UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

EVALUACION DE LA SENSIBILIDAD A ANTIBIOTICOS " IN VITRO " DE 50 CEPAS DE *Corynebacterium pseudotuberculosis*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

M.V.Z. FRANK DIAZ AYALA

ASESORES

M.V.Z. SUSANA E. GARCIA V. & M.V.Z. M.C. TONATIUH A. CRUZ S.

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO SEPTIEMBRE 1993

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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 está 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.

INDICE

Resumen	1
Introducción	3
Objetivos	19
Material y Método	20
Resultados	25
Discusión	31
Conclusiones	35
Bibliografía	37

RESUMEN

El presente trabajo fue diseñado con el objeto de determinar la sensibilidad "in vitro" a 12 antibióticos por parte de 50 cepas de **Corynebacterium pseudotuberculosis** obtenidos a partir de animales con manifestaciones clínicas en algunos municipios del Estado de México.

El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Microbiología Veterinaria, en el Campo 4 de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

La determinación de la sensibilidad a los antibióticos de **Corynebaterium pseudotuberculosis** se realizó a través de la prueba de difusión Kirby-Bauer y los resultados obtenidos fueron:

El 100% de las cepas mostraron sensibilidad a cefalotina, 98% a dicloxacilina y ceftriaxona, 94% a amplicilina, 88% a la combinación sulfametoxasol/trimetoprim, 82% a cloramfenicol, 80% a amikacina, 66% a penilicina, 38% a netilmicina, 14% a eritomicina, 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 cloramfenicol, 14% a gentamicina, 12% a amikacina y la combinación sulfametoxasol/trimetroprim, 6% a ampicilina y 2% ceftriaxona y dicloxacilina.

El 82% de las cepas fueron resistentes a gentamicina, 52% a enoxacina, 40% a netilmicina, 26% a eritromicina, 8% a amikacina y 6% a penicilina.

Se puede concluir que existen diferencias en cuanto a la sensibilidad en relación a las cepas extranjeras de **Corynebacterium pseudotuberculosis**, mostrándose una mayor resistencia para gentamicina y enoxacina. Es observable una disminución en la sensibilidad para penicilina y eritromicina en comparación con los reportes nacionales y extranjeros. Existe una sensibilidad intermedia mostrada para netilmicina, aunque no existen reportes previos con el uso de este antimicrobiano contra **Corynebacterium pseudotuberculosis.** Para el caso amikacina, ampicilina, ceftriaxona, cefalotina, dicloxacilina y la combinación sulfametoxasol/trimetoprim se muestra una alta sensibilidad por parte de **Corynebacterium pseudotuberculosis,** dato que concuerda con los reportes de los Estados Unidos y Canadá.

Se considera la posibilidad de instaurar un tratamiento utilizando cefalosporinas, dicloxacilina, ampicilina o la combinación sulfametoxasol/trimetoprim después de la primera trasquila o en los estadios tempranos de la infección, aunado a las medidas de control como trasquila primero de animales jóvenes y posteriormente los de mayor edad, mantener en condiciones adecuadas las instalaciones, antisepsia durante el manejo médico y desinfecciones periodicas.

INTRODUCCION

En ovejas y cabras **Corynebacterium pseudotuberculosis** induce a una enfermedad crónica y contagiosa, de carácter enzoótico denominada Linfadenitis caseosa (LC) (Brogden, 1980).

La enfermedad está caracterizada en la mayoría de los casos por abscedación de ganglios linfáticos con contenido caseoso y purulento e inflamación necrótica supurativa, involucrando uno o más ganglios linfáticos (Brown, 1987).

La linfadenitis caseosa tiene dos formas de presentación, una superficial y una visceral. En la forma superficial la presencia de abscesos en la zona de entrada es común, estableciéndose posteriormente en los ganglios regionales, preferentemente los ganglios preescapulares y prefemorales. En la forma visceral la enfermedad se da en forma generalizada y la fomación de abscesos ocurre en órganos, incluyendo pulmones, hígado, riñón, cerebro, médula espinal y en forma preferencial en nodos linfáticos. La forma visceral se ha sugerido como el factor causal del síndrome debilitante y de adelgazamiento de la oveja (Harland, 1979).

La identificación bacteriológica del microorganismo está basada en la determinación de su morfología, características de cultivo y reacciones bioquímicas (Favier, 1990).

La demostración de la bacteria por el método de Gram, muestra

un bastón corto o pleomórfico Gram (+), inmóvil, sin cápsula y que produce beta-hemólisis en agar sangre. Las pruebas bioquímicas manifestan producción de catalasa, ureasa, formación de ácido a partir de glucosa, maltosa, manosa y causa hidrólisis del almidón (MacFadin, 1990).

La linfadenitis caseosa en los ovinos y caprinos presenta ciertas dificultades para ser tratada debido a que hay pocos antibióticos específicos contra este gérmen y los que existen pueden lograr curar lesiones abiertas, pero una vez que el gérmen se halla encapsulado, tal como sucede en los ganglios linfáticos y abscesos debajo de la piel o en órganos internos, ya el medicamento no puede actuar, lo que permite al **Corynebacterium pseudotuberculosis** mantenerse encapsulado y volver a atacar cuando hay bajas de defensa en el animal o cuando estos abscesos se abren, llegando a producir finalmente la muerte (Holstad, 1989, Gilmour, 1990).

El tratamiento más eficaz contra los focos caseosos es la incisión quirúrgica a fin de eliminar el contenido, este puede fluidificar con soluciones clorinadas o lugol. Ayuda al control del problema la eliminación o aislamiento de los animales infectados (Burrell, 1981).

Los resultados de los tratamientos son muy irregulares. De acuerdo a los antibiogramas realizados de gérmenes obtenidos directamente de lesiones, de pases por animales de laboratorio y de hemocultivos de animales enfermos se muesta que dentro de los antibióticos más eficaces están: eritromicina, penicilina, rifacina y dentro de las sulfonamidas está con cierta acción el sulfatiazol. Otros antimicrobianos como los

nitrofuranos, tetraciclinas, neomicina y cloramfenicol no parecen tener una buena acción, además de estos tratamientos específicos se recomiendan reconstituyentes en general (Márquez, 1970).

El **Corynebacterium pseudotuberculosis** ha mostrado una gran sensibilidad "in vitro" a otros antibióticos como ampicilina, estreptomicina, bacitracina (Alwis, 1984), gentamicina, lincomicina y la combinación sulfametoxasol/trimetoprim, mientras que algunas cepas son sensibles a neomicina. Estos antimicrobianos han sido probados desafiando al microorganismo a través de la prueba de difusión en disco (Judson, 1991).

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

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 más profunda.

Estos tratamientos pueden ser observados y analizados en el cuadro 1.

CUADRO 1

TRATAMIENTOS EMPIRICOS BASADOS EN LA CAUSA MICROBIOLOGICA

PATOGENO	DROGA DE PRIMERA ELECCION	DROGA ALTERNATIVA
Cocos, Gram (+) aeróbicos		
Streptococcus		Eritromicina
Beta-hemoliticos	Penicilina	Cefaslosporina
Alfa-hemoliticos	Penicilina + Aminoglucósidos	Cefalosporina
Staphylococcus		
s/penicilinasa	Penicilina	Cefalosporina
c/penicilinasa	Penicilina resistente	Cefalosporina
Bastones, Gram (+) aeróbicos		
Bacillus sp.	Penicilina	Eritromicina
Corynebacterium	Penicilina	Eritromicina
Erysipelothrix rhusiopathiae	Penicilina	Eritromicina
Listeria monocytogenes	Ampicilina	Tetraciclina Cloramfenicol
Nocardia sp.	Sulfanamidas	Minociclina
Rhodococcus equi	Eritromicina + Rifampicina	Penicilina G Gentamicina

(Biberstein, 1990)

La utilidad de establecer el perfil de sensibilidad, es que este puede servir como indicador de patogenicidad. Cepas de **C. pseudotuberculosis** aisladas de casos crónicos o difíciles son resistentes a la familia de los aminoglucósidos.

RESISTENCIA A LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS

La resistencia a la drogas antimicrobianas ha sido el tópico de muchos reportes en época reciente.

La resistencia a antibióticos como ampicilina, cloramfenicol, gentamicina y penicilina se observan cada vez con mayor frecuencia en aislamientos bacterianos.

El incremento en la resistencia es causa de un serio problema para la salud animal, y no solo en ésta, sino también para el hombre, ya que existe un contacto contínuo a través de vías como alimento, prescripción, automedicación y uso inadecuado que propician concentraciones indebidas, menguando su efecto bactericida o bacteriostático.

Se ha demostrado que existe una modificación en la resistencia a los antibióticos por parte de las bacterias, especificamente se ha logrado demostrar estas variantes a partir de los años 80's a la fecha, por lo que se ha considerado la necesidad de replantear el nivel de resistencia. Se recomienda que esta nueva estimación se haga a partir de los aislamientos de cada hato y no en base a las tablas establecidas. Se ha creado un programa denominado MICROBIAL 1, el cuál permite dar

una predicción de la resistencia en determinado hatos (Martín, 1981).

Se puede pensar que la resistencia de los microorganismos a una gran variedad de agentes antimicrobianos se ha incrementado dramáticamente en los últimos años, especialmente en algunas enterobacterias como **Salmonella y Escherichia coli** (Benson, 1985).

La variabilidad en la resistencia a los antibióticos es tan grande como el número de géneros bacterianos. Para el caso de **Bordetella bronchiseptica** la sensibilidad a las sulfonamidas es de interés particular, ya que se ha logrado demostrar la relación entre la resistencia seguida de una historia del uso extensivo de la droga. Inclusive, se pudo observar una resistencia del 100% en cerdos que se encontraban bajo estas condiciones (Hodges, 1983).

Es posible encontrar informes sobre resistencia "in vitro" a varios antibióticos e inclusive de un microorganismo a varios antibióticos. Entre las resistencias más comunes se encuentran penicilina G y tetraciclina, eritromicina, ampicilina y cloramfenicol para ciertos géneros anaeróbios (Chirino, 1983).

Estudios realizados con **Corynebacterium pyogenes** 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 tratramiento no se pone en práctica, propiciando un menor contacto entre el medicamento y el microorganismo, reduciendo la probabilidad de desarrollar una resistencia (Mohan, 1980).

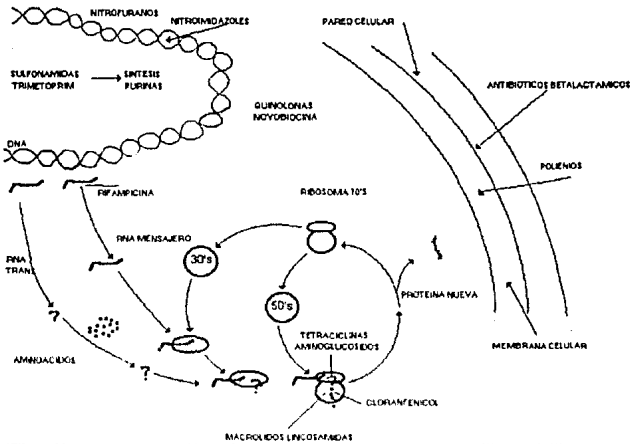
La elección del antimicrobiano no solamente depende del agente causal involucrado, sino de la forma de acción que tiene éste sobre el microorganismo. Los antimicrobianos presentan dos efectos importantes sobre las bacterias, uno bactericida y otro bacteriostático. Estos efectos dependen de la zona o estructura bacteriana a la que afectan específicamente. (Cuadro 2).

CUADRO 2

DROGAS ANTIMICROBIANAS UTILIZADAS COMUNMENTE CONTRA Corynebacterium ovis

ANTIMICROBIANO	EFECTO	MODO DE ACCION
Sulfonamidas	Bacteriostático	Inhibición competitiva
Penicilina natural	Bactericida	Inhibición pared cel.
Penicilina G y V		
Penicilina semisint. Ampicilina Methicilina Oxacilina	Bactericida	Inhibición pared cel
Gentamicina	Bactericida	Inhibición síntesis prot.
Cloramfenicol	Bacteriostático	Inhibición síntesis prot.
Eritromicina	Bacteriostático	Inhibición síntesis prot.

(Prescott, 1991)



SITIOS DE ACCION DE LOS ANTIMICROBIANOS UTILIZADOS EN FORMA RUTINARIA EN MEDICINA VETERINARIA (Akasaka, T., 1981)

Existen reportes elaborados que muestran la susceptibilidad de **Corynebacterium pseudotuberculosis** desafiando 71 cepas aisladas de cabras a través de la prueba de difusión con disco en los Estados Unidos trabajando con 10 antimicrobianos. Otro trabajo muestra la utilización de 25 cepas obtenidas a partir de ovinos en Canadá, usando los mismos antimicrobianos para determinar la concentración mínima inhibitoria. Por otro lado, la susceptibilidad antimicrobiana de cepas de **Corynebacterium pseudotuberculosis** en Japón no ha sido probada (Zhao, 1991).

No solamente es de importancia conocer la sensibilidad de una bacteria a cierto antimicrobiano, sino que se debe conocer la concentración

adecuada que puede producir el efecto deseado, a esto se le conoce como concentración mínima inhibitoria (MIC), y nos ayuda además a determinar incremento o decremento en la sensibilidad a determinados antimicrobianos (Cuadro 3).

Las pruebas para determinar la concentración mínima inhibitoria en el género **Mycoplasma** sp. han revelado que existe la posibilidad de un decremento en la sensibilidad a las drogas (Zimmerman, 1975).

Cuadro 3

CONCENTRACIONES MINIMAS INHIBITORIAS DE TETRACICLINA PARA ALGUNOS PATOGENOS EN MEDICINA VETERINARIA

PATOGENO	CONCENTRACION INHIBITORIA MINIMA (mg/ml)	
	MIC50	MIC90
Bordetella bronchiseptica	1.0	02.0
Brucella canis	1.6	01.6
C. pseudotuberculosis	0.09	00.19
Escherichia coli	4.0	64.0
Klebsiella pneumoniae	2.0	64.0
Mycoplasma canis	5.0	10.0
Pasteurella multocida	0.4	00.4
Bacteroides asaccharolyticus	1.0	02.0

(Biberstein, 1990)

Factores adicionales al conocimiento de la concentración mínima inhibitoria que inducen a una respuesta adecuada del tratamiento deben ser considerados. Entre ellos se encuentran dosis del antimicrobiano, selección del antimicrobiano, tiempo de exposición, niveles séricos y poder de penetración (Martín 1983).

En base a trabajos realizados con **Bordetella bronchiseptica** se ha considerado la alternativa de utilizar asociaciones antimicrobianas específicas con la finalidad de disminuir la resistencia ante un tratamiento o potencializar su efecto. (Giles, 1980)

Existen varios mecanismos mediante los cuales las bacterias adquieren resistencia:

Resistencia constitutiva

Es posible que las bacterias sean resistentes a los antibióticos porque carecen de mecanismos celulares necesarios para que estos agentes ejerzan su acción. Entre los muchos ejemplos de resistencia, se encuentra la resistencia natural de la familia **Enterobacteriaceae** a la penicilina G y la de las bacterias gram positivas a la polimixina. Además, se puede dar el caso de bacterias que "in vitro" son sensibles, sean resistentes "in vivo" como ocurre en el caso de **Corynebacterium pseudotuberculosis** que por su característica de parasitismo intracelular

y las condiciones de encapsulamiento, no permite el acceso del antibiótico en forma adecuada al microorganismo. También es posible que algunas bacterias pierdan su pared celular para después seguir viviendo en el organismo como formas L, y que tras perder su pared, se vuelvan resistentes a los antibióticos beta-lactámicos. De igual modo, las bacterias gram positivas de crecimiento lento, pueden ser resistentes "in vivo" a los antibióticos que actúan sobre la pared celular, debido a que estos antibióticos solo ejercen su acción sobre microorganismos en fase de multiplicación (Prescott, 1991).

Resistencia adquirida

La resistencia adquirida, de base genética puede aparecer como consecuencia de mutaciones cromosómicas o lo que es más importante, por adquisición de material genético transmisible.

Las mutaciones cromosómicas que originan la resistencia contribuyen a producir cambios estructurales en la célula bacteriana, mientras que la resistencia transmisible contribuye a codificar enzimas que metabolizan a los antibióticos.

La resistencia cromosósima suele ser un fenómeno de aparición gradual, paso a paso, mientras que la resistencia transmisible es con frecuencia un fenómeno de aparición brusca.

Los principales mecanismos de resistencia comprenden:

- Inactivación de antibióticos por enzimas.

- Impermeabilización de las bacterias
- Alteración de los receptores de la célula a los que se unen los antibióticos.
- Desarrollo de mecanismos de retroinhibición en las vías metabólicas
- Aparición de enzimas con escasa afinidad por los fármacos

(Scanlan, 1990).

La capacidad de los gérmenes gram positivos y gram negativos de producir beta-lactamasas, que pueden abrir el anillo beta-lactámico, constituye un factor primordial de la resistencia bacteriana y tiene una indudable importancia clínica. Algunos estudios han revelado que la enzima destructora de penicilina la segregan las células bacterianas y en parte permanece unida a ellas. La enzima es inducida comunmente por los antibióticos beta-lactámicos. Muchas bacterias gram negativas producen también beta-lactamasa, en estos microorganismos la enzima es a menudo constitutiva, es decir, se sintetiza en grandes cantidades aunque no se añada el inductor. Se ha observado que los génes que codifican las beta-lactamasas pueden transferirse de una especie bacteriana a otra a través de plásmidos (Biberstein, 1990).

La penicilinasa es detectada por técnicas químicas, microbiológicas e inmunolólgicas. Estas técnicas son cualitativas y semicuantitativas, una cuantificación correcta de penicilinasa es difícil de conseguir. Se ha intentado esta cuantificación a partir de pruebas de ELISA y Western blotting. (Kamata, 1992).

Mutaciones cromosómicas

Las mutaciones que originan la resistencia a los antibióticos son acontecimientos espontáneos que implican modificaciones de secuencias de nucleótidos de los cromosomas, que nada tienen que ver con la presencia de los antibióticos. Los mecanismos mediante los cuales las mutaciones cromosómicas originan la resistencia incluyen la modificación de la permeabilidad celular, mayor producción de enzimas inactivantes y mayor producción de metabólicoscompetitivos. Las mutaciones responsables de la resistencia pueden aparecer en forma brusca o en forma gradual. Las mutantes resistentes aparecen con menor frecuencia " in vivo " debido a que las defensas del hospedador eliminan a muchas de ellas. Las dosis bajas e intermitentes favorecen la aparición de resistencia debida a mutaciones cromosómicas. La resistencia cromosómica de los microorganismos contra aminoglucósidos depende principalmente de la ruta de la proteína receptora específica sobre la subunidad 30s ribosomal (Prescott, 1991).

La resistencia es mediada por un plásmido contra los aminoglucósidos y está directamente relacionada con la producción por parte del microorganismo de enzimas adenilhilantes, fosforilantes o acetilantes que destruyen al fármaco. (Cruz, 1987).

Otro tipo de resistencia consiste en un defecto de la permeabilidad, debido quizás, a la falta de transporte activo del aminoglucósido hacia el interior de la célula, de modo que el fármaco no puede llegar al ribosoma. (Ackerman, 1984).

Resistencia a los fármacos por intercambio genético

El intercambio de material genético como causa de resistencia de los microorganismos a los agentes antimicrobianos tiene una gran importancia y se realiza por distintos mecanismos:

Transducción

Un plásmido es incorporado por un bacteriófago y es transferido a otra bacteria. El ejemplo más representativo de transducción fágica lo constituye la transferencia del gen que codifica la beta-lactamasa de estafilococos resistentes a estafilococos sensibles (Davis, 1983).

Transformación

Se trata de un mecanismo de transferencia de genes, en el que el DNA libre pasa de una bacteria a otra, modificando el genotipo de la bacteria receptora que se transforma.

Algunas veces los transposones son transferidos de una célula a otra de esta forma (Prescott, 1991).

Conjugación

En este fenómeno de transferencia de genes, que se da con frecuencia, la bacteria sintetiza un pelo sexual, el cual se fija a la bacteria receptora

mediante un fenómeno de apareamiento y transfiere a esta última copia de los génes de resistencia por medio de plásmidos. La bacteria donadora conserva copias del plásmido, mientras que la bacteria ahora es receptora se convierte en posible donadora. Esta transferencia genética puede tener lugar entre especies y entre distintos géneros. Los elementos genéticos responsables de la transmisión de resistencia son los plásmidos o factores R. Poseen regiones en las que se encuentran los genes responsables de la resistencia, los cuales pueden codificar la resistencia a un solo antibiótico o a varios de ellos, hasta un total de 10 distintos y la capacidad de las bacterias para transmitir genes por conjugación (Davis, 1983).

En años recientes muchas cepas de Salmonella aisladas de bovinos y cerdos han mostrado ser resistentes a antibióticos como tetraciclina, estreptomicina, sulfadimetoxina y cloramfenicol, encontrándose que su resistencia está medida por conjugación de un plásmido R. (Ishiguro, 1980).

Es bien sabido que la producción de enterotoxina en E. coli está bajo control de un plásmido que tiene su transmisión por conjugación. Ahora se conoce que las cepas receptoras del plásmido " Ent " poseen ciertos factores que facilitan su capacidad de recibir plásmidos en general. Varios estudios han mostrado que el uso de antibióticos en el alimento resulta en el incremento del número de E. coli en el intestino que albergan el factor R, lo cual demuestra la transmisión no solo de la resistencia a antibióticos, sino también la capacidad de producir toxinas. (Bourque, 1980).

Esta condición existe también para **Bordetella bronchiseptica** que es capaz de albergar el factor R, que juega el papel más importante en la alta prevalencia de resistencia contra las sulfonamidas. (Smith, 1980), Esta resistencia es de suma importancia para este microorganismo, ya que de ello depende que pueda protegerse de la acción de las sulfonamidas contra su cápsula, que es uno de los más importantes factores de virulencia. (Kuwano, 1982).

Transposones

Fragmentos cortos de DNA conocidos como transposones son capaces de cambiar su posición intracelular, pasando de un plásmido a otro, de un plásmido al cromosoma bacteriano o viceversa. En su primitiva localización queda una copia del transposon con la frecuencia que tiene lugar este cambio de localización o transposición. La importancia de la transposición como elemento clave en el fenómeno de transmisión de resistencia, reside en que tiene lugar independientemente del fenómeno de recombinación genética. Gracias a la existencia de los transposones, plásmidos de origen muy diverso poseen genes responsables de la resistencia. La rápida transferencia intracelular de tansposones de unos plásmidos a otros, así como entre cromosomas y los plásmidos, junto con la transferencia de plásmidos de unas bacterias a otras, pueden dar lugar a una rápida aparición de resistencia a antibióticos en las poblaciones bacterianas (Prescott, 1991).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la sensibilidad a distintos antibióticos de cepas de **Corynebacterium pseudotuberculosis** aisladas a partir de casos clínicos de ovinos y caprinos.

OBJETIVOS PARTICULARES

Aislamiento e identificación bioquímica de cepas de **Corynebacterium pseudotuberculosis,** a partir de muestras clínicas.

Elaboración de la prueba de sensibilidad a antimicrobianos por el método de Kirby-Bauer.

Análisis estadístico de los resultados para establecer la sensibilidad a los antimicrobianos

MATERIAL Y METODO

MATERIAL PARA LA PRUEBA DE SENSIBILIDAD

Los antibióticos utilizados están contenidos en multidiscos combinados de uso comercial elaborados por Laboratorios Bigaux por lo que su elección y concentración está bajo su control.

ANTIBIOTICO	SITIO DE ACCION	CONCENTRACION
PENICILINAS	PARED CELULAR	
AMPICILINA		10 mcg.
PENICILINA G		10 U.I.
DICLOXACILINA		1 mcg.
CEFALOSPORINAS	PARED CELULAR	
CEFALOTINA		30 mcg.
CEFTRIAXONA		30 mcg.
AMINOGLUCOSIDOS	30s RIBOSOMAL	
AMIKACINA		30 mcg.
GENTAMICINA		10 mcg.
NETIMICINA		30 mcg.
MACROLIDOS	50s RIBOSOMAL	
ERITROMICINA		15 mcg.
CLORANFENICOL	50s RIBOSOMAL	30 mcg.
QUINOLONAS	DNA	
ENOXACINA		5 mcg.
SULFONAMIDAS	BASES PURICAS	
SULFAMETOXASOL		100 mcg.
TRIMETOPRIM		25 mcg.

MATERIAL ADICIONAL

- Pinzas de disección estériles
- Hisopos estériles
- Tubos de ensayo estériles
- Cajas de Petri (15 cm.) estériles
- Medio de cultivo Mueller-Hinton
- Calibrador vernier
- Nefelómetro de MacFarland

METODO PARA LA IDENTIFICACION

La identificacion se realizó a partir de la observación morfológica, pruebas primarias y pruebas secundarias de acuerdo a García, 1980.

METODO PARA LA PRUEBA DE SENSIBILIDAD

Para la evaluación de la sensibilidad se empleó el método de Kirby-Bauer. Este método se fundamenta en que al colocar un disco impregnado con determinada cantidad de antimicrobiano, sobre un medio sólido inoculado con bacterias, el antimicrobiano difunde formando un gradiente de concentración inhibiendo el crecimiento bacteriano.

Preparación del agar Mueller-Hinton

- Pesar la cantidad necesaria para el número de cajas a sembrar.
- Hidratar el medio en polvo
- Homogenizar la mezcla
- Clarificar sobre un mechero
- Esterilizar a 121°C 15 minutos 15 libras de presión.
- Dejar enfriar hasta 45-50°C
- Adicionar 5% de suero equino estéril
- Vertir 25 ml. de medio en las cajas de Petri (dentro de una zona de esterilidad)
- Dejar a temperatura ambiente hasta lograr gelificación
- Incubrar 37°C/24 hrs. (Prueba de esterilidad).

Cultivo Bacteriano

Se tomó una asada de cultivo bacteriano puro y se inoculó 2-3 ml. de medio caldo infusión - cerebro - corazón (BHI). Se adicionaron 0.3 ml

de suero equino estéril y se incubó a 37°C durante 48 hrs.

La turbidez se ajustó con solución salina estéril o caldo estéril hasta tener una densidad comparable con un estándar de sulfato de bario.

El estándar se preparó mezclando 0.5 ml. de cloruro de bario con 99.5 ml. de ácido sulfúrico al 1% v/v, que es la mitad de la densidad estándar No. 1 de MacFarland.

Este estándar corresponde aproximadamente a 100,000,000 de microorganismos por mililitro. La suspensión ajustada del inóculo no debió permanecer más de 15-20 minutos antes de sembrarla en la caja de Petri.

Inóculo del agar Mueller-Hinton

Para inocular el agar se utilizó un hisopo estéril, el cual se humedece en la suspensión, se quitó 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, para obtener un inóculo uniforme. Se efectuó un último barrido del hisopo sobre el reborde de la caja de Petri y el agar.

Cuando el inóculo había secado (3-5 min.) se procedió a colocar los discos impregnados con los antimicrobianos.

COLOCACION DE LOS DISCOS

Los discos se tomaron con pinza de disección estéril y se colocaron en el medio antes de 15 min. de haber inoculado la placa. Los discos se presionarion ligeramente para asegurar un contacto con la superficie. Se previno una superposición de las zonas de inhibición con distribución adecuada de los discos con un límite no menor de 15mm. de los bordes de la placa.

Después de 15 minutos de haber colocado los discos, se invirtieron las cajas de Petri y se incubaron a 37°C durante 48 hrs. (Barry, 1982).

Las medidas de los halos de inhibición se realizaron con un calibrador Vernier por el fondo de la caja, la cual se iluminó con luz reflejada. El punto final del sistema de lectura fue una completa inhibición del crecimiento determinada visualmente, ignorando colonias tenues o muy pequeñas que pudieron ser observadas. (Stanley, 1983).

Las cepas se clasificaron como Resistentes (R), Intermedias (I) o Susceptibles (S), dependiendo del estándar de tablas conocidas. (Giono, 1983).

Los datos fueron analizados y se estableció el número y porcentaje de cepas resistentes, intermedias y susceptibles a cada agente antimicrobiano probado.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos de los halos de inhibición de la prueba de sensibilidad antimicrobiana efectuada a las 50 cepas de **C. pseudotuberculosis** se muestran en la Tabla 4.

La mayoria de las cepas mostraron una alta sensibilidad para cefalotina (100%), ceftriaxona (98%), dicloxacilina (98%), ampicilina (94%).

En cuanto a sensibilidad intermedia los porcentajes más altos fueron presentados por eritromicina (60%), enoxacina (42%).

La resistencia fue principalmente en gentamicina (82%) y enoxacina (52%).

El número de cepas sensibles de **Corynebacterium pseudotuberculosis** a los antimicrobianos se mostraron en la siguiente forma :

40 cepas mostraron sensibilidad a amikacina, 6 tuvieron sensibilidad intermedia y 4 se mostraron resistentes. En cuanto a ampicilina se puede observar que 47 cepas fueron altamente sensibles, 3 mostraron sensibilidad intermedia y ninguna mostró resistencia. Altos niveles de sensibilidad fueron dados para cefalotina con 50 cepas sensibles y para ceftriaxona con 49 sensibles y solo una cepa con sensibilidad intermedia. 41 cepas mostraron sensibilidad a cloramfenicol y 9 con sensibilidad intermedia. Un alto nivel de sensibilidad se observó para

dicloxacilina con 49 cepas sensibles y una cepa intermedia. Con la combinación sulfametoxasol/trimetoprim se manifestó que 44 cepas resultaron sensibles y 6 con sensibilidad intermedia. Es interesante observar que existe una sensibilidad disminuida con relación a penicilina, ya que solo 33 cepas fueron sensibles, 14 presentaron sensibilidad intermedia y 3 de ellas fueron resistentes. La utilización de netilmicina mostró que 19 cepas fueron sensibles, 11 con sensibilidad intermedia y 20 presentaron resistencia marcada. Los antimicrobianos a los cuales se presentó menor sensibilidad fueron gentamicina con 2 cepas sensibles, 7 cepas con sensibilidad intermedia y 41 cepas resistentes, enoxacina con 3 cepas sensibles, 21 cepas intermedias y 26 cepas resistentes y eritromicina con 7 cepas sensibles, 30 cepas con sensibilidad intermedia y 13 cepas resistentes (Cuadro 5).

El porcentaje de los resultados antes mencionados puede observarse en el cuadro 6 y gráfica 1.

Cuadro 5
NUMERO DE CEPAS SENSIBLES DE
Corynebacterium pseudotuberculosis
A LOS ANTIMICROBIANOS

ANTIBIOTICO	SENSIBLE	INTERMEDIO	RESISTENTE
AMIKACINA	40	6	4
AMPICILINA	47	3	0
CEFALOTINA	50	0	0
CEFTRIAXONA	49	1	0
CLORANIFENICOL	41	9	0
DICLOXACILINA	49	1	0
ENOXACINA	3	21	26
ERITROMICINA	7	30	13
GENTAMICINA	2	7	41
NETILMICINA	19	11	20
PENICILINA	33	14	3
SULFAMETOXASOL TRIMETOPRIM	44	6	0

Cuadro 6

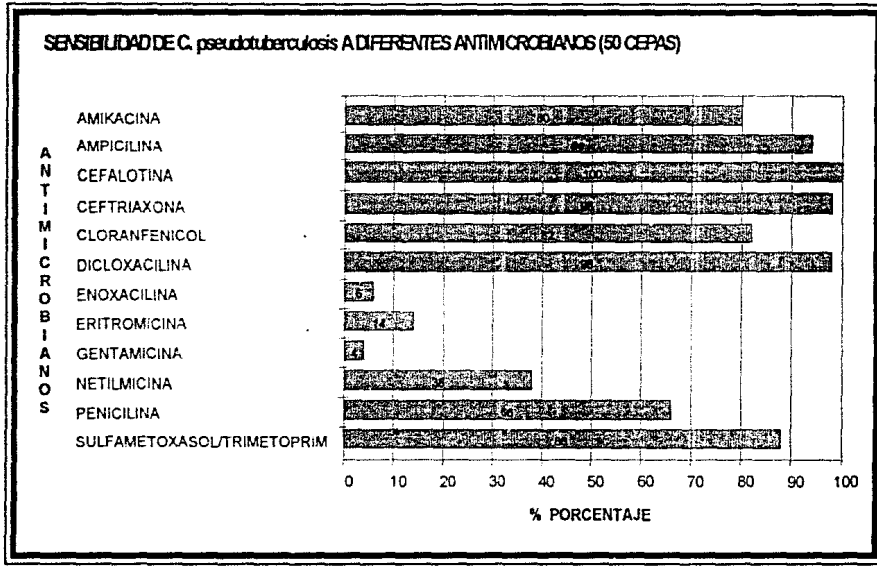
PORCENTAJE DE LA SENSIBILIDAD DE LAS 50 CEPAS DE

Corynebacterium pseudotuberculosis

A LOS ANTIMICROBIANOS

ANTIBIOTICO	SENSIBLE (%)	INTERMEDIO (%)	RESISTENTE (%)
AMIKACINA	80.0	12.0	8.0
AMPICILINA	94.0	6.0	0
CEFALOTINA	100.0	0	0
CEFTRIAXONA	98.0	2.0	0
CLORANFENICOL	82.0	18.0	0
DICLOXAMICINA	98.0	2.0	0
ENOXACINA	6.0	42.0	52.0
ERITROMICINA	14.0	60.0	26.0
GENTAMICINA	4.0	14.0	82.0
NETILMICINA	38.0	22.0	40.0
PENICILINA	66.0	28.0	6.0
SULFAMETOXASOL TRIMETOPRIM	88.0	12.0	0

GRAFICA 1


SENSIBILIDAD DE C. pseudotuberculosis A DIFERENTES ANTIMICROBIANOS (50 CEPAS)
ANTIMICROBIANOS
AMIKACINA
AMPICILINA
CEFALOTINA
CEFTRIAXONA
CLORANFENICOL
DICLOXACILINA
ENOXACILINA
ERITROMICINA
GENTAMICINA
NETILMICINA
PENICILINA
SULFAMETOXASOL/TRIMETOPRIM
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
% PORCENTAJE

DISCUSION

En el presente estudio se intenta ofrecer información sobre sensibilidad de cepas existentes en México, especificamente en el Estado de México, a los antibióticos utilizados en forma común.

Debido a la falta de información referente a la sensibilidad de las cepas de **Corynebacterium pseudotuberculosis** en México se decidió hacer una evaluación sobre 50 cepas.

Se ha considerado que **Corynebacterium pseudotuberculosis** es refractario a la terapia antibiótica porque el absceso caseoso que se ha producido por la infección está densamente encapsulado. Sin embargo, la aplicación de antibióticos como cefalotoína, ceftriaxona, dicloxacilina, ampicilina y la combinación sulfametoxasol/trimetoprim a los cuales existe sensibilidad " in vitro " por parte del microorganismo, podrían también ser eficaces contra el microorganismo " in vivo " si se aplicaran en un estadio temprano de la infección. Trabajos previos (Chikamatsu,1989), han revelado que los anticuerpos anti-**Corynebacterium pseudotuberculosis** están en niveles bajos en ovejas menores de un año de edad, y la proporción se incrementa significativamente en aquellas que cumplen 1 año de edad. Esto sugiere que la infección por **Corynebacterium pseudotuberculosis** ocurre mayormente en ovejas de alrededor un año de edad.

Un estudio sobre la reducción en la ocurrencia de linfadenitis caseosa por aplicación de anibióticos en ovejas de un año de edad,

especialmente después de la primera trasquila, está en desarrollo. (Zhao, 1991).

Los resultados concuerdan en muchos aspectos con reportes previos en los que se muestra una alta sensibilidad para cefalosporinas, ampicilina, amikacina, dicloxacilina y sulfas.

Se puede considerar que la sensibilidad mostrada está dada por que algunos de estos antimicrobianos no se utilizan en forma rutinaria en medicina veterinaria, por lo que el contacto que se tiene .entre el microorganismo y el agente antimicrobiano no ha permitido el desarrollo de factores de resistencia. Además no se ha logrado demostrar la existencia de bacteriófagos que puedan transferir información de resistencia contra estos antimicrobianos para **Corynebacterium pseudotuberculosis.**

Existen diferencias notorias en cuanto al porcentaje de sensibilidad para antibióticos como gentamicina y eritromicina.

La resistencia mostrada para eritromicina y los aminoglucósidos como gentamicina, netilmicina y amikacina es atribuible a la capacidad de los microorganismos a desarrollar resistencia cruzada contra antimicrobianos de un mismo grupo, por lo que bastaría el contacto con un antimicrobiano para desarrollar resistencia contra algunos de los antibacterianos del grupo. Este contacto es conseceancia de la utilización de antibióticos como gentamicina en la terapia cotidiana o su utilización en las raciones alimenticias como promotores de crecimiento. Se ha considerado en el presente trabajo la importancia de conocer la

concentración mínima inhibitoria como un factor determinante en la obtención de efectos adecuados. Es de importancia recalcar que la adición de antimicrobianos en las raciones, con una concentración menor a la necesaria, permite el desarrollo de resistencia para algunos microorganismos, ya que estos niveles de antibióticos no logran eliminar a ciertos microorganismos, pero permite el contacto continuo con ellos.

El uso indiscriminado de antimicrobianos en la producción animal no solo propicia cepas resistentes en forma directa, sino que permite a través de bacteriófagos la transferencia de información de resistencia de un género a otro aumentando en gran proporción la probabilidad de desarrollar dicha resistencia. Para el caso de **Corynebacterium pseudotuberculosis** se ha demostrado la existencia de bacteriófagos que transmiten resistencia contra aminoglucósidos. Entonces, se puede pensar que la resistencia para gentamicina, eritromicina, enoxacina y netilmicina no se establece únicamente por el contacto de **Corynebacterium pseudotuberculosis** con los antimicrobianos, sino que cabe la posibilidad de que esté dada por la información genética de otros géneros bacterianos que tienen un contacto más continuo con ellos.

Es importante mostrar estas diferencias si se pretende tener una elección adecuada de antimicrobianos, dosis y tiempo de exposición para cepas nacionales de **Corynebacterium pseudotuberculosis.**

Esta recomendación es considerando que regularmente se encuentran lesiones muy crónicas en ovinos y caprinos normalmente a nivel de

rastro, en donde el microorganismo está localizado dentro de los macrófagos y que requiere posiblemente la administración prolongada de antimicrobianos específicos para obtener buenos resultados o tal vez pensar en evitar que se presente la infección utilizando estos datos para instaurar un tratamiento preventivo.

CONCLUSIONES

1. Existen diferencias en la sensibilidad a los antimicrobianos por parte de las cepas aisladas en México, especificamente en el Estado de México, en relación a las cepas de Canadá y Estados Unidos.

2. La diferencia radica especialmente en un nivel de resistencia para antibióticos como gentamicina y eritromicina.

3. La sensibilidad a antimicrobianos es muy similar para cefalosporinas, ampicilina y dicloxacilina.

4. Es posible observar una sensibilidad disminuída para penicilina en relación a reportes nacionales y extranjeros.

5. Existe la posibilidad de instaurar un tratamiento preventivo con los antimicrobianos más efectivos inmediatamente después de la primera trasquila o en los estadios tempranos de la infección y manteniendo las medidas de control conocidas.

6. Se debe determinar la sensibilidad de la cepa infectante en cada rebaño a fin de conocer la sensibilidad real y elegir el tratamiento más eficaz utilizando esta sencilla prueba " in vitro ".

BIBLIOGRAFIA

Ackerman, B.H., Baille, GR.R. 1984.
Aminoglycoside Therapy: Improving pattient response and safety
Drug monite, Vol. 75 p.p. 177-185.

Aharonwitx, Y., Cohern, G. 1981.
The micobiological production of pharmaceuticals
Sci. Am. 245 p.p. 141.

Alwis, M.C.L., Wijewardana, T.G. 1984.
Caseous Lymphadenitis in goat farm in Sri Lanka
Sri Lanka Veterinary Journal, 31 (1/2) p.p. 26-29

Barry A., Thornsberry, C. 1982.
Pruebas de susceptibilidad: Procedimientos para pruebas de difusión.
En Lennette, E. H. Manual de Microbiología Clínica, 3a. edición,
Editorial Médica Panamericana. p.p. 561-574.

Benson, C.E.: Palmer, J.E. 1985.
Antibiotic susceptibilities of Salmonella species isolates at a Large
Animal Veterinay Medinal Center: A three year study.
Can. J. Comp. Med. Vol. 49 p.p. 125-128

Biberstein, L.E. 1990.
Review of Veterinary Microbiology
Blackwell Scientific Publication, 1a. ed. p.p. 56-68

Bourque, R.: Lallier, R. 1980.
Influence of oral antibiotics on resistence and enterotoxigenety of Escherichia coli
Can. J. Comp. Med. Vol. 44, January, p.p. 101-108.

Brodgen, K.A., Chedida, L. 1990.
Effect of muramyl dipeptide on immunogenety of Corynebacterium pseuodtuberculosis whole-cell vaccine in mice and lambs
Am. J. Vet. Res. Vol. 51 No. 2 February. p.p. 200-202.

Brown, C.; Olander, J. 1987.
Caseous lymphadenitis in goats and sheep. A review.
Veterinary bulletin, Vol. 57 No. 1 p.p. 56-58

Burrell, D.H. 1981.
Caseous Lymphadenitis in goats
Australian Veterinary Journal, Vol. 57 March, p.p. 105-110.

Colmenares, V.G.; Torres, A.O. 1988.
Resistencia antimicrobiana no codificada por plasmidos en Actinoacillus pleuropneumoniae Serotipo 1.
Vet. Mex. Vol. 19 p.p. 315-320.

Cruz, R.M. 1987.
Revisión bibliográfica de reacciones adversas de algunos farmacos antimicrobianos inhibidores de la sintesis proteica existentes en México. Tesis Profesional F.E.S.C.-U.N.A.M.

Chikamatsu, S.; Zhao, H. 1989.
Seropidemiological survey of Corynebacterium pseudotuberculosis infection in sheep in Japan using Enzime-Linked Immunosorbent Assay and Immunodiffusion.
Jpn. J. Vet. Sci. 51 (5) p.p. 887-891.

Chirino, J.M.; Prescott, J.F. 1983.
Identification an antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria from pneumonic cattle lungs.
Can. J. Comp. Med. Vol. 47 p.p. 270-276

Davis, D.B. 1983.
Tratado de Microbiologia. 2a. edición. Salvat Editores
Barcelona, p.p. 195-206.

Favier, B.; Richard, Y. 1990.
Etudé bacteriologique de 58 souches de Corynebacterium pseudotuerculosis. Note 1. Intéret d' une micromethode.
Revue de Med. Vet. 14 (1) p.p. 43-47.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

García, V.S. 1980.
Aislamiento y caracterización de Corinebacteria en muestras de ovinos y caprinos en México.
Tesis Licenciatura M.V.Z. FES-CUAUTITLAN-UNAM

Giles, C.J.; Smith, I.M. 1980.
Clinical bacteriological and epidemiological observations on infectious atrophic rhinitis of pigs in southern England.
Veterinary Record, January, Vol. 106 p.p. 25-28.

Gilmour, N.J.L. 1990.
Caseous lymphadenitis: A cause of concern.
Veterinary Record, June 9 p.p. 556.

Giono, C.G. 1983.
Prueba de Kirby-Bauer para sensibilidad a antimicrobianos.
Infectología III (7) p.p. 325.

Harland, W.R. 1979.
Visceral Caseous lymphadenitis in thin ewes syndrome: Isolation of Corynebacterium, Staphylococcus and Moraxella spp. from internal abscess in emaciated ewes.
Am. J. Vet. Res. Vol. 40 No. 8 p.p. 1110-1113.

Hodges, R.T.; Young, G.W. 1984.
Prevalence and in vitro antimicrobial sensivity of Bordetella
New Zeland Veterinary Journal, Vol. 42 p.p. 111-114.

Holstad, G.J.; Teige, jr. 1989.
Corynebacterium pseudotuberculosis infection in goats VIII.
Acta Vet. Scand. Vol.30 No. 3 p.p. 275-283.

Ishiguro, N.; Makino, S. 1980.
Antibiotic resistence and genetic properties of R. Plasmids in Salmonella
isolates of swine origina in Japan.
Am. J. Vet. Res. Vol. 41 p.p. 46-50.

Judson, R.; Songer, G.J. 1991.
Corynebacterium pseudotuberculosis "in vitro". Susceptibility to 39 antimicrobial agents.
Veterinary Microbiology, 270. p.p. 145-150
Elsevier Science Publisher B.V.

Kamata, S.; Ohkawa, A. 1992.
Preliminary experiment for detection of pelicillinase by Enzime-linked Immunosorbent Assay and Western blotting Technique.
J. Vet. Med. Sci. 54 (2) P.P. 395-397.

Kuwano, A.; Ito, T. 1992.
Comparison of the inhibitory effect of sulfamonomethoxine and other sulfanamides on capsule formation of Bordetella bronchiseptica.
J. Vet. Med. Sci. 54 (5) p.p. 1057-1059.

Lloyd, S.; Lindsay, J. 1990.
Caseous Lymphadenitis in goats
Veterinary Record. Nov. 10 p.p. 127, 148.

MacFadin, F.S. 1990.
Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica.
3a. edición, Ed. Panamericana. p.p. 60-64.

Márquez, Q.N. 1970.
Estudio clínico de Linfadenitis Caseosa en caprinos en Venezuela criollos e importados.
Revista de Medicina Veterinaria y Parasitología. Vol. XXIII.

Martín, W.S.; Meek , A.H. 1981.
The interpretation of antimicrobial susceptibility patterns.
Can. J. Comp. Med. Vol. 45 p.p. 199-202.

Martín, W.S.; Meek, A.H. 1983.
Antimicrobial use in feedlot calves: Its association with culture rates and antimicrobial susceptibility.
Can. J. Comp. Med. Vol. 47 p.p. 6-10.

Prescott, J.F.; Desmond, B.J. 1991.
Terapeutica Antimicrobiana Veterinaria.
Ed. Acribia, S.A. España p.p. 19-33

Scanlan, M. Ch. 1990.
Introducción a la Bacteriología Veterinaria
Ed. Acribia, S.A. Zaragoza, España p.p. 31-67

Smith, I.M.; Oliphant, J. 1980.
High prevalence of strains of Bordetella bronchiseptica resistant to potentiated sulphonamide in England pig herd in 1978-79.
Veterinary Record, Vol. 106 p.p. 462-463.

Stanley, S.R. 1983.
Linc's Medical Laboratory Technology.
Ed. W.B. Saunder. U.S.A. p.p. 434-440

Zhao, H.; Morimura, H. 1991.
Antimicrobial susceptibility of Corynebacterium pseudotuberculosis isolaes from lesions of Caseous Lymphadenitis in sheep in Hokkaido, Japan.
J. Vet. Med. Sci. 53 (2) p.p. 355-356.

Zimmerman, J.B.; Ross, R.F. 1975.
Determination of sensitivity of Mycoplasma hyosynoviae to tylosin and selected antibacterial drugs by a Microtiter Technique.
Can, J. Comp. Med. Vol. 39 p.p. 17-21.