

Artículo Original

Resistencia Bacteriana

Kasmera 49(2):e49235288, Julio-Diciembre, 2021

ISSN 0075-5222 E-ISSN 2477-9628

<https://doi.org/10.5281/zenodo.5338773>



Efecto inhibitorio del extracto hidroalcohólico de "Eucalipto" *Eucalyptus globulus* en bacterias aisladas de vacas con mastitis

Inhibitory effect of the hydroalcoholic extract of "Eucalyptus" Eucalyptus globulus in bacteria isolated from mastitis bovine

Flores-Somarriba Byron ¹, Mejía-Solorzano José Leonel ¹, Morales Marcela ¹, Mora-Sánchez Brenda ¹, Torres Dayana ¹, Sheleby-Elías Jessica ¹

¹Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-León. Escuela de Ciencias Agrarias y Veterinarias. Departamento de Veterinaria y Zootecnia. Centro Veterinario de Diagnóstico e Investigación. León-León. Nicaragua.

Resumen

Las bacterias causantes de mastitis bovina representan un riesgo para la salud humana, debido a los altos niveles de resistencia antimicrobiana. Este estudio evaluó el efecto antimicrobiano de *Eucalyptus globulus* en bacterias aisladas de vacas con mastitis. Se utilizaron 8 cepas de bacterias Gram Positivas (4 *Staphylococcus aureus* y 4 *Staphylococcus coagulasa* negativa y 8 cepas Gram negativas (4 *Klebsiella* spp. y 4 *Escherichia coli*) que fueron enfrentadas al extracto hidroalcohólico *Eucalyptus globulus*, determinando la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y los diámetros de inhibición mediante el método de difusión en agar Müeller Hinton. La CMI en bacterias Gram positivas fue de 48.82 µg/mL, mientras que en bacterias Gram negativas fue de 97.65 µg/mL. Para la concentración de 200 mg/mL se obtuvo un diámetro de 21.62 mm (DE=5.01) para bacterias Gram positivas y de 9.6 mm (DE=3.50) para bacterias Gram negativas ($p=0.0001$). En 50 mg/mL de extracto se encontró un diámetro promedio de 13.75 mm (DE=4.70) en Gram Positivas, mientras que, en Gram negativas no se obtuvo inhibición ($p<0.0001$). Los resultados demuestran que el extracto hidroalcohólico de *Eucalypto globulus* presenta un buen efecto antimicrobiano frente a bacterias aisladas de mastitis bovina, observándose un mayor efecto en bacterias del género *Staphylococcus*.

Palabras claves: mastitis bovina, *Staphylococcus*, *Eucalyptus globulus*, resistencia a antibióticos, antibióticos

Abstract

Bacteria that cause bovine mastitis can represent a risk to human health, due to high levels of antimicrobial resistance. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial effect of *Eucalyptus globulus* in isolated bacteria from cows with mastitis. Eight strains of Gram-positive bacteria (4 *Staphylococcus aureus* and 4 coagulase negative *Staphylococcus*) and eight Gram negative strains (4 *Klebsiella* spp. and 4 *Escherichia coli*) were used which challenged to *Eucalyptus globulus* hydroalcoholic extract, determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the inhibition diameters using the Müeller Hinton diffusion method. The CMI in Gram positive bacteria was 48.82 µg/mL, whereas in Gram negative bacteria it was 97.65 µg/mL. For a concentration of 200 mg/mL a diameter of 21.62 mm (SD = 5.01) was obtained for Gram positive bacteria and 9.6 mm (SD = 3.50) for Gram negative bacteria ($p=0.0001$). In 50 mg/mL of extract it was found 13.75 mm (SD = 4.70) in Gram Positives, which, in Gram Negatives, did not obtain inhibition ($p<0.0001$). The results show that the hydroalcoholic extract of *Eucalyptus globulus* has a good antimicrobial effect against bacteria isolated from bovine mastitis, with a greater effect being observed in bacteria of the *Staphylococcus* genus.

Keywords: bovine mastitis, *Staphylococcus*, *Eucalyptus globulus*, drug resistance, microbial, antibiotics

Recibido: 27/02/2021

Aceptado: 24/07/2021

Publicado: 30/08/2021

Como Citar: Flores-Somarriba B, Mejía-Solorzano JL, Morales M, Mora-Sánchez B, Torres D, Sheleby-Elías J. Efecto inhibitorio del extracto hidroalcohólico de "Eucalipto" *Eucalyptus globulus* en bacterias aisladas de vacas con mastitis. Kasmera. 2021;49(2):e49235288. doi: 10.5281/zenodo.5338773

Autor de Correspondencia: Flores-Somarriba, Byron. E-mail: byronfloressomarriba@gmail.com

Información detallada de la autora está disponible al final del artículo.

©2021. Los Autores. **Kasmera**. Publicación del Departamento de Enfermedades Infecciosas y Tropicales de la Facultad de Medicina. Universidad del Zulia. Maracaibo-Venezuela. Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons atribución no comercial (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>) que permite el uso no comercial, distribución y reproducción sin restricciones en cualquier medio, siempre y cuando la obra original sea debidamente citada.



Introducción

La mastitis bovina es la inflamación de la glándula mamaria que puede ser ocasionada por factores físicos, químicos, mecánicos o infecciosos. El 80% de los casos de mastitis bovina son ocasionados con la entrada de microorganismos patógenos específicos a través de los pezones y tejidos mamaros (1). La mastitis puede ser causada por una variedad de patógenos bacterianos, más comúnmente estafilococos coagulasa positiva y negativa, especies de estreptococos y bacterias Gram negativas, incluida *Escherichia coli* (2). El tratamiento de la mastitis con antibióticos ocasiona altos costos y promueve la aparición de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos disponibles en el mercado, además, su uso exige un periodo de retiro que incrementa los costos de producción (3).

En Nicaragua como en la mayor parte de los países, se ha encontrado que las bacterias del género de *Staphylococcus* son las más frecuentes en la mastitis bovina (4,5), estas bacterias poseen diferentes mecanismos de resistencia antimicrobiana y uno de los de mayor distribución es la resistencia a los β -lactámicos que se debe a la presencia del gen *mecA*, en un grupo de estafilococos que se les conoce como *Staphylococcus* meticilino-resistentes (SMR), su importancia radica en que el gen *mecA* codifica una proteína de unión a la penicilina 2a (PBP2a) de baja afinidad por la penicilina y es un gen móvil, por lo tanto puede transmitirse horizontalmente entre poblaciones de *Staphylococcus* spp (6). En la mastitis clínica, *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae* son patógenos que comúnmente se asocian con una mala higiene (7). Se sabe las betalactamasas de espectro extendido (BLEE), son el principal mecanismo de resistencia dentro de las enterobacterias (8,9), y se considera que los animales de granja son un reservorio potencial de *E. coli* productora de BLEE, por lo tanto, se ha considerado que la propagación de tales bacterias resistentes puede ocurrir a través de la cadena alimentaria (10).

El impacto de esta enfermedad en la calidad de la leche y el riesgo para la salud humana ha aumentado el interés por conocer los agentes implicados y sus niveles de resistencia frente a tratamientos comúnmente utilizados (11), remarcando la necesidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas que sean eficaces, de bajo costo y de fácil aplicación para el tratamiento (12).

Desde tiempos ancestrales, las plantas han sido fuente indispensable de la medicina tradicional para la ganadería, en particular de las zonas rurales de países en desarrollo (13), y se ha documentado el uso de extractos naturales con potencial antimicrobiano, estos, han sido sugeridos tanto para el tratamiento de mastitis como para la desinfección de las ubres. Se ha evaluado la actividad antibacteriana de ciertas especies vegetales como: *Anacardium occidentale* L. *Lippia graveolens*, *Piper jacquem ontienum* y *Psidium guajava*, propoleos y especies de eucalipto en microorganismos causantes de mastitis en vacas lecheras (14,15). El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad antimicrobiana de *Eucalyptus*

globulus Labill (*Eucalyptus globulus* L). en bacterias aisladas de vacas con mastitis.

Métodos

Tipo y diseño de la investigación: Se aplicó un diseño experimental

Población y muestra: Se utilizaron 16 cepas bacterianas aisladas de vacas con mastitis en el Occidente de Nicaragua, 4 *Staphylococcus aureus*, 4 *Staphylococcus* coagulasa negativa (SCN), 4 *Klebsiella* spp. y 4 *Escherichia coli*. Las bacterias forman parte del cepario del Laboratorio de Microbiología Veterinaria del Centro Veterinario de Diagnóstico e Investigación (CEVEDI), Escuela de Ciencias Agrarias y Veterinarias (ECAV), Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León (UNAN-León), estas se habían almacenado en caldo Infusión Cerebro Corazón (ICC) con 10% de glicerol a una temperatura de -20° C. Para su reactivación se inocularon 50 μ l de cada cepa en 1 mL de ICC, incubadas a 37° C por 24 h, posteriormente las bacterias Gram positivas fueron inoculadas en Agar Sangre de Carnero al 5% (ASC), mientras que las Gram negativas fueron inoculadas en McConkey (MC), incubando las placas de agar a 37° C por 24 h.

Criterios de inclusión: Las cepas fueron seleccionadas por presentar resistencia a Amoxicilina más ácido clavulánico (AMC) y Cefalexina (CL). Se verificó el crecimiento puro de las bacterias y se procedió a realizar nuevamente su identificación mediante API 20E (Biomériux®, España) para las bacterias Gram negativas, mientras que para *Staphylococcus* se empleó la tinción de Gram, las pruebas de Catalasa, Coagulasa y DNasa.

Criterios de exclusión: Las cepas con sensibilidad a AMC y CL, además se excluyeron los crecimientos bacterianos contaminados y las que no presentaron un perfil bioquímico definido en el API 20E (bioMérieux®, España).

Metodología:

Preparación del extracto hidroalcohólico: Se utilizó la metodología descrita por Alvarado-Aguilar en 2019 (16). La materia vegetal fue limpiada manualmente con agua destilada para la liberación de sustancias extrañas, posteriormente se secaron a temperatura ambiente bajo sombra por un periodo de 7 días, fueron trituradas hasta obtener un polvo fino de masa seca. Se maceraron 20 g de masa en 100 mL de etanol al 80% v-v y se dejó en reposo durante 7 días a temperatura ambiente sin taparlo para facilitar la evaporación total del alcohol, posteriormente se centrifugó a 3000 g por 5 minutos para obtener el sobrenadante libre de residuos, que fue transferido a un frasco y almacenado en refrigeración, protegiéndolo de la luz, hasta su utilización.

Preparación de sensidiscos: Se utilizó papel Whatman N°01, del cual, se obtuvieron discos de 5 mm de diámetro, que fueron colocados dentro de viales para ser esterilizados en autoclave (120 °C y 27 psi, por 15 minutos),

se dejó secar en horno a 60°C por 24 horas, posteriormente, los discos se embebieron con 10 µl en las diferentes concentraciones (200, 100, 50, 25, 12.5, 6.75 mg/mL) del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* L. "eucalipto" y se dejó en reposo por 5 minutos, se colocaron en una placa Petri estéril para permitir su secado por 10 minutos y luego se realizó la prueba de sensibilidad.

Método de difusión en agar: En placas con agar Müller Hinton se procedió a sembrar superficialmente los inóculos bacterianos a partir de las colonias aisladas anteriormente, se prepararon suspensiones bacterianas estandarizadas mediante el espectrofotometría a 620 nm con una turbidez de 0,5 Mc Farland, para obtener una concentración equivalente a 1.5×10^8 UFC/mL, se inocularon con un hisopo embebido en la suspensión, utilizando un estríado múltiple, cubriendo toda la placa de un borde al otro, se giró la placa 60° para repetir el procedimiento, luego se giró nuevamente la placa 60° por tercera vez para garantizar una distribución homogéneamente (17), la placa con el agar ya sembrado se dejó secar por un periodo de 5 minutos y posteriormente se colocaron los discos impregnados del extracto hidroalcohólico de eucalipto colocados a una distancia de 15-20mm, a favor de las manecillas del reloj y de mayor a menor concentración. También se colocó un disco control embebido en etanol a 80% (se dejó previamente durante 7 días a temperatura ambiente para facilitar la evaporación total) en el centro de la placa. Posteriormente, las placas se llevaron a incubación a 37° C/24horas. Transcurrido el tiempo se midieron las zonas de inhibición (mm), registrando la medida de los diámetros para cada una de las cepas (Figura 1).



Figura 1. Se observan las zonas de inhibición para el crecimiento de *Staphylococcus aureus* mediante el método de difusión en agar Müller Hinton para las concentraciones de *E. globulus*, 1 (200 mg/mL), 2 (100 mg/mL), 3 (50 mg/mL), 4 (25 mg/mL), 5 (12.5 mg/mL), 6 (6.75 mg/mL) y 7 (control).

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI): Se utilizó el método de microdilución en caldo para determinar la CMI del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* L, como se describió anteriormente (18). Se colocó un volumen de 50 µl de solución salina estéril en todos los pozos, excepto en el de la primera columna. Se colocó un volumen de 100 µl del extracto (200 mg/mL) preparado previamente en el primer pocillo, después se transfirieron 50 µl del "pozo uno" al "pozo dos", y se repitió una transferencia de 50 µl desde el "pozo dos". al "pozo tres", y sucesivamente hasta el "pozo diez". A continuación, se añadieron 50 µl de ICC 2x (Oxoid®; Basingstoke, Reino Unido) a todos los pocillos. Finalmente, se colocaron 10 µl de suspensión bacteriana estandarizadas mediante espectrofotometría a 620 nm, en una escala de turbidez de 0,5 McFarland (5×10^8 UFC / mL) en todos los pocillos (de uno a once). El Pocillo 11 fue el control positivo (crecimiento) y el pocillo 12 fue el control negativo (esterilidad). Después de 24 h de incubación a 37° C, todos los pocillos se inspeccionaron visualmente para detectar la presencia de turbidez debido al crecimiento bacteriano. La CMI se determinó como la concentración más baja del extracto que inhibió el crecimiento visible de bacterias.

Recolección de la información: La información fue registrada en una ficha de recolección de datos, conteniendo la especie de cada cepa, su perfil de resistencia y la procedencia, además se registraron los resultados de la CMI y los diámetros de inhibición en el método de difusión en agar.

Análisis estadístico: Como estadísticos descriptivos se utilizó la media de los diámetros en las zonas de inhibición con sus respectivas desviaciones estándar, para comparar los diámetros de inhibición entre bacterias Gram positivas y Gram negativas se aplicó la prueba T de Students.

Aspectos Bioéticos: La especie vegetal utilizada fue *Eucalyptus globulus*, que no se considera como protegida. Se cumplió con lo establecido en la Norma Técnica Obligatoria Nicaragüense (NTON 18 001 – 12), "Manejo Sostenible de los Bosques Naturales Latifoliados y de Coníferas". Se conservó la confidencialidad de las fincas de donde se obtuvieron las cepas y se realizó la firma del consentimiento informado por los propietarios de las vacas. El estudio fue presentado y aprobado por el comité de investigación de la Escuela de Ciencias Agrarias y Veterinarias (ECAV) de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León (UNAN-León).

Resultados

La CMI en bacterias Gram positivas fue de 48.82 µg/mL, mientras que en bacterias Gram negativas fue de 97.65 µg/mL.

Para la concentración de 200 mg/mL del extracto, se obtuvo un diámetro de inhibición de 21.62 mm (DE=5.01) para bacterias Gram positivas y de solo 9.60 mm (DE=3.50) para bacterias Gram negativas, revelando

diferencias significativas ($p=0.0001$) según la prueba T de Student para muestras independientes. Para la concentración de 100 mg/mL del extracto se observó un diámetro 18.00 mm (DE=3.80) en bacterias Gram positivas, un valor significativamente mayor ($p<0.0001$) respecto a los 7.80 mm (DE=2.44) obtenido como promedio en bacterias Gram negativas. En 50 mg/mL de extracto se encontró 13.75 mm (DE=4.70) en Gram positivas, mientras que, en Gram negativas no se obtuvo inhibición ($p<0.0001$); para la concentración 25 mg/mL del extracto se obtuvo un diámetro de inhibición

promedio de 7.31 mm (DE=1.15), mientras que en bacterias Gram negativas no se observó inhibición (Figura 2). En la comparación del efecto antimicrobiano entre *S. aureus* y otras especies de *Staphylococcus*, se obtuvo un resultado similar, con un promedio de 20.75 mm para *S. aureus* y de 22.50 mm para SCN, para la concentración de 200 mg/mL del extracto de *Eucalypto globulus*. La comparación entre bacterias Gram negativas mostró un promedio del diámetro de 10.00 mm para *Klebsiella* spp. y de 9.00 mm para *Escherichia coli* ($p<0.05$), en una concentración de 200 mg/mL.

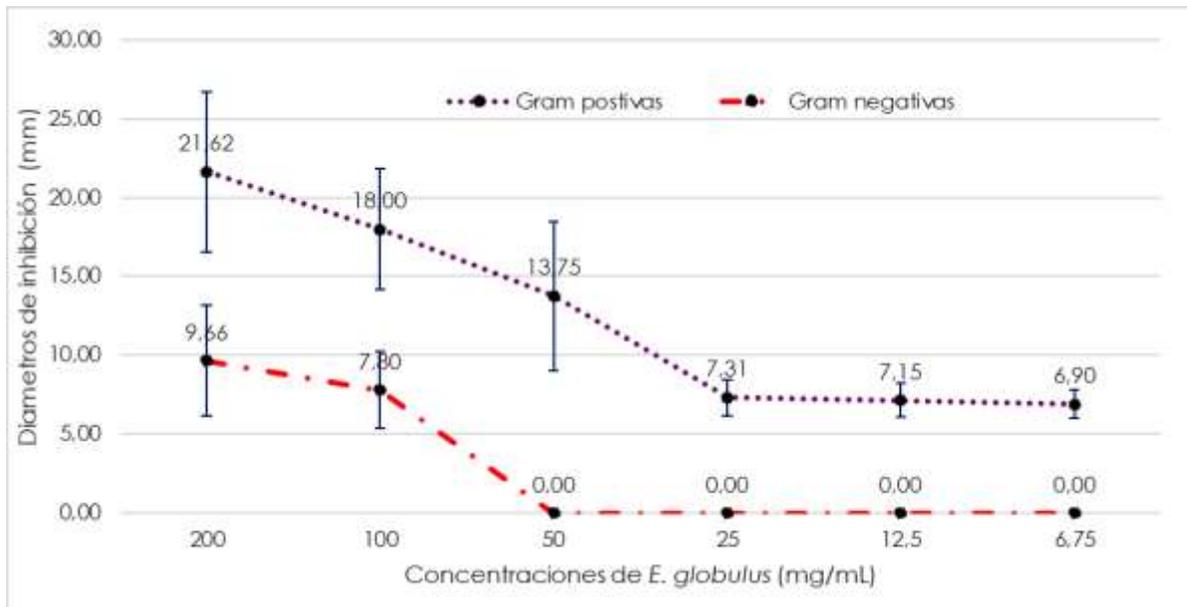


Figura 2. Diámetros de inhibición en el método de difusión para bacterias Gram positivas y Gram negativas en diferentes concentraciones de *E. globulus*

El análisis de regresión lineal simple entre la concentración del extracto y el diámetro de inhibición reflejó un $R^2=0.779$.

Discusión

En este trabajo se obtuvo una CMI de 48.82 $\mu\text{g/mL}$ del extracto de *E. globulus* en bacterias Gram positivas y de 97.72 $\mu\text{g/mL}$ para bacterias Gram negativas, resultados más bajo en comparación a los encontrados en otro estudio en el que se obtuvieron valores de CMI en el rango de 15.75 a 36.33 mg/mL (15.75×10^3 a $36.33 \times 10^3 \mu\text{g/mL}$) (19), contra las bacterias Gram negativas y positivas al enfrentarlas con aceites esenciales de *E. globulus*. Sin embargo, fue más elevada que el rango de 8–16 $\mu\text{g/mL}$ encontrada por otro estudio al enfrentar cepas de estafilococos con el extracto etanólico de *Rhodomyrtus tomentosa* (19). Es importante obtener valores bajos en la CMI ya que esto implica el uso de cantidades pequeñas para el tratamiento *in vivo* y reduce los efectos secundarios, como la citotoxicidad, como es reflejado por otros investigadores quienes encontraron que el extracto de *E. globulus* a una concentración de 195 $\mu\text{g/mL}$ presentó

un porcentaje de células viables del 63,9%, un valor cerca del límite para ser considerado no citotóxico (70%) según ISO 10993-5: 2006 (20).

La comparación de la capacidad antimicrobiana del extracto entre bacterias Gram positivas y Gram negativas mostró diferencias significativas en todas las concentraciones. Estos hallazgos son similares a los encontrados en otros estudios en los que se observó que las bacterias Gram positivas eran más susceptibles que las bacterias Gram negativas frente a los extractos hidroalcohólicos (21); sin embargo, algunos investigadores difirieron de estos resultados al observar similitud en los diámetros de inhibición para ambos grupos bacterianos (22). Las diferencias encontradas en este trabajo se pueden entender, ya que las bacterias Gram positivas poseen una capa de peptidoglucano que permite una mejor absorción de la solución hidroalcohólica, mientras que las bacterias Gram negativas poseen en la parte externa de su pared una membrana lipídica la cual es hidrofóbica, eso dificulta el mecanismo de absorción del extracto hidroalcohólico de *E. globulus* (21,23).

La comparación de las zonas de inhibición entre *S. aureus* y SCN, no mostró diferencias significativas,

sugiriendo que el extracto es igualmente efectivo para las diferentes especies del género *Staphylococcus*, esto sería una ventaja respecto a lo reportado para antibióticos usados en ambos grupos de bacterias, los que refieren encontrar mayor resistencia a Levofloxacina, Eritromicina, Gentamicina, Trimetoprim/sulfametoxazol en especies de *Staphylococcus* diferentes de *S. aureus* (24), sin embargo, los hallazgos de este estudio coinciden con otro que describe similar susceptibilidad frente a *E. globulus* entre las diferentes especies de *Staphylococcus*, incluyendo cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA), aislados de mastitis bovina (19). La resistencia de las cepas MRSA se debe principalmente por la expresión del gen *mecA*, localizado en un elemento genético móvil, el casete estafilocócico cromosoma *mec* (*SCCmec*), que codifica una proteína de unión a penicilina alterada (PBP2a) con una baja afinidad a los β -lactámicos, contribuyendo a que *S. aureus* sobreviva al tratamiento con antibióticos β -lactámicos (25). Por tanto, los resultados obtenidos con el extracto de *P. tuberculatum* representan un hallazgo importante ya que demuestra que el uso de tratamientos naturales como *E. globulus* puede ser empleado en diferentes especies de bacterias Gram positivas.

Otros investigadores han descrito que el uso de *E. globulus* solo parece ejercer un efecto bacteriostático contra *S. aureus* hasta las 8 h de incubación, pero también han documentado que el uso del extracto de *Eucalypto* tiene un efecto sinérgico cuando es aplicado con Penicilina G, lo que podría permitir una mayor eficacia a dosis más bajas, reduciendo el desarrollo de especies resistentes o previniendo la aparición de efectos secundarios (20). Otros investigadores han descrito que el ácido gálico, un compuesto presente en *E. globulus*, es capaz de inhibir la PBP2a (26), que les confiere a las bacterias una resistencia al grupo β -lactámico (6), por lo tanto, es posible que este inhibidor de PBP2a sea el mecanismo responsable de la sinergia observada entre *E. globulus* y la Penicilina G (20).

Este trabajo representa el primer paso para la aplicación del extracto de *E. globulus* en el tratamiento de mastitis bovina, ya que aún se requieren de pruebas adicionales *in vitro* con una mayor colección de cepas que sean representativas de la población en las que se pretende utilizar el producto y con una caracterización molecular de la resistencia antimicrobiana, además requiere de pruebas de toxicidad para evaluar los efectos secundarios sobre el tejido de las glándulas mamarias. Sin embargo, los resultados de este estudio demuestran la consistencia en el efecto antimicrobiano del extracto hidroalcohólico de *E. globulus* (16,20,27), principalmente en bacterias Gram positivas (16), ya que se observó mayor diámetro de los halos inhibición en *Staphylococcus aureus* que en *E. coli* y *Klebsiella* spp.

Conflicto de Relaciones y Actividades

Los autores declaran que la investigación se realizó en ausencia de relaciones comerciales o financieras que

podieran interpretarse como un posible conflicto de relaciones y actividades

Financiamiento

Esta investigación no recibió financiamiento de fondos públicos o privados, la misma fue autofinanciada por los autores. El estudio fue realizado con el apoyo de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León (UNAN-León).

Referencias Bibliográficas

1. Aranguren Parra AJ, López Ortega AA, Mendoza CA, Delgado N. Efecto de la mastitis clínica y subclínica sobre la concentración plasmática de metabolitos, proteínas totales y albúmina en hembras bovinas. *Zootec Trop* [Internet]. 2009;27(1):57-64. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-72692009000100007.
2. Kuehn JS, Gorden PJ, Munro D, Rong R, Dong Q, Plummer PJ, et al. Bacterial Community Profiling of Milk Samples as a Means to Understand Culture-Negative Bovine Clinical Mastitis. *PLoS One* [Internet]. 2013;8(4):e61959. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061959> DOI: [10.1371/journal.pone.0061959](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061959) PMID [23634219](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23634219/) PMCID [PMC3636265](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3636265/)
3. Sharma C, Rokana N, Chandra M, Singh BP, Gulhane RD, Gill JPS, et al. Antimicrobial Resistance: Its Surveillance, Impact, and Alternative Management Strategies in Dairy Animals. *Front Vet Sci* [Internet]. 2018;4:237. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fvets.2017.00237> DOI: [10.3389/fvets.2017.00237](https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00237) PMID [29359135](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29359135/) PMCID [PMC5766636](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC5766636/)
4. Chavarría S, Lilliam M. Identificación de agentes bacterianos implicados en mastitis subclínica y perfil de resistencia en vacas que abastecen los centros de acopio Tecuaname y El Sauce en el departamento de León. [Internet] [Licenciatura en Medicina Veterinaria]. León-León. Nicaragua: Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-León; 2012. Disponible en: http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/handle/123456789/5929?mode=simple&submit_simple=Mostrar+el+registro+sencillo+del+ítem
5. Sharun K, Dhama K, Tiwari R, Gugjoo MB, Iqbal Yattoo M, Patel SK, et al. Advances in therapeutic and management approaches of bovine mastitis: a comprehensive review. *Vet Q* [Internet]. 2021;41(1):107-36. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/01652176.2021.1882713> DOI: [10.1080/01652176.2021.1882713](https://doi.org/10.1080/01652176.2021.1882713) PMID [33509059](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33509059/) PMCID [PMC7906113](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC7906113/)
6. Jiménez Velásquez S del C, Torres Higuera LD, Parra Arango JL, Rodríguez Bautista JL, García Castro FE, Patiño Burbano RE. Perfil de resistencia antimicrobiana

- en aislamientos de *Staphylococcus* spp. obtenidos de leche bovina en Colombia. Rev Argent Microbiol [Internet]. 2020;52(2):121-30. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754119300604> DOI: [10.1016/j.ram.2019.05.004](https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.05.004) PMID [31537323](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31537323/)
7. Saidani M, Messadi L, Soudani A, Daaloul-Jedidi M, Châtre P, Ben Chehida F, et al. Epidemiology, Antimicrobial Resistance, and Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* in Clinical Bovine Mastitis in Tunisia. Microb Drug Resist [Internet]. 2018;24(8):1242-8. Disponible en: <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0049> DOI: [10.1089/mdr.2018.0049](https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0049) PMID [29757079](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29757079/)
 8. Dorina T, Maciucă JE, Evans NJ, Williams H, Wattret A, Fick JC, et al. Detection and Molecular Characterization of *Escherichia coli* CTX-M-15 and *Klebsiella pneumoniae* SHV-12 β -Lactamases from Bovine Mastitis Isolates in the United Kingdom. Antimicrob Agents Chemother [Internet]. 2014;58(2):789-94. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/AAC.00752-13> DOI: [10.1128/AAC.00752-13](https://doi.org/10.1128/AAC.00752-13) PMID [24247146](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24247146/) PMCID [PMC3910873](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3910873/)
 9. Eisenberger D, Carl A, Balsliemke J, Kämpf P, Nickel S, Schulze G, et al. Molecular Characterization of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolates from Milk Samples of Dairy Cows with Mastitis in Bavaria, Germany. Microb Drug Resist [Internet]. 2017;24(4):505-10. Disponible en: <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0182> DOI: [10.1089/mdr.2017.0182](https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0182) PMID [28953418](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28953418/)
 10. Geser N, Stephan R, Hächler H. Occurrence and characteristics of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Enterobacteriaceae* in food producing animals, minced meat and raw milk. BMC Vet Res [Internet]. 2012;8(1):21. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-21> DOI: [10.1186/1746-6148-8-21](https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-21) PMID [22397509](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22397509/) PMCID [PMC3319423](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3319423/)
 11. Cobirka M, Tancin V, Slama P. Epidemiology and Classification of Mastitis. Animals. 2020;10(12):2212. DOI: [10.3390/ani10122212](https://doi.org/10.3390/ani10122212) PMID [33255907](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33255907/) PMCID [PMC7760962](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC7760962/)
 12. Máttar S, Calderón A, Sotelo D, Sierra M, Tordecilla G. Detecting antibiotics in milk: A public health problem. Rev Salud Publica [Internet]. 2009;11(4):579-90. Disponible en: <https://www.scielosp.org/article/rsap/2009.v11n4/579-590/es/#ModalArticles> DOI: [10.1590/s0124-00642009000400009](https://doi.org/10.1590/s0124-00642009000400009) PMID [20169214](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20169214/)
 13. Kalayou S, Haileselassie M, Gebre-egziabher G, Tiku'e T, Sahle S, Taddale H, et al. In-vitro antimicrobial activity screening of some ethnoveterinary medicinal plants traditionally used against mastitis, wound and gastrointestinal tract complication in Tigray Region, Ethiopia. Asian Pac J Trop Biomed [Internet]. 2012;2(7):516-22. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2221169112600884> DOI: [10.1016/S2221-1691\(12\)60088-4](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60088-4) PMID [23569962](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23569962/) PMCID [PMC3609345](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3609345/)
 14. Kunth DP, Campos C, Maure OB, Trujillo MM. Propiedades fitoquímicas y antibacterianas de *Piper auritum* Kunth. Av en Investig Agropecu [Internet]. 2018;22(1):77-90. Disponible en: <http://www.ucol.mx/revaia/portal/pdf/2018/enero/6.pdf>
 15. Sánchez Y, Correa TM, Abreu Y, Pino O. Efecto del aceite esencial de *Piper auritum* Kunth y sus componentes sobre *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson y *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson. Rev Protección Veg [Internet]. 2013;28(3):204-10. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522013000300007
 16. Alvarado-Aguilar J, Vásquez-Montenegro V, Vergara-Espinoza M, Santa Cruz-López CY. Efecto del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* L. sobre *Staphylococcus aureus*. Rev Exp en Med del Hosp Reg Lambayeque [Internet]. 2019;5(3):119-25. Disponible en: <http://rem.hrlamb.gob.pe/index.php/REM/article/view/359> DOI: [10.37065/rem.v5i3.359](https://doi.org/10.37065/rem.v5i3.359)
 17. Odoi H, Boamah VE, Boakye YD, Agyare C. Prevalence and Phenotypic and Genotypic Resistance Mechanisms of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Clinical, Environmental, and Poultry Litter Samples from the Ashanti Region of Ghana. J Environ Public Health [Internet]. 2021;2021:9976064. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2021/9976064> DOI: [10.1155/2021/9976064](https://doi.org/10.1155/2021/9976064) PMID [34221030](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34221030/) PMCID [PMC8221878](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC8221878/)
 18. Clinical and Laboratory Standards Institute. M07: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically [Internet]. 11.a ed. Vol. M07. Wayne, PA 19087 USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2016. p. 112. Disponible en: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m07/>
 19. Mordmuang A, Brouillette E, Voravuthikunchai SP, Malouin F. Evaluation of a *Rhodomyrtus tomentosa* ethanolic extract for its therapeutic potential on *Staphylococcus aureus* infections using in vitro and in vivo models of mastitis. Vet Res [Internet]. 2019;50(1):49. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s13567-019-0664-9> DOI: [10.1186/s13567-019-0664-9](https://doi.org/10.1186/s13567-019-0664-9) PMID [31221210](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31221210/) PMCID [PMC6585048](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC6585048/)
 20. Gomes F, Rodrigues ME, Martins N, Ferreira ICFR, Henriques M. Phenolic Plant Extracts Versus Penicillin G: In Vitro Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitis. Pharmaceuticals

- [Internet]. 2019;12(3):128. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1424-8247/12/3/128> DOI: [10.3390/ph12030128](https://doi.org/10.3390/ph12030128) PMID [31480446](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31480446/) PMCID [PMC6789528](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC6789528/)
21. Maya J, Tarek N. Antibacterial effect of the leaves of *Eucalyptus globulus* against clinical bacterial isolates. GSC Biol Pharm Sci [Internet]. 2019;09(02):110-6. Disponible en: <https://gsconlinepress.com/journals/gscbps/node/1026> DOI: [10.30574/gscbps.2019.9.2.0205](https://doi.org/10.30574/gscbps.2019.9.2.0205)
 22. Montero-Recalde M, Morocho-Núñez MJ, Avilés-Esquivel D, Carrasco-Cando Á, Erazo-Gutierrez R. Eficacia antimicrobiana del aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus* spp) sobre cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* subsp. aureus. Rev Investig Vet del Perú [Internet]. 2019;30(2):932-8. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172019000200042 DOI: [10.15381/rivep.v30i2.16099](https://doi.org/10.15381/rivep.v30i2.16099)
 23. Tejada GM de, Sanchez-Gomez S, Razquin-Olazarán I, Kowalski I, Kaonis Y, Heinbockel L, et al. Bacterial Cell Wall Compounds as Promising Targets of Antimicrobial Agents I. Antimicrobial Peptides and Lipopolyamines. Curr Drug Targets [Internet]. 2012;13(9):1121-30. Disponible en: <http://www.eurekaselect.com/node/101041/article> DOI: [10.2174/138945012802002410](https://doi.org/10.2174/138945012802002410) PMID [22664072](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22664072/) PMCID [PMC3694180](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3694180/)
 24. De Vecchi E, George DA, Romanò CL, Pregliasco FE, Mattina R, Drago L. Antibiotic sensitivities of coagulase-negative staphylococci and *Staphylococcus aureus* in hip and knee periprosthetic joint infections: does this differ if patients meet the International Consensus Meeting Criteria? Infect Drug Resist [Internet]. 2018;11:539-46. Disponible en: <https://www.dovepress.com/antibiotic-sensitivities-of-coagulase-negative-staphylococci-and-staph-peer-reviewed-fulltext-article-IDR> DOI: [10.2147/IDR.S151271](https://doi.org/10.2147/IDR.S151271) PMID [29695923](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29695923/) PMCID [PMC5905490](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC5905490/)
 25. Pu W, Su Y, Li J, Li C, Yang Z, Deng H, et al. High Incidence of Oxacillin-Susceptible *mecA*-Positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) Associated with Bovine Mastitis in China. PLoS One [Internet]. 2014;9(2):e88134. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088134> DOI: [10.1371/journal.pone.0088134](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088134) PMID [24523877](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24523877/) PMCID [PMC3921137](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3921137/)
 26. Aldulaimi OA. General Overview of Phenolics from Plant to Laboratory, Good Antibacterials or Not. Pharmacogn Rev [Internet]. 2017;11(22):123-7. Disponible en: <https://www.phcogrev.com/article/2017/11/22/104103phrevphrev4316> DOI: [10.4103/phrev.phrev.43.16](https://doi.org/10.4103/phrev.phrev.43.16) PMID [28989246](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28989246/) PMCID [PMC5628517](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC5628517/)
 27. Gomes F, Martins N, Ferreira ICFR, Henriques M. Antibiofilm activity of hydromethanolic plant extracts against *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. Heliyon [Internet]. 2019;5(5):e01728. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01728> DOI: [10.1016/j.heliyon.2019.e01728](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01728) PMID [31193536](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31193536/) PMCID [PMC6535580](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC6535580/)

Autores:

Correspondencia: Flores-Somarriba Byron. <https://orcid.org/0000-0002-1932-3227>. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-León. Escuela de Ciencias Agrarias y Veterinarias. Departamento de Veterinaria y Zootecnia. Centro Veterinario de Diagnóstico e Investigación. León-León. Nicaragua. Dirección Postal: Carretera a La Ceiba 1 Km al Este, León, Nicaragua. Teléfono: (0050585270294). E-mail: byronfloressomarriba@gmail.com

Mejía-Solorzano José Leonel. <https://orcid.org/0000-0003-4357-4357>. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-León. Escuela de Ciencias Agrarias y Veterinarias. Departamento de Veterinaria y Zootecnia. Centro Veterinario de Diagnóstico e Investigación. León-León. Nicaragua. E-mail: joseleonelemejiasolorzano0@gmail.com

Morales Marcela. <https://orcid.org/0000-0001-7721-4945>. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-León. Escuela de Ciencias Agrarias y Veterinarias. Departamento de Veterinaria y Zootecnia. Centro Veterinario de Diagnóstico e Investigación. León-León. Nicaragua. E-mail: mmorales733@yahoo.com

Mora-Sánchez Brenda. <https://orcid.org/0000-0003-2042-927X>. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-León. Escuela de Ciencias Agrarias y Veterinarias. Departamento de Veterinaria y Zootecnia. Centro Veterinario de Diagnóstico e Investigación. León-León. Nicaragua. E-mail: bremsa2006@yahoo.es Scopus ID: <https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorid=57202585231>

Torres Dayana. <https://orcid.org/0000-0002-3393-0154>. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-León. Escuela de Ciencias Agrarias y Veterinarias. Departamento de Veterinaria y Zootecnia. Centro Veterinario de Diagnóstico e Investigación. León-León. Nicaragua. E-mail: cibt0509@gmail.com

Sheleby-Elías Jessica. <https://orcid.org/0000-0001-7370-5763>. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-León. Escuela de Ciencias Agrarias y Veterinarias. Departamento de Veterinaria y Zootecnia. Centro Veterinario de Diagnóstico e Investigación. León-León. Nicaragua. E-mail: jessicasheleby@gmail.com

Contribución de los Autores:

FSB, MSJL, MM: conceptualización, metodología, análisis formal, curación de datos, redacción-preparación del borrador original, redacción-revisión y edición. **MSB, TD:** análisis formal, curación de datos, redacción-preparación del borrador original, redacción-revisión y edición. **SEJ:** conceptualización, metodología, análisis formal, curación de datos, redacción-preparación del borrador original, redacción-revisión y edición.