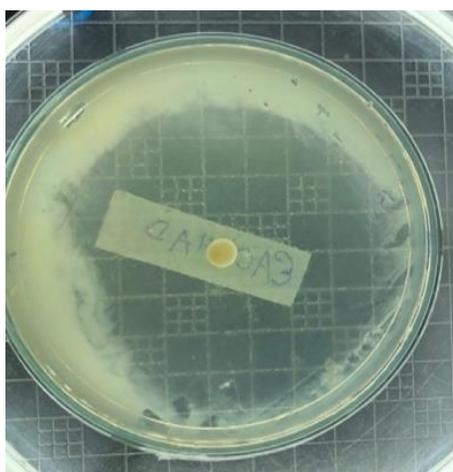


Figura 7 Actividad Antimicrobiana del aceite esencial del tomillo frente a *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina.

Fuente: Chávez (2022).

5.4. Análisis de la susceptibilidad antimicrobiana del antibiótico Eritromicina frente a *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina

La actividad antimicrobiana de la Eritromicina se establece mediante los puntos de corte establecido por el Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI, 2020) y European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2022), donde establecen que 15µg de eritromicina determina las siguientes categorías interpretativas:

Tabla 16 Categorías interpretativas y puntos de corte del diámetro del halo de inhibición de la Eritromicina frente a *Staphylococcus aureus*.

Puntos de Corte	S	I	R
CLSI: VT01S	≥ 23	14 – 22	≤ 13
EUCAST	≥ 21	-	≤ 20

S: Sensible, I: intermedio, R: resistente.

Elaborador por: Chávez (2022).

Tabla 17 Frecuencia y porcentaje del análisis de la susceptibilidad antimicrobiana de la Eritromicina frente a *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina.

Bacteria	S		I		R	
	Fr	%	Fr	%	Fr	%
<i>Staphylococcus aureus</i> "CLSI"	1	5%	19	95 %	0	0 %
<i>Staphylococcus aureus</i> "EUCAST"	6	30%	0	0%	14	70 %

S: Sensible, I: intermedio, R: resistente.

Elaborador por: (Chávez,2022)

Análisis: En la tabla 17. Podemos ver el análisis de la susceptibilidad a la eritromicina de 15µg por parte del *Staphylococcus aureus*, donde según los puntos de corte establecidos por el CLSI, (2020), podemos ver que el 5% (n=1) de los aislados fueron sensible y el 95 % (n=19) tiene una resistencias intermedia, así mismo los puntos de corte establecidos por el EUCAST, (2022), se evidenció que el 30 % (n=6) es sensible y el 70 % (n=14) fueron resistentes a dicho fármaco con la concentración antes mencionada.

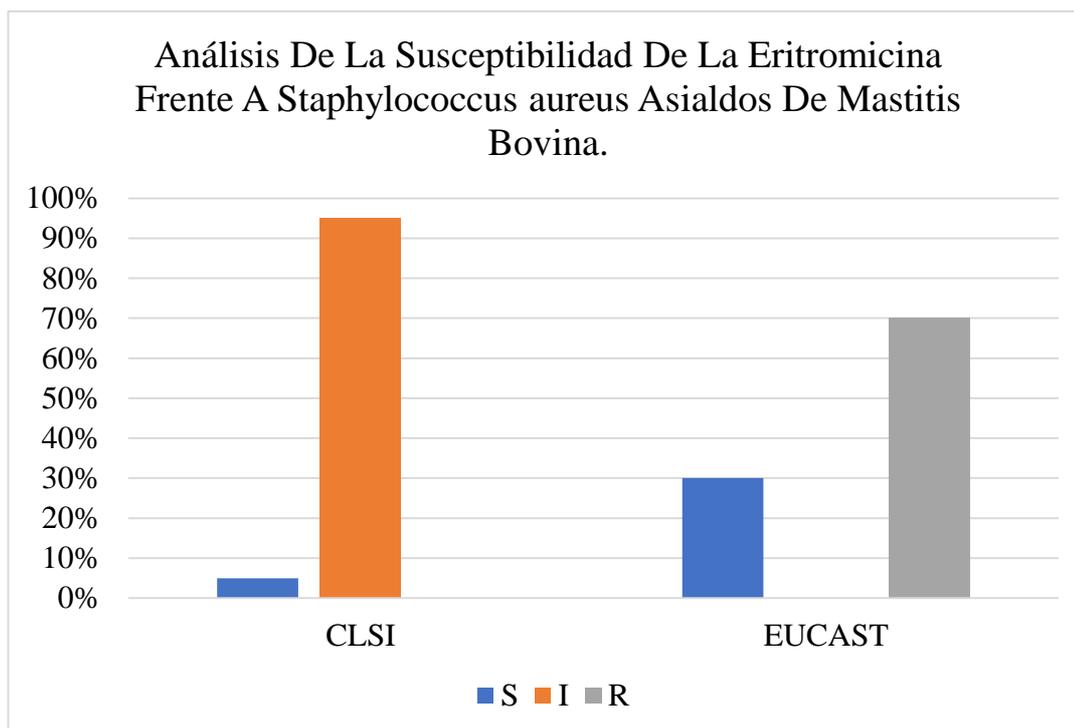


Figura 8 Análisis de la susceptibilidad de la Eritromicina frente a *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina.

Fuente: Chávez (2022)

Discusión: Según Calvinho *et al*, (2002) en su investigación de la susceptibilidad del *Staphylococcus spp* coagulasa positivo de un total de 101 cepas aisladas, la actividad inhibitoria de la Eritromicina a 15µg presentó el 38.6 % (n=39) de sensibilidad, el 17.8% (n=18) de resistencia intermedia y el 2 % (n=2) de resistencias, Comparativamente podemos inferir que según los criterios establecidos por el CLSI en la presente investigación se evidenció un 5% de sensibilidad, un 95% de resistencia intermedia y una resistencia total nula, difiriendo de lo encontrado en la investigación previamente citada.

5.5. Análisis de concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial del Tomillo, frente a *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina

La concentración mínima inhibitoria (CMI), se realizó con el método de difusión disco en placa de Kirby Bauer utilizando de referencia la escala 0.5 de McFarland de *Staphylococcus aureus* causante de mastitis bovina, una vez sembrado el patógeno se impregnaron los discos en blanco con las respectivas concentraciones (5%, 7% y 10 %) del aceite esencial del tomillo para ser cultivados en Müeller Hinton.

Tabla 18 Análisis de varianza (DBCA) de la CMI.

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F. Valor	Pr. > F.
Tratamiento.	2	2660.70	1330.35	5072.24	<.0001**
Bloque	19	102.18	5.378	20.51	<.0001**
Error	38	9.96	0.2622		
Total	59	2772.85			CV: 4.67 %

***: Diferencias estadísticas sumamente significativas; CV: Coeficiente de variación.*

Elaborador por: Chávez (2022)

Análisis: En la tabla 18. podemos ver el análisis de varianza, donde la prueba de Fisher nos indica que; existió un efecto altamente significativo por parte de las repeticiones es decir que los 20 aislados se comportaron de una forma diferente, mientras que, se evidenció un efecto altamente significativo ($p < 0.05$) por parte de los tratamientos, es decir que 5, 7 y 10 % del aceite esencial tuvo un efecto distinto sobre los aislados, con un coeficiente variación del 4.67% expresando confianza en los datos en esta investigación. Y finalmente R^2 de 0.99 confirmando lo antes mencionado.

5.5.1. Análisis de la comparación de las medias con la prueba de Tukey al 5% del efecto antimicrobiano del aceite esencial del tomillo al 5, 7 y 10%

Tabla 19 Comparación de medias de los tratamientos, Tukey a el 5%.

Tratamiento	Media	N	Tukey agrupación.
3 (10 %)	19.60	20	A
2 (7 %)	9.85	20	B
1 (5 %)	3.40	20	C

Elaborador por: Chávez (2022)

Análisis: El análisis de la prueba de Tukey a el 5%, expresó que las medias son estadísticamente diferentes, el mayor promedio fue exhibido por el T3 (10 %) con 19.60 mm de diámetro de halo de inhibición, siguiéndole el T2 (7 %) con una media de 9.85 mm de diámetro de halo de inhibición. Posteriormente el T1 (5%) exhibió

una media de 3.40 mm de diámetro, concluyendo así que la concentración de 7 % del aceite esencial del tomillo fue suficiente para inhibir el crecimiento obteniendo halos con medidas superiores a 8mm de diámetro en los 20 aislados de *Staphylococcus aureus* causantes de mastitis bovina.

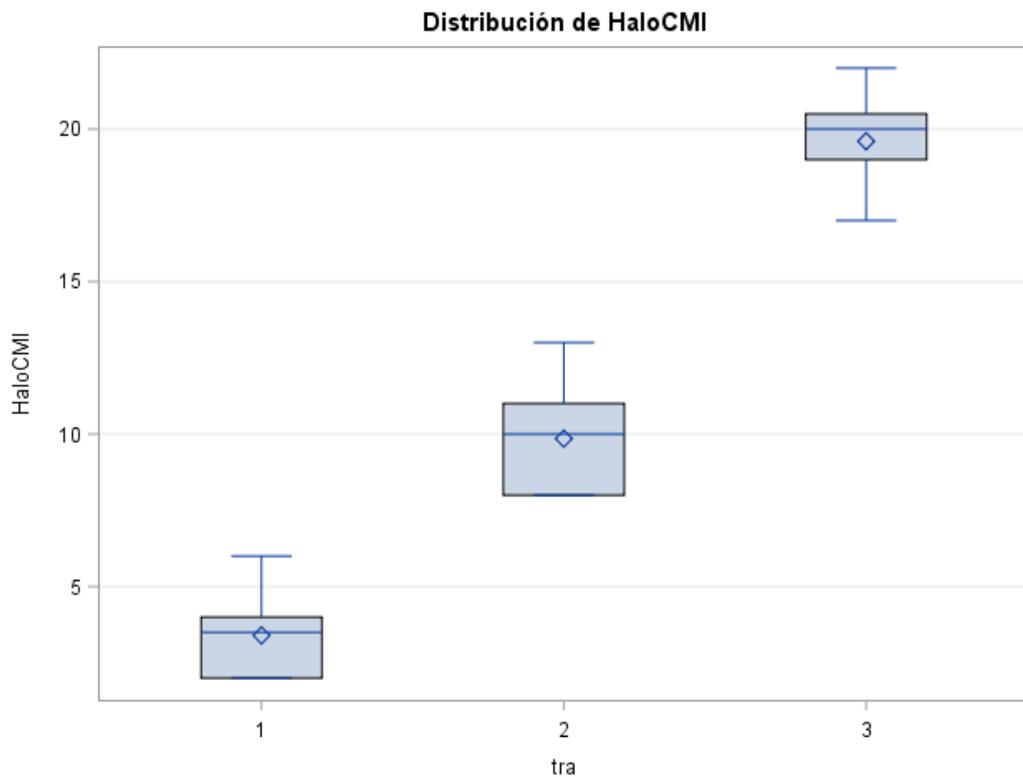


Figura 9. Efecto de los tratamientos sobre el *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina.

Fuente: SAS (2022).

Discusión: Según Montero *et al*, (2018) en su investigación la concentración mínima inhibitoria (CMI) exhibió un efecto inhibitorio marcado a partir de una concentración de 1 % de aceite esencial de tomillo sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC ® BAA-976 ^{TM*}, dicha concentración presentó medias de 12.2 mm de diámetro de halo de inhibición, Comparativamente en la presente investigación al estudiar cepas de tipo silvestre la CMI se observó en 7% del aceite esencial del tomillo, cabe destacar que esta variable esta en dependencia de muchos factores influyentes como la variedad del tomillo, la procedencia de las cepas, entre otras.

5.6. Análisis de la susceptibilidad antimicrobiana de la CMI a las concentraciones del 5, 7 y 10 % del aceite esencial del tomillo

La actividad de antimicrobiana se realizó por el método establecido en la investigación, para ello se midió la sensibilidad según la Tabla 9. donde nos expresa que es sensibles halos mayores a 8 mm de diámetro (+) y nula menor o igual a 8 mm (-), en la siguiente tabla se detalla las escalas de sensibilidad, Duraffourd *et al.* (1897).

Tabla 20 Escala de la susceptibilidad del aceite esencial del tomillo.

No.	Código	T1		T2		T3	
		5%		7%		10%	
1	SA001PI	2	-	8	-	18	++
2	SA004PI	4	-	10	+	19	++
3	SA004PD	4	-	12	+	20	++
4	SAR001PI	6	-	13	+	21	+++
5	SAR002AD	3	-	9	+	19	++
6	SAR003AI	4	-	10	+	20	++
7	SAR004PI	2	-	8	-	18	++
8	SAR004PD	6	-	12	+	21	+++
9	SAR005AD	2	-	8	-	19	++
10	SAZ009PI	2	-	8	-	18	++
11	SAZ010AD	4	-	10	+	20	++
12	SAZ011PD	4	-	11	+	21	+++
13	SAZ018AD	5	-	12	+	22	+++
14	AT001PD	4	-	10	+	20	++
15	AT001AD	3	-	10	+	20	++
16	AT002AI	2	-	8	-	17	++
17	AT002PD	2	-	9	+	19	++
18	AT003AI	4	-	11	+	21	+++
19	AT004PD	3	-	10	+	20	++
20	AT005PI	2	-	8	-	19	++

(-): Actividad nula, (+): Sensible, (++) : Muy sensible, (+++): Sumamente sensible.

Análisis: En la tabla 20 podemos evidenciar la escala de la susceptibilidad de los 20 aislados, donde se resalta con color naranja las cepas que a una concentración del 7 % del aceite esencial presentaron una actividad nula, mientras que se resalta de color amarillo las cepas que son sumamente sensibles al 10 % del aceite esencial del tomillo.

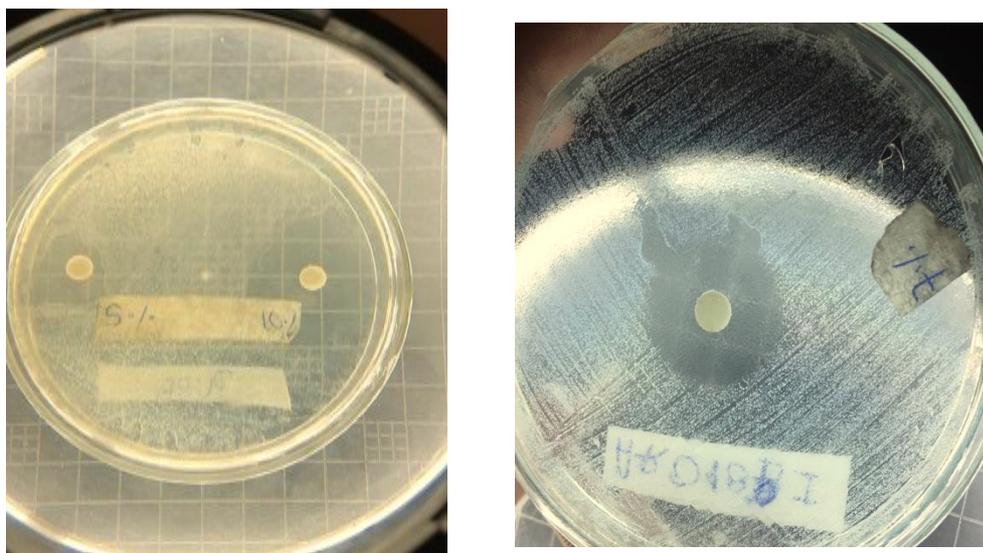


Figura 10 Halos de inhibición de la CMI del aceite esencial del tomillo frente a cepas de *Staphylococcus aureus* causante de mastitis bovina.

Fuente: Chávez (2022).

Tabla 21 Frecuencia y porcentajes de la susceptibilidad de la CMI del aceite esencial del tomillo.

Sensibilidad	T1 (5%)		T2 (7%)		T3 (10%)	
	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%
Nula (-)	20	100	6	30	0	0
Sensible (+)	0	0	14	70	0	0
Muy sensible (++)	0	0	0	0	15	75
Sumamente sensible (+++)	0	0	0	0	5	25
Total	20	100	20	100	20	100

Elaborador por: Chávez (2022).

Análisis: Podemos evidenciar que el tratamiento T1 (5%) presentó el 100% de actividad nula, mientras que el T2 (7%) presentó el 30 % (n=6) de actividad nula y el 70 % (n=14) de los aislados son sensibles a dicha concentración, finalmente el T3 (10%) presentó el 75% (n=15) de los aislados son muy sensibles y el 25 % (n=5) de los aislados son sumamente sensibles. Según Pozzo *et al*, (2011) aceite esencial del *Thymus sp.* el principal compuesto es el timol, ha mostrado ser de interés en el tratamiento de la mastitis bovina, pudiendo reducir la internalización del *Staphylococcus aureus* en células epiteliales mamarias bovinas e inhibir la producción de óxido nítrico.

También Zhengkai *et al*, (2014) evaluó los cambios del *Staphylococcus aureus* en presencia del aceite del tomillo, donde encontraron daños en la membrana citoplasmática que pueden ser ocasionados por la sinergia de los mecanismos de acción de los compuestos que potencializan la actividad antimicrobiana. En la figura 11. podemos ver los porcentajes de sensibilidad de dichas concentraciones del aceite esencial del tomillo frente a *Staphylococcus aureus* causantes de mastitis bovina.

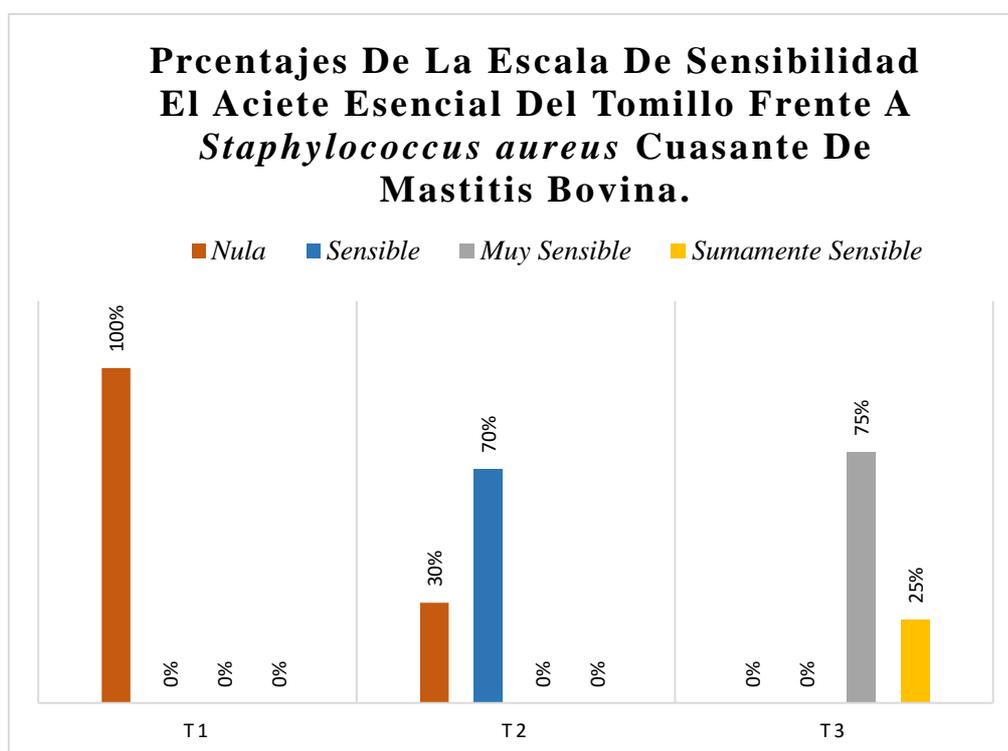


Figura 11 Porcentaje de la escala de sensibilidad del aceite esencial del tomillo frente a *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina.

Elaborado por: Chávez (2022).

CAPITULO VI

6. COMPROBACIÓN DE HIPÓTESIS

Mediante el análisis estadístico realizado sobre los resultados obtenidos en la presente investigación sobre las variables propuestas, para la comprobación de las hipótesis se planteó que;

HO = 75% = 50% = 25% = 8mm

Hi ≠ 75% ≠ 50% ≠ 25 % ≠ 8mm.

Mediante el análisis de varianza del (DBCA), podemos decir que existió un efecto altamente significativo ($p < 0.05$) por parte de los tratamientos, es decir que se acepta la hipótesis alterna y se rechaza la hipótesis nula, la misma que nos expresa que; Existe actividad antimicrobiana del aceite esencial de tomillo (*Thymus zygis*) a las tres concentraciones, frente a *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina con un hola de inhibición superior a 8 mm.

Tabla 20. Análisis de varianza (DBCA) del efecto de las tres concentraciones del aceite esencial del tomillo frente a *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina.

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F. Valor	Pr. > F.
Tratamiento.	3	23343.73	7781.24	499.18	<.0001**
Bloque	19	622.13	32.74	2.10	0.0163*
Error	57	888.512	15.58		
Total	79	24854.38			CV: 8.95%

** : Diferencias estadística altamente significativa; * : Diferencias estadística significativa; CV: Coeficiente de variación.

Elaborador por: Chávez (2022)

CAPITULO VII

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1. CONCLUSIONES

- El aislamiento e identificación se concluyó que; en la finca “Edith” se presentó una tasa de prevalencia del 48.33% de mastitis bovina, de un total de 60 vacas testeadas, 29 animales resultaron positivas al diagnóstico de mastitis, de las cuales, 20 vacas cursaban con dicha patología causada por *Staphylococcus aureus* el que representó el 68.96 %, de los agentes patógenos totales que se lograron identificar, en donde se exhibió que aquellos animales de raza Holstein expresaron el 65.6% (n=19) de casuística, seguido de aquellos animales de raza Jersey los cuales representaron el 24.12% (n=7) de ocurrencia y presentación clínica de la enfermedad, y por ultimo, la menor ocurrencia de la patología antes mencionada se observó en aquellos animales de raza Brown Swiss en donde se apreció el 10,28% (n=3) de casos clínicos.
- En el análisis de la actividad antimicrobiana del aceite esencial del tomillo se concluyó que; el mejor promedio lo presentó el T3:75% con una media de 64.45 mm, siguiéndoles el T2:50% con una media de 54.95 mm y finalmente el menor promedio lo presentó el T1:25% con una media de 37.05 mm, versus a el T4: Eritromicina 15µg que presentó una media de 19.90 mm.
- En el análisis de la susceptibilidad antimicrobiana de la Eritromicina frente a *Staphylococcus aureus* causante de mastitis bovina, según los puntos de corte establecidos por CLSI, el 95% de los aislados exhibieron resistencia intermedia y solo el 5% demostraron ser sensibles, mientras que según la guía EUCAST los puntos de corte para aislados de tipo salvaje demostró que el 70% de los aislados son resistentes a dicha concentración.
- La concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial para *Staphylococcus aureus* causante de mastitis bovina se establece en una concentración del 7 % de aceite esencial del tomillo, ya que presentó un promedio de 9.85 mm de diámetro del halo de inhibición, superando la escala de la sensibilidad nula (-) < 8 mm.

7.2. RECOMENDACIONES

- Mejorar los protocolos de sanitización de la máquina de ordeño operarios, lotización de animales, reajustar la rutina de ordeño y señalar los animales portadores de *Staphylococcus aureus* ya que es de carácter contagioso En la finca “Edith”.
- Realizar un estudio de la actividad antimicrobiana del aceite esencial con la flora normal de la ubre y pezón.
- Usar el Aceite esencial del tomillo al 10 % ya que presentó escalas de sensibilidad desde muy sensibles hasta sumamente sensible, garantizando mayor efectividad contra cepas del género *Staphylococcus aureus* causantes de mastitis bovina.
- Establecer una propuesta para futuros estudios del uso asociativo de aceite esencial del tomillo con fármacos antimicrobianos y otros asociativos para disminuir el efecto de resistencia a los antibióticos.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, O., Castro, A., Roque, M., & Félix, L. (2000). Composición Química Del Aceite Esencial Del Thymus Vulgaris "Tomillo" Por Cromatografía De Gases-Espectrómetro De Masa Gc/Ms Y Análisis De Su Actividad Antimicrobiana. *Ciencia E Investigación*, 3(2): pp: 69 – 78, DOI: <https://doi.org/10.15381/ci.v3i2.5326>.
- Agexport, A. (2020). Tomillo, Thymus Vulgaris. *Agexport*, 1(1), pp: 6 – 9.
- Agrocalidad. (2015). Agrocalidad. Obtenido De <Http://Www.Agrocalidad.Gob.Ec/Sanidad-Animal/>.
- Andrade, C., & Sánchez, A. (2018). Estudio Clínico, Microbiológico Y Estimación Económica De Mastitis Bovina, En La Cooperativa De Producción Agropecuaria "El Salinerito", Provincia Bolívar - Ecuador. *Trabajo De Titulación. Universidad De Las Fuerzas Armadas*, Guaranda, pp: 6 – 15, Obtenido de: [https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/14267/1/T-IASA% 20I-005437Pdf](https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/14267/1/T-IASA%20I-005437Pdf).
- Angles, E. (2018). Uso Racional De Antimicrobianos Y Resistencia Bacteriana ¿Hacia Dónde Vamos? *Rev. Med. Hered.*, 29(1), pp: 3 - 4
- Aranguren Parra, A., & Medina, C. (2012). Papel De La Respuesta Inmune Innata Y El Estrés Oxidativo En La Mastitis Bovina. *Boletín Médico De Postgrado*. Vol. 28 N° 3, pp: 3-6.
- Baser, H., & Buchbauer, G. (2015). Handbook Of Essential Oils - *Science, Technology And Applications*. Boca Raton: Prensa Crc, pp: 353 - 540 DOI: <https://doi.org/10.1201/9781420063165>.
- Boeris, G. Meglia, & G. Genero, Glándula Mamaria Y Lactación (Págs. 13-23). Santa Rosa, La Pampa: *Edunlpam*, DOI: <https://repo.unlpam.edu.ar/handle/unlpam/63>.
- Bonifaz, N., & Conlago, F. (2016). Prevalencia E Incidencia De Mastitis Bovina Mediante La Prueba De California Mastitis Test Con Identificación Del

Agente Etiológico, En Paquiestancia, Ecuador. *La Granja*, pp: 43 - 52, DOI: <https://www.redalyc.org/journal/4760/476051632003/476051632003.pdf>.

- Boua, G., Fernández, A., García, C., Sáez, J., & Valdezate, S. (2011). Métodos De Identificación Bacteriana En El Laboratorio De Microbiología. *Elsevier*, pp: 601-602.
- Bradford, S. (2010). *Medicina Interna De Grandes Animales*. Barcelona España: *Elsevier*.
- Buldain, D. (2021). “Evaluación De Combinaciones Antimicrobianas/Aceite Esencial De Melaleuca Armillaris Sm. Como Alternativas Terapéuticas Para El Tratamiento De Mastitis Bovina Por Staphylococcus Aureus”. *Universidad Nacional De La Plata Facultad De Ciencias Veterinarias*, pp: 1 - 50, URL: <https://doi.org/10.35537/10915/117394>.
- Calderón, A., & Rodriguez, V. (2008). Prevalenciademastitisbovinaysu Etiología Infecciosa En Sistemas Especializados En Producción De Leche En El Altiplano Cundiboyacense (Colombia). *Revista Colombiana De Ciencias Agropecuarias*, pp: 582 – 589, URL: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-06902008000400006.
- Calvinho, F.G., T., W.R., W., V.R., C., V.E., N., & I.A, I. (2002). Susceptibilidad A Antimicrobianos De Cepas De Estafilococos Coagulasa Positivos Aisladas De Mastitis Bovina En La Cuenca Lechera Central De La Argentina. *Producción Animal Sanidad*.
- Calvinho. (2005). Estreptococos Ambientales Causantes De Mastitis Bovina. *Jornada Técnica De Actualización En Mastitis*, URL: http://rafaela.inta.gov.ar/Publicaciones/documentos/anuarios/anuario2002/a2002_p47.htm.
- Cano, C. (2016). Nuevas Alternativas En El Diagnostico Clínico De Campo Y En El Tratamiento De Mastitis. *Voletín Tecnico Virtual*, .
- Cecilia M. Camussone, L. F. (Febrero-Abril De 2013). Factores De Virulencia De Staphylococcus Aureus Asociados Con Infecciones Mamarias En

Bovinos: Relevancia Y Rol Como Agentes Inmunógenos. *Revista Argentina De Microbiología*, 45(2), pp: 119-130, URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754113700117>.

- Clsi. (2020). Estándares De Rendimiento Para Pruebas De Susceptibilidad De Dilución Y Disco Antimicrobiano Para Bacterias Aisladas De Animales. *Clsi Vet01s*.
- Colak, A., Polat, B., Okumus, Z., Kaya, M., Yanmaz, Y., & Hayirli, A. (2008). Short Communication: Early Detection Of Mastitis Using Infrared Thermography In Dairy Cows. *Journal Dairy Science*, pp: 4244, URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002203020870972X>.
- Cuzco, G. (2015). Determinación De La Sensibilidad De Cmt Para El Diagnóstico De Mastitis Y Antibiograma En La Hacienda “El Boliche. Ecuador: *Técnica De Ambato*, pp: 7 – 40, URL: <http://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/18364>.
- Delgado, D. (2020). Fitoterapia En La Acuicultura, Una Mirada Global Desde La Zootecnia. Trabajo De Titulación. *Universidad Nacional Abierta Y A Distancia - Unad, Boyacá*, pp: 15-34 , URL: <https://repository.unad.edu.co/handle/10596/37274>.
- Duraffourd, C., J., L., & L., D. H. (1897). *Cuadernos De Fitoterapia Clínica*. Primera Ed. (Masson, Ed.) Barcelona, España, pp: 14.
- Echeverry, D., & Ruiz Cortés, Z. T. (2015). Expresión De Receptores De Leptina En Glándula Mamaria De Bovinos Lactantes Y No Lactantes. En D. Echeverry, & Z. T. Ruiz Cortés, Expresión De Receptores De Leptina En Glándula Mamaria De Bovinos Lactantes Y No Lactantes (Págs. 171 - 172). Medellín - Colombia: Grupo *Biogénesis*.
- Enrique Ruiz Bordes. (2015). Epidemiología Molecular Y Resistencia A Los Antimicrobianos En Staphylococcus Spp. En Centros Sanitarios De Mallorca Durante Los Últimos 15 Años. *Universitas Balarica* , pp: 38. URI: <http://hdl.handle.net/11201/149180>.

- Erkmen, O. (2021). Laboratory Practices In Microbiology. San Diego, California , Usa: *Elsevier*, pp: 10.
- Eucast. (2022). Erythromycin/Staphylococcus Aureus. International Zone Diameter Distribution-Reference Database.
- Fernández Bolaños, O. F. (2012). Mastitis Bovina: Generalidades Y Métodos De Diagnóstico. Usa, Dallas: *Revista Electrónica De Veterinaria*, pp: 1-11, URL: <https://www.produccion-animal.com.ar/>.
- García Estrella, G. R. (2014). Características Generales Del Staphylococcus Aureus. *Rev. Latinoamericana De Patología Clínica Y Medicas De Laboratorio*, 61(1), pp: 28 - 40.
- García Vilanova, C., Galbis Caravajal, J., Sabater, M., Fuster, D., F., V. F., Bruna, E., & Fernández., Z. (2016). Etiología De La Mastitis Crónica: Propuesta De Secuencia. *Elsevier*, pp: 1-2, URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0210573X16300648>.
- García, M. (2016). Diente De León - Una Maleza Alternativa Con Múltiples Beneficios Para La Salud. Trabajo De Titulación. *Universidad Fasta*, pp: 4-7.
- Grauter, W., & Rodriguez. (2012). Código Internacional De Nomenclatura. Melbourne: *Regnum Vegetabile*, pp: 1-6.
- Guio Ávila, J. I., Cruz Rueda, Á. R., & Pérez Morón, J. E. (2016). Mastitis Granulomatosa: Presentación Clínica, Imagenológica E Histológica. Serie De Casos. *Elsevier*, pp: 236, URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0121737216300851>.
- Guzñay, M. (2016). Estudio Integral De La Mastitis Bovina Para Controlar Su Incidencia En La Comunidad San Pedro De Iguazo.”. Riobamba, Chimborazo, Ecuador: *Espch*, pp: 45-67.
- Hammer, K., Carson, C., & Riley, T. (1999). Antimicrobial Activity Of Essential Oils And Other Plant Extracts. *Journal Of Applied Microbiology*, 86, pp: 985-990, DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00780.x>.

- Hernández Reyes, J., & Bedolla Cedeño, J. L. (2008). Importancia Del Conteo De Células Somáticas En La Calidad De La Leche . *Redvet*, pp:12-16, URL: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>.
- Hernández, R. J., & Bedolla, C. J. (2017). Importancia Del Conteo De Células Somáticas En La Calidad De La Leche. *Redvet*, pp: 12-16, URL: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>.
- Holdridge, L. (1971). Sistema De Zonas De Vida . En L. Holdridge.
- Hyldgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. (2012). Essential Oils In Food Preservation: Mode Of Action, Synergies, And Interactions With Food Matrix Components. *Frontiers In Microbiology*, pp: 1-24, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00012>.
- Lasa, J. L. (Mayo-Agosto De 2005). Bacterial Biofilms And Infection. *Scielo*, 28(2).
- Instituto Nacional De Meteorología E Hidrología. (2021). Instituto Nacional De Meteorología E Hidrología. Obtenido De Inamhi: <https://Www.Inamhi.Gob.Ec/>
- Jácome, M. (2022). Prevalencia De Agentes Bacterianos Resistentes A Antibióticos En Mastitis Bovina De Ganaderías Lecheras Del Cantón Antonio Ante. *Universidad Técnica Del Norte*, pp:30 - 68 , URL: <http://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/11957>.
- Jagielski, T., Roeske, K., Bakula, Z., Piech, T., Wlazlo, L., Bochniarz, M., . . . Krukowski, H. (2019). A Survey On The Incidence Of Prototheca Mastitis In Dairy Herds In Lublin Province, *Poland. Elsevier*, pp: 619 – 628, URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030218310701>.
- Jiménez Velásquez, L., Torres Higuera, L., Parra Arango, J., Rodríguez Bautista, J., García Castro, F., & Patiño Burbano, R. (2020). Perfil De Resistencia Antimicrobiana En Aislamientos De Staphylococcus Spp. Obtenidos De Leche Bovina En Colombia. *Elsevier*, 121-123.

- Jingao., Liu, C., Wang, Y., Hanli., Ming, W., Wu, Y., . . . Qi, Z. (2020). Impacto De La Levadura Y Las Bacterias Del Ácido Láctico En La Mastitis Y La Composición De La Microbiota De La Leche En Vacas Lecheras. *Amb Expresso*, 10(22).
- Katzung, B. G. (2017). *Basic & Clinical Pharmacology, Antimycobacterial Drugs*. (Vol. 47). México, D. F.: Mcgraw-Hill.
- Lehew, & Dechow, C. (2021). Relationship Of Daily Total Somatic Cell Output With Somatic Cell Concentration And Clinical Mastitis. *Elsevier*, pp: 196-199, URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666910221000569>.
- Linzell, J., & Peaker, M. (1975). Efficacy Of The Measurement Of The Electrical Conductivity Of Milk For The Detection Of Subclinical Mastitis In Cows: Detection Of Infected Cows At A Single Visit. *Elsevier*, pp: 447-448, URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0007193517352405>.
- Luengo., L. (2006). Tomillo Propiedades Farmacológicas E Indicaciones Terapéuticas. *Offarm*, 25(1).
- Maestro Durána, M., García Salinero, C., Almagro Sanchez, M., Santiago Freijanes, M. P., Varela Romero, J. R., & Mosquera Oses, J. J. (2021). Avance En El Tratamiento De La Mastitis Granulomatosa Idiopática: Utilidad De Micofenolato De Mofetilo. *Elsevier*, pp: 10 – 15, URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0214158221000347>.
- Magap. (2015). Ministerio De Agricultura, Ganadería, Acuacultura Y Pesca.
- Maldonado, F., Quilapanta, E., Santos, C., & Mena, L. (2022). Diagnosis Of Subclinical Mastitis Using Three Methods For Control And Treatment In Holstein Dairy Cattle. *Ciencias De La Salud*, 8(1), pp: 773-790, URL: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8383375>.
- Martínez, L., Nieto, M. V., Léndez, P. A., Barone, L., Pérez, S. E., Dolcini, G., & Ceriani, M. C. (2018). Stable Infection Of A Bovine Mammary Epithelial

Cell Line (Mac-T) With Bovine Leukemia Virus (Blv). *Elsevier*, pp: 11-16, URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168170218302508>.

- Martínez, P. (2015). Evaluación De Dos Dosis De Ozono En El Tratamiento De Mastitis Bovina. Trabajo De Titulación. *Universidad Central Del Ecuador*, Quito, URL: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/6968>.
- Montero, M., Mira, J., Avilés, D., Pazmiño, P., & Erazo, R. (2018). Eficacia Antimicrobiana Del Aceite Esencial Del Tomillo (*Thymus Vulgaris*) Sobre Una Cepa De *Staphylococcus Aureus* (Vol. 29). Ambato, Tungurahua, Ecuador *Scielo*, pp: 588 - 593 DOI: <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v29i2.14520>.
- Montes, M. (2017). Efecto Genotóxico In Vitro Del Látex De Plantas Medicinales De Uso Dérmico *Argemone Mexicana* L. “Cardo Santo” Y *Taraxacum Officinale* “Diente De León”. Trabajo De Titulación. Universidad Nacional De San Cristóbal De Huamanga, Ayacucho, pp: , URL: <http://repositorio.unsch.edu.pe/handle/UNSCH/4165>.
- Muñoz, M. C., Agudelo, E. J., & Maldonado Estrada, J. (2007). Relación Entre El Recuento De Células Somáticas Individual O En Tanque De Leche Y La Prueba Cmt En Dos Fincas Lecheras Del Departamento De Antioquia (Colombia). *Revista Colombiana De Ciencias Pecuarias*.
- O’neill, J. (2016). Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report And Recommendations. Wellcome Trust Y Hm Government, 106.
- Otero, F. C. (1991). Mecanismos De Defensa De La Glándula Mamaria Bovina En La Fase De Involución Y Lactancia. México, Toluca: Inifap, Sarh.
- Ouweltjes, W., Beerda, Windig, J., M.Pl, C., & R.F., V. (2007). Effects Of Management And Genetics On Udder Health And Milk Composition In Dairy Cows. *Elsevier*, pp:229 – 238, URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030207726243>.
- Paredes, M. (2019). Evaluación De La Sensibilidad De La Ubre Y La Pared Abdominal En Vacas Lecheras Después De Parto Por Cesárea Por Laparotomía En El Flanco Izquierdo. *Revista De Medicina Veterinaria*, 1(38), pp: 73 – 90, DOI: <https://doi.org/10.19052/mv.vol1.iss38.7>.

- Parra, A. A., Ortega, A. L., Mendoza, C., & Delgado, N. (2009). Efecto De La Mastitis Clínica Y Subclínica Sobre La Concentración Plasmática De Metabolitos, Proteínas Totales Y Albúmina En Hembras Bovinas. *Scielo*, pp: 57 – 64, URL: http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0798-72692009000100007&script=sci_arttext.
- Pascal, R., Florence, G., Germon, P., & Foucras, G. (2021). Invited Review: A Critical Appraisal Of Mastitis Vaccines For Dairy Cows. *Journal Of Dairy Science*.
- Pellegrino, M., Frola, I., Odierno, L., & Bogni, C. (2011). Mastitis Bovina: Resistencia A Antibióticos De Cepas De Staphylococcus Aureus Asiladas De Leche. *Redvet*, 12(7), pp: 1- 14.
- Pereyra, E., Dallard, B., & Calvino, L. F. (2014). Aspectos De La Respuesta Inmune Innata En Las Infecciones Intramamarias Causadas Por Staphylococcus Aureus En Bovinos. *Elsevier Doyma*, pp: 364-366, URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754114700963>.
- Pérez, L., Andrade, S., Levario, A., Cantú, E., Sánchez, D., Nevárez, G., & Loya, M. (2019). Evaluación De La Propiedad Antimicrobiana Y Antiadherente Del Sulfato De Cobre (Cu₂so₄) Y Monoterpenos Sobre Lactobacillus Acidophilus Y Streptococcus Mutans. *Acta Universitaria - Multidisciplinary Scientific Journal*, 10.
- Pharmacopeia, U. S. (2008). Tests For Specified Microorganismo. *Microbiological Examination Of Nonsteril Products*, 31.
- Pizzorno, J., & Murray, M. (2020). *Textbook Of Natural Medicine* (Quinta Ed.). St. Louis, Missouri: *Elsevier*.
- Posso, M., Santurio, D., Rossatto, L., Vargas, A., & Alves, S. (2011). Activity Of Essential Oils From Spices Against Staphylococcus Spp. Isolated From Bovine Mastitis. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 63(5), pp: 1229 – 1232, DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-09352011000500026>.

- Quevedo, W. (2018). Recuento De Celulas Somaticas (Rsc), Como Indicador En La Resistencia De La Mastitis Bovina. *Rev. Cien. Tec. In.*, 16(17), pp: 1001 – 1012.
- Ramírez Heredia, R. C. (2022). Actividad Antimicrobiana In Vitro De La Crema Elaborada De La Combinación Del Aceite Esencial De *Syzygium Aromaticum* (Clavo De Olor) Y Extracto Etanolico De *Thymus Vulgaris* L.(Tomillo) Frente A Cepas De *Escherichia Coli* Y *Staphylococcus Aureus* Y *Candida* A, pp: 20 – 41, URL: <http://repositorio.uigv.edu.pe/handle/20.500.11818/5814>.
- Ramos, M., & Hernández, M. (2019). Actividad Antibacteriana In Vitro Del Aceite Esencial De *Thymus Vulgaris* “Tomillo” Frente A Las Cepas De *Staphylococcus Aureus* Y *Pseudomonas Aeruginosa*. *Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo*, URL: <http://repositorio.upagu.edu.pe/handle/UPAGU/943>.
- Rampone, H., Bogni, C., Giraudo, J., & Calzolari, A. (1993). Identificación De Estafilococos De Leche Bovina En Argentina. *Europe PMC*, pp: 537 – 538, DOI: 10.1016/s0934-8840(11)80426-3.
- Requelme, N., & Bonifaz, N. (2011). Buenas Prácticas De Ordeño Y La Calidad Hiegiénica De La Leche En El Ecuador. *La Granja*, 45-46.
- Reyes, H., & Bedolla, C. (2018). Importancia Del Conteo De Células Somáticas En La Calidad De La Leche. *Redvet*, pp: 1 – 34.
- Reyes, H., & J, B. C. (2018). Importancia Del Conteo De Células Somáticas En La Calidad De La Leche. *Redvet*.
- Rodríguez, C., Zárate, A., & Sánchez, L. (2017). Actividad Antimicrobiana De Cuatro Variedades De Plantas Frente A Patógenos De Importancia Clínica En Colombia. *Scielo*, pp: 119-129, URL: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702017000100119.
- Rodríguez, E. (2011). Uso De Agentes Antimicrobianos Naturales En La Conservación De Frutas Y Hortalizas. *Ra Ximhai*, pp: 154, URL: <http://www.uaim.edu.mx/webraximhai/Ej19articulosPDF/14USO%20DE%20AG>

ENTES%20ANTIMICROBIANOS%20%20NATURALES%20EN%20LA%20%
20CONSERVACION_Elvia%20Rguez.pdf.

- Rojas, C. (2018). Eficacia De La Ozonoterapia En El Control De La Mastitis Bovina . Ascistegan, pp: 1 -11, URL: https://www.researchgate.net/profile/Carlos-Eduardo-Torrico/publication/328394149_Eficacia_de_la_Ozonoterapia_en_el_Control_de_Mastitis_Bovina/links/5bca6d55299bf17a1c619949/Eficacia-de-la-Ozonoterapia-en-el-Control-de-Mastitis-Bovina.pdf.
- Salcido, N., Villareal, J., Díaz, M. A., & Patricia., G. P. (2015). Evaluación De La Actividad De Los Agentes Antimicrobianos Ante El Desafío De La Resistencia Bacteriana. *Scielo*, Vol.46 (No. 2), pp: 7 – 16, URL: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S187001952015000200007&script=sci_arttext.
- Sánchez, Y., & Marchán, A. (2018). Determinación De Hemólisis En Cepas De Staphylococcus Spp Causantes De Mastitis Bovina. *Revista Investigación En Salud Universidad De Boyacá*, 5(1), pp: 15-30.
- Sciences National Academy Of Agricultural, N. (2013). Mastitis Management In Dairy *Animals*. New Delhi.
- Seija, V. (2018). Etiopatogenia Microbiológica. En D. D. Higiene, Temas De Bacteriología y Virología Médica (Págs. 257-259). Montevideo: Facultad De Medicina, Instituto De Higiene.
- Sharma, N. (2007). Enfoque Alternativo Para Controlar La Infección Intramamaria En Vacas Lecheras. *Asian Journal Of Animal And Veterinary Advances*, pp: 50 - 62.
- Singh, K., Chandra, M., Kaur, G., Narang, D., & Kumar Gupta, D. (2018). Prevalence And Antibiotic Resistance Pattern Among The Mastitis Causing Microorganisms. *Open Journal Of Veterinary Medicine*, pp: 54-64, DOI: 10.4236/ojvm.2018.84007.

- Soriano, R. (2022). Efectividad Antibacteriana In Vitro Del Thymus Vulgaris Frente A Cepas De Escherichia Coli Y Staphylococcus Aureus: Revisión Sistemática. pp: 1-24, URL: <https://hdl.handle.net/20.500.12692/87651>.
- Spanamberg, A., Wunder, E., Brayer, D., Argenta, J., Cavallini, E., & Laerte Ferreiro, P. (2008). Diversity Of Yeasts From Bovine Mastitis In Southern Brazil. *Elsevier*, pp: 154, URL: <https://www.reviberoammicol.com/2008-25/154156.pdf>.
- Srivastava K, K. A. (2015). Mastitis In Dairy Animals. Azadpur, Delhi-110033 (India): *Satish Serial Publishing House*.
- Suarez, I. (2007). “Evaluación De Dos Tratamientos Alternativos Para La Mastitis Subclínica En Vacas Utilizando Ozono” *Fcp-Espoch. Riobamba, Chimborazo, Ecuador: Fcp-Espoch*.
- Swinkels, J., Leach, K., Breen, J., Payne, B., White, V., Green, M., & Bradley, A. (2020). Randomized Controlled Field Trial Comparing Quarter And Cow Level Selective Dry Cow Treatment Using The California Mastitis Test. *Elsevier*, pp: 9063-9067, URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030221005567>.
- Tettey, C; Ocloo, A; Nagajyothi, P; Lee, K. (2014). An In Vitro Analysis Of Antiproliferative And Antimicrobial Activities Of Solvent Fractions Of Taraxacum Officinale (Dandelion) Leaf. *Scielo*, pp: 42-44, URL: <http://ugspace.ug.edu.gh/handle/123456789/25603>.
- Tettey, C., Ocloo, A., Nagajyothi, P., & Lee, K. (2014). An In Vitro Analysis Of Antiproliferative And Antimicrobial Activities Of Solvent Fractions Of Taraxacum Officinale (Dandelion) Leaf. *Journal Of Applied Pharmaceutical Science*, (4), pp: 44.
- Tolosa, T., Verbeke, J., Piepers, S., Supré, K., & S., D. V. (2013). Risk Factors Associated With Subclinical Mastitis As Detected By California Mastitis Test In Smallholder Dairy Farms In Jimma, Ethiopia Using Multilevel Modelling. *Elsevier*, pp: 70-72.
- Vidales, C. C. (2017). Association Of Birth Order And Racial Component With The Prevalence Of Clinical Mastitis In A Specialized Dairy Herd Located In

The High Tropics Of Colombia. *Rev. Med. Vet.*, 1(34), pp: 23 – 30, URL: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S012293542017000200023&script=sci_abstract&tlng=en.

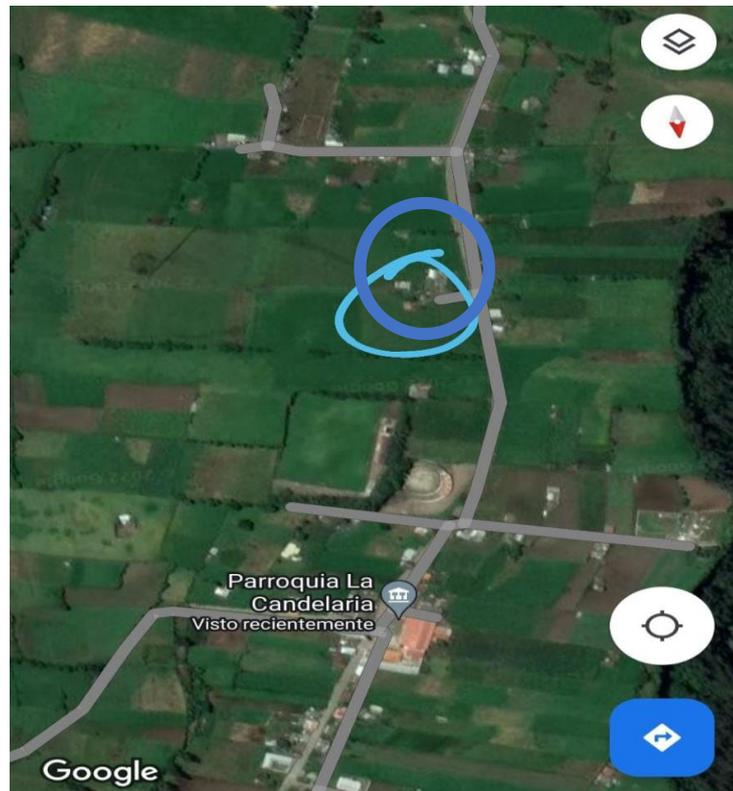
- Viguier, C., Arora, S., Niamh, G., Welbeck, K., & O'kennedy, R. (2009). Mastitis Detection: Current Trends And Future Perspectives. *Elsevier*, pp: 485-493.
- Viguier, Carolina; Arora, Sushrut; Niamh, Gilmartin; Welbeck, Katherine; O'kennedy, Richard. (2009). Detección De Mastitis: Tendencias Actuales Y Perspectivas De Futuro. *Elsevier*, 27: pp: 486-493.
- Wolter, W., Castañeda, V., Kloppert, B., & Zschoeck, M. (2019). La Mastitis Bovina. Mexico: Instituto Estatal De Investigaciones De Hesse. Universidad De Guadalajara, pp: 34 - 56.
- World Bank Group. (2017). Drug-Resistant Infections: A Threat To Our Economic Future. World Bank Group, pp: 28-29.
- Zambrano, W. J., & Marques, A. D. (2008). Evaluación De La Glándula Mamaria Y Composición Química De La Leche En Vacas Primíparas Mestizas Lecheras En El Parto, Hasta El Quinto Mes De La Lactación. *Scielo*, pp: 562 – 569, URL: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592008000500006.
- Zeghad, N., & Merghem, R. (2013). Antioxidant And Antibacterial Activities Of Thymus Vulgaris. *Medicinal And Aromatic Plant Research Journal*, 1(1), pp: 5-11, URL: <http://www.sciencewebpublishing.net/maprj/archive/2013/September/pdf/Nadia%20and%20Rachid.pdf>.
- Zhengkal, W., Ershun, Z., Changming, G., Yunhe, F., & Yuqlang, Y. (2014). Thymol Inhibits Staphylococcus Aureus Internalization Into Bovine Mammary Epithelial Cells By Inhibiting Nf-Kb Activation. *Microbial Pathogenesis*, 71(72), pp: 15-19, URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0882401014000084>.

ANEXOS

Anexo 1. Lugar de la experimentación



Ubicación del laboratorio general de la facultad de Ciencias Agropecuarias Recursos Naturales y del Ambiente.



Ubicación de la finca "Edith", donde se realizó el testeo de las vacas positivas a mastitis bovina.

Anexo 2. Ficha de certificación del aceite esencial del Tomillo (*Thymus zygis*) de la empresa Aromalab.

	CERTIFICADO DE ANÁLISIS		Código:	FCOA
			Versión:	001
			Fecha:	26/07/19
			Página:	1 de 1

Nombre del producto	Tomillo NI 8575	Grupo	Aceite
Lote	84280	N° CAS	85085-75-2
Fecha de elaboración	21/10/2021	INCI	<i>Thymus zygis</i> oil
Fecha de caducidad	21/4/2023	Origen	España

Control de calidad del producto terminado de acuerdo a las especificaciones aprobadas:

Análisis Físico-Químico

Parámetro	Método de análisis	Fecha de análisis	Especificación (criterio de aceptación)		Resultado	A: Aceptado R: Rechazado NE: No Evaluado
			Mínimo	Máximo		
<i>Densidad</i>	Densímetro @20°C g.cm-3	2/3/2022	0,890	0,950	0,920	A
<i>Ph</i>	Potenciómetro @20°C	2/3/2022	3,440	3,500	3,470	A
<i>Grados Alcohólicos</i>	Alcoholímetro @20°C	2/3/2022	56,970	57,030	57,000	A
<i>Índice de refracción</i>	Refractómetro @20°C	2/3/2022	1,471	1,531	1,501	A

Análisis Organoléptico

Parámetro	Método de análisis	Fecha de análisis	Especificación (criterio de aceptación)	Resultado	A: Aceptado R: Rechazado NE: No Evaluado
<i>Estado físico @20 C</i>	Sensorial- Visual	2/3/2022	Líquido	Líquido	A
<i>Color</i>	Sensorial- Visual	2/3/2022	Característico	Característico	A
<i>Olor</i>	Sensorial- Visual	2/3/2022	Característico	Característico	A
<i>Solubilidad en agua</i>	Sensorial- Visual	2/3/2022	No	No	A
<i>Solubilidad en aceite</i>	Sensorial- Visual	2/3/2022	Si	Si	A

Fecha de emisión 2/3/2022
Certificado por Israel Escudero
 Dpto. Control de Calidad

Juan Pablo Barrezuela N76-59 y Tadeo Benitez. Quito – Ecuador.

Anexo 3. Base de datos y Resultados de la investigación.

Anexo 3.1. Análisis de la actividad antimicrobiana de los tratamientos propuestos.

Análisis de la actividad antimicrobiana.					
No.	Código	T1	T2	T3	T4
		25%	50%	75%	15µg Estreptomicina
1	SA001PI	34	46	62	18
2	SA004PI	28	50	60	20
3	SA004PD	36	52	64	22
4	SAR001PI	33	56	50	25
5	SAR002AD	35	50	60	19
6	SAR003AI	38	50	69	17
7	SAR004PI	40	48	65	18
8	SAR004PD	30	60	63	19
9	SAR005AD	37	55	65	22
10	SAZ009PI	35	60	62	19
11	SAZ010AD	40	55	61	21
12	SAZ010AD	41	53	67	20
13	SAZ18AD	40	50	59	18
14	AT001PD	40	56	68	20
15	AT002AI	37	54	67	20
16	AT001PD	36	55	60	21
17	AT002PD	39	63	75	22
18	AT003AI	35	61	73	18
19	AT004PD	42	65	70	19
20	AT005PI	45	60	69	20

Anexo 3.2. Análisis de la susceptibilidad antimicrobiana de la Eritromicina.

Análisis de la susceptibilidad antimicrobiana.		
T4		
15µg Estreptomicina	CLSI	EUCAST
18	I	R
20	I	R
22	I	S
25	S	S
19	I	R
17	I	R
18	I	R
19	I	R
22	I	S
19	I	R
21	I	S
20	I	R
18	I	R
20	I	R
20	I	R
21	I	S
22	I	S
18	I	R
19	I	R
20	I	R

Anexo 3.3. Resultados de la actividad de la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial del tomillo.

Concentración mínima inhibitoria.				
No.	Código	T1	T2	T3
		5%	7%	10%
1	SA001PI	2	8	18
2	SA004PI	4	10	19
3	SA004PD	4	12	20
4	SAR001PI	6	13	21
5	SAR002AD	3	9	19
6	SAR003AI	4	10	20
7	SAR004PI	2	8	18
8	SAR004PD	6	12	21
9	SAR005AD	2	8	19
10	SAZ009PI	2	8	18
11	SAZ010AD	4	10	20
12	SAZ011PD	4	11	21
13	SAZ18AD	5	12	22
14	AT001PD	4	10	20
15	AT002AI	3	10	20
16	AT001PD	2	8	17
17	AT002PD	2	9	19
18	AT003AI	4	11	21
19	AT004PD	3	10	20
20	AT005PI	2	8	19

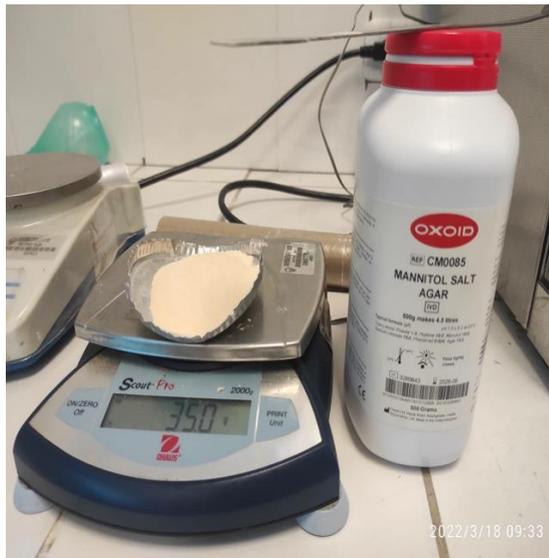
Anexo 4. Fotografías de la investigación.



Fotografía 1. *Realización del CMT.*



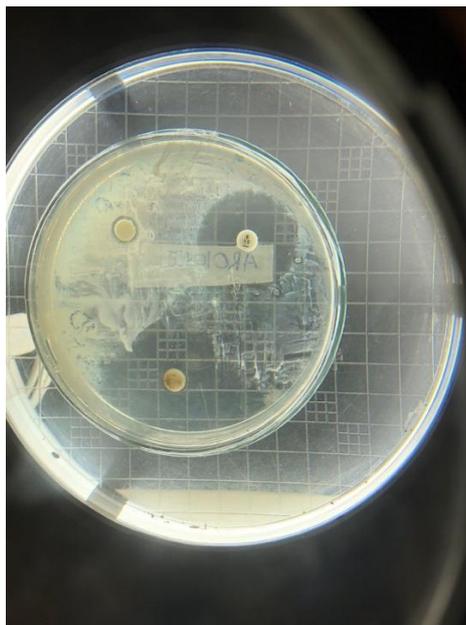
Fotografía 2. *Reacción del CMT.*



Fotografía 3. *Preparación de medios*



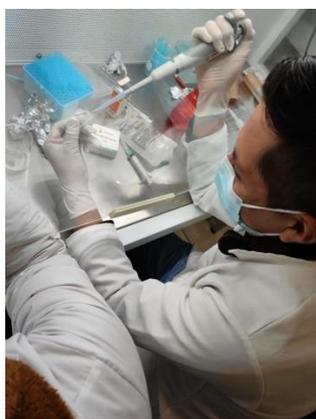
Fotografía 4. *Siembras de bacterias.*



Fotografía 5. Discos impregnados de aceite esencial del tomillo, discos con el antibiótico eritromicina y discos solos dimetilsulfóxido evidenciando que no hay interacción.



Fotografía 6. Actividad antimicrobiana a la concentración 10% y 5% , donde se observa mayor halo a la de 10%.



Fotografía 7. Preparación de las concentraciones del aceite.



Fotografía 8. Visita del tribunal de tesis.

Anexo 5. Glosario de términos

- **ABSORCIÓN:** Movimiento de sustancias hacia el interior de las células. Transferencia de energía desde las ondas electro-magnéticas a los enlaces químicos.
- **ANAEROBIO / ANAERÓBICO FACULTATIVO:** Organismo que crece en tanto presencia o como en ausencia de oxígeno.
- **ANTIBIOGRAMA:** El antibiograma es la prueba microbiológica que se realiza para determinar la susceptibilidad (sensibilidad o resistencia) de una bacteria a un grupo de antibióticos. Las técnicas de antibiograma son las utilizadas en el laboratorio de microbiología para estudiar la actividad de los antimicrobianos frente a los microorganismos responsables de las infecciones.
- **ANTICUERPO:** Un anticuerpo, también llamado inmunoglobulina, es una proteína producida por el sistema inmunitario como respuesta a la detección de la presencia de una sustancia percibida como ajena al organismo. Esta sustancia, denominada antígeno, puede ser una bacteria, un parásito, o incluso una molécula, como las proteínas. Los anticuerpos reconocen a los antígenos y se enganchan a ellos a fin de expulsarlos del cuerpo humano. A cada anticuerpo le corresponde un antígeno.
- **BACTERIA:** Las bacterias son microorganismos procariotas que presentan un tamaño de unos pocos micrómetros (por lo general entre 0,5 y 5 μm de longitud) y diversas formas, incluyendo filamentos, esferas (cocos), barras (bacilos), sacacorchos (vibrios) y hélices (espirilos).
- **BACTERIOCINAS:** Proteínas excretadas por unas bacterias que inhiben o matan a otras especies relacionadas.
- **BACTERIOCLOROFILAS:** Pigmentos de las bacterias que realizan fotosíntesis anoxigénica. **BACTERIÓFAGO:** Virus que infecta células procarióticas.
- **BACTERIORRODOPSINA:** Proteína que contiene retinal, presente en la membrana de algunas arqueobacterias halófilas extremas.

- **BACTERIOSTÁTICO:** Que inhibe el crecimiento y la multiplicación de las bacterias, sin matarlas.
- **BACTEROIDE.** Célula de *Rhizobium* deformada e hinchada que se encuentra en los nódulos radicales y es capaz de fijar nitrógeno.
- **CATALASA.** Enzima que descompone el peróxido de hidrógeno liberando oxígeno.
- **CICLO DEL CITRATO:** Sistema de enzimas que convierten al acetato (proveniente de la descarboxilación del piruvato o de la β oxidación de los ácidos grasos) en CO₂ con la liberación de átomos de hidrógeno, acarreados por los transportadores hacia la cadena respiratoria.
- **CITOPLASMA:** Materia viva encerrada por la membrana citoplasmática. Citoquinas. Proteínas mediadoras de la respuesta inmune producidas por los leucocitos.
- **CMI:** Es la menor concentración de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento de 10⁵ bacterias en 1 mL de medio de cultivo, tras 18-24 h de incubación. Se clasifica la sensibilidad de un germen frente a un antibiótico en función de sus respectivas CMI.
- **CURVA DE CRECIMIENTO.** Representación de los cambios en la población microbiana a lo largo del tiempo.
- **DISBIOSIS:** También denominada disbacteriosis, hace referencia a un desequilibrio en el número o tipo de colonias microbianas que han colonizado al hombre. Se da más en el tracto digestivo, pero puede producirse en cualquier parte en la que haya una superficie expuesta o una membrana mucosa. La disbiosis puede afectar a la digestión, absorción de nutrientes, producción de vitaminas y control de microorganismos dañinos. Numerosos factores, entre ellos los cambios de hábitos alimenticios o los tratamientos antibióticos, pueden influir en el delicado equilibrio microbiano y provocar por tanto una disbiosis.
- **GRAM-NEGATIVA:** Célula procariótica cuya pared celular contiene relativamente poco péptidoglucano y tiene una membrana externa compuesta de lipopolisacáridos, 196 Manual de Microbiología Agrícola, 2013

lipoproteínas y otras macromoléculas complejas. Aparece roja después de sometida a la tinción de Gram.

- **GRAM-POSITIVA:** Célula procariótica cuya pared celular consiste principalmente de péptidoglucano y no posee membrana externa. Aparece azul o violeta después de la tinción de Gram.
- **MASTITIS:** La mastitis es una enfermedad multicausal, habiéndose identificado más de 80 especies de bacterias, hongos, mycoplasmas y algas capaces de causar infecciones intramamarias (IIM).
- **POLIPÉPTIDO.** Molécula que consta de muchos aminoácidos unidos por enlaces peptídicos.
- **RESISTENCIA FARMACOLÓGICA:** Se produce cuando las células cancerosas o los microorganismos, como bacterias o virus, no responden a un medicamento que por lo general los debilita o destruye.
- **RESPIRACIÓN ANAERÓBICA.** Uso de un aceptor de electrones distinto del O₂, en una oxidación basada en el transporte de electrones que conduce a la bomba de protones
- **RETÍCULO ENDOPLÁSMICO.** Una disposición de membranas internas en las células eucarióticas
- **SIEMBRAS DE MICROORGANISMOS:** Sembrar o inocular es introducir artificialmente una porción de muestra (inóculo) en un medio adecuado.