



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTILÁN

Evaluación de la actividad antimicrobiana del propóleo  
sobre cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

## TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA  
PRESENTA:  
JUAN CARLOS CALLEJA CALDERÓN

Asesora: MVZ ME Susana Elvira García Vázquez

Coasesores: Dra. Amparo Londoño Orozco  
Dr. Tonatiuh A. Cruz Sánchez

Cuautitlán Izcalli, Edo. de México.

2012



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.

Este trabajo fué apoyado por los proyectos IT223811-3 Perspectivas del propóleo en la salud animal y Proyecto PACIVE-GVC-11.

Y se realizó en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán en las instalaciones del campo 4 en el laboratorio de Bacteriología L-514 de la Sección de Ciencias de la Salud Animal y el laboratorio 6 de Microbiología de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria.

## Índice.

1. Resumen	5
2. Introducción	6
2.1 Características de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	6
2.2 Desarrollo de la Linfadenitis Caseosa	7
2.3 Tratamiento	11
2.4 Prevención y control	12
2.5 Alternativas a los antibióticos	12
2.6 El propóleo	14
3. Objetivos	19
4. Hipótesis	19
5. Diseño experimental	20
6. Materiales y métodos	21
7. Resultados	22
8. Discusión	26
9. Conclusiones	27
10. Bibliografía.	28

## Índice de figuras y gráficas.

Figura 1. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> en tinción de Gram	6
Figura 2. Lesión clásica de Linfadenitis caseosa	8
Figura 3. Ruptura de las paredes de un absceso submandibular	9
Figura 4. Ovino afectado por la forma visceral	10
Figura 5. Necropsia realizada a ovino afectado por la forma visceral.	10
Figura 6. Propóleo secado para su corte y procesamiento.	25
Figura 7. Inhibición de las cepas a concentración de 1, 3 y 6 mg/ml	24
Figura 8. Inhibición de las cepas a concentración de 0,75, 0,50 y 0,25 mg/ml	25
Figura 9. Crecimiento de la cepa 7 en concentración de 0,25mg/ml	26
Gráfica 1. Representación gráfica de la actividad antimicrobiana del propóleo sobre las cepas de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	24

## Índice de cuadros.

Cuadro 1. Análisis de calidad del propóleo recolectado en el campo, según el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura.	14
Cuadro 2. Lugar de procedencia y tipos de vegetación predominante en las muestras de propóleo obtenidas de Campeche	15
Cuadro 3. Metabolitos obtenidos del tamizaje fotoquímico en propóleos de Campeche	15
Cuadro 4. Componentes del propóleo obtenido del apiario de FESC-UNAM	16
Cuadro 5. Concentraciones mínimas bactericidas de los propóleos de Campeche	17
Cuadro 6. Actividad bactericida del propóleo frente a otras sustancias naturales y desinfectantes.	18
Cuadro 7. Concentraciones de propóleo utilizados en cada caja de petri en contra de las cepas de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> .	22
Cuadro 8. Resultados de la inhibición de las cepas de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> frente a las diversas concentraciones de propóleo.	23

## 1. Resumen.

La Linfadenitis Caseosa es una enfermedad crónica difundida en la República Mexicana, que afecta a ovinos y caprinos, es producida por la bacteria *Corynebacterium pseudotuberculosis*; provocando la formación de abscesos en los linfonodos submandibulares y preescapulares que se encuentran repletos de exudado purulento, también se pueden ver involucrados otros linfonodos, los animales mas afectados presentan un adelgazamiento excesivo o también llamado caquexia; estos animales pueden consumir alimento de forma normal sin recuperar el peso perdido (Estevao y col. 2006).

Las bacterias al estar rodeadas de exudado purulento y de tener la capacidad de ser intracelulares facultativas, hace que los tratamientos antimicrobianos muestren poca efectividad, la enfermedad solo se trata de forma local a través de la debridación. El propóleo es un producto producido por las abejas formado por múltiples sustancias, en las que destacan los flavonoides que le confieren sus cualidades antimicrobianas (Kilic et. al, 2005).

En este trabajo se evaluó la actividad antimicrobiana del propóleo sobre cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, por medio de la técnica de dilución en agar, las cepas fueron obtenidas de ovinos con abscesos en los linfonodos submandibulares que fueron debridados y enviados al laboratorio de Bacteriología para su aislamiento e identificación, se seleccionaron 10 cepas de los aislamientos realizados (numeradas e identificadas del 1 al 10). El extracto etanólico de propóleo fué obtenido del apiario de la FES-Cuautitlán UNAM, de donde se extrajo una solución stock de 200 mg/0.5ml, posteriormente se hicieron diluciones a concentraciones de 6, 3, 1, 0.75, 0.50 y 0.25 mg/ml una vez realizado esto, se preparó agar PPLO al que se le adicionó la solución de propóleo y fue colocado en prueba de esterilidad, una vez listos los medios, se inocularon las cepas a concentración  $1 \times 10^8$  UFC/ml. En el grupo control se utilizaron cajas sin propóleo inoculadas con las cepas a la misma concentración, todas se incubaron a 37° C durante 48 horas. Pasado este tiempo, se observó que las cepas fueron inhibidas en su mayoría a excepción de la cepa 7 que logró crecer a una concentración de 0,25 mg/ml.

En conclusión se observó que *Corynebacterium pseudotuberculosis* es susceptible a la acción del propóleo, obteniendo que la concentración mínima inhibitoria es de 0.50 mg/ml, en donde no hubo desarrollo de colonias. Se necesitan mas pruebas para determinar la forma mas apropiada de dar el propóleo como tratamiento para la Linfadenitis caseosa.

## 2. Introducción.

El género *Corynebacterium* es un grupo de bacterias que incluyen especies, causantes de enfermedades en el hombre y los animales, antes se les denominaba con los siguientes términos: difteromorfo y corineforme, causando confusión debido a que algunas bacterias presentan similitudes de forma. El término corineforme aun es aceptado por muchos microbiólogos (Fernández, 2010).

Se han reportado 68 especies: 44 aisladas en humanos y 24 en animales en las que se encuentra *Corynebacterium pseudotuberculosis*, la primera descripción de la bacteria fue hecha por el médico veterinario francés Edmond Isidore Nocard en el año de 1888, reconociéndola como la causante de la linfangitis bovina, más tarde en Budapest, Hugo Von Preisz aisló un microorganismo similar a partir de un absceso renal de oveja, por lo que se le llamo como “bacilo de Preisz-Nocard”, nombrando también así a la enfermedad, posteriormente se le dio el nombre de *Corynebacterium ovis* y finalmente en la década de los 40`s se le dio el nombre oficial de *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Vadillo y col, 2002).

### 2.1 Características de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

Es un microorganismo Gram (+) en forma de bastón pequeño e irregular que mide 0,5 a 0,6 x 0,1 a 3,0  $\mu\text{m}$ , es aerobio facultativo y cuando se dividen las células se colocan en ángulos análogos a las letras chinas o también llamadas empalizadas (Fig.1), en sus paredes poseen una alta cantidad de lípidos, en especial el ácido micólico, que lo incluye dentro del grupo “CMNR”, que son las letras iniciales de los géneros: *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus*. Presentan gránulos metacromáticos en su citoplasma, en la prueba de catalasa da resultado positivo y negativo en prueba de oxidasa. Es un habitante normal del suelo y el agua, reside en la piel del hombre y los animales (Ruíz y col, 2007; Songer and Post, 2005).

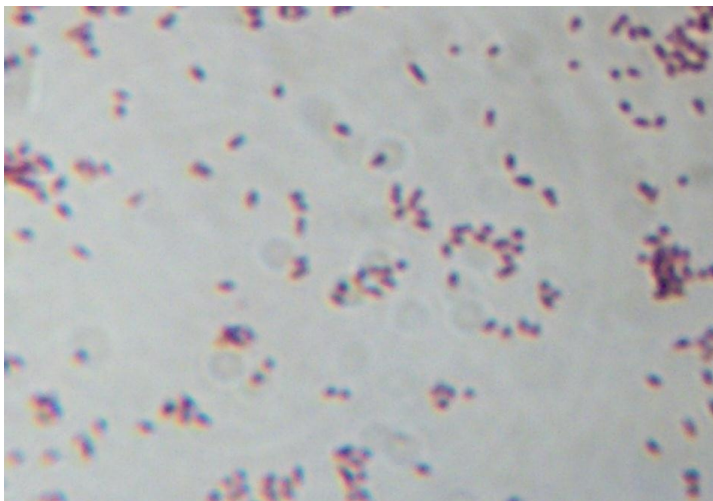


Fig. 1 *Corynebacterium pseudotuberculosis* en tinción de Gram, se observa la coloración morada de la bacteria y su forma de bastón corto agrupados en forma de letras chinas, tomada del Laboratorio de Bacteriología FES-Cuautitlán UNAM.

Para su aislamiento en el laboratorio, la bacteria se cultiva en agar sangre a 37° C durante 48 horas, observándose colonias opacas, convexas con la superficie mate, frecuentemente presenta una zona de  $\beta$ -hemólisis alrededor de la colonia, para obtener un medio más selectivo, se le adiciona telurito de potasio a la sangre, en donde se observan colonias negras. En medios líquidos como el caldo PPLO y el caldo BHI (infusión cerebro-corazón) presentan un crecimiento abundante con turbidez y un sedimento blanco amarillento, se pueden usar medios selectivos con fosfomicina o furoxona y medios con sulfato de colistina o ácido nalidíxico para inhibir el crecimiento de bacterias gram negativas. En cuanto a sus características bioquímicas, da resultados muy variados entre cepas, siendo más evidentes en la utilización de azúcares, se ha observado que la mayoría de las cepas aisladas se reportan negativas a la fermentación de arabinosa, galactosa, inositol, lactosa y manitol, mientras que a manosa, maltosa presentan resultado positivo, hidrolizan la urea. En la prueba de nitratos, se ha observado que algunas cepas los reducen y otras no, de acuerdo a la especie animal de donde fué aislada, se encontró que las cepas que reducen los nitratos fueron obtenidas de equinos y bovinos, conociéndose como *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovariedad *equi*, las negativas fueron más comunes en ovinos y caprinos, por lo que se les designó como *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovariedad *ovis*. En base a estas características se han desarrollado sistemas comerciales, como el API Coryne TM V2.0 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia), cuya base de datos identifica 49 especies, tiene un 90% de confiabilidad ya que en las pruebas de identificación reconoció bien las especies del género sin necesidad de pruebas complementarias (Fernández, 2010).

Entre los antígenos más importantes de la bacteria se encuentran los ácidos micólicos (corinemicólico y corinemicolénico) y una exotoxina conocida como fosfolipasa D, también llamada fosfatidilcolina fosfatidil hidrolasa compuesta de una glicoproteína muy estable y de alto peso molecular, tiene la función de catalizar fosfolípidos siendo un factor importante para el desarrollo de la patogenicidad de la enfermedad (Manning et.al, 2007).

## 2.2 Desarrollo de la Linfadenitis Caseosa.

*Corynebacterium pseudotuberculosis* es el agente causal de la Linfadenitis Caseosa, una enfermedad de distribución mundial, en México se le conoce con los nombres de "Lobanillo" y "Orejones", afecta principalmente a ovinos y caprinos provocando pérdidas económicas a los productores y está caracterizada por la formación de lesiones caseosas y purulentas inicialmente en los linfonodos superficiales. La principal fuente de infección es a través de las heridas producidas por las prácticas de manejo (esquila, vacunación, corte de cola) usando material que estuvo en contacto con el exudado purulento de otros animales infectados. Las cabras y ovejas de cualquier edad son susceptibles al contagio; también se ha observado que la vía oral es otra fuente de infección siempre y cuando haya heridas en la cavidad oral. Tiene un período de incubación bastante prolongado, que va de los 4 a los 6 meses en ambas especies, por lo que es común ver signos clínicos en animales cercanos o mayores a un año, la enfermedad tiene dos presentaciones, típica y atípica, esta última también llamada forma visceral (Estevao y col, 2006; Quinn et.al, 2002).



La pared celular es fundamental para la supervivencia del agente frente al sistema inmune del hospedero, En los macrófagos, se ha observado que al momento de fagocitar a *Corynebacterium pseudotuberculosis*, se bloquea la unión del fagosoma con el lisosoma; la bacteria puede liberarse mientras la célula se degenera y muere; algunas otras pueden mantenerse dentro del macrófago cuando este migra hacia los linfonodos más cercanos al sitio de infección, por lo tanto, también se le considera como una bacteria intracelular facultativa, el ácido micólico tiene efecto citotóxico al inducir una mayor degeneración de células leucocitarias (Gyles et.al., 2010).

La exotoxina o fosfolipasa D se encuentra presente dentro del citoplasma y en pequeñas cantidades en la pared celular, en medios líquidos se han obtenido grandes cantidades; por si sola es capaz de producir lesiones dermonecroticas al momento de ser inoculada en animales de laboratorio, dentro del organismo, la toxina afecta la esfingomielina de las membranas celulares de los endotelios vasculares de los vasos sanguíneos y linfáticos, la desestabilización de las membranas provoca lisis celular, incrementando la permeabilidad vascular, con la consecuente formación de edemas y facilitando la colonización regional junto con la diseminación sistémica en el huésped. Otros efectos de la toxina incluyen la inhibición de la quimiotaxis de los neutrófilos, la degranulación de los granulocitos, activa la vía alterna del complemento provocando trombosis de los vasos y con ellos necrosis, por lo que favorece la multiplicación y sobrevivencia de los microorganismos; la acumulación de desechos celulares comienza a atraer fibrocitos que rodean la lesión para tratar de controlarla, algunas bacterias logran escapar de la pared de fibrina e invadir el tejido sano del linfonodo, iniciando de nuevo el cuadro, agregando una capa más de masa necrótica y de tejido fibroso, formándose la lesión característica de la enfermedad que es el absceso (Fig. 2) con laminaciones concéntricas que comúnmente se denominan en “aspecto de cebolla” (Matthews, 2009, Suleiman y col, 2006, Pugh, 2002).



Fig. 2. Lesión clásica de Linfadenitis caseosa. Absceso en el linfonodo retrofaringeo (círculo) de un caprino Toggenburg mayor de un año de Tequisquiapan Querétaro.

Se han analizado las poblaciones de linfocitos T y B, así como las concentraciones de IgG de animales sanos y enfermos; las cantidades de linfocitos T en animales enfermos, eran menores que en animales sanos, mientras que las concentraciones de linfocitos B se encontraban iguales en ambos casos, los anticuerpos del tipo IgG se encontraban en mayor cantidad en los animales enfermos, por lo que se considera que la inmunidad humoral tiene mayor actividad, esto se confirmó después al revisar los niveles de proteínas plasmáticas, donde se encontraron altos niveles de  $\text{INF-}\gamma$ , IL 4,  $\text{TNF-}\alpha$ . Las bacterias que logran salir del linfonodo afectado, migran a los vasos eferentes, viajando por la linfa a los otros linfonodos y finalmente pasan a órganos como los pulmones, bazo, hígado y riñones dando origen a la forma visceral, no siempre es necesaria la presencia de los grandes abscesos para la aparición de la forma visceral (Ruiz y col, 2007).

Los ovinos y caprinos se observan con los linfonodos aumentados de tamaño, en cabras se afectan los parotídeos, en cambio en ovinos los linfonodos precurales se muestran dañados, en ambas especies los preescapulares son siempre afectados. En la forma visceral se observa a los animales con pérdida progresiva de peso hasta la caquexia (fig. 4), se considera a ésta enfermedad parte del síndrome de la oveja flaca, los animales no presentan fiebre y se alimentan de forma normal, pueden llegar a desarrollar procesos neumónicos debido a la formación de los abscesos en los pulmones, otros signos clínicos descritos son retrasos en la ganancia de peso (Estevao y col, 2006).



Fig. 3. Ruptura de las paredes de un absceso submandibular de un ovino, parte del exudado purulento ha sido drenado, la mayor concentración se encuentra aún contenida dentro del linfonodo, Villa del Carbón Edo. de México.

A la palpación, estos abscesos son indoloros; cuando se encuentran repletos de exudado caseoso, se rompen las paredes de tejido fibroso, incluyendo la piel que los cubre, liberando toda la masa necrótica al exterior (fig. 3), junto con bacterias que representan un enorme riesgo de infección para animales sanos (Matthews 2009).



Fig. 4 Ovino afectado por la forma visceral, no hay presencia de abscesos superficiales, el animal se alimenta normalmente y no recupera el peso, esta forma de la enfermedad se incluye dentro del "síndrome de la oveja flaca", tomada del Valle del Mezquital, Hidalgo.



Fig. 5. Necropsia realizada al ovino anterior (Fig. 4), donde se notan los abscesos viscerales y la pobre condición corporal, el exudado purulento se encuentra rodeado de capas de tejido conectivo mostrando la reacción del animal por controlar la infección.

Al realizar la necropsia, en animales afectados por la forma típica se observan solamente los abscesos en los linfonodos ya mencionados, mostrando la característica de aspecto de cebolla, en cambio, en animales con la forma visceral los abscesos se localizan en varios linfonodos (fig. 5) y en órganos como lo son riñones, hígado, bazo y pulmones donde también hay neumonía por la presencia de zonas de consolidación alrededor de los abscesos (Matthews 2009).

El diagnóstico clínico de la enfermedad, se realiza a través de la exploración del animal, revisando la palpación de los linfonodos afectados y la observación del exudado, que va de una coloración blanco amarillento a verde pistache. También hay que hacer una inspección de la condición general del rebaño y las instalaciones donde se encuentra alojado (Fernández, 2010).

El diagnóstico bacteriológico se realiza mediante el aislamiento e identificación del agente causal, para eso se debridan los linfonodos afectados, en los focos de infección, el exudado purulento presenta gran abundancia de bacterias, mientras que en lesiones más avanzadas es posible que el agente causal esté ausente, dominando la reacción exudativa piógena sobre la proliferativa celular (Hirsh et.al, 2004).

En el diagnóstico inmunológico, por prueba de ELISA, se han empleado diferentes componentes antigénicos, tales como extractos de la pared celular y la toxina obtenida ya sea de los cultivos o por métodos recombinantes, en pruebas realizadas con antígenos de la pared se han reportado resultados erróneos, por lo que se ha trabajado más con la exotoxina. Se ha estado desarrollando el uso de técnicas basadas en cadenas de ADN (PCR), sin embargo presentan aún muchas desventajas, debido a similitudes de códigos genéticos, principalmente entre *Corynebacterium pseudotuberculosis* y *Corynebacterium diphtheriae*, además de ser muy costoso debido a la falta de reactivos comerciales (Sargison,2008; Solanet y col, 2011).

El diagnóstico diferencial hay que realizarlo con otras patologías que también presentan la formación de abscesos, entre ellas infecciones causadas por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp.*, *Actinomyces*, *Arcanobacterium pyogenes* y en el caso de la presentación visceral con *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*, traumatismos, reacciones de sensibilidad a soluciones inyectables y menos comunes tumores (Estevao y col, 2006).

### 2.3 Tratamiento.

*C. pseudotuberculosis* es sensible *in vitro* a antibióticos usados comúnmente en el tratamiento de infecciones bacterianas tales como penicilina, sulfas con trimetoprim, tetraciclina, eritromicina, cefalosporina, cloranfenicol y rifampicina, sin embargo, se han observado fracasos en la terapias *in vivo*, debido a que el microorganismo suele estar inmerso en el exudado purulento que se encuentra encapsulado dentro del linfonodo. Se han reportado aislamientos resistentes a nitrofuranos, cicloheximida y ácido nalidíxico. Los aislamientos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis*, son resistentes a la mayoría de los aminoglucósidos en comparación con *Corynebacterium. pseudotuberculosis* biovar *equi*; la causa es la incapacidad de síntesis de la enzima nitrato reductasa en los primeros, dado que esta imposibilidad está asociada a una reducción de la habilidad de las células bacterianas de transportar aminoglucósidos y compuestos de estructura similar (Estevao y col, 2006).

La necesidad de largos períodos de tratamiento, el fracaso de la antibioterapia, el riesgo de complicaciones y el costo, provoca que en la mayoría de los casos solo se emplee la remoción quirúrgica del linfonodo o la punción con aspiración del contenido y limpieza diaria con antisépticos como la solución de yodo; el drenaje y la apertura de los abscesos no es usualmente utilizado para la resolución de la enfermedad, pues no garantiza que las lesiones sanen, además del riesgo de la entrada de otros agentes por medio de la herida (Costa y col, 1998; Ruiz y col, 2009).

## 2.4 Prevención y control.

El control de la enfermedad incluye la separación de animales más afectados de los sanos, la limpieza y desinfección de tijeras para la esquila, el uso individual de agujas en la aplicación de vitaminas y antiparasitarios; también se sugiere completa limpieza de comederos y bebederos, sitios muy comunes donde puede haber descargas de exudado purulento, también la revisión del forraje para evitar la presencia de alambres y demás objetos que puedan lesionar la cavidad bucal, todos los animales que se encuentren severamente afectados, en particular de la forma visceral, deben ser eliminados de la explotación ya que representan mayores gastos al productor (Matthews, 2009).

Existen productos para la inmunización, el primero producido en Estados Unidos contiene la pared celular de la bacteria, el segundo desarrollado en Nueva Zelanda llamado GlanvaCTM6, que contiene antígenos filtrados, no solo de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, también incluye a varios miembros del género *Clostridium* (Estevao y col, 2006).

## 2.5 Alternativas a los antibióticos.

En los últimos años, no solamente la Linfadenitis Caseosa ha sido problema por su baja o nula respuesta a tratamientos con antibióticos, lamentablemente el uso sin control de estos productos, ha provocado que algunas enfermedades que hasta hace poco se creían ya controladas, se presenten actualmente con mayor intensidad y persistan causando graves problemas, que se han originado por diferentes factores: como la prescripción irracional de antibacterianos por parte de médicos cirujanos y veterinarios, en muchas ocasiones, utilizan para diferentes padecimientos el mismo antibiótico, o bien dan tratamientos realizando combinaciones antagónicas, y comúnmente no solicitan las pruebas de sensibilidad *in vitro*. En la producción de alimentos para diferentes especies animales, se emplean antibacterianos como aditivos y conservadores o promotores del crecimiento y finalmente las compañías farmacéuticas que los comercializan sin restricción alguna (La Peña, 1999, Pastor, 2006).

La resistencia a los antibióticos se ha vuelto un problema de salud pública. Antes del descubrimiento de la penicilina, la población humana y animal era azotada por grandes epidemias producidas por bacterias y dependía del estado inmunológico de los individuos sobrevivir a la infección, esto era parte del equilibrio ecológico donde el mejor adaptado sobrevivía, los antibióticos cambiaron esto, se redujo la tasa de mortalidad por infecciones bacterianas, pero todo beneficio tiene un costo, se rompió el equilibrio ecológico que había perdurado por siglos y también las bacterias encontraron la forma de defenderse de los antibióticos, provocándose la aparición de resistencias y superinfecciones. Sabemos que todos los seres vivos evolucionan para adaptarse a las condiciones del ambiente y éste se ha visto alterado de una forma rápida en los últimos 50 años donde la selección natural se ha acelerado, las bacterias antes sensibles, han ido desapareciendo quedando las resistentes; un estudio realizado en el Reino Unido y Holanda donde las infecciones por *Campylobacter* y *Escherichia coli* en personas que consumieron alimentos de origen animal (carne de pollo y cerdo) demostró que el uso de antibióticos de manera profiláctica origina bacterias resistentes. El riesgo aumenta

cuando estas bacterias transfieren esta información de resistencia a otras bacterias (Gérvas, 2000; Orden y Fuente, 2001).

Se han realizado campañas a nivel mundial, para hacer conciencia sobre el desarrollo de resistencia a los antibióticos, en España se ha promovido la campaña “Con los antibióticos no se juega. Si los tomas cuando no debes, no te harán efecto cuando los necesites”, donde se incluyen estrategias a tres niveles: mundial, europeo y nacional, en la que los médicos están comprometidos a concientizar a la población sobre este problema. Parte de esta campaña consiste en la publicación de artículos sobre el tema, principalmente sobre los mecanismos por los cuales las bacterias adquieren resistencia, todo éste esfuerzo es para tratar de evitar que los antimicrobianos se vuelvan obsoletos (Gobernado 2003; Ripoll, 2002, Rodríguez y col, 2002).

Los primeros reportes de resistencia se hicieron en 1961, con la aparición de una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina, denominándola MRSA por sus iniciales en inglés, y fué la causa de múltiples decesos por infecciones nosocomiales, esto debido al desarrollo de una enzima conocida como beta-lactamasa que inactiva a los antibióticos, en especial las penicilinas (Alpuche, 2002, Echevarría, 2003, Fernández, 2005).

Hasta hoy, los informes sobre resistencia han aumentado, en Estados Unidos se ha reportado una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina, estos reportes se hicieron en hospitales, en donde se convirtió en un grave problema buscar otras alternativas para tratar a los pacientes con infecciones por esta bacteria. En Colombia también se han reportado problemas con pacientes en terapia intensiva y en pediatría donde el número de decesos ha aumentado. México no está exento del problema, el consumo de antibióticos es algo tan cotidiano y recomendado por médicos cirujanos y veterinarios para el tratamiento de enfermedades sin haber realizado previamente estudios que revelen el agente involucrado y su perfil de sensibilidad. En nuestro país el consumo de antibióticos es el que mayores ganancias le da a la industria farmacéutica y la automedicación es un problema grave, los sectores de la población con menores ingresos son los que más se automedican, no solo en las ciudades, también en el campo, donde por ahorrar los honorarios del veterinario la gente medica también a sus animales sin conocer dosis y duración del tratamiento, por lo que de manera urgente fué necesario trabajar en una ley para la prescripción de antibióticos, actualizando la NOM-064-ZOO-2000 y la ley general de salud en su artículo 226 (Dresser y col, 2008; Miranda y col, 2006; Zaidi y Peredo, 2010).

Se han buscado alternativas para reducir el consumo de antibióticos, por lo que se han evaluado varias sustancias y algunas plantas de uso tradicional como el ajo, que ha sido probado como bactericida, fungicida y anticancerígeno. Algunas otras, como la cebolla y la sábila también se les atribuyen propiedades antimicrobianas, por poseer compuestos fenólicos e isoflavinas (Morfín 2002, Saiz y López, 2010).

El uso de aceites esenciales obtenidos de plantas también tiene un enorme aceptación, se han trabajado aceites tanto para tratamiento, como en el control de contaminantes en la industria alimenticia, mostrando resultados muy variables, en cambio los extractos alcohólicos de las hojas de algunas plantas, que han sido usados por tradición en algunos pueblos, han despertado el interés de los investigadores, ya que han probado tener efectos muy importantes sobre

infecciones causadas por *Staphylococcus aureus*, en estudios realizados se encontró que las plantas tenían compuestos como aldehídos, cetonas y terpenos capaces de inhibir el crecimiento de las bacterias (Álvarez y col, 2005).

En los últimos años se ha trabajado con productos de origen vegetal y algunos de origen diverso, este es el caso de las abejas, que durante mucho tiempo pasaron al olvido y solamente se obtenía miel de ellas, se volvieron a retomar algunos otros de sus subproductos, en especial una sustancia que producen para la protección de sus colmenas, evidenciando su enorme potencial como terapéutico, esta sustancia es el propóleo.

## 2.6 Propóleo.

Es una sustancia resinosa de color oscuro (Fig. 6) elaborada por las abejas para la protección y el aislamiento térmico de las celdillas de cría y como sellador de los bastidores para evitar la entrada de individuos ajenos a la colmena. Para su elaboración las abejas recorren los campos en busca de árboles que dejan salir la savia de las ramas, llevándolo a la colmena donde lo mezclan con aceites, cera, polen, tierra y ceniza para darle mayor consistencia. Desde los tiempos del antiguo Egipto era utilizado para embalsamar los cuerpos de los faraones, manteniendo los cuerpos en un casi perfecto estado de conservación, este mismo fenómeno se ha observado también en las colmenas al encontrarse insectos y demás animales ajenos a ella momificados y sin representar un foco de infección para las abejas (Dussart y Bartholomé 2007).

El análisis de calidad del propóleo se han establecido parámetros representados en el cuadro 1:

Análisis	Parámetros
Análisis macroscópicos	Aspectos generales relativos a la textura, dureza, gomosidad, residuos de la colmena, astillas, residuos de abejas muertas, presencia de moho, presentación global, densidad y consistencia
Análisis sensorial	Aroma, color de la masa global, sabor, textura y aspecto
Análisis químicos	Masa mecánica total, contenido de cera, solubles e insolubles en etanol, humedad, sólidos fijos, actividad reductora, contenido de fenoles totales, flavonoides e Isoflavonoides, espectro electrónico. Color de la solución alcohólica 0.5ml en 1000 partes de alcohol (Técnica del triestímulo).
Microbiológicos Actividad biológica	Presencia de hongos, coliformes totales. Mesófilos totales. Actividad biológica frente a <i>S.aureus</i> o <i>E.coli</i> .

Cuadro 1. Análisis de calidad del propóleo recolectado en el campo, según el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (Dussart y Bartholomé 2007).



Fig. 6. Propóleo secado para su corte y posterior procesamiento para la elaboración de tinturas, jabones etc. (Dussart y Bartholomé 2007).

La composición química del propóleo se caracteriza por tener un 55% de resinas y bálsamos aromáticos, 30% de ceras, 10% de aceites esenciales y 5% en granos de polen (Mayta y Sacsquispe, 2010, Samara, 2011)

Un estudio más completo se realizó en Campeche, recolectando muestras de varias regiones, analizando el clima y flora del lugar, como se muestra en el cuadro 2.

Denominación de la muestra	Lugar de procedencia	Tipo de vegetación
1	Pixtum i	Selva alta subperennifolia
2	Chiná	Secundaria con sabana
3	Chamotón	Selva mediana
4	Pixtum ii	Selva alta subperennifolia
5	Hampolol i	Selva baja caducifolia
6	Calkini	Selva baja caducifolia
7	Hampolol ii	Selva baja caducifolia
8	Tenabo	Secundaria con sabana
9	Dzibalchén	Secundaria con sabana
10	Pocyaxum	Selva mediana

Cuadro 2. Lugar de procedencia y tipos de vegetación predominante en las muestras de propóleo obtenidas de Campeche (Tolosa y Cañizares, 2002).

Posteriormente se determinaron los metabolitos por medio de tamizaje fotoquímico a cada uno de los propóleos, observando los siguientes componentes que se listan en el cuadro 3.



Extracto	Lactonas	Saponinas	Fenoles y Taninos.	Sustancias aminadas	Leucotocandinas	Flavonoides	Quinonas	Triterpenos y Esteroides	Alcaloides.	Cardenolidos
1	+++	+++	+++	---	---	+++	---	---	---	---
2	+++	+++	+++	---	---	+++	---	---	---	---
3	+++	+++	+++	---	---	+++	---	+++	+++	---
4	+++	+++	+++	---	---	+++	---	-	+++	---
5	+++	+++	+++	---	---	+++	---	+++	+++	---
6	+++	+++	+++	+++	---	+++	---	+++	---	---
7	+++	+++	+++	---	---	+++	---	+++	+++	---
8	+++	+++	+++	---	---	+++	---	+++	+++	---
9	+++	+++	+++	+++	---	+++	---	+++	+++	---
10	+++	+++	+++	---	---	+++	---	+++	+++	+++

Cuadro 3. Metabolitos obtenidos del tamizaje fotoquímico en propóleos de Campeche (Tolosa y Cañazares, 2002).

En el Estado de México, también se ha analizado el propóleo producido en los apiarios de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM y la determinación de componentes se hizo por medio de cromatografía, los resultados se observan en el cuadro 4.

Fracción	Tiempo de retención (min)	Max (nm)	Compuesto aislado
Propóleo-etanol	3.5	236, 260, 294	Isoflavona
	4.1	238, 276, 324	Flavona
	4.6	250, 322	Quercetina
	4.8	242, 296, 324	Flavona
	5.9	236, 288	Flavona
	9.7	236, 293, 328	Flavona
	11.9	238, 292, 328	Flavona
	14.1	282	Derivado de ácido cinámico
	16.1	236, 290	Derivado de ácido cinámico
Propóleo-hexano	19.3	290	Derivado de ácido cinámico
	7.0	314	Derivado de ácido cafeico
	13.1	286	Derivado de ácido cinámico
	16.2	236, 290	Derivado de ácido cinámico
	16.9	236, 290	Derivado de ácido cinámico

Cuadro 4. Componentes del propóleo obtenido del apiario de FESC-UNAM (Londoño y col, 2010).

Los propóleos se evaluaron contra bacterias Gram (+) *Staphylococcus aureus*, y *Streptococcus pyogenes*; Gram (-) *Salmonella typhi* y *Pseudomonas aeruginosa*, todas mostraron susceptibilidad al ponerlas en contacto con el propóleo, logrando determinar las concentraciones mínimas bactericidas como lo muestra el cuadro 5.

Procedencia del propóleo	Concentración mínima bactericida ( mg/ml)											
	<i>S. aureus</i>			<i>S. pyogenes</i>			<i>P. aeruginosa</i>			<i>S. typhi</i>		
1	3.75	3.75	3.75	1.87	3.75	3.75	1.87	1.87	1.87	3.75	3.75	3.75
2	3.75	3.75	3.75	1.87	3.75	3.75	1.87	1.87	1.87	3.75	3.75	7.5
3	1.87	1.87	1.87	3.75	3.75	3.75	1.87	0.93	0.93	7.5	7.5	7.5
4	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	1.87	3.75	1.87	7.5	7.5	7.5
5	0.93	0.93	0.93	3.75	3.75	3.75	3.75	1.87	1.87	3.75	3.75	3.75
6	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	1.87	3.75	3.75	3.75
7	0.93	1.87	1.87	0.93	0.93	0.93	0.93	1.87	1.87	3.75	3.75	3.75
8	1.87	1.87	1.87	1.87	1.87	1.87	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75
9	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	1.87	7.5	7.5	7.5
10	1.87	1.87	1.87	1.87	1.87	1.87	3.75	3.75	3.75	7.5	7.5	7.5

Cuadro 5. Concentraciones mínimas bactericidas de los propóleos de Campeche (Tolosa y Cañizares, 2002).

El propóleo obtenido de la FESC-UNAM, además de ser desafiado contra bacterias, también fué comparado con la actividad de otros extractos obtenidos de plantas y algunos desinfectantes como lo muestra el cuadro 6.

Extracto	<i>Staph. aureus</i>	<i>Staph. epidermidis</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>V. cholerae</i> (aislamiento clínico)
Propóleo Hexano						
• Diámetro	9.7	9.0	SA	SA	9.0	8.7
• CMI	0.125	0.125	-	-	0.125	0.125
Etanol						
• Diámetro	11.3	11.0	SA	SA	9.7	11.0
• CMI	<0.125	<0.125	-	-	<0.125	<0.125
<i>R. communis</i> Hexano						
• Diámetro	13.6	14.0	SA	SA	SA	SA
• CMI	>3.00	>3.0	-	-	-	-
Acetato de etilo						
• Diámetro	9.3	SA	SA	SA	SA	SA
• CMI	2.50	-	-	-	-	-
Metanol						
• Diámetro	10.0	11.7	8.7	10.0	SA	SA
• CMI	0.70	0.25	>3.0	>3.0	-	-
<i>E. camaldulensis</i> Hexano.						
• Diámetro	SA	SA	SA	SA	SA	SA
• CMI	-	-	-	-	-	-
Acetato de etilo.						
• Diámetro	SA	SA	SA	SA	SA	SA
• CMI	-	-	-	-	-	-
Metanol.						
• Diámetro	11.0	11.3	SA	SA	9.7	SA
• CMI	2.00	0.75	-	-	>3.0	-
<i>C. citrinus</i> Hexano						
• Diámetro	9.3	9.0	SA	SA	SA	SA
• CMI	2.50	>3.0	-	-	-	-
Acetato de etilo						
• Diámetro	15.0	19.6	SA	SA	18.0	SA
• CMI	<0.125	<0.125	-	-	<0.125	-
Metanol						
• Diámetro	15.0	15.0	SA	SA	10.0	SA
• CMI	0.125	0.125	-	-	0.50	-

Diámetro: Diámetro del anillo de inhibición en mm.

CMI: Concentración mínima inhibitoria mg/ml.

SA: Sin actividad.

Cuadro 6. Actividad bactericida del propóleo frente a otras sustancias naturales y desinfectantes (Londoño y col, 2010)

De todos los componentes analizados, los flavonoides tienen la propiedad de desactivar la actividad de la membrana citoplasmática, inhiben la motilidad en las bacterias móviles o hacen rígidos los flagelos, facilitando al sistema inmune la destrucción de éstas o potencializando la acción de los antimicrobianos, se ha observado que también produce la desorganización del citoplasma y la pared celular provocando la ruptura de ésta. (Londoño, 2008, Manrique y Santana, 2008; Salamanca y col. 2007).

Su actividad no solo se limita a ser un antimicrobiano, hasta la fecha se han descrito 19 propiedades terapéuticas al propóleo, se describen las más importantes a continuación:

a) Antioxidante.

Puede ser utilizado para la industria alimenticia, para perfumería, medicina y biología.

b) Antiviral.

Cuenta con la capacidad de contener el desarrollo de formas patógenas de los virus.

c) Fungicida.

Ha sido registrado el efecto del extracto de propóleo sobre casi cuarenta hongos que afectan la piel.

d) Regeneradoras o cicatrizantes.

Posee la capacidad de acelerar positivamente la división celular en la regeneración de heridas reduciendo la presencia de grandes cicatrices.

e) Anestésicas.

Estudios científicos demostraron que un extracto acuoso de propóleo es un buen anestésico local, con una acción periférica en la membrana ocular.

f) Antiinflamatorias.

Es utilizado en preparados para el tratamiento de inflamaciones de todo tipo y enfermedades ulcerosas de la piel (Navarro y col, 2009)

Los extractos acuosos de propóleo han sido utilizados en oftalmología veterinaria, donde mostraron resultados satisfactorios aun en casos bastante severos, los extractos alcohólicos se han usado como antisépticos y para el tratamiento de infecciones en la piel. En el mercado se encuentra en productos como tinturas con alcohol, combinado con miel, comprimidos, caramelos y jabones, ofreciendo una alternativa bastante prometedora en la búsqueda de nuevos tratamientos. (Dussart y Bartholomé 2007, Fokt y col, 2010, Giral y col, 2007).

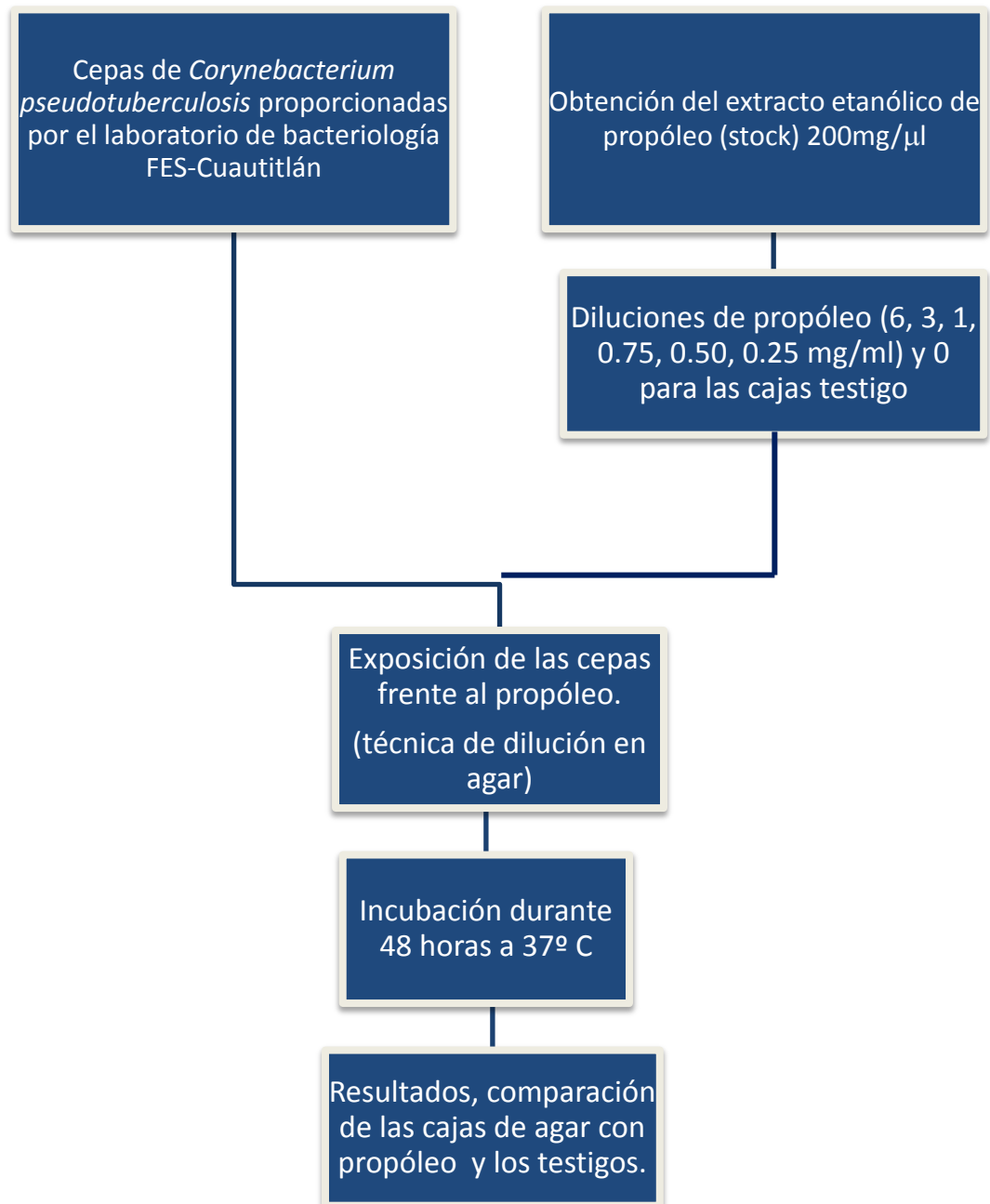
### **3. Objetivos.**

- a) Evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* de un extracto etanólico de propóleo sobre cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.
- b) Determinar la concentración mínima inhibitoria del extracto sobre el crecimiento de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

### **4. Hipótesis.**

El propóleo tiene efectos antimicrobianos sobre *Corynebacterium pseudotuberculosis* de acuerdo con los datos publicados de investigaciones previas sobre otras bacterias.

## 5. Diseño experimental.



## 6. Materiales y Métodos

### *Microorganismos:*

Se utilizaron 10 cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, proporcionadas por el Laboratorio de Bacteriología de la FES-Cuautitlán, dichas cepas fueron obtenidas a partir de ovinos afectados con Linfadenitis Caseosa.

### *Extracto etanólico de propóleo:*

Se obtuvo del apiario de la FES-Cuautitlán, para la elaboración del extracto se maceró el propóleo y se diluyó en etanol al 70%, se mantuvo en un frasco ámbar por dos semanas para su posterior filtración, posteriormente se preparó una solución stock de 200 mg/0.5 ml.

Las diluciones de propóleo se realizaron en base al siguiente cuadro:

Concentración de propóleo (mg/ml)	Miligramos de extracto	Stock (μl)
0,25	1,50	3,75
0,50	3,0	7,5
0,75	4,50	11,25
1,0	6,0	15,0
3,0	18,0	45,0
6,0	36,0	90,0

Cuadro 7. Concentraciones de propóleo utilizados en cada caja de petri en contra de las cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

### *Preparación de las placas de Agar.*

Se realizó la Técnica de dilución en agar, para la cual se elaboró agar PPLO colocando 6 ml del medio en tubos de ensaye, los cuales fueron esterilizados a 121° C a 15 lb de presión durante 15 minutos, una vez realizado esto, se enfriaron a una temperatura de 40° para colocar la solución de propóleo y homogeneizarla en el medio con ayuda del vortex, posteriormente se vertieron los medios contenidos en los tubos, en cajas de petri para la prueba de esterilidad y una vez revisados los medios se inocularon en ellos las cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* y se incubaron durante 48 hrs en la estufa bacteriológica, esto fué realizado por triplicado para cada cepa.

Para el testigo, se utilizó un medio libre, se incubaron las placas a 37° C durante 48 horas y se determinó la concentración mínima inhibitoria (Modificado de Koneman et al, 2003).

## 7. Resultados.

Se reportaron los siguientes resultados después de la incubación de los medios de cultivo.

# Cepa	Cajas testigo	Concentración de propóleo mg/mL.						
		6,0	3,0	1,0	0,75	0,50	0,25	
1	+	-	-	-	-	-	-	
2	+	-	-	-	-	-	-	
3	+	-	-	-	-	-	-	
4	+	-	-	-	-	-	-	
5	+	-	-	-	-	-	-	
6	+	-	-	-	-	-	-	
7	+	-	-	-	-	-	+	
8	+	-	-	-	-	-	-	
9	+	-	-	-	-	-	-	
10	+	-	-	-	-	-	-	

Cuadro 8. Resultados de la inhibición de las cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* frente a las diversas concentraciones de propóleo.

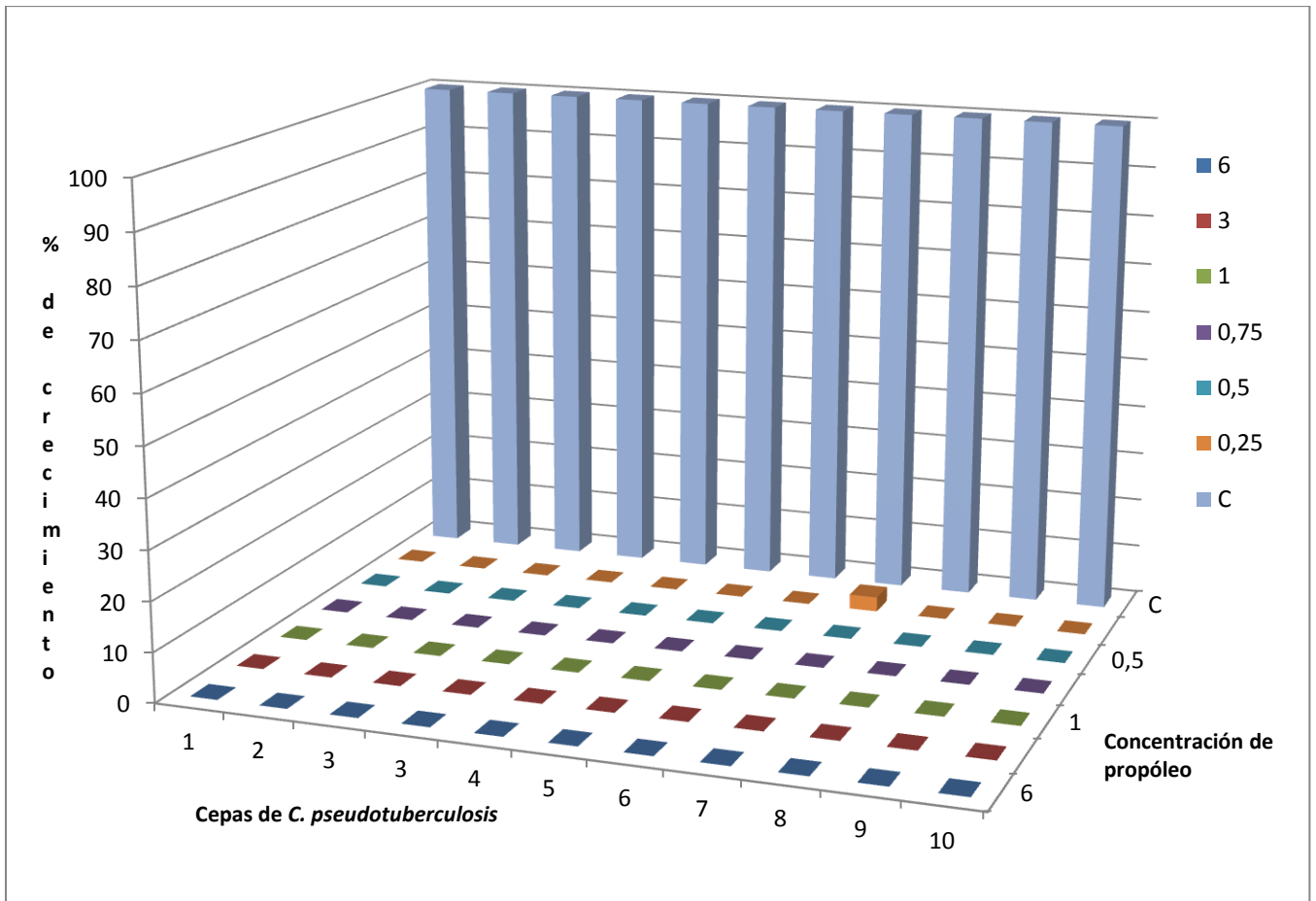
Control: cultivo sin propóleo.

(+) Crecimiento de colonias en los medios.

(-) No se presentó crecimiento.

Todas las cajas testigo presentaron crecimiento y hubo inhibición en el desarrollo de todas las cepas hasta la concentración de 0.50 mg/ml (ver las figuras 7,8 y 9).





Gráfica 1. Representación de la actividad antimicrobiana de las diferentes concentraciones de propóleo y el grupo control (C).

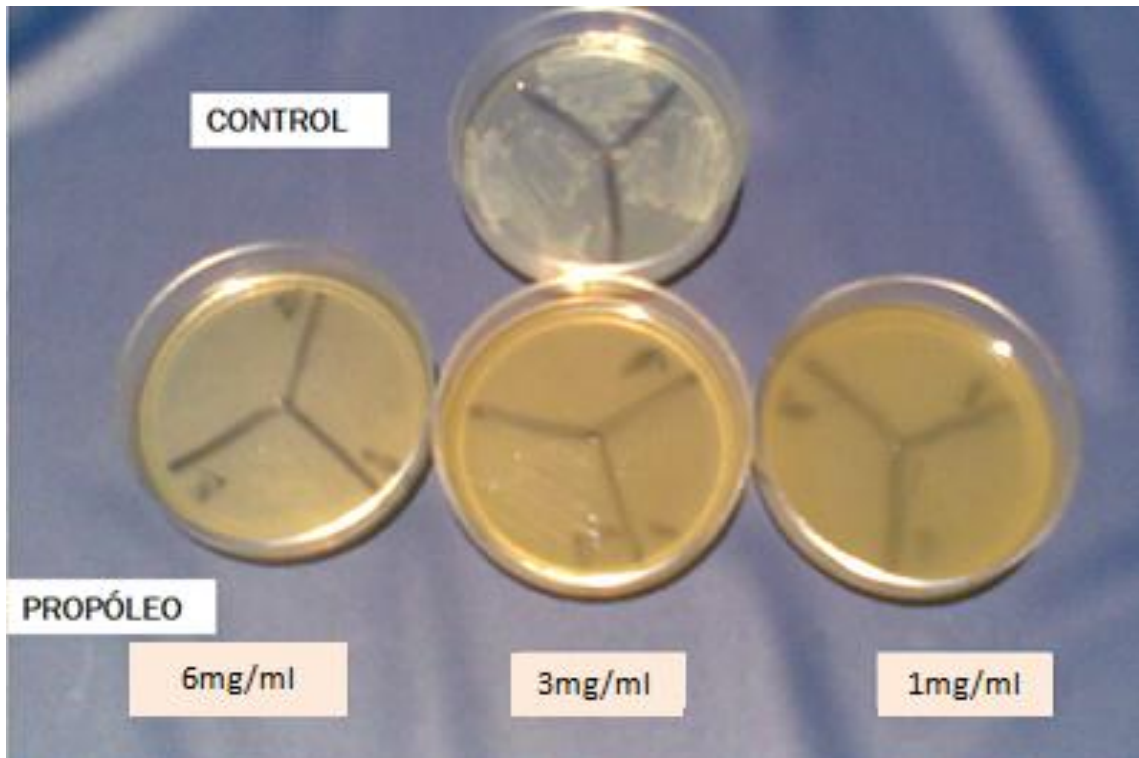


Fig 7. Se muestra la inhibición de las cepas en concentraciones de 6, 3, 1 mg/ml y el testigo donde se observa el desarrollo de las colonias.

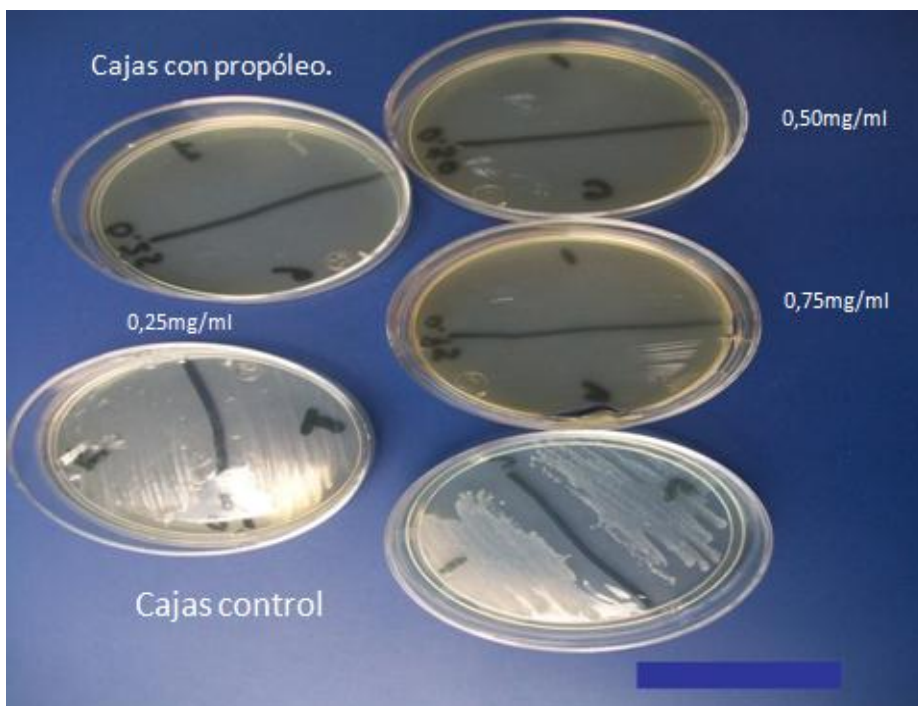


Fig 8. Cajas a diferentes concentraciones de propóleo mostrando la inhibición de crecimiento de las cepas 6 y 1, se observan las líneas de sembrado sin colonias bacterianas a comparación del control donde se observa el desarrollo de colonias.

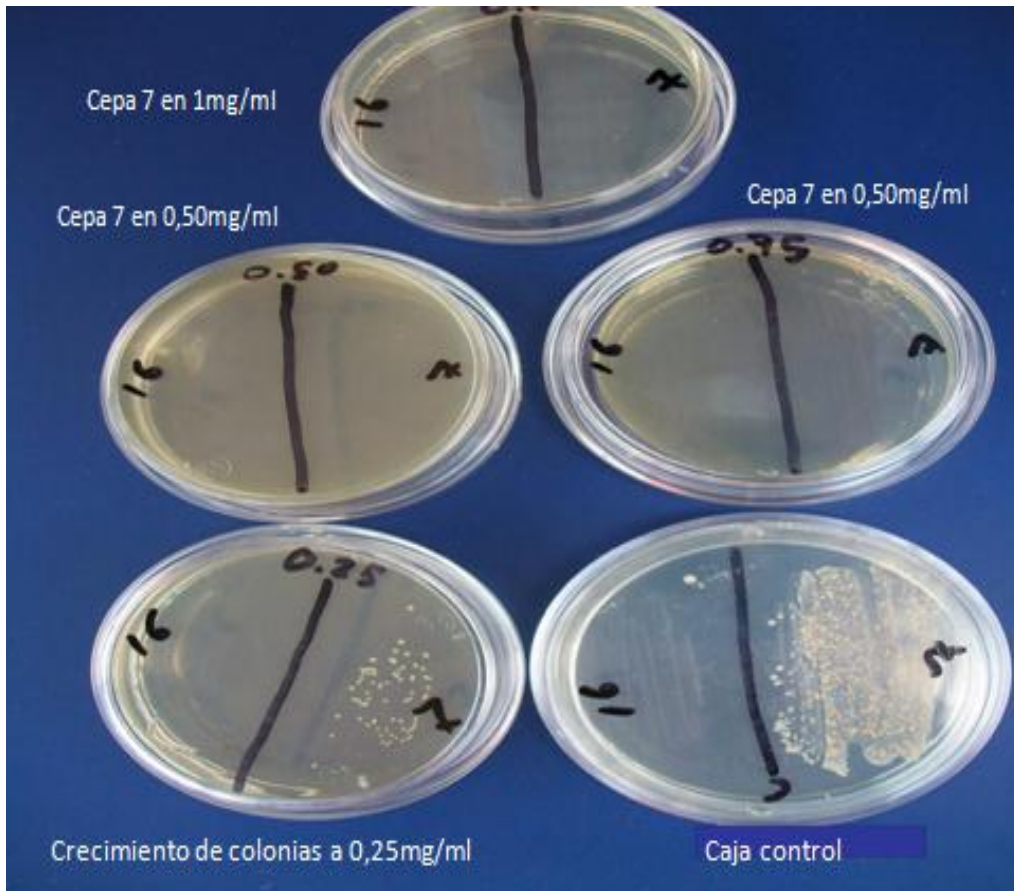


Fig 9. Se observa el desarrollo de colonias de la cepa 7 en la caja con 0,25 mg/ml de propóleo, en comparación con la caja control que muestra mayor desarrollo de colonias.

## 8. Discusión.

Los resultados muestran el efecto antibacteriano del propóleo contra las cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Fig. 7 y 8), estudios previos como el realizado por Grange y col. en 1990, en donde, usando extractos etanólicos, evidenciaron la susceptibilidad del género al propóleo, posteriormente en China, Li-ping et al. (2008), evaluaron también ésta sustancia, frente a *Corynebacterium diphtheriae*, y observaron que las bacterias crecían a concentraciones de 0.25 mg/ml y menores.

Estos estudios, demuestran que se ha trabajado con especies de éste género y los resultados indican que presentan sensibilidad al producto; en éste trabajo se observó el crecimiento de la cepa identificada como 7 (Fig. 9) en concentración de 0.25 mg/ml. La razón de éste crecimiento se debió quizá a la dilución del propóleo; tomando en cuenta que ésta, es donde la concentración fué mínima, es posible que la cantidad de flavonoides y resinas no fué suficiente para inhibir a todas las bacterias presentes en la caja y éstas al no encontrar el ninguna sustancia inhibitoria, lograron multiplicarse.

Se sabe que el etanol tiene efectos antibacterianos, sin embargo el etanol con el que se obtuvo el extracto de propóleo que se empleó en éste trabajo, no influyó en los resultados, en estudios realizados por Tolosa y Cañizares (2002), Mayta y Sacsquispe (2010) y Londoño y col. (2010), utilizaron controles empleando únicamente etanol, y observaron que las bacterias utilizadas crecían en medios impregnados con éste y más aún, un dato interesante observado por Tolosa, fué que el etanol potencializaba el efecto del propóleo en comparación de extractos acuosos.

La mayoría de los trabajos realizados, no solamente con *Corynebacterium*, también con otras bacterias como lo son MRSA, *Salmonella spp*, *Pseudomonas aeruginosa* entre otras, reportan la inhibición del crecimiento en pruebas *in vitro*, hay todavía mucho por investigar sobre el efecto real del propóleo en contra de la bacteria, al principio se mencionó que el principal componente bactericida del propóleo son los flavonoides y entre sus muchas actividades es el daño a la pared celular y la desorganización del citoplasma bacteriano, acción que tiene que ser demostrada y evidenciada (Kilic y col, 2009; Manrique y Santana, 2008).

No es suficiente realizar solo una prueba *in vitro* para saber si el propóleo es completamente efectivo contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*, es importante seguir realizando más pruebas para determinar completamente su eficacia, aún no podemos decir que es un tratamiento prometedor en contra de la enfermedad y tampoco hay que descartarlo; si bien es cierto, la bacteria resultó ser sensible frente a compuestos naturales como el propóleo, es necesario continuar la investigación, para conocer el sitio de acción específico en la bacteria y cuál sería la forma mas apropiada para aplicarlo como tratamiento.

## **9. Conclusiones.**

Se determinó la actividad antimicrobiana del propóleo *in vitro* sobre cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, donde el crecimiento de las bacterias fué inhibido en la mayoría de las cajas cumpliendo con el primer objetivo.

Se determinó la concentración mínima inhibitoria del propóleo, ésta fué hasta los 0,50 mg/ml, concentración en la que ya no se observó el desarrollo de colonias bacterianas.

Aún falta realizar más estudios, para conocer el sitio de acción del propóleo sobre la bacteria, además de evaluar su acción *in vivo* y el efecto que tiene sobre los animales afectados con Linfadenitis Caseosa.

## 10. Bibliografía.

1. Alpuche AC, Daza AC. Infecciones nosocomiales por bacterias Gram negativas resistentes a cefalosporinas de amplio espectro extendido: asociación de dos peligrosos enemigos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología* 2002; 8:192-199.
2. Álvarez LM, Isaza MG, Echeverry LH. Efecto Antibacteriano *in vitro* de *Austroeupeatorium inulaefolium* H.B.K. (Salvia amarga) y *Ludwigia polygonoides* H.B.K. (Clavo de laguna). *Revista Ciencias Básicas* 2005; 10: 46-55.
3. Costa RL, Spier JS, Hirsh CD. Comparative molecular characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* of different origin. *The Veterinary Journal*. 1998; 62:135-143.
4. Dresser A., Jacobson M., Peredo M. Uso de antibióticos en México: revisión de problemas y políticas. *Salud Pública de México* 2008; 50 Suppl 4:480-487.
5. Dussart GE., Bartholomé Y. “Elaboración de subproductos de la miel y las colmenas”. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura; 2007 Octubre 24-27 Managua (Nicaragua) Organización de Estados Americanos 2007;16-25.
6. Echevarría ZJ, Iglesias QD. Estafilococo Meticilino resistente, un problema actual en la emergencia de resistencia entre los Gram positivos. *Revista Médica Herediana* 2003; 14:195-203.
7. Estevao BS, Gallardo A, Abalos A, Jodor N, Jensen O. Actualización sobre linfadenitis caseosa; el agente etiológico y la enfermedad. *Veterinaria Argentina* 2006; 23: 258-278.
8. Fernández JA., Balestrin CE., Cristina BJ, Oliveira OR, Ribeiro SM, Montelli AC. Propolis: anti-*Staphylococcus aureus* activity and synergism with antimicrobial drugs. *Instituto Oswaldo Cruz* 2005; 100:563-566.

9. Fernández NM. Identificación y poder patógeno de microorganismos del género "*Corynebacterium*" aislados de muestras clínicas. (Tesis doctorado). Madrid (España) Universidad Complutense de Madrid, 2010.
10. Fokt H, Pereira A, Ferreira A, Cunha A. and Aguiar C. How do bees prevent hive infections? The antimicrobial properties of propolis. Current Research, Technology and Educations Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology 2010; 1: 481-493.
11. Gervas J. La resistencia a los antibióticos, un problema de salud pública. INSALUD 2000; 25 (8): 589-596.
12. Giral T., Hugues B., Soto CJ. Suspensión oftálmica de propóleos-R: una alternativa en el tratamiento de las oftalmopatías en animales afectivos. 2007; Rec Vet. Vol. II (9).
13. Gobernado M. Reflexiones sobre resistencia bacteriana. Rev. Esp. Quimioterapia 2003; 16:158-160.
14. Grange MJ, Davey RW. Antibacterial properties of propolis (bee glue). Journal of the Royal Society of Medicine 1990; 83: 159-160
15. Gyles C, Prescott J, Songer G, Thoen C. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. 4<sup>th</sup> ed. Iowa: Wiley-Blackwell, 2010.
16. Hirsh D, McLachlan J, Walker R. Veterinary Microbiology. 2<sup>nd</sup> ed. England: Blackwell Publishing, 2004.
17. Kilic A., Baysallar M., Besirbellioglu B., Salih B., Sorkun K., Tanyuksel M. *In vitro* antimicrobial activity of propolis against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. Annals of Microbiology 2005; 5:113-117.
18. Koneman EW, Allen SD, Dowell VR, Sommers HM. Diagnóstico Microbiológico. 5<sup>a</sup> ed. México: Editorial Médica Panamericana, 2003
19. La Peña LS. Resistencias a antibióticos en nuestro medio. Visión global del problema. Boletín de la Sociedad de Pediatría de Asturias, Cantabria, Castilla y León 1999; 39:243-247.

20. Li-ping Z., Bing X., Jin L. Antibacterial activity of propolis against *Corynebacterium diphtheriae*. Journal of Pathogen Biology. 2008; 5:285-289.
21. Londoño OA., Penieres CJ., García TC., Carrillo ML., Quintero M.M, García VS., Mendoza SM, and Cruz ST. Estudio de la actividad antifúngica de un extracto de propóleo de la abeja *Apis mellifera* proveniente del estado de México. Tecnología en Marcha 2008; 21:49-55.
22. Londoño OA., Ávila AJ., Canales MM., Hernández DC., Serrano RP., Flores OM, Durán DA. Penieres CJ. Antibacterial Comparative Study Between Extracts of Mexican Propolis and of Three Plants Wich Use *Apis mellifera* for its Productions. Journal of Animal and Veterinary Advances 2010; 9(8):1250-1254.
23. Manning J., Heather E., Hietola S., Wolf C. Impact of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection on serologic surveillance for John's disease in goats; J. Vet. Diagn. Invest 2007; 19, 187-190.
24. Manrique JA., Santana CW. Flavonoides, actividad antibacteriana y antioxidante de propóleos de abejas sin aguijón *Melipona quadrifasciata*, *Melipona compressipes*, *Tetragonisca angustula* y *Nannotrigona* sp. de Brasil y Venezuela. Zootecnia tropical 2008; 10: 157-166.
25. Matthews J. Diseases of the goat. 3<sup>rd</sup> ed. Massachusetts: Wiley-Blackwell, 2009
26. Mayta T.F, Sacsquispe CS. Evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo de Oxapampa – Perú sobre cultivos de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). (2010). Rev. Estomatol Herediana 2010; 20(1):19-24.
27. Miranda CM., Pérez F., Zuluaga T, Oliveira MR, Correa A., Reyes S.L. y col.) Resistencia a los antimicrobianos de bacilos Gram negativos aislados en unidades de cuidado intensivo en hospitales de Colombia, WHONET 2003, 2004 y 2005. Biomédica 2006; 10:424-433.
28. Morfín OR, Rangel FS, Rodríguez NE. Infecciones producidas por bacterias grampositivas. Controversias relacionadas al desarrollo de resistencias. Enfermedades Infecciosas y Microbiología. 2002; 22(2): 46-50.



29. Navarro R., Aguilar M., Bórquez F. Resultados y Lecciones en Desarrollo de Productos de Propóleo. Ministerio de Agricultura de Chile; 2009 p 58.
30. Orden J, Fuente R. Repercusiones en la salud pública de la resistencia a quinolonas en bacterias de origen animal. Rev. Esp. Salud Pública 2001; 75:313-320.
31. Pastor SR. Alteraciones del nicho ecológico: resistencias bacterianas a los antibióticos. Gac. Sanit. 2006; 7:175-181.
32. Peña CR. Estandarización de propóleos: agentes químicos y biológicos. Cien. Inv Agr. 2008; 35(1):17-26
33. Pugh D.G. Sheep and Goat Medicine. Philadelphia: Saunders Company, 2002.
34. Ripoll M. Con los antibióticos no se juega. Medicina general 2002; 42:167-168.
35. Quintero MM., Londoño OA., Soto ZC., Carrillo ML., Penieres G., García TC., Cruz ST. Structural and genetic alterations of fungal cells caused by mexican propolis. Science against microbial pathogens. 2011; 2: 1060-1072.
36. Quintero MM, Londoño OA, Hernández HF, Manzano GP, López MR, Soto ZC. y col. Efecto de extractos de propóleos mexicanos de *Apis mellifera* sobre el crecimiento *in vitro* de *Candida albicans*. Rev. Iberoam de Micol. 2008; 25: 22-26
37. Quinn P.J, Carter M.E, Markey B.K, Carter G.R. Clinical Veterinary Microbiology. London: Wolfe publishing, 1994.
38. Rodríguez R., Calderón E., Gómez D., Espinoza L. Características de la resistencia antimicrobiana de una colección clínica de *Streptococcus pyogenes*. Salud Pública de México 2002; 42: 226-229.
39. Ruíz L, Jerónimo R, Barrera VM, Frías MT. Linfadenitis caseosa I: Aspectos etiológicos, históricos y clínicos. 2007 Rec Vet. Vol. II (9)

40. Ruíz CG., García VS., Hernández AI., Ramírez OF. Compendio de Antibacterianos en Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM-FESC Cuautitlán; 2009.
41. Saíz AM, López GN. Obtención y aplicación de extractos naturales. Centro Nacional de Tecnología y Seguridad Alimentaria; 2010 p 44.
42. Salamanca GG, Correa CI, Principal J. Perfil de flavonoides e índices de oxidación de algunos propóleos colombianos. Zootecnia Tropical. 2007; 25:95-102.
43. Samara N, Benitez N, Cabezas F. Actividad antibacteriana y composición cualitativa de propóleos provenientes de dos zonas climáticas del departamento del Cauca. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. 2011; 9: 8-16.
44. Sargison N. Sheep Flock Health: a planned approach. Oxford: Blackwell Publishing, 2008
45. Solanet JJ, Malena R, Estein MS, Estevao BS, Paolicchi FA. Desarrollo de una prueba de ELISA para detectar anticuerpos de carneros vacunados o infectados con *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Revista Argentina de Microbiología 2011; 43:9-17.
46. Songer GJ, Post WK. Veterinary Microbiology: Bacterial and Fungal Agents of Animal Disease. Philadelphia: ELSEVIER-Saunders, 2005
47. Suleiman MK., Boehnel H., Babiker HS. And Zaki A.Z. Cellular fatty acid profile of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its relation to pathogenicity. Journal of Animal and Veterinary Advances 2006; 5 (11), 943-954.
48. Tolosa L., Cañizares E. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. Ars Pharmaceutica 2002; 19: 37-56.
49. Vadillo MS, Píriz DS, Mateos YE, Manual de Microbiología Veterinaria. España: McGraw-Hill Interamericana, 2002.
50. Zaidi M., Peredo M. Regulación y promoción para el uso adecuado de antibióticos en México. UNAM, Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica A.C. 2010; p17.