

100



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

“SUSCEPTIBILIDAD DE *Corynebacterium pseudotuberculosis* IN VITRO A DOCE AGENTES ANTIMICROBIANOS”

288553

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE: MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

ISABEL ROMERO GUERRA

DIRECTORA DE TESIS: M.V.Z. SUSANA E. GARCIA VAZQUEZ

ASESOR DE TESIS: M.V.Z. SILVIANO TREJO NUÑEZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

200



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

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



ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

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



DEPARTAMENTO DE  
 EXAMENES PROFESIONALES

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

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

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

" Susceptibilidad de Corynebacterium pseudotuberculosis in vivo  
 a doce agentes antimicrobianos."

que presenta la pasante: Isabel Romero Guerra  
 con número de cuenta: 9361841-2 para obtener el título de  
Médica Veterinaria Zootecnista

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

**ATENTAMENTE**

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

Cuautitlán izcalli, Méx. a 27 de Octubre de 2000

|                  |  |  |
|------------------|--|--|
| PRESIDENTE       | M.V.Z. <u>Susana Elvira García Vázquez</u> |  |
| VOCAL            | M.V.Z. <u>Gilberto Ochoa Uribe</u>         |  |
| SECRETARIO       | M.V.Z. <u>Martha E. Perez Arias</u>        |  |
| PRIMER SUPLENTE  | M.V.Z. <u>Leticia Villegas Chávez</u>      |  |
| SEGUNDO SUPLENTE | M.V.Z. <u>Maura Cruz Fierro</u>            |  |

## AGRADECIMIENTOS

Gracias a **Dios** por el don de mi ser y por el gran amor que empeñó en mí. **A el debo quien soy.**

A mis padres: **Sr. Leobardo Romero Cabrera y la Sra. Epifania Guerra Mendoza**, gracias por ser mi guía en la vida con su ejemplo y amor. A ellos dedico este triunfo.

A mis hermanos, **Tomasa, Rafael, Arnulfo y Antonio** amigos de mi vida, por todas sus contribuciones mil gracias.

A mis amigos y amigas, **Melissa, Sarita, Juanita, Martha, José Luis A. Juanita y su esposo Joao, Mireya, Mauricio, Cesar** y todos aquellos que de una u otra forma estuvieron conmigo sabiendo ser como un hermano alentandome siempre hacia el triunfo, gracias.

Un agradecimiento muy especial a mi esposo **Juan Antonio Velázquez Cadena** por su gran amor y comprensión, sin ello no habría logrado esta meta.

A la sección de **Microbiología y Virología** de esta facultad, muchas gracias por su valiosa colaboración y ayuda.

Al **M. en C M.V.Z. Tonathiu Cruz Sánchez** por su colaboración, gracias.

A mis asesores la **M.V.Z Susana E. García V.** y el **M.V.Z. Silvano Trejo N.** Por brindarme su amistad y apoyo participandome sus conocimientos mil gracias.

Al **Sr. Iñigo García** de Tehuacán, Puebla, un valioso reconocimiento por toda su atención y colaboración, para la realización de esta tesis.

Y a todas aquellas personas que han sido partícipes en mi vida y a la **Universidad** misma, Gracias.

## INDICE

|                   |    |
|-------------------|----|
| RESUMEN.....      | 1  |
| INTRODUCCION..... | 2  |
| OBJETIVOS.....    | 12 |
| MATERIAL.....     | 13 |
| METODO.....       | 15 |
| RESULTADOS.....   | 19 |
| DISCUSION.....    | 24 |
| CONCLUSIONES..... | 26 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 27 |

## RESUMEN

El presente estudio, es llevado a cabo con el objeto de determinar la sensibilidad *in vitro* de 35 cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, a 12 agentes antimicrobianos. Las cepas se aislaron e identificaron a partir de muestras de nodos linfáticos abscedados, de cabras para sacrificio que llegaron al rastro de Tlalnepantla, Estado de México.

El aislamiento e identificación, así como la prueba de sensibilidad se realizaron en el laboratorio L-514 de Microbiología Veterinaria, de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, C-4.

La técnica que se utilizó para determinar la sensibilidad fué la del Antibiograma, y los antimicrobianos que se evaluaron, estaban contenidos en multidiscos combinados de uso comercial elaborados por Laboratorios SANOFI.

Los resultados obtenidos, nos muestran que el máximo porcentaje de sensibilidad fué para el Trimetoprim-sulfametoxazol con 97.1 %, la Pefloxacina con 91.4 %, la Tetraciclina con 91.4 % y la Eritromicina con 82.5 %. A estos le siguieron la Gentamicina con 68.5 %, la Cefuroxima con 62.8 %, la Cefalotina con 62.8 %, y la Cefotaxima con 57.1 %.

Para la sensibilidad intermedia, el porcentaje más alto fué para la Ampicilina con el 20 % de las cepas, le siguieron la Penicilina con 14.2 % y la Cefalotina con el 11.4%.

Por el contrario el 100 % de las cepas fueron resistentes a la Dicloxacilina, siguiendole la Ceftazidima con el 91.4 % de cepas resistentes, la Penicilina con 85.5 % y la Ampicilina con el 80 %; resultados semejantes nos muestran la Cefotaxima con 34.2 %, la Cefuroxima con 28.5 %, la Gentamicina con 28.5 % y la Cefalotina con 25.7 %.

De acuerdo a los resultados se concluyó que en porcentaje de sensibilidad, las cepas aisladas en este estudio muestran gran similitud con los resultados obtenidos en un estudio previo realizado en Estados Unidos con cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* aisladas también a partir de cabras, esto probablemente se debio a que las cepas utilizadas en este trabajo fueron aisladas de cabras provenientes del extranjero, las cuales de acuerdo a informes de los inspectores del rastro provenian del Estado de Texas.

## INTRODUCCION

La linfadenitis caseosa es una enfermedad contagiosa crónica de carácter enzoótico, que afecta principalmente a ovejas y cabras adultas, caracterizada por agrandamiento unilateral y supuración de nodos linfáticos afectando ocasionalmente pulmones y bazo. Tiene incidencia en muchas regiones de Norte y Sur América, Australia, Nueva Zelanda, Sudáfrica, Europa, Estados Unidos, Argentina, Perú, México, Sudan, Egipto, Noruega, España, Italia, Irán y las Filipinas. Es una enfermedad que ocasiona grandes pérdidas en la industria ovina y caprina. Las pérdidas económicas resultan de la muerte en algunos animales y otras por el decomiso de las canales infectadas. La enfermedad puede ocurrir también en ciervos, bovinos y de manera rara en humanos, llega afectar a roedores especialmente cuyos, también se sabe que ocurre en conejos domésticos y silvestres de Europa (Brogden, 1990; Jensen and Swifts, 1988; Jones, 1997; Ned, 1989; Smith, 1994; Sharma, 1997).

El agente causal de esta enfermedad es *Corynebacterium pseudotuberculosis*, bastón corto pleomórfico Gram (+), inmóvil sin cápsula, el cual no forma esporas, mide de 0.5 a 0.6 por 1.0 a 3.0  $\mu\text{m}$ , vive de manera natural en el suelo e intestinos, sobre la piel y en los órganos infectados especialmente nodos linfáticos. Puede sobrevivir por arriba de 20 semanas en las descargas de material purulento, en áreas de sombra ó cobertizos de tranquila. Las pruebas bioquímicas manifiestan producción de catalasa, ureasa, formación de ácido a partir de glucosa, maltosa, manosa y produce hidrólisis del almidón. En agar sangre produce beta-hemólisis, crece abundantemente en agar suero, donde produce colonias blanco amarillentas, opacas, secas, fragmentadas, arenosas o concéntricas (Cameron, 1970; Mc-Fadin, 1990; Smith, 1994)

De acuerdo al contenido lipídico de su pared celular al género *Corynebacterium* se le agrupa con los géneros *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus*, formando el grupo CMNR, debido a que los cuatro géneros tienen paredes celulares ricas en complejos lipídicos similares. La virulencia de las cepas de *Corynebacterium*, se relaciona con la cantidad de lípidos de su pared celular además de proporcionarle la habilidad de crecimiento intracelular. La remoción del lípido por extracción sucesiva con acetona, éter y alcohol no reduce la actividad del microorganismo al igual que no afecta su viabilidad. Los lípidos removidos con formalina, retienen su capacidad, para producir abscesos estériles en el cuye. El protoplasma derivado de dichas células no es tóxico, inversamente las células que son inactivadas con formol pierden su habilidad para causar abscesos subcutáneos, en tanto que su protoplasma permanece tóxico, entonces se deduce que aparte del lípido tóxico el *C. pseudotuberculosis*, contiene una toxina protoplasmática (Cameron, 1970; Morales, 1992).

La exotoxina es una fosfatidil colina-fosfato-hidrolasa, mejor conocida como fosfolipasa D. Esta exotoxina es una esfingomielinasa que cataliza la esfingomielina de los eritrocitos en ceramida y colina. Por otro lado también actúa sobre las células endoteliales aumentando la permeabilidad capilar, estructuralmente la exotoxina es una glicoproteína con una composición de aminoácidos; estimando su peso molecular entre los 14500 y 31000 Daltons, se localiza principalmente en el citoplasma de la célula bacteriana y en menor cantidad en la pared celular se obtiene de manera muy fácil del sobrenadante, cuando se cultiva en caldo nutritivo. Es estable en líquido inactivándose



en presencia de calor, almacenaje prolongado o con formalina. La fosfolipasa D de *C. pseudotuberculosis*, es similar a la toxina producida por la *Loxosceles reclusa* (araña reclusa) ambas son proteínas básicas con valor isoeléctrico similar, estimándose el peso molecular de la fosfolipasa D de la araña en 32000 y 34000 Daltons mientras que el de la enzima corinebacterial es cercano a los 31000. Tienen semejanza en la carga específica del substrato y la actividad biológica letal (Berheimer, 1985; Ned, 1989; Pirah, 1990; Morales, 1997; Berheimer, 1996).

De manera experimental, cuando es inoculada intravenosamente la fosfolipasa D es letal tanto para animales de laboratorio como para ovinos y caprinos en dosis altas y en dosis pequeñas cuando es inoculada intradérmicamente ocasiona eritema, edema y necrosis en cuyes y conejos. En los conejos existe una reacción más severa que en los ratones y las ratas. Las ovejas también sucumben a la inyección subcutánea de la toxina, pero se requieren altas dosis para producir lesiones similares a las de los cuyes. La toxina al ser inoculada subcutáneamente ocasiona la producción de antitoxina en los animales de laboratorio y ovinos (Doty, 1964; Jolly, 1965; Cameron, 1970; Morales, 1992).

En la Facultad de Medicina Veterinaria del Instituto Superior de Ciencias Agropecuarias, de Bayamo, La Habana, se realizó la obtención de la exotoxina de *Corynebacterium pseudotuberculosis* basada en la centrifugación, concentración y ultrafiltración, además de evaluaciones de la exotoxina y determinación de la actividad, concentración, pureza y la presencia de polipéptidos inmunoespecíficos. El ensayo de hemólisis sinérgica reveló que hubo actividad hasta en dilución de 1:128. Se utilizó una prueba de ELISA indirecta para realizar la curva de dosis respuesta, 1:500 fue la dilución óptima. La electroforesis en gel de poli(acrilamida) y la inmunotransferencia revelaron la presencia de las bandas inmunodominantes en la preparación (Ruiz, 1996).

La linfadenitis caseosa tiene dos formas de presentación, una superficial y una visceral, en la forma superficial los abscesos son comunes en la zona de entrada y posteriormente se establecen en los nodos linfáticos regionales, preferentemente preescapulares y prefemorales. La forma visceral se da de manera generalizada, preferencialmente en nodos linfáticos, ocurriendo la formación de abscesos en pulmones, hígado, riñón, cerebro y médula espinal. La secuencia de eventos, se inicia por la penetración de la bacteria, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, a través de una herida, este microorganismo alcanza los vasos linfáticos aferentes y gradualmente llega a los nodos linfáticos regionales donde continúa su crecimiento y multiplicación. En el tejido linfoide los leucocitos se aglomeran alrededor de la bacteria, especialmente los neutrófilos, mientras que los fibrocitos y los capilares forman la periferia de la infección. La producción de exotoxina del microorganismo, así como el factor piogénico termoestable leucotóxico y el lípido de superficie que lo cubre, lisan lenta pero continuamente a los leucocitos y al tejido al mismo tiempo que evitan la destrucción del mismo, antes y después de ser fagocitado. La lesión formada, consistirá en una masa central de tejido necrótico limitado por una gruesa pared de tejido conectivo y capilares. La bacteria sin control de la pared de tejido conectivo puede entrar a los capilares, donde forma colonias que ocluyen y trombosan los vasos, la isquemia resultante y la toxina destruyen las células de la parte interna de la pared de tejido conjuntivo, agregándose una nueva capa a la masa necrótica. Prolifera tejido conjuntivo nuevo reforzando la pared. Este proceso es repetitivo por lo que sucesivas capas se adicionan a la masa necrótica. El factor piogénico bacteriano contribuye a la formación

de lesiones locales, mientras que la barrera celular lipídica y la producción de la toxina se asocian con el mantenimiento del curso crónico de la enfermedad. La bacteria infectante puede escapar de las lesiones y extenderse vía linfática a lo largo de la cadena, a otros nódulos. Ocasionalmente entran a la sangre venosa dirigiéndose hacia los pulmones, donde pueden causar lesiones, al igual que en cualquier otro órgano invadido. En las lesiones de los nodos linfáticos periféricos, infectados, la pared del tejido conectivo puede romperse y descargar pus y bacterias al medio ambiente. La infección visceral extensa da lugar a la enfermedad crónica, que causa el síndrome de la oveja flaca y su asociado fracaso reproductivo (Harland, 1979; Jubb, 1982; Cottral, 1986; Mora, 1990; Bueno, 1993; Berheimer, 1996).

A la necropsia se comprueba la presencia de abscesos caseosos, repletos de pus amarillo verdoso, sobre todo en nodos linfáticos y en menor grado en órganos internos. En estados tempranos la pus es pastosa de consistencia semilíquida, mas tarde se endurece y seca adoptando un aspecto laminado característico. El diagnóstico de esta enfermedad se hace en base a las lesiones y al aislamiento de la bacteria. Se han llevado a cabo diversas pruebas serológicas para detectar la enfermedad pero ninguna ha sido ampliamente utilizada (Pijoan, 1986; Blood, 1992).

Los intentos para producir una vacuna contra la linfadenitis caseosa a dado pocos resultados. Por medio de la vacunación ha sido posible proteger a los animales contra los efectos de la toxina, sin que se limite mucho la propagación sistémica o la formación de abscesos. El control depende de eliminar la infección, seleccionando y descartando las ovejas que tienen linfadenopatía, preferentemente durante la esquila. También debe sumergirse en soluciones desinfectantes, antes de utilizarse, todo aquel instrumental usado para castraciones, corte de cola, esquila, etc. Y cuando se drenen abscesos de animales enfermos debe limpiarse y desinfectar el suelo en caso de contaminación (Pijoan, 1986; Blood, 1992).

La bacteria causal de la linfadenitis caseosa es sensible a un gran número de antimicrobianos, tales como cefalotina, dicloxacilina, ampicilina, sulfametoxazol-trimetoprim, cloranfenicol, amikacina, penicilina, eritromicina, gentamicina, todos ellos *in vitro*. Tiene sensibilidad intermedia a eritromicina, enroxacina, penicilina y desarrolla resistencia a enoxacina, metilmicina; pero como las lesiones en el animal son encapsuladas se dificulta la entrada por estas barreras por lo que se recomienda el tratamiento quirúrgico. En el tratamiento quirúrgico, se inciden los focos caseosos, a fin de eliminar el contenido el cual puede fluidificar con soluciones clorinadas o lugol. Ayuda al control del problema la eliminación ó aislamiento de los animales infectados (Burrel, 1981; Pijoan, 1986; Blood, 1992; Díaz, 1994).

El efecto de los antimicrobianos sobre cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* de aislamientos humanos a logrado probar la sensibilidad a eritromicina y penicilina (Judson, 1991).

En Israel se realizó un estudio clínico, epidemiológico en hatos bovinos infectados experimentalmente con *C. pseudotuberculosis*; los cuales se dividieron en dos grupos clasificados como A y B. El grupo A constó de 178 animales, los cuales se les trató con 20,000 U.I./ Kg. de penicilina G y el grupo B fué de 168 animales a los cuales se les dio un tratamiento con 10 mg / Kg. De amoxicilina administrandolo intramuscularmente,

ambos tratamientos se siguieron por 5 días consecutivos. Otro grupo de 199 animales, fueron tratados localmente, los abscesos se drenaron, se lavaron con isodine povidona y se rociaron con un repelente de moscas. Los resultados obtenidos fueron insatisfactorios, tanto para el tratamiento sistémico como para el tratamiento local. El aislamiento de los animales infectados y el control de las moscas previno la enfermedad evitando que se diseminara a otros hatos (Yeruham , 1997 )

En un trabajo realizado en Estados Unidos sobre pruebas de sensibilidad a antibióticos *in vitro*, se obtuvieron 71 aislamientos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* de cabras con signos de linfadenitis caseosa los cuales mostraron sensibilidad a ampicilina, cloranfenicol, eritromicina, gentamicina, penicilina y tetraciclina; siendo resistentes a estreptomycin nitrofuranos y colistina. Tabla 1.

**TABLA 1**

**RESULTADOS DE PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS EN 71 AISLAMIENTOS DE *Corynebacterium pseudotuberculosis***

| ANTIBIOTICO   | Cepas de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> |            |            |
|---------------|--|------------|------------|
|               | SENSIBLE   | INTERMEDIO | RESISTENTE |
| Ampicilina    | 71   | ----       | ----       |
| Cloranfenicol | 71   | ----       | ----       |
| Colistina     | ----   | 5          | 66         |
| Eritomicina   | 71   | ----       | ----       |
| Gentamicina   | 71   | ----       | ----       |
| Neomicina     | 61   | 5          | 5          |
| Nitrofuranos  | ----   | ----       | 71         |
| Penicilina    | 71   | ----       | ----       |
| Estreptomycin | ----   | ----       | 71         |
| Tetraciclina  | 71   | ----       | ----       |

Asfaq, (1979)

En un estudio realizado en Egipto, con 60 cepas de *C. pseudotuberculosis*, aisladas de ovejas, se concluyó que la mayoría de estas fueron sensibles *in vitro* a clortetraciclina, seguida por oxitetraciclina y penicilina lo mismo ocurrió con la oleandomicina plus y tetraciclina, pero no con la estreptomomicina ó el cloranfenicol. Cuando el tratamiento se llevó a cabo *in vivo*, con animales infectados la clortetraciclina, oxitetraciclina y penicilina dieron resultados similares (Nadim , 1973).

En México, se realizó un trabajo con 50 cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* aisladas de ovejas clínicamente enfermas para evaluar la sensibilidad de antibióticos *in vitro* a través de la prueba de difusión Kirby-Bauer obteniendo lo siguiente; el 100 % de las cepas mostraron sensibilidad a cefalotina, 98 % a dicloxacilina y ceftriaxona , 94 % a ampicilina , 88 % a la combinación sulfametoxazol-trimetoprim, 82 % a cloramfenicol, 80 % a amikacina, 66 % a penicilina, 38 % a netilmicina , 14 % a eritromicina , 6 % enoxacina y 4 % a gentamicina. La sensibilidad intermedia se manifestó como un 60 % a eritromicina , 42 % a enoxacina, 28 % a penicilina , 22 % a netilmicina , 18 % a cloranfenicol , 14 % a gentamicina , 12 % a amikacina y la combinación sulfametoxazol - trimetoprim, 6 % a ampicilina y 2 % ceftriaxona y dicloxacilina . El 82 % fueron resistentes a gentamicina , 52 % a enoxacina , 40 % a netilmicina , 26 % a eritromicina , 8 % a amikacina y 6 % a penicilina (Díaz, 1993 ).

Recientes resultados en el tratamiento de neumonías causadas por *Rhodococcus equi*, con una combinación de eritromicina y rifampicina incrementa el interés en el tratamiento médico de valor para cabras y ovejas. Los datos de la farmacocinética derivan de otras especies sugiriendo que una dosis de rifampicina dos veces al día, puede ser apropiada. Una posible dosis de eritromicina es 4 mg/Kg. administrado intramuscularmente o subcutáneamente, como la eritromicina es altamente irritante, una combinación rifampicina-penicilina puede ser preferible. El tratamiento se continua por 4-6 semanas. Los reportes de la eficacia de la rifampicina en cabras con linfadenitis caseosa todavía no estan disponibles (Smith, 1994).

Se han utilizado tratamientos empíricos basados en el agente etiológico, que son utilizados como parámetros de tratamiento en forma general pero requieren de una investigación mas profunda. Tabla 2

TABLA 2

DROGAS ANTIMICROBIANAS UTILIZADAS COMUNMENTE CONTRA  
*Corynebacterium pseudotuberculosis*

| ANTIMICROBIANO             | EFEECTO         | MODO DE ACCIÓN                              |
|----------------------------|-----------------|---|
| Sulfonamidas               | Bacteriostático | Inhibición competitiva                      |
| Penicilina natural         | Bactericida     | Inhibición de la pared celular              |
| Penicilina G y V           |                 |   |
| Penicilinas semisintéticas | Bactericidas    | Inhibición de la pared celular              |
| Ampicilina                 |                 |   |
| Meticilina                 |                 |   |
| Oxacilina                  |                 |   |
| Gentamicina                | Bactericida     | Inhibición de la síntesis de proteínas 30 S |
| Cloramfenicol              | Bacteriostático | Inhibición de la síntesis de proteínas 50 S |
| Eritromicina               | Bacteriostático | Inhibición de la síntesis de proteínas 50 S |

( Prescott, 1991)

**MECANISMOS DE RESISTENCIA**

Desde los inicios de la terapia antibiótica los científicos se dieron cuenta, que las especies bacterianas sensibles normalmente pueden llegar a ser resistentes a los antibióticos. Para comprender lo que pasa se debe conocer la naturaleza de la resistencia. Así, podemos mencionar la existencia de una resistencia natural en la cual las bacterias carecen de la estructura o mecanismo celular necesario para que los agentes antimicrobianos ejerzan su acción. Otro tipo de resistencia es, la adquirida, de la cual mencionamos como primer mecanismo, las mutaciones que ocurren en el ribosoma bacteriano, que se transfieren en sentido vertical, por selección a las células hijas, en las cuales pueden alterarse la estructura del microorganismo no permitiendo que se una el antibiótico. Como segundo mecanismo, tenemos la adquisición de un código genético, a través de un intercambio en los cuales existe la formación de enzimas inactivadoras de antibiótico, tal como la penicilinas, cloranfenicol acetilasa, estreptomycin fosfotransferasa, etc.. Dicho fenómeno se adquiere por una transferencia genética (transferencia vertical) de los determinantes de resistencia de una célula donante a una receptor. Estos genes son frecuentemente transportados sobre plásmidos y pueden ser transferidos entre las cepas bacterianas y especies relacionadas. Los plásmidos causantes estrechamente de la resistencia, son moléculas circulares extracromosómicas de DNA que tienen existencia autónoma en el citoplasma. Así, por ejemplo los plásmidos de resistencia de *Staphylococcus aureus* se clasifican en nueve grupos. Seis de ellos son: el pT181, plásmido de resistencia a tetraciclinas, el pS194 plásmido de resistencia a la estreptomycin y los plásmidos pC221, pC223, pCW7 de resistencia al cloranfenicol y el plásmido pUB112 con sistemas de replicación conocida (García, 1987; Ketchum, 1988; Novick, 1990; Talaro, 1993; Godman, 1996; Garcia, 1998).

Algunos antibióticos interfieren con la síntesis del péptidoglican. Las penicilinas y las cefalosporinas, antibióticos Beta-lactámicos, inhiben la reacción de transpeptidación, sin embargo las bacterias gram positivas se ven más afectadas por la penicilina que las bacterias gram negativas, ya que para llegar a la capa del péptidoglican debe penetrar primero la espesa capa de lipopolisacáridos y otros componentes de la membrana externa, así por ejemplo es lo que ocurre con *Escherichia coli* y la penicilina (Gottschalk, 1988; Prasad, 1997).

El intercambio genético llevado a cabo en la resistencia adquirida puede efectuarse a través de tres mecanismos:

**1) Conjugación.** Este mecanismo es predominantemente utilizado por bacterias gram negativas, para la transferencia de plásmidos R. En el una célula bacteriana resistente, actúa como célula macho (F- o R) y transmite la información genética a otra célula bacteriana que actúa como hembra (F+ o S). El contacto entre las dos células se lleva a cabo mediante la estructura denominada pili ó pelo sexual, que es un puente proteico, filamentosos, hueco, de la célula macho. La síntesis del pelo sexual es codificada por genes presentes en el plásmido, existiendo además en este último genes responsables de la autoduplicación así como los genes responsables de la resistencia, los cuales generalmente forman parte de entidades genéticas definidas, conocidas como transposones, los cuales cuentan con las llamadas "secuencias de inserción" (SI), que les permiten insertarse en la secuencia de DNA por recombinación legítima, independientemente de la homología en las secuencias nucleótidas de ambos fragmentos recombinantes. Los genes de resistencia generalmente codifican para enzimas inactivadoras de antibióticos, aunque algunas veces los mecanismos son diferentes (Godman, 1996, García, 1998).

**2) Transducción:** En este mecanismo la transferencia de material genético se lleva a cabo mediante fagos ó bacteriófagos, que se produce como resultado de la infección de una célula bacteriana con una partícula viral que contiene DNA bacteriano. El DNA infeccioso puede ser insertado al genoma bacteriano y enseguida se replica con el DNA bacteriano huésped. Si el DNA codifica para proteínas puede conferir resistencia, a uno o más antibióticos a la célula bacteriana infectada (Braude, 1984; Godman, 1996).

**3) Transformación.** En esta se lleva a cabo una exposición bacteriana a un DNA aislado, de diferente especie, lo que da la posibilidad de que algunos fragmentos de DNA, entren a la célula viable y puedan ser incorporados al cromosoma. El proceso opera con una eficiencia relativamente baja y muchos DNA's extraños provienen de cepas con las cuales tienen algo en común (Braude, 1984; Godman, 1996; García, 1998).

La *Leptospira*, por ejemplo es naturalmente susceptible a la estreptomycin, en concentraciones por arriba de 40 µg / ml, pero la resistencia puede ser inducida fácilmente en concentraciones mayores de 500 µg/ml en cultivos de crecimiento activamente densos subcultivándolos, dentro de un medio que contenga 50 µg/ml de estreptomycin, ocurriendo presumiblemente por procedimientos clásicos de un solo pase. Aunque la genética no se ha estudiado (Faine, 1994)

En estudios realizados con *Actinomyces pyogenes* (*Corynebacterium pyogenes*) se demuestran que el género ha desarrollado resistencia en contra de los antibióticos más utilizados en medicina veterinaria como penicilina y tetraciclina, a pesar de que en ocasiones el tratamiento no se pone en práctica, propiciando un menor contacto entre el medicamento y el microorganismo, reduciendo la probabilidad de desarrollar una resistencia (Chirino, 1983; Hodges, 1984).

Otros géneros estudiados, tales como el *Mycoplasma* y el *Staphylococcus*, nos demuestran que los mismos han desarrollado alta resistencia, *in vitro*, a diferentes antibióticos, tal es el caso por ejemplo de *Mycoplasma hyopneumoniae*, que presenta resistencia alta a oxitetraciclina y tilosina, y de *Mycoplasma bovis* que es altamente resistente a la eritromicina. El *Staphylococcus* por su parte produce Beta-lactamasas, que le hacen altamente resistente a las penicilinas pero además también ha generado alta resistencia *in vitro*, a antibióticos tales como: la estreptomomicina y el cotrimoxazole (Madariaga, 1979; Hanann, 1997; Sharma, 1997)

Existen varios métodos microbiológicos que se utilizan en el laboratorio para estimar *in vitro* la susceptibilidad o la resistencia de una cepa bacteriana a los antimicrobianos en su concentración más baja; estos consisten en la inoculación del material sospechoso en un medio de cultivo que contiene diversas diluciones de medicamentos antimicrobianos en su concentración más baja, el crecimiento inhibido de una bacteria se expresa como sensibilidad. (Stokes, 1975; Jarvis, 1976).

La sensibilidad bacteriana *in vitro* a diferentes antimicrobianos, se puede determinar mediante diferentes técnicas de las cuales mencionaremos algunas.

Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de difusión en agar para bacterias aerobias.

**1.- Método de Kirby-Bauer.** También conocido como método de sensidisco ó multidisco. Este, utiliza multidiscos impregnados de diferentes antimicrobianos a una determinada concentración y correlaciona el tamaño de la zona de inhibición con la susceptibilidad clínica del microorganismo frente al antibiótico. Se trata de una prueba cuantitativa, ya que su interpretación se basa en los diámetros de la zona de inhibición y se relaciona de manera directa con las concentraciones inhibitoras mínimas. Este procedimiento, solo se efectúa con bacterias patógenas de rápido desarrollo más comunes como *Staphylococcus aureus*, enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa*. No se utiliza en microorganismos de desarrollo lento y engorroso y tampoco para anaerobios. Por otro lado los resultados de esta prueba no son válidos si los cultivos no son puros. Si dentro de la zona aparecieran colonias debe verificarse la pureza del cultivo y repetir la prueba de susceptibilidad y si a pesar de ello las colonias persisten, se considera que existe desarrollo y se interpretará como tal (Balows, 1988; Talaro, 1993; Quin, 1996).

**2.- Método de superposición en agar.** Es empleado para bacterias de crecimiento rápido y no puede utilizarse en aquellos casos en los cuales se agregue sangre. A partir de cultivos primarios se aíslan en caldo BHI, de 4-5 colonias y se incuban 4-6 horas de 35-37° C obteniendo una solución turbia. Posteriormente con una asa calibrada de 0.001 se toma una muestra del cultivo en caldo y se disemina en una cubierta que contiene 9 ml de solución acuosa al 1.5 % de agar a 42 °C mezclando por inversión, luego se vierten sobre la superficie entibiada de una placa de agar Mueller Hinton, se espera a que solidifique y se colocan los discos sobre la superficie, incubando a 37 °C 16-18 horas. Después se miden con Vernier las zonas de inhibición (Balows, 1988; García, 1998).

**3.- Método de placa con Zanjas.** Es un método satisfactorio cuando se desean probar numerosos microorganismos. Se utilizan como control el *Staphylococcus* Oxford, para compararlo en sensibilidad con todos los microorganismos gram positivos a probar y a la *Escherichia coli* (N.C.T.C 10,418) para compararla con todos los gram negativos. Las placas deben prepararse diariamente además de que algunos microorganismos pueden ser resistentes a antibióticos cuando sus zonas son menores que las de los microorganismos control y al contrario ningún microorganismo se considera sensible cuando en realidad es resistente, a lo que sucede con los métodos de disco cuando se usan incorrectamente. Este método consiste en retirar una tira de agar sangre de la placa mediante un cortador estándar estéril, reemplazando la hondonada resultante con agar sangre que contiene antibiótico. Se deja solidificar y se siembra con estrias perpendiculares al surco con los microorganismos de prueba previamente preparados. Se pueden hacer cinco pruebas en cada placa, incluyendo el testigo. Las placas inoculadas se incuban a 37 ° C durante 12 horas y se leen. También se utilizan tiras de papel filtro impregnadas con antibiótico para substituir las tiras de agar sangre (Bryan, 1976; García, 1998).

**4.- Método de Difusión Stockes.** En este se utilizan como microorganismos controles el *Staphylococcus aureus* y *E. coli*, para compararlos con la cepa problema. En este método debe agregarse sangre al medio y la base debe ser altamente nutritiva, ya que un medio pobre en nutrientes puede aumentar artificialmente el tamaño de la zona de inhibición por razón inversa a la velocidad de desarrollo de las colonias. Los cultivos control pueden prepararse tomando 3 gotas del cultivo de *E. coli* o de *Staphylococcus* y se diluyen en 2 ml de caldo. La placa se divide en 3 partes, quedando sembrado el microorganismo problema (previamente identificado y aislado) en forma uniforme, en banda que atraviesa la mitad de la placa de agar sangre. Y el control se siembra a ambos lados de la banda referida. Se colocan 4 discos de manera que involucren ambas zonas del inóculo la del microorganismo control y la del microorganismo problema. La lectura de resultados varía en ocasiones hasta de 2 mm el microorganismo control del problema, por lo tanto los resultados se registran de la manera siguiente: el inóculo es equivalente y sensible a controles con zonas de 10-15 mm de radio. Serán sensibles, cuando el radio de la zona es igual, mayor o menor de 2 mm que el control. Moderadamente sensitivas, cuando el radio de la zona de inhibición es más pequeño por 2 mm o más que la zona de control. Y resistente cuando no hay zona de inhibición (Bryan, 1976; García, 1998)

**5.- Método de turbidimetría en tubo.** Este se basa en la inhibición del crecimiento de un cultivo microbiano en una solución uniforme de antibiótico, en un medio fluido que



favorece su desarrollo rápido. Con la cinética de la acción bactericida y con la lectura de densidad óptica ó nefelometría este método utiliza la habilidad de dispersión de la luz a través de la turbidez del caldo y puede detectar pequeños cambios en el crecimiento (García, 1998).

**6.- Método cilindro-placa ó de placa.** Este consiste en la difusión del antibiótico por un cilindro vertical a una capa de agar solidificado en una caja de petri hasta una extensión tal que el crecimiento del microorganismo adicionado se impide completamente en una área circular o zona alrededor del cilindro que contiene una solución de la sustancia antimicrobiana, utilizando para esto el agar Mueller Hinton como medio de difusión (Stryer, 1990).

**7.- Método de dilución en tubo.** En este método se utiliza una serie de tubos que contienen medio de cultivo, cultivados adecuadamente de acuerdo al Estandar Nefelómetro de Mcfarland. A estos tubos se les pondrán cantidades crecientes del antibiótico a probar, que van de 0.0, 0.06, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0 microgramos y se incuban a 37 °C por 48 horas. Observándose la concentración mínima inhibitoria que es la dilución más baja capaz de inhibir el crecimiento de un determinado microorganismo y se expresa en microgramos (García, 1998).

Así como es de importancia conocer la sensibilidad bacteriana a ciertos antimicrobianos, debe conocerse también la concentración adecuada que produce el efecto deseado, a lo que se conoce como concentración mínima inhibitoria (MIC), lo que ayuda además a determinar el incremento o el decremento en la sensibilidad a determinados antimicrobianos (Biberstein, 1990).

Las dosis del antimicrobiano, su selección, el tiempo de exposición, los niveles séricos y el poder de penetración son otros factores adicionales que deben considerarse también al utilizar un antimicrobiano (Martín, 1983)

## OBJETIVOS

### Objetivo general.

Evaluar la sensibilidad a diferentes antibióticos en cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* aisladas a partir de nodos linfáticos abscedados.

### Objetivos particulares.

1. Aislamiento e identificación bioquímica de cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, a partir de muestras obtenidas de cabras con Linfadenitis caseosa que llegaron para sacrificio al rastro de Tlalnepantla, Edo. de México,
2. Realización de la prueba de sensibilidad a antimicrobianos por el método de antibiograma.

## MATERIAL

### A) Técnica de Antibiograma.

Los antibióticos que se usaron están contenidos en multidiscos combinados de uso comercial elaborados por los laboratorios SANOFI por lo que su elección y concentración está bajo su control

TABLA 3

#### SITIO DE ACCION Y CONCENTRACION DE LOS ANTIBIOTICOS DE ACUERDO A LABORATORIOS SANOFI

| ANTIBIÓTICO                          | SITIO DE ACCIÓN | CONCENTRACIÓN |
|--------------------------------------|-----------------|---------------|
| Penicilina (PE)                      | Pared celular   | 10 u          |
| Cefalotina (CF)                      | Pared celular   | 30 mcg        |
| Eritromicina (E)                     | 50 s ribosomal  | 15 mcg        |
| Ampicilina (AM)                      | Pared celular   | 10 mcg        |
| Trimetoprima- Sulfametoxazol (S X T) | Bases púricas   | 25 mcg        |
| Cefotaxima (CTX)                     | Pared celular   | 30 mcg        |
| Cefuroxima (CXM)                     | Pared celular   | 30 mcg        |
| Pefloxacina (PEF)                    | DNA girasa      | 5 mcg         |
| Gentamicina (GE)                     | 30s ribosomal   | 10 mcg        |
| Tetraciclina (TE)                    | 30s ribosomal   | 30 mcg        |
| Ceftazidima (CAZ)                    | Pared celular   | 30 mcg        |
| Dicloxacilina (DC)                   | Pared celular   | 1 mcg         |

### B) Cristalería.

- Tubos de ensaye estériles de 5 ml.
- Cajas de Petri de 15 cm. estériles.
- Matraz Erlenmeyer 500 ml.
- Probetas 500 ml.
- Vasos de precipitado.
- Pipetas graduadas.

### C) Biológico.

Cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, aisladas e identificadas en el laboratorio L-514 (anexo) de Microbiología Veterinaria de la F.E.S.Cuautitlán, UNAM, a partir de las muestras de cabras con linfadenitis caseosa.

### D) Medios de cultivo

- Agar sangre.
- Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI).
- .Mueller-Hinton.
- Caracterización bioquímica.

### E) Otros.

- Suero equino al 5 %.
- Agua destilada.
- Tren para tinción de Gram.
- Reactivos para identificación bacteriana.
- Pinzas de disección estériles.
- Hisopos estériles
- Estufa bacteriológica.
- Autoclave.
- .Mecheros Bunsen.
- Microscopio óptico.
- Calibrador Vernier.
- Nefelómetro de Mc Farland.
- Asas de inoculación.

## MÉTODO

### A) Identificación.

La identificación bacteriana se realizó a partir de las pruebas primarias y pruebas secundarias de acuerdo a García, 1980

### B) Preparación del agar Mueller-Hinton

Se pesó la cantidad necesaria para el número de cajas a sembrar, hidratando el medio y clarificándolo sobre un mechero. Posteriormente se esterilizó 121° C 15 minutos 15 libras de presión, se dejó enfriar (40 - 45 °C) y se le adicionó 5 % de suero equino estéril, virtiéndose en las cajas de Petri (25 ml aproximadamente) dentro de una zona de esterilidad, se dejó solidificar a temperatura ambiente, exponiéndolo por último a la prueba de esterilidad (incubar 37° C / 24 hrs.).

### C) Cultivo bacteriano

Se tomó con una asa, cultivo bacteriano puro y se inoculó en 2-3 ml de medio de caldo infusión -cerebro - corazón (BHI). Se le adicionó 0.3 ml de suero de equino estéril y se incubó a 37 ° C durante 48 horas. La turbidez se ajustó con caldo estéril hasta tener una densidad comparable con un estándar de sulfato de bario. Este estándar se preparó mezclando 0.5 ml de cloruro de bario con 99.5 ml de ácido sulfúrico al 1 % volumen / volumen ( v/v), que es la mitad de la densidad del estándar No. 1 de MacFarland. La turbidez ajustada presentó similitud con este estándar el cual corresponde aproximadamente a 100,000,000 de microorganismos por ml. La suspensión ajustada del inoculo no deberá permanecer mas de 15 - 20 minutos antes de sembrarla en la caja.

### D) Prueba de sensibilidad.

La sensibilidad se evaluó, empleando el método de Antibiograma, en el cual se utilizaron multidiscos comerciales impregnados con cantidades conocidas de antibióticos ( laboratorios SANOFI), mismos que se colocan en las superficies de las cajas de Petri inoculadas con los microorganismos a examinar. Los resultados se observan cuando el antimicrobiano difunde formando un gradiente de concentración inhibiendo el crecimiento bacteriano.

### E) Inoculación del agar Mueller-Hinton.

El agar se inoculó utilizando un hisopo estéril (figura 1), el cual fue humedecido en el cultivo bacteriano, quitando el exceso de caldo presionando y girando el hisopo sobre la pared interna del tubo, por arriba del nivel del caldo. Se estrió el medio en tres direcciones sobre la totalidad de la superficie del agar (figura 2), para obtener un inóculo uniforme. Efectuando un último barrido de l hisopo sobre el reborde de la caja de petri y el agar.

Una vez que el inóculo se secó (3-5 minutos), se procedió a colocar los discos impregnados con los antimicrobianos (figura 3), estos se toma con pinza de disección estéril y se colocan en el medio antes de 15 minutos de haber inoculado la placa. Los discos fueron presionados ligeramente para asegurar un contacto con la superficie. Para prevenir una superposición de las zonas de inhibición se distribuyeron adecuadamente los discos con un límite no menor de 15 mm de los bordes de la placa. Quince minutos después de haber colocado los discos se invirtieron las cajas de petri y se incubaron a 37 ° C durante 48 horas. (Bany, 1982).

## F) Interpretación de resultados

Para medir lo halos de inhibición se utilizó un calibrador Vernier por el fondo de la caja (figura 4), la cual se iluminó con luz reflejada. El punto final del sistema de lectura es una completa inhibición del crecimiento determinándolo visualmente, ignorando colonias tenues o muy pequeñas que pudieran observarse (Stanley, 1983).

Las cepas se clasificaron como resistentes (R), intermedias (I), o susceptibles (S), dependiendo del estándar de tablas conocidas. Los datos se analizaron y se estableció el número y porcentaje de cepas resistente, intermedias y susceptibles a cada agente antimicrobiano probado (Giono, 1983)

## TECNICA DEL ANTIBIOGRAMA

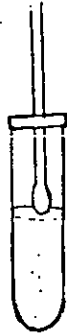


Fig. 1. Humedecer el hisopo en el cultivo bacteriano

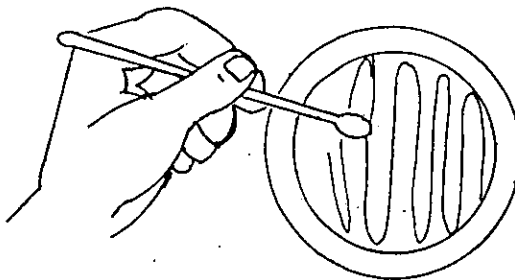


Fig. 2. Estriar el medio en tres direcciones

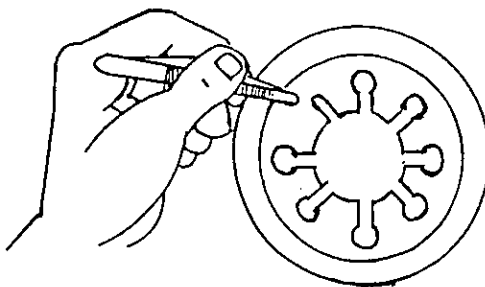


Fig. 3. Colocar el antibiograma con pinzas estériles

## INTERPRETACION DEL ANTIBIOGRAMA

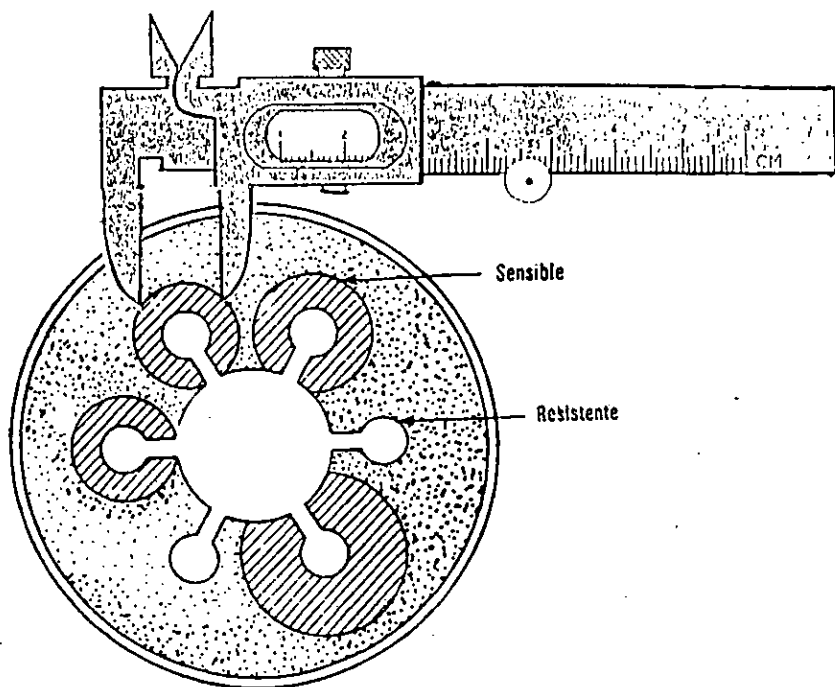


Fig. 4. Método para determinar las zonas de inhibición de crecimiento



## RESULTADOS

De acuerdo a los resultados obtenidos podemos observar que el porcentaje máximo de sensibilidad de las cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* a los antibióticos empleados, fué para las sulfas-trimetoprin seguida de la pefloxacina , tetraciclina y eritromicina, con 97 %, 91.4 %, 91.4 % y 88.5 %, respectivamente, un efecto similar se observó con la gentamicina, cefuroxima, cefalotina y cefotaxima, en las cuales resultaron un 68.5 %, 62.8 %, 62.8 % y 57.1 % de manera respectiva. Ver tabla 4 y 5, gráfica 1 y 2.

El mayor porcentaje de sensibilidad intermedia fué para la ampicilina con el 20 % de las cepas, le siguieron la penicilina con 14.2 % y la cefalotina con el 11.4 %. Ver tabla 5, gráfica 2.

Por el contrario las cepas se encontraron marcadamente resistentes a la dicloxacilina, frente a la cual 0 % de las cepas fueron sensibles, 0 % intermedias y el 100 % fueron resistentes, esta fué seguida por la ceftazidima en la cual hubo 5.7 % sensibles, 2.8 % intermedias y 91.4 % resistentes, seguida por las penicilinas en las cuales se presentó un 85.7 % de cepas resistentes, 14.2 % intermedias y 0 % sensibles. La cefotaxima presentó 34.2 % de cepas resistentes, la cefuroxima 28.5 %, la gentamicina 28.5 % y la cefalotina 25.7 %. Ver tabla 4 y 5, gráfica 1 y 2.

TABLA 4

NUMERO DE CEPAS SENSIBLES A LOS ANTIMICROBIANOS

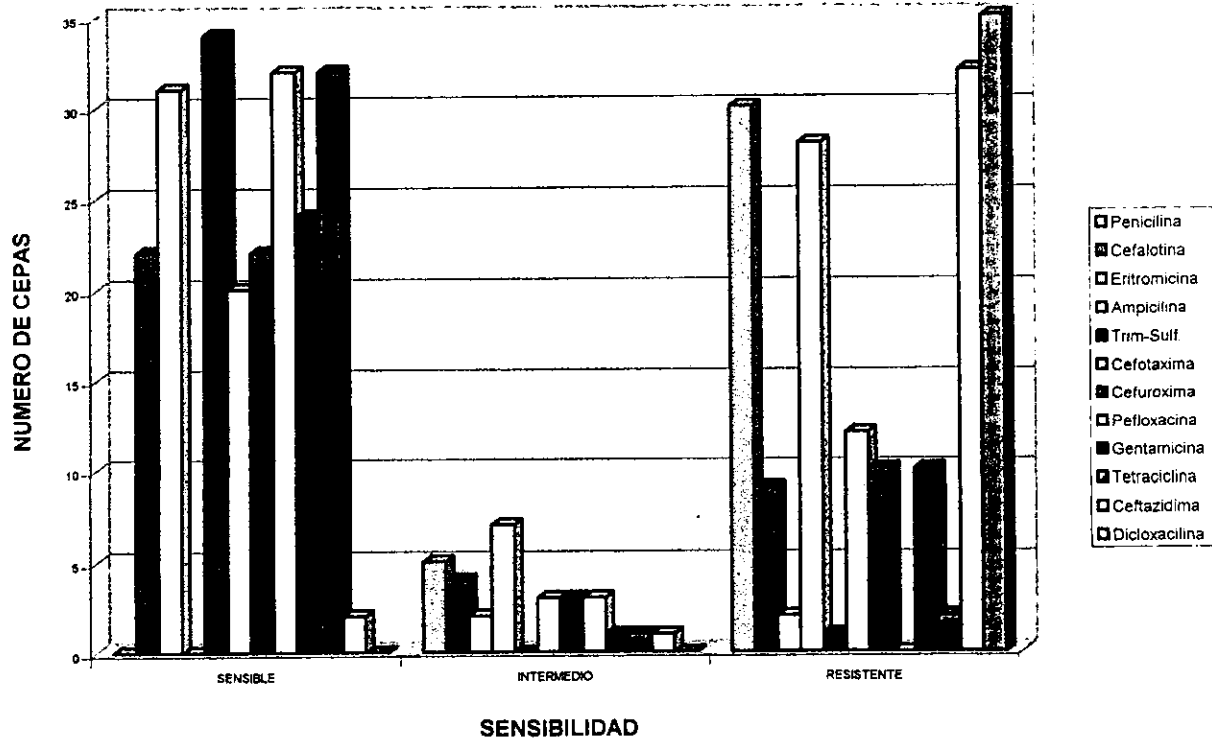
| ANTIBIOTICO   | SENSIBLE | INTERMEDIO | RESISTENTE |
|---------------|----------|------------|------------|
| Penicilina    | 0        | 5          | 30         |
| Cefalotina    | 22       | 4          | 9          |
| Eritromicina  | 31       | 2          | 2          |
| Ampicilina    | 0        | 7          | 28         |
| Trim-Sulf.    | 34       | 0          | 1          |
| Cefotaxima    | 20       | 3          | 12         |
| Cefuroxima    | 22       | 3          | 10         |
| Pefloxacina   | 32       | 3          | 0          |
| Gentamicina   | 24       | 1          | 10         |
| Tetraciclina  | 32       | 1          | 2          |
| Ceftazidima   | 2        | 1          | 32         |
| Dicloxacilina | 0        | 0          | 35         |

**TABLA 5**  
**PORCENTAJE DE SENSIBILIDAD DE LAS 35 CEPAS DE *C. pseudotuberculosis***  
**A LOS ANTIMICROBIANOS**

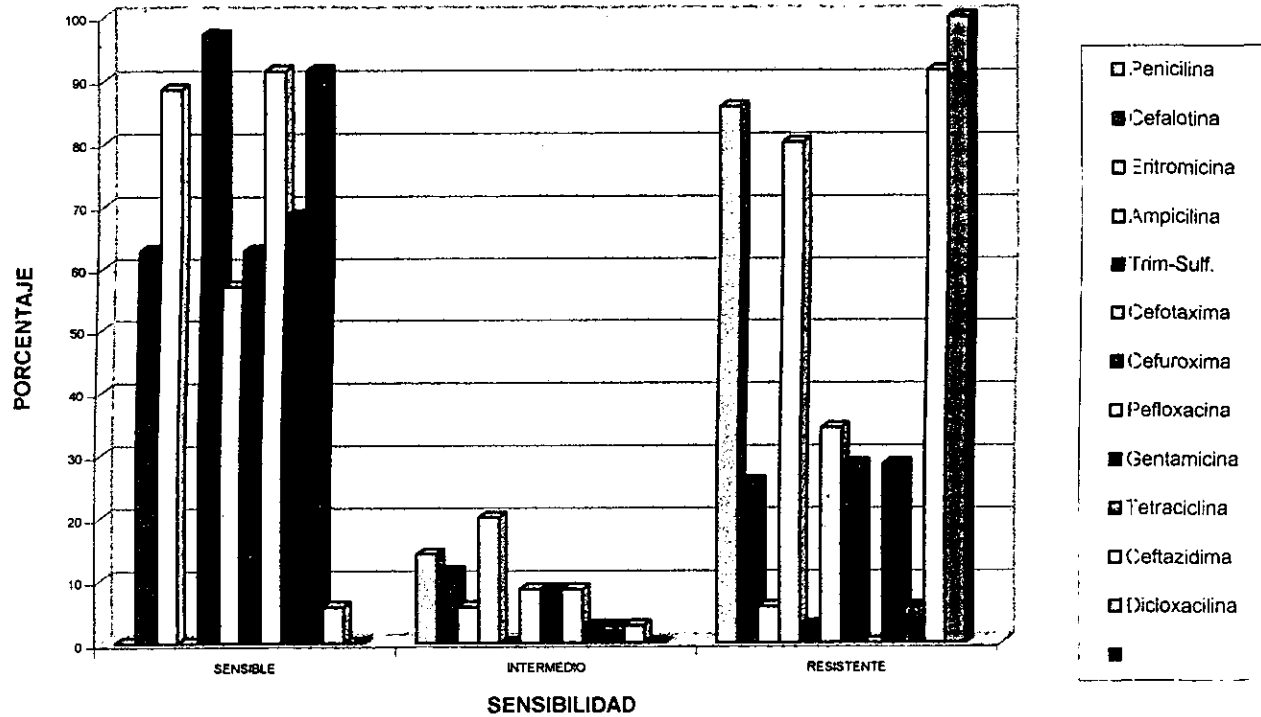
| ANTIBIOTICO   | SENSIBLE | INTERMEDIO | RESISTENTE |
|---------------|----------|------------|------------|
| Penicilina    | 0        | 14.2       | 85.7       |
| Cefalotina    | 62.8     | 11.4       | 25.7       |
| Eritromicina  | 88.5     | 5.7        | 5.7        |
| Ampicilina    | 0        | 20         | 80         |
| Trim-Sulf.    | 97.1     | 0          | 2.8        |
| Cefotaxima    | 57.1     | 8.5        | 34.2       |
| Cefuroxima    | 62.8     | 8.5        | 28.5       |
| Pefloxacina   | 91.4     | 8.5        | 0          |
| Gentamicina   | 68.5     | 2.8        | 28.5       |
| Tetraciclina  | 91.4     | 2.8        | 5.7        |
| Ceftazidima   | 5.7      | 2.8        | 91.4       |
| Dicloxacilina | 0        | 0          | 100        |

# GRAFICA 1

## NUMERO DE CEPAS SENSIBLES A LOS ANTIMICROBIANOS



PORCENTAJE DE SENSIBILIDAD DE LAS 35 CEPAS DE *C. pseudotuberculosis* A LOS ANTIMICROBIANOS



## DISCUSION

Uno de los trabajos para determinar la sensibilidad del microorganismo a diferentes antimicrobianos, se realizó aquí en México con 50 cepas aisladas de ovinos de diversas partes del Estado de México que presentaban signos clínicos de la enfermedad, y se demostró que la bacteria fué sensible a antibióticos tales como la cefalotina, dicloxacilina, ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol, cloranfenicol, amikacina, penicilina, eritromicina y gentamicina. Y resultaron resistentes a gentamicina, enoxacina y metilmicina (Díaz, 1993).

De acuerdo con estudios realizados en Estados Unidos a partir de cepas aisladas de cabras (Tabla 1), la sensibilidad de las cepas aisladas en ovinos aquí en México, varía mucho en cuanto a su respuesta a los antimicrobianos evaluados *in vitro* (Judson, 1991; Díaz, 1993)

En otros trabajos, realizados en Israel en los cuales se han implementado, tratamientos para animales infectados experimentalmente, los resultados han sido insatisfactorios. Estos han utilizado antibióticos tales como la penicilina G y la amoxicilina para tratamiento local y sistémico sin grandes resultados (Smith, 1994; Yeruham, 1997)

En este estudio, la sensibilidad que muestran las cepas aisladas a los antimicrobianos utilizados, es muy distinta a la reportada de las cepas provenientes de ovinos en el Estado de México. Los resultados concuerdan mas con los de las cepas aisladas de cabras en los Estados Unidos, en lo referente al trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclina y eritromicina, pero para la pefloxacina una quinolona con poco uso en medicina veterinaria no se encontraron reportes, sin embargo los trabajos con el género *Corynebacterium* en medicina humana realizados también en Estados Unidos, demuestran su sensibilidad a la misma quinolona (Asfaq, 1979; Goodman, 1996).

En las cefalosporinas, nuestros resultados muestran que el porcentaje de sensibilidad es mas bajo con respecto a las cepas aisladas en el Estado de México, tal es el caso de la cefalotina, cefuroxima y cefotaxima, sin embargo continúan siendo sensibles, en cambio la ceftazimida presentó un elevado grado de resistencia y su porcentaje de sensibilidad fué muy bajo.

En el caso de las penicilinas, los resultados concuerdan con los estudios realizados en Estados Unidos, se menciona como uno de los antibióticos más utilizados en medicina veterinaria, por lo que es probable que el género haya desarrollado gran resistencia al mismo (Chirino, 1983; Hodges, 1984).

En cuanto a la ampicilina y la dicloxacilina , los resultados no concuerdan con ninguna de las cepas aisladas en México y en Estados Unidos, ya que en los trabajos realizados en estos países la sensibilidad que demuestran las cepas para la ampicilina y la dicloxacilina es muy alta y para las cepas aisladas en nuestro estudio, la sensibilidad a la ampicilina es baja, mientras que todas las cepas son resistentes a la dicloxacilina.

Para la gentamicina, el resultado está mas de acuerdo con lo obtenido de las cepas aisladas de cabras en Estados Unidos, aunque su porcentaje de sensibilidad es mas bajo. El grado de resistencia que se muestra a este antimicrobiano es mas alto si se compara con el de las cepas extranjeras, esto podría deberse a que en muchos de los casos el uso indiscriminado de antimicrobianos en la producción animal propicia la generación de resistencia bacteriana, por un lado de manera directa cuando se forman cepas resistentes al mismo al tener contacto con el antibiótico y por otro lado a través del intercambio genético; para el *Corynebacterium pseudotuberculosis*, se ha demostrado la existencia de bacteriófagos que transmiten la resistencia contra aminoglicósidos.

## CONCLUSIONES

1. El porcentaje mas alto de sensibilidad que mostraron las cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en este estudio, fué para el Trimetoprim - Sulfametoxazol, Tetraciclina, Eritromicina, y Pefloxacina, con 97.1 %, 91.4 %, 91.4 % y 88.5 %, respectivamente.

2. Las cepas mostraron ser sensibles a la Gentamicina en un 68.5 %, a la Cefalotina 62.8 %, Cefuroxima 62.8 % y Cefotaxima 57.1 %.

3.- La sensibilidad intermedia mas alta fué para la Ampicilina con el 20 %, le siguio la Penicilina con 14.2 % y la Cefalotina con el 11.4 %.

4.- El 100 % de las cepas fueron resistentes a la dicloxacilina, el 91.45 % resistieron a la ceftazidima, el 85.5 % a la penicilina y el 80 % a la ampicilina.

5.- Por lo obtenido nos damos cuenta que las cepas de *C. pseudotuberculosis* aisladas y estudiadas en este trabajo, tuvieron resultados mas similares a las aisladas de cabras en Estados Unidos que a las aisladas de ovinos aquí en el Estado de México. Esto podría deberse a que las muestras trabajadas provenian de nodos linfáticos abscedados de cabras sacrificadas en el rastro de Tlalnepantla Estado de México y cuyo origen de las mismas, de acuerdo a informes de los inspectores de dicho rastro, fué el Estado de Texas.

6.- Los resultados también nos permiten deducir que probablemente dependiendo de la especie animal de la cual provengan las cepas de *C. pseudotuberculosis*, las características de sensibilidad a los antimicrobianos *in vitro* van a variar. Las cepas aisladas de cabras serán sensibles a un determinado grupo de antimicrobianos mientras que las de ovinos serán resistentes y viceversa algunas cepas caprinas serán resistentes a uno o varios antimicrobianos, en tanto que las aisladas de ovinos serán sensibles.

Por otro lado aunque en la práctica de campo se utilizan muy poco los aislamientos bacterianos con antibiograma, sería recomendable llevarlos a cabo en los hatos ovinos y/o caprinos si se detectan animales que presente abscesos con exudado purulento en los nodos linfáticos palpables, ya que nos permitira determinar el tipo de microorganismo que está presente y los antibióticos de mayor eficacia contra el mismo.



## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Asfaq, M.K. (1979) Caseous lymphadenitis. *Veterinary medicine & small animal clinical*. Vol. 74, No. 9 1161-1165
- 2.- Baiows, A., (1988) Pruebas de susceptibilidad a los antibióticos. Técnicas actualizadas Editorial Panamericana. pp 14-25.
- 3.- Barry, A. y Thornsberry C. (1982) Pruebas de susceptibilidad, procedimientos para pruebas de difusión . 3ª. Edición. E.D. Medica Panamericana, p.p.561-574.
- 4.- Bernheimer, W.A. (1985) Comparative toxinology of *Loxosceles reclusa* and *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Science*, Vol. 228, pp 590 y 591.
- 5.- Bernheimer, W.A. (1996) Some aspects of the history of membrana domagin toxins. *Journal Medical Microbiology and Immunology*, Vol. 185, pp 61.
- 6.- Biberstein, L.E (1990) Review of veterinary microbiology. Blackwell Scientific Publication. 1a. de. pp 56-68.
- 7.- Blood, D.C. (1992) Medicina Veterinaria. Interamericana Mc Graw-Hill, 7a. de. Vol. 1, pp 167- 627.
- 8.- Braude, A.E. (1984). Microbiología clínica. Editorial Panamericana S.A. p.p. 3-40.
- 9.- Bryant, M.C. (1982). Antibióticos y su control mediante el laboratorio. Capítulo 3 Quimioterapia y pruebas de laboratorio. Editorial el Manual Moderno S.A. México D.F. p.p. 47-81.
- 10.- Brogden, K.A. (1990) Alterations in the phospholipid composition and morphology of ovine erythrocytes after intravenous inoculation of *Corynebacterium pseudotuberculosis* *American Journal of veterinary Research* Vol. 51. No. 6, pp 874-877.
- 11.- Brogden, K.A. (1990) Effect of muramyl dipeptide on immunogenety on *Corynebacterium pseudotuberculosis* whole cell vaccine in mice and lambs. *Am J. Vet. Res.* Vol. 51, No 2, Febrero. pp 200-202.
- 12.- Bueno, S.P. (1993) Empleo de la prueba de inhibición de la hemólisis para el diagnóstico de la linfadenitis caseosa en rebaños caprinos de la costa chica de Guerrero, México. Tesis licenciatura F.E.S.C. UNAM.
- 13.- Burrell, D.H (1981) Caseous lymphadenitis in goats. *Australian Veterinary Journal*. Vol. 57 March. pp 105-110.
- 14.- Cameron, C.M. (1970) Relationship of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, protoplasmic toxins to the exotoxin. *Ondertspoort J. Vet. Res.* 37(2), 97-104.

- 15.- Chirino, J.M. (1983) Identification and antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria from pneumonic cattle lungs. *Can. J. Com. Med.* Vol. 47, pp 270-276.
- 16.- Cottral, G.E. (1986). Microbiología veterinaria. Cap. 48 *Corynebacterium*. La Prensa Médica Mexicana. 1a. edición. pp. 472-479.
- 17.- Das, S.C. and Khana P.N. (1995) Antibiogram of *Staphylococcus aureus* strains of animal and human origen. *Indian J. Anim.* 34 : 2, 105-108.
- 18.- Díaz, A.F. (1994) Evaluación de la sensibilidad a antimicrobianos de 50 cepas de *C. pseudotuberculosis*. Memorias XIV Congreso panamericano de ciencias veterinarias (PANVET).
- 19.- Diaz, A.F. (1993) Evaluación de la sensibilidad a antibióticos *in vitro* de 50 cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Tesis licenciatura, F.E.S.C. UNAM.
- 20.- Doty, R.B. (1964) Acomparision of toxin by various isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and development of sheep and goats. *Am. J. Vet. Res.* 25
- 21.- Faine, S. (1994) Leptospira and leptospirosis. Editorial CRC Press. Boca Raton Florida. pp 95
- 22.- García, D.E. (1987) Sensibilidad bacteriana a los antibióticos en problemas de infertilidad en vacas lecheras. Tesis licenciatura. F.E.S.C. UNAM
- 23.- García, V. S. (1980) Aislamiento y caracterización de corinebacterias en muestras de ovinos y caprinos en México . Tesis licenciatura M.V.Z., E.N.E.P. Cuautitlán U.N.A.M.
- 24 - García, V S y Trejo N.S. (1998) Memorias Curso de actualización en antibioterapia. La importancia del antibiograma en Medicina Veterinaria. pp 28-30. Resistencia bacteriana, pp 30-32. F.E.S.C. UNAM
- 25.- Giono, C.G. (1983) Prueba de Kirby-Bauer para sensibilidad a antimicrobianos. *Infectología III (7)*, pp 325.
- 26.- Godman, G.A. (1996) Las bases farmacológicas de la terapéutica. 9ª Edición. Vol II. Editorial Mc-Graw Hill Interamericana. México. pp 1116-1236.
- 27.- Gottschalk, G. (1988) Bacterial metabolism 2da. de. Editorial Springer-Verlag. Newyork pp 79.
- 28.- Hannan, P.C.T. (1997) In vitro susceptibilities of recente field isolates of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyosinoviae* to valnemulin (Econor ®), tiamulin and enrofloxacin and the *in vitro* development of resistance to certain antimicrobial agents in *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Research in Veterinary Science*, 63, 157-160

- 29.- Harland, W.R. (1979) Visceral caseous lymphadenitis in thin ewes isolation of *Corynebacterium*, *Staphylococcus* and *Moraxella spp.* from internal abscess in emaciated ewes. Am. J. Vet. Res. Vol. 40, No. 8, pp 1110 - 1113.
- 30.- Hernández, A.L (1991) Sensibilidad antimicrobiana y producción de B-lactamasa en *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus coagulasa* negativo aislados de mastitis bovina. Vet. Mex., XXII: 4, pp 290-294
- 31.- Hodges, R.T., Young G.W. (1984). Prevalence in *vitro* antimicrobial sensitivity of Bordetella. New Zeland Veterinary Journal, Vol. 42, pp 111-114.
- 32.- Jarvis, J.D. (1976) Bacteriología clínica básica. Editorial El manual moderno. pp 126-129.
- 33.- Jensen and Swifts (1988) Diseases of sheep. 3a. de. Editorial Lea & Febiger, Filadelfia. pp 374-377.
- 34.- Jolly, R.D. (1965) The patogenic action of exotoxin of *Corynebacterium ovis*. J. Com.Path. Vol. 75.
- 35.- Jones, C.T. (1997) Veterinary pathology. 6a. edición, Editorial Willians & Wilkins ( Sans-tache), pp. 479-481.
- 36.- Jubb, F.K. (1982). Patología de los animales domésticos . Tomo 1. Vol. 75. 1a. de. UPOME. p.p 440-442.
- 37.- Judson, R. (1991) Preliminary experimete for detection of penicillinase by enzyme-linked immunosorbent assay and western blotting technique. J. Vet. Med. Sci. 54 (2) pp 395-397.
- 38.- Kettchum, A.P. (1988) Microbiology concepts and appliccations. De. Jon Wiley and Sons. pp 506-508.
- 39.- Madariaga, A.O. y Alvarez L.J. (1979) Bacterias asociadas con la mastitis bovina en México, y su susceptibilidad a agentes quimioterapéuticos. Veterinaria Mex. 10, pp 213-219.
- 40.- McFadin, F.S. (1990) Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3a. de. Editorial Panamericana, pp 60-64.
- 41.- Martín, W.S. (1983) Antimicrobial use in feedlot calves: its association whit culture rates and antimicrobial susceptibility . Can. J. Com. Med. Vol. 47, pp. 6-10
- 42.- Mora, I. M.(1990) Prevalencia de linfadenitis caseosa en ovinos del centro ovino del programa de extensión agropecuaria, determinada mediante una prueba indirecta de ELISA. Tesis licenciatura, F.M.V.Z. UNAM.

- 43.- Morales S.J. (1992) Evaluación de un antisuero para la identificación de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Tesis licenciatura. F.E.S.C. UNAM.
- 44.- Nadim, M.A. and Farid A. (1973) Caseous lymphadenitis in sheep in Egypt. II. Bacteriological studies on the isolates *C. ovis* strains. III. Trials for treatment both **in vitro** and **vivo**. Journal of the Egyptian Veterinary Medical Association. No. 1/2, 19-32, 33-43; 1 table.
- 45.- Ned, B.E. (1989) Purification of the phospholipase D of *Corynebacterium pseudotuberculosis* by recycling isoelectric focusing. Am. J. Vet. Vol. 50, No. 8.
- 46.- Novick, P.R. (1990) Molecular biology of the **Staphylococci**. Editorial VCH Publisher, Inc. Newyork.
- 47.- Pijoan, P.J. (1986) Principales enfermedades de los ovinos y caprinos. F.E.S.C. UNAM pp. 235-238.
- 48.- Pirah, V. (1990) Development of a dot blot, assay serodiagnosis of caseous lymphadenitis usin a purified exotoxin as antigen. University of California. pp.71.
- 49.- Prasad, V. (1997) **In vitro** antibiogram studies of *Escherichia coli* in chickens. Indian Vet. J. Vol. 74, No. 7, pp 616-617.
- 50.- Prescott, J.F. (1991) Terapéutica antimicrobiana veterinaria. Editorial Acribia. España. pp. 19-33.
- 51.- Quin, P.J. and Carter M.E. (1996) Clinical Veterinary Microbiology. Editorial WOIFE.
- 52.- Ruiz, J.R. (1996) Obtención de la toxina de *Corynebacterium pseudotuberculosis* como antígeno para ensayos inmuno enzimáticos. Rev. Salud Anim. Vol. 18, No. 1pp. 17-22.
- 53.- Sharma, A.K. (1997) Pseudotuberculosis in a german angora rabbit. Indian Veterinary J. Vol. 74, pp 461-462
- 54.- Sharma, V. (1997) In vitro antibiotic sensitivity test for the mollicutes isolated from the buffalo genital trac. Indian Vet. J. 74, 618-619.
- 55.- Smith, M.C. (1994) Goat medicine. Lea & Febiger, U.S. pp 46-49.
- 56.- Stanley, S.R. (1983). Linc's medical laboratory technology. E.D. W.B. SAUNDER. U.S.A. pp 434 - 440
- 57.- Stokes, J. (1975) Clinical Bacteriology. 4a edición, Editorial Year Book. pp 208
- 58.- Stry, L. (1990). Bioquímica. 3ª. Edición, Ed. Reverté, S.A., Tomo 2, España. p.p. 739-740.

- 59.- Talaro, K. (1993). Foundations in microbiology. Editorial WM. C Brown Publishers. pp 310-320 .
- 60.- Yeruham, D.E. and Shpigel N.Y. ( 1997 ) *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in Israeli cattle: clinical an epidemiological studies. Veterinary Record140, 423-427.