

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

EVALUACION DE LA SENSIBILIDAD A
DIFERENTES DESINFECTANTES IN VITRO
EN 30 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 N

ERIC VILLEGAS ALCARAZ

CAROLINA BENITEZ SANCHEZ

DIRECTOR DE TESIS:

M. V. Z. SUSANA E. GARCIA VAZQUEZ

COASESOR: M. en C. TONATIUH CRUZ SANCHEZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO 1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

0271867



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES-CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO. VOTOS APROBATORIOS

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

DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

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

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

"Evaluación de la sensibilidad a diferentes desinfectantes in vitro en 30
cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*".

que presenta el pasante: Eric Villegas Alcaraz

con número de cuenta: 8612578-9 para obtener el TITULO de:
Médico Veterinario Zootecnista

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

A T E N T A M E N T E.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 09 de Diciembre de 1998

PRESIDENTE MVZ. Jose Rojo López

VOCAL MVZ. Susana García Vázquez

SECRETARIO MVZ. Gilberto Ochoa Uribe

PRIMER SUPLENTE MVZ. Enrique Flores Gasca

SEGUNDO SUPLENTE MVZ. Francisco Morales Alvarez



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

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



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

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el Trabajo de:
"Evaluación de la sensibilidad a diferentes desinfectantes in vitro en 30 cepas
de Corynebacterium pseudotuberculosis".

que presenta la pasante: Carolina Benítez Sánchez
con número de cuenta: 7925543-3 para obtener el TITULO de:
Médica Veterinaria Zootecnista.

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

A T E N T A M E N T E.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 09 de Diciembre de 199 8

PRESIDENTE

MVZ. José Rojo López

VOCAL

MVZ. Susana García Vázquez

SECRETARIO

MVZ. Gilberto Ochoa Uribe

PRIMER SUPLENTE

MVZ. Enrique Flores Gasca

SEGUNDO SUPLENTE

MVZ. Francisco Morales Alvarez

Para ti Susana que eres lo mejor

Eric

El que inicia la Carrera de Medicina obtiene en realidad una matrícula de estudiante en un curso indefinido y vertiginoso, que sólo termina cuando la vejez y el agotamiento hace del médico un trabajador inútil.

Eric Villegas Alcaraz

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio L-513 de la Sección de Ciencias de la Salud Animal de la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Campo 4, perteneciente a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2 - 19
OBJETIVOS	20
MATERIAL Y MÉTODO	21 - 26
RESULTADOS	27 - 33
DISCUSION	34 - 35
CONCLUSIONES	36
RECOMENDACIONES	37
LITERATURA CITADA	38 - 42

RESUMEN

Corynebacterium pseudotuberculosis es una bacteria productora de infecciones tales como Linfadenitis caseosa en pequeños rumiantes y Linfangitis ulcerativa en equinos. La vía de entrada, en ambos casos, es una herida y la fuente de contaminación más importante es el exudado purulento que se genera en forma característica en estas enfermedades y que puede contaminar el ambiente o diversos fomites. Es frecuente consultar en la literatura que la bacteria es susceptible a soluciones desinfectantes y antisépticas comunes empleadas rutinariamente en la explotaciones animales, sin embargo, algunos autores mencionan que es capaz de sobrevivir en algunas soluciones químicas empleadas para la desinfección del material de esquila en los ovinos, de ahí la inquietud de determinar cuáles pueden ser algunas de las soluciones más recomendadas para desinfección del material y desinfección general así como, las soluciones antisépticas adecuadas en las heridas que se puedan presentar en los animales. El presente trabajo tiene como finalidad determinar la sensibilidad que presentan diferentes cepas de ***Corynebacterium pseudotuberculosis*** a diversos desinfectantes y antisépticos. Se obtuvieron muestras sospechosas de Linfadenitis caseosa de nodos linfáticos, hígado y pulmón de ovinos durante el sacrificio efectuado en el rastro Tipo Inspección Federal (TIF) localizado en San Lorenzo, Edo. de México y de casos recibidos en el Servicio de Diagnóstico Bacteriológico de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán; todas contenían abscesos a partir de los cuales se aislaron 30 cepas de ***Corynebacterium pseudotuberculosis***. Los desinfectantes y antisépticos utilizados fueron: cloruro de benzalconio al 10%, fenol al 2%, formol al 2%, yodo al 2%, hidróxido de sodio al 2% y dos presentaciones comerciales: isodine, benzal concentrado y tintura de violeta de genciana. Las pruebas para determinar la sensibilidad fueron la técnica de placa en agar mediante el uso de discos impregnados con el desinfectante, realizándose la lectura mediante la medición de los halos de inhibición y la Técnica de Gardner (Microensayo) empleando 2 superficies madera y metal, en las cuales se colocó inicialmente la bacteria y después el desinfectante, para ser introducidas posteriormente en un medio líquido, la lectura fue determinada por medición de la turbidez en un espectrofotómetro (Spectronic 20, Bauch & Lomb) a una longitud de 400 nm. De acuerdo a los resultados de los halos de inhibición de las 30 cepas, las soluciones de mayor actividad inhibitoria fueron el benzal al 10% y el yodo al 2%. Con respecto al método de Gardner, las lecturas de absorbancia revelaron que los desinfectantes con mejor actividad fueron el formol al 2% y el hidróxido de sodio al 2%. Con estos resultados se puede hacer una recomendación sustentada en el uso de soluciones desinfectantes o antisépticas para el control y eliminación de ***Corynebacterium pseudotuberculosis***.

INTRODUCCIÓN

Corynebacterium pseudotuberculosis produce Linfadenitis caseosa en borregos y cabras, Linfangitis ulcerativa en equinos y ha sido aislada de abscesos y otros procesos supurativos en otras especies animales tales como bovinos, búfalos y humanos. La prevalencia de la infección en animales adultos puede ser de un 50 a 80% en algunos países como Australia, Nueva Zelanda, Canadá, Uruguay y Perú en especial en áreas con prácticas de manejo intensivas, sobre todo de borregos y cabras (Chandiramani,1982; Judson, 1991; Sutherland, 1993).

Las bacterias del género *Corynebacterium* son bastones pequeños Gram (+) que se presentan en filamentos angulares característicos y agrupaciones en empalizada, no son ácido resistentes y no forman esporas. *C. pseudotuberculosis* es un parásito intracelular facultativo y ha sido clasificado en 2 biotipos de acuerdo a la prueba de nitratos, el biotipo nitrato negativo infecta a borregos y cabras, y el biotipo nitrato positivo infecta a bovinos y equinos. Ambos biotipos son productores de una exotoxina conocida como fosfolipasa D, la cual participa en forma importante en la supervivencia y multiplicación del microorganismo en el hospedero, esto puede ser debido a los efectos que presenta sobre las células fagocitarias inhibiendo la quimiotaxis y la degranulación, produciendo elevada letalidad en neutrófilos y además actúa como un factor que incrementa la permeabilidad de vasos sanguíneos y linfáticos. El efecto mayor de la exotoxina se relaciona al establecimiento de la infección y posibles lesiones locales (Aldridge, 1995; Favier, 1990; Lindsay,1991; Sutherland, 1989; Walker, 1994).

El progreso de la infección a partir del foco primario o secundario involucra fagocitosis, multiplicación intracelular y muerte de las células. Las bacterias liberadas son otra vez ingeridas por los fagocitos, los cuales sufren un proceso de degeneración y muerte mientras el microorganismo continúa su multiplicación. Este ciclo de fagocitosis, multiplicación del microorganismo y degeneración celular proporciona las bases para las lesiones crónicas observadas en forma característica . El tamaño de las lesiones varía y probablemente depende de varios factores tales como el número inicial de microorganismos que originan la infección, tasa de multiplicación y accesibilidad de una lesión en los tejidos. La difusión de la bacteria del sitio primario de infección ocurre principalmente por vía linfática a nodos linfáticos locales los cuales presentan diversos focos infecciosos con formación de abscesos. La inflamación y los efectos de la toxina originan un incremento de la permeabilidad vascular y facilita la transferencia del microorganismo del sitio primario. La difusión linfática y hematogena puede

originar septicemia y lesiones internas , así como involucrar otros nodos linfáticos y formación de abscesos en otros órganos (Harland,1979; Hodgson, 1994; Holstad, 1989; Lindsnay, 1991; Redondo, 1988; Yeruham, 1997; Zaituon, 1994).

Habitat Normal

La ecología del microorganismo y el origen natural de la infección no están bien documentados, sin embargo se sabe que *C. pseudotuberculosis* está presente y es capaz de sobrevivir en el medio ambiente que ha sido contaminado por animales infectados. Las bajas temperaturas y condiciones de humedad prolongan el tiempo de supervivencia . La contaminación ambiental es por consiguiente considerada el factor más importante en la difusión de éste microorganismo . *C. pseudotuberculosis* ha mostrado ser capaz de sobrevivir por periodos prolongados de tiempo (más de 6 meses) en ambientes contaminados y puede ser aislado de polvo, comederos, alimento, cercas, tijeras, baños de inmersión y muestras de suelo de alrededor de áreas ganaderas (Aldridge,1995; Smith;1994).

La concentración de bacterias en exudado purulento fue determinada en un estudio, desafiando por inoculación subcutánea a cabras con 10^7 UFC de *C. pseudotuberculosis* resultando una infección. La microbiota de los abscesos inducidos experimentalmente fue evaluada 24 semanas después y la concentración de *C. pseudotuberculosis* fue determinada, en lesiones axénicas con un promedio de 2.2×10^5 a 2.6×10^8 UFC/ml con un promedio de 2.9×10^7 UFC/ml , en lesiones con microbiota mixta variaron de 2.1×10^6 a 4×10^8 UFC/ml con un promedio de 7×10^7 UFC/ml. La supervivencia del microorganismo en diversos fomites incluyendo superficies inanimadas (plástico, madera, acero) y otros como rasuradoras, paja, heno, heces, suelo y agua se determinó a 37°, 22° y 4° C. El microorganismo generalmente permaneció viable por largos periodos de tiempo, cuando el contenido de los abscesos fue colocado particularmente en fomites y se diseminó en superficies, generalmente la incubación fue a bajas temperaturas y el periodo de supervivencia del microorganismo fuera del hospedero se amplió. La supervivencia de *C. pseudotuberculosis* en exudado purulento en el suelo fue también estudiada utilizando muestras de suelo esterilizadas y no esterilizadas. El microorganismo persistió más en muestras de suelo esterilizadas por 6 meses o más y en muestras de suelo arenoso no esterilizadas por un lapso de tiempo de 3 a 7 semanas (Agustine, 1984) .

Dos factores contribuyen a la persistencia de la enfermedad, por un lado el gran número de bacterias eliminadas en el exudado purulento (en una dosis infectante de 10^7 microorganismos/g de pus) y por otro la capacidad de la bacteria de sobrevivir fuera del animal, en el suelo y en las instalaciones (Alonso, 1992).

La forma más común de entrada de la bacteria es a través de las heridas superficiales en la piel o las membranas mucosas, siguiendo la extensión a nodos linfáticos regionales de allí a otros nodos linfáticos y posteriormente produciendo un cuadro visceral afectando diversos órganos (pulmones, riñones, bazo etc.).

Ocasionalmente entra por tracto respiratorio causando lesiones torácicas y pulmonares pero, es generalmente aceptado que no es común que los pulmones se involucren en forma primaria. La ingestión de la bacteria puede producir lesiones en nodos linfáticos de cabeza y tórax (Aldridge, 1995 ; Jensen, 1988; Lloyd, 1990; Nagy ,1976; Paton, 1995).

Ovinos. La infección es a menudo adquirida por heridas durante la esquila, castración y corte de cola. Otras heridas en forma general, tales como mordidas de perro y rasguños pueden también estar implicados. La contaminación de las heridas con la bacteria a partir de fomites o por contacto directo con animales afectados resulta ser la vía más importante en la transmisión. Otro origen potencial de la infección es la persistencia del microorganismo en el agua en baños de inmersión , las bacterias son capaces de sobrevivir en soluciones desinfectantes comerciales por 24 horas sin reducción significativa en el conteo viable . El exudado purulento de una sola descarga de un nodo linfático afectado es capaz de contaminar grandes volúmenes . Las ovejas bañadas en fluidos contaminados, si son esquiladas en un lapso de 2 semanas posteriores son especialmente susceptibles a la infección debido al contacto entre la bacteria y la piel (Chandiramani, 1982; Ellis, 1987; Girones, 1993; Paton, 1995; Redondo, 1988; Serikawa y col., 1993).

En un estudio experimental realizado por Alonso y col. en 1992, fueron inoculados subcutáneamente 3 grupos de 4 ovejas cada uno con 2×10^6 células de *C. pseudotuberculosis*, siete días antes del apareamiento y durante la gestación durante el estado embrionario y fetal. Los signos clínicos, la respuesta humoral y el resultado de la infección en la reproducción fueron analizados. Nueve de las hembras mostraron algunos cambios en su condición general durante la preñez, las hembras inoculadas durante el estado embrionario

fueron severamente afectadas y algunas abortaron; en otras los corderos nacieron muertos y si estaban vivos se encontraban infectados, las hembras inoculadas durante el estado fetal de la gestación no mostraron desórdenes reproductivos sin embargo, algunas permanecieron crónicamente infectadas. Se concluye que la infección crónica con *C. pseudotuberculosis* puede ser de transmisión vertical y ocasionar desórdenes reproductivos tales como: aborto, mortalidad en recién nacidos y reducción de la tasa de crecimiento de corderos infectados.

Cabras. La transmisión es generalmente a partir de lesiones en la piel, heridas producidas durante peleas o traumatismos en la mucosa oral pueden también actuar como puerta de entrada para el microorganismo. *C. pseudotuberculosis* se encuentra asociado con el 70% de abscesos superficiales, otras bacterias como *Staphylococcus sp.* pueden originar infecciones mixtas en forma ocasional. Los abscesos pueden no estar asociados con nodos linfáticos y generalmente la infección no se transmite de cabra a cabra. Se ha observado que no existe diferencia entre el sexo o la raza en la presentación de la enfermedad, se ha reportado que cabras de 3 meses a 10 años de edad pueden infectarse, sin embargo, la incidencia es alta en cabras viejas tal vez por la exposición repetida a la infección o porque una cabra infectada no elimina la infección completamente (Aldridge, 1995).

Equinos. La causa más común de infección son heridas en la piel y no existe una predisposición de edad, sexo o raza. La elevada incidencia está relacionada con un pobre manejo, el problema es más frecuente en lugares con hacinamiento, animales con piquetes de insectos, las moscas y otro tipo de artrópodos pueden actuar como vectores mecánicos, lesiones provocadas por patadas y otro tipo de daños a tejidos. Las camas contaminadas y utensilios de las caballerizas contaminados pueden también actuar como fomites. En algunos países llega a existir un patrón estacional de ocurrencia con un pico durante el verano. Una elevada incidencia ocurre también después del invierno cuando hay un incremento importante en las lluvias, que propicia condiciones óptimas para la supervivencia y multiplicación de los artrópodos, el incremento de las poblaciones de insectos y el alto grado de infestación con ectoparásitos durante el próximo verano (Miers, 1980).

Tipo de lesiones/ órganos afectados.

Linfadenitis Caseosa

Es una enfermedad crónica y purulenta de borregos y cabras caracterizada por la formación de abscesos con agrandamiento palpable en nodos linfáticos superficiales, nodos linfáticos viscerales y órganos internos (Agustine,1984; Ellis,1987; Lloyd,1990).

Generalmente la lesión no se presenta en el sitio de entrada pero después de un período de incubación de varias semanas a 2 años se pueden formar abscesos en nodos linfáticos regionales . Los abscesos se encuentran más comúnmente en los nodos superficiales tales como: parotídeos, retrofaríngeos, prescapulares, subiliacos e inguinales; puede existir una significativa prevalencia en pulmón y nodos linfáticos torácicos . Se ha demostrado una diferencia en la distribución de las lesiones en borregos y cabras, los ovinos rara vez presentan lesiones en cabeza y cuello y los abscesos se observan más frecuentemente en la región prescapular y prefemoral; en el caso de los caprinos se involucran más frecuentemente los nodos mandibulares y parotídeos, las lesiones en el cuerpo de los animales afectados es similar en ambas especies pero las lesiones viscerales se presentan con menos frecuencia en cabras particularmente a nivel de pulmón lo que sugiere una diferencia en la patogénesis de la enfermedad, especialmente en relación al embolismo pulmonar ; el cual tal vez refleja diferencias anatómicas o fisiopatológicas. Se ha observado que las lesiones esplénicas son relativamente más comunes en cabras por lo que la localización de la bacteria en la circulación puede tener lugar en forma mas extensa en el tejido retículo endotelial (Batey, 1992; Girones,1993; Harker,1990; Hodgson, 1994; Holstad, 1989; Lindsay, 1991; Lloyd, 1990; Paton, 1995; Zaituon, 1994) .

Típicamente un absceso puede tener un diámetro de 5 a 10 cm y está asociada con una densa cápsula fibrosa. Contiene un exudado purulento cremoso, espeso que llega a ser con el tiempo de consistencia firme, el exudado inicialmente puede tener una consistencia friable y posteriormente es seco. En ovinos el exudado es de un color verde brillante o verde pistache y a menudo se presenta en laminación concéntrica, esta apariencia es debida a los repetidos estados de necrosis y formación de la cápsula de tejido fibroso. En cabras el contenido de los abscesos es más pastoso que seco presenta la apariencia laminar y raramente están calcificados (Agustine, 1984; Girones, 1993 ; Hodgson, 1994; Holstad, 1989; Lindsay, 1991; Redondo, 1988).

Los abscesos de aumento considerable en nodos linfáticos pueden romperse y descargar el exudado purulento alrededor de la herida y contaminan el ambiente. Cuando ocurren lesiones internas en pulmón los nodos linfáticos torácicos están frecuentemente involucrados, los animales con lesiones pulmonares intersticiales presentan neumonía, pleuresía y otras lesiones internas, sin embargo en muchos de los casos frecuentemente están ausentes los signos clínicos (Ellis, 1987; Nagy, 1976; Smith, 1994; Walker, 1994).

Los mayores daños de ésta enfermedad, son debidos a pérdidas económicas ocasionadas por el decomiso de canales, disminución en la producción de lana, en el valor de la piel, pérdida de peso , decremento en la producción de leche y en la eficiencia reproductiva (Aldridge, 1995; Alonso, 1992; Chandiramani, 1982; Paton, 1994).

Para satisfacer la demanda de ganado ovino y caprino destinados al abasto y para ajustar programas de mejoramiento genético, México se ha visto en la necesidad de importar ganado de los Estados Unidos de Norteamérica, Canadá, Nueva Zelanda y Australia, afectando la economía del país por la fuga de divisas, y por otro lado, el riesgo de introducir agentes patógenos que ponen en peligro la salud de la población nacional de pequeños rumiantes en los rebaños que están destinados a la cría y mejoramiento genético de la población ganadera del país, produciendo mermas en la industria pecuaria al ocasionar pérdidas de peso e incrementar gastos por tratamiento y mano de obra (Vázquez, 1992).

Existen pocos estudios sobre las principales enfermedades que afectan a los ovinos y caprinos del país, sin embargo los escasos datos recopilados de las regiones norte y centro del país, sitúan a la linfadenitis caseosa como una de las principales enfermedades con alta prevalencia en esas zonas, que ocasiona graves pérdidas por morbilidad y mortalidad del ganado. A nivel de rastro esta enfermedad es la causa mas importante de decomisos, encontrándose que en el caso de canales es del 80%, fracciones de canal 94-98%, cabezas 99% y vísceras 71% (Vázquez, 1992).

Tratamiento

El tratamiento más eficaz contra los focos caseosos es la incisión quirúrgica a fin de eliminar el contenido que puede perder esa consistencia con soluciones clorinadas o lugol. Los resultados de los tratamientos son muy irregulares; sin embargo se puede realizar una incisión vertical en el absceso encapsulado y si es

posible profunda para asegurar un buen drenaje. Se debe colectar el exudado purulento con mucho cuidado y debe ser incinerado o tratado con una solución desinfectante, la herida debe ser tratada con una solución antiséptica. el operador puede infectarse durante este procedimiento, por lo que deben extremarse las precauciones en el proceso para evitar la contaminación de otros animales, el operador y el medio ambiente. (Burrel, 1981; Redondo, 1988).

En pruebas realizadas por Serikawa y colaboradores (1994) en 2 explotaciones ovinas fue rociada tintura de yodo en todas las heridas visibles inmediatamente después de la esquila empleando un rociador comercial, resultando una significativa reducción en el número de ovinos positivos a pruebas de laboratorio encaminadas a detectar anticuerpos contra *C. pseudotuberculosis*. Diez animales de 48 en el grupo tratado (20.8%) y 19 de 46 (41.3%) en el grupo control fueron positivos a la prueba de ELISA 3 meses después de la esquila; esto sugiere que el tratamiento de las heridas provocadas durante la esquila con tintura de yodo es efectivo en la protección contra la enfermedad.

Para el tratamiento parenteral la naturaleza encapsulada de las lesiones hace sumamente difícil la penetración de los medicamentos, evitando que entren en contacto en forma eficiente para ejercer su mecanismo de acción contra *C. pseudotuberculosis*, además de que se trata de una bacteria intracelular facultativa. Debido a esto, a pesar de la sensibilidad que muestra la bacteria in vitro a una gran cantidad de substancia antimicrobianas, los resultados que se obtienen después de la administración de los mismos son muy pobres (Nagy, 1976 ; Redondo, 1988 ; Pijoan y Tórtora, 1985).

Otras posibles razones para explicar la ineficacia de la terapia antimicrobiana in vivo es la presencia del exudado purulento caseoso y algún factor antagonista en el mismo que pueda neutralizar el efecto bactericida del antibiótico (Redondo, 1988).

De acuerdo a los antibiogramas realizados a partir de bacterias obtenidas directamente de lesiones características, se muestra que dentro de los antimicrobianos más eficaces in vitro se encuentran: eritromicina, penicilina, rifamicina neomicina, tetraciclinas, cloranfenicol, sulfatiazol, ampicilina, ácido nalidíxico, lincomicina, cefalotina, amikacina, gentamicina y la combinación de sulfametoxazol-trimetoprim (Elad y col. 1991; Judson, 1991; Márquez, 1970; Pepin, 1989; Zhao, 1991).

Prevención

Se han realizado numerosos estudios empleando animales de laboratorio para evaluar la respuesta inmune hacia *C. pseudotuberculosis*. La inmunidad mediada por células se ha demostrado que está restringida a evitar la proliferación de bacterias. La neutralización de la exotoxina (fosfolipasa D) producida por este microorganismo se piensa está limitada a evitar la difusión de la bacteria del sitio primario de infección . El valor de la vacunación como auxiliar en el control de la enfermedad en pequeños rumiantes está frecuentemente cuestionada . Las bacterinas autógenas han sido también utilizadas y se ha notado un decremento en la prevalencia de abscesos en el rebaño , pero concierne al propietario tener simultáneamente conocimiento de animales con heridas infectadas y tener medidas higiénicas adecuadas (Hodgson,1994; Paton, 1995 ; Walker, 1994) .

Una vacuna comercial denominada Glanvac (Commonwealth Serum Labs., Melbourne, Australia) desarrollada en Australia y disponible también en Canadá (Vetrepharm Inc., London, Ontario, Canadá) se ha evaluado en pequeños rumiantes y es el único inmunógeno utilizado rutinariamente en los países antes mencionados para proteger a los animales contra ésta enfermedad. Este producto es a base de la toxina formalinizada y combinada con adyuvante incompleto de Freund's; en un estudio desafiaron animales al colocar cutivos vivos del microorganismo sobre la piel y observaron que 1 o 2 dosis de vacuna dieron una buena protección , 3 de 20 cabras vacunadas desarrollaron abscesos comparado con 10 de 10 cabras control. (Smith, 1994).

Diagnóstico

El diagnóstico veterinario de linfadenitis caseosa, se realiza en base a signos, lesiones típicas y pruebas de laboratorio . El alargamiento unilateral de nodos linfáticos prescapulares y/o precurales con descarga de exudado purulento verdoso (en algunos casos) sugiere la enfermedad, la laminación en las lesiones es una evidencia adicional. El aislamiento de *C. pseudotuberculosis* , confirma el diagnóstico .

Las actividades hemolíticas y hemoaglutinantes de la exotoxina producida por *C. pseudotuberculosis* se han considerado para el desarrollo de pruebas diagnósticas tales como: inhibición de antihemolisina, inhibición de hemólisis, prueba de protección al ratón, hemoaglutinación directa e indirecta, inmunodifusión en gel, prueba dérmica (linfadenización) y prueba de ELISA entre otras.

Según Kuria y Holstad (1989), la prueba de inhibición de la hemólisis es una prueba sensitiva, fácil de interpretar, puede realizarse la lectura después de 8 a 22 horas y se correlaciona bien con la infección existente en cabras. La prueba de ELISA también da resultados comparables con los de inhibición de la hemólisis y ha sido extensamente utilizada con resultados satisfactorios. Laak y col. (1991) reportan que desde septiembre de 1988 se ha empleado esta prueba en Holanda y ha resultado apropiada para el control de la enfermedad, declarándose en base a estos resultados varios rebaños libres de linfadenitis caseosa.

Erradicación y Programas de Control

Existen una serie de medidas y recomendaciones mencionadas a continuación encaminadas a controlar la linfadenitis caseosa, las cuales llevadas a cabo en forma adecuada pueden disminuir la prevalencia e incidencia de la enfermedad.

1. No introducir animales infectados al rebaño, inicialmente se puede realizar una inspección de los nodos linfáticos superficiales.
2. Los procedimientos quirúrgicos deberán ser realizados en lugares limpios y con equipo estéril, o bien, sumergidos previamente en soluciones desinfectantes.
3. Animales muy delgados e improductivos con nodos linfáticos aumentados deben ser considerados para la eliminación, puesto que pueden desarrollar abscesos y constituir una fuente de infección para el resto del rebaño.
4. Esquilar en forma secuencial a las ovinos de acuerdo a su edad, los más jóvenes primero, al final los animales más viejos y los sospechosos.
5. Los animales que han sido trasquilados deben ser tratados con soluciones antisépticas en las heridas que se originen durante este proceso y en cualquier otra práctica que implique pérdida de continuidad en la piel, liberándolos a las praderas con pastizales para evitar el roce entre ellos. La tintura de yodo ha sido utilizada inmediatamente después de la esquila, resultando una reducción en el número de animales infectados.

(Jensen, 1988; Serikawa, 1994).

Desinfección

La fuente de propagación principal de la linfadenitis caseosa la representa el animal enfermo, el cual a través del exudado purulento infecta a los animales sanos y contamina el ambiente: suelo, pastos y fomites.

La desinfección se define como la eliminación o destrucción de los microorganismos patógenos sobre superficies inanimadas y es una de las medidas de saneamiento al igual que el control de vectores, eliminación de residuales (sólidos: estiércol y líquidos: deyecciones y excreciones) y la disposición de cadáveres, que son las encargadas de eliminar los agentes patógenos y de modificar las condiciones ambientales para interrumpir la cadena epizootiológica ayudando así a la preservación de la salud de los animales.

La importancia del desinfectante depende de su naturaleza, de la condición del material a desinfectar, concentración, temperatura, periodo de contacto y de la capacidad de penetrar en intersticios y lugares de difícil acceso. Es importante señalar que si no hay una buena limpieza previa, el desinfectante es afectado por la materia orgánica presente, que limita su acción y eficacia.

Las características que debe tener un desinfectante son: no ser tóxico, no dejar olores ni sabores residuales en productos ni en instalaciones, no ser corrosivo, empleo fácil y rápido, de acción humectante efectiva, compatible con las proteínas, que se conserve sin perder eficacia diluido o concentrado (Carter, 1992 ; Clark, 1992 ; Sumano, 1988).

Formas de desinfección

La correcta destrucción o eliminación de los microorganismos que se encuentran en el medio depende de la frecuencia y del tipo de la desinfección. Por lo tanto se distinguen 3 formas para realizar la desinfección:

1. **Corriente** : es la que se realiza cuando existe un brote o enfermedad de los animales, con el fin de ir eliminando los microorganismos a medida que son expulsados del animal infectado.
2. **Final** : es la que se lleva a cabo después de liquidada la enfermedad, antes de proceder a declarar como libre una unidad o antes de dar por terminada una cuarentena para repoblar o liberar una área. Su objetivo es la eliminación total del agente patógeno específico.
3. **Profiláctica** : es aquella que se realiza periódicamente en los locales donde se mantienen animales sanos y su finalidad es prevenir la presencia de la enfermedad.

Factores a considerar en la desinfección

1. Tiempo de exposición: es el periodo durante el cual se deja actuar el desinfectante sobre las superficies tratadas . Este tiempo depende en cada caso de la naturaleza del microorganismo que se desea eliminar , de las propiedades bactericidas y de la concentración del producto. La reacción desinfectante microorganismo no es inmediata, si no que el número de gérmenes que mueren a consecuencia de la desinfección se incrementa en función del tiempo de contacto entre los elementos. Lo ideal es dejarlo actuar de 24 a 48 horas, pero en la práctica se debe exigir como tiempo mínimo de exposición 3 a 4 horas.

2. Método de aplicación de la solución : se ha comprobado que si es pulverizada la solución desinfectante se obtienen resultados más efectivos . Cuando se utiliza el método de chorro para aplicar 50 litros de solución se necesitan 3 minutos, cuando se utiliza la pulverización son necesarios 12 minutos, esto permite que el tiempo de contacto entre el microorganismo y la solución sea de 3 a 4 veces mayor aumentando el resultado. También, permite distribuir mas uniformemente la solución por la superficie a desinfectar y penetra con mayor profundidad.

3. Influencia de la limpieza mecánica previa sobre la calidad de la desinfección : los microbios son expulsados por los animales infectados dentro de un medio favorable para ellos (heces, orina , secreciones nasales, exudado purulento). Como ya se ha dicho anteriormente, los desinfectantes cuando se enfrentan a estos medios pierden una buena parte de su acción , ya que ellos constituyen una valiosa protección contra las influencias exteriores. De esto se desprende que para la desinfección de los locales es necesario como primer paso, realizar una limpieza mecánica de los mismos. Esta limpieza mecánica de la basura seca, estiércol, restos de alimentos, se debe realizar después de remojarlos con agua o solución desinfectante, para impedir la propagación de los microorganismos con el polvo. La limpieza mecánica además de reducir la cantidad de microorganismos en el medio, despoja a estos de su protección, y por lo tanto, aumenta considerablemente la efectividad de la desinfección (Carter, 1992; SAGAR. 1995).

Características y mecanismo de acción de algunas soluciones desinfectantes y antisépticas

Agentes con actividad de superficie :

Estos compuestos (tensoactivos) reciben generalmente el nombre de detergentes sintéticos. Tales compuestos al igual que los ácidos grasos (jabones) contienen una parte hidrófoba y una hidrófila ; en consecuencia forman micelos (agregados de gran tamaño) en las soluciones acuosas, en las que tan sólo la porción hidrófila se pone en contacto con el agua; también pueden formar una capa que recubre y solubiliza estructuras y moléculas hidrófobas. Los detergentes

aniónicos tienen escasa capacidad bactericida, quizá debido a que son repelidos por la carga negativa de la superficie bacteriana. Los detergentes no iónicos no poseen capacidad bactericida y pueden incluso ser utilizados como sustancia nutritiva por los microorganismos. Sin embargo los detergentes catiónicos poseen actividad frente a una gran variedad de microorganismos. Los compuestos más efectivos son los cuaternarios de amonio, que contienen tres grupos alquilo de cadena corta, así como un grupo alquilo de cadena larga (por ejemplo el Cloruro de Benzalconio) (Sumano, 1988).

Indicaciones. Este grupo de compuestos son utilizados extensamente para la antisepsia cutánea y para la desinfección de instrumental, utensilios y materiales de caucho, existen soluciones para sumergir instrumental, catéteres barnizados materiales de caucho sintético e instrumentos de aluminio, se usan para desinfección de utensilios empleados para comer o beber, así como en equipos lácteos (Carter, 1992).

Mecanismo de acción. Su acción se ejerce por la alteración de la membrana celular, dando lugar a la liberación de metabolitos; además su acción detergente presenta la ventaja de disolver las capas lipídicas que, en algunos casos pueden proteger a las bacterias, y por otra parte el objeto tratado queda cubierto por una capa que posee acción bactericida. Tienen acción sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas, pero estas últimas sólo son susceptibles en concentraciones altas, algunos tienen acción fungicida contra *Candida albicans* y *Trichophyton rubrum*.

Ventajas. Posee acción desodorizante, detergente, queratolítica y emulsificante.

Desventajas. Es inactivo contra esporas, no son bactericidas contra el bacilo tuberculoso; actividad viricida limitada; deben diluirse en agua destilada para usarse, es inflamable e irrita los tejidos en forma pura; la materia orgánica reduce considerablemente su actividad al igual que es incompatible con jabones y otros agentes catiónicos y aniónicos (Carter, 1992; Dulbecco, 1990; Mateos, 1996; Sumano, 1988).

Halógenos

Son una familia de elementos, formada por el flúor, el cloro, yodo, bromo y astato. Halógeno significa "engendrador de sales". Como soluciones antisépticas y desinfectantes el yodo y el cloro son los más importantes del grupo. A continuación serán mencionadas algunas características importantes del yodo (I_2) (Freeman, 1983).

Mecanismo de acción. El yodo se une de forma irreversible a las proteínas (por ejemplo uniéndose a los residuos de tirosina) y es un oxidante, la tintura de yodo

(solución de I_2 al 2-7 % en alcohol acuoso que contenga yoduro potásico) es un bactericida de acción rápida . Este compuesto se emplea como antiséptico cutáneo y en pequeñas heridas, pero su aplicación es dolorosa y tiene efecto destructor sobre tejido expuesto . El I_2 forma complejos espontáneamente con los detergentes dando lugar a *yodóforos* , que constituyen una reserva de yodo ligado en equilibrio con I_2 libre a concentraciones efectivas , pero no irritantes (Dulbecco, 1990) .

Compuestos de yodo. Tintura de yodo o solución acuosa (2 al 5%) ; yodóforos. Los preparados de yodo figuran entre los más utilizados contra infecciones locales. Estos preparados se emplean casi en su totalidad en animales vivos y casi nunca para desinfectar locales, utensilios o instrumentos. El yodo metálico y sus preparados resultan muy caros y no suelen utilizarse como desinfectantes de carácter general. El yodo coloidal se ha utilizado como agente terapéutico, tanto en piel como en ojos. Se ha combinado yodo con agentes de superficie activa para formar compuestos muy utilizados en la industria. El yodo se combina con alcohol y actúa intensamente contra la flora bacteriana de la piel intacta. El alcohol etílico al 70 % es un potente antiséptico de la piel (Clark, 1993) .

El yodo también se combina con surfactantes no iónicos como la *povidona* (polivinil piroidona) , y para formar compuestos como el yoduro de povidona , y de esta manera incrementar la duración del efecto antibacteriano.

Por el poder amortiguador que tiene el yodo, las soluciones yodadas se preparan a un pH que fluctúa en un nivel de 6.0 a 7.2 . El yodo ejerce acción esporicida, bactericida, así como fungostática a partir de 0.01% y fungicida a partir de 0.1%. Se ha utilizado también para desinfectar agua en concentraciones de 0.5 a 1.0 ppm (Sumano, 1988) .

En cuanto a su toxicidad, se puede decir que es baja para los tejidos, aunque puede ocasionar efectos secundarios .

Indicaciones . La tintura de yodo , es una solución de 2% de yodo libre, con 2.4% de yoduro sódico en alcohol etílico al 50%. Esta tintura constituye uno de los mejores antisépticos , se emplea con frecuencia aplicada en la piel antes de una incisión quirúrgica , se ha empleado también en infecciones de la piel . Algunos productos han sido utilizados en operaciones realizadas durante el ordeño (Sumano, 1988) .

Ventajas. Son fuertes bactericidas, dejan un efecto antibacteriano residual, causa poca irritación y se extiende de manera uniforme en la piel . Los preparados a base de yodo se encuentran entre los más utilizados para la antisepsia local.

Desventajas . La tintura de yodo mancha la piel y la ropa . La aplicación repetida a la piel o a las membranas mucosas causa formación de ampollas con

descamación del epitelio , el yodo metálico y sus preparados resultan demasiado caros y no se utilizan como desinfectantes de carácter general (Carter, 1992; Clark, 1993).

Fenol

Los fenoles son bencenos con un grupo oxhidrilo, debido a esta estructura tiene propiedades químicas características, otros compuestos parecidos se comportan de forma semejante y , por eso, toman el nombre genérico de *fenoles* . Este grupo de compuestos se obtienen de la destilación del carbón de hulla y son diferentes con respecto a sus propiedades físicas (Dulbecco, 1990).

Los desinfectantes fenólicos conservan su actividad germicida aún en aguas duras y en presencia de materia orgánica, pero baja en presencia de alcohol y grasas, y se refuerza con cloruro de sodio y elevación de la temperatura (Clark,1993).

Mecanismo de acción . Son venenos protoplasmáticos que coagulan las proteínas, y agentes reductores en los que, en presencia de oxígeno la molécula se reordena rápidamente y pierde dos átomos de hidrógeno , que forman agua con el oxígeno. La combinación fenol-proteína es muy estable y tiene poder penetrante. Los fenoles metilados, los cresoles orto , para y meta, y los fenoles halogenados, tienen mayor actividad que el compuesto original . El fenol y sus derivados se encuentran entre los compuestos orgánicos antibacterianos más útiles (Carter, 1992; Dulbecco, 1990) .

Indicaciones. Una solución acuosa de fenol del 5% se emplea para la desinfección de objetos y materiales contaminados destruye rápidamente las células vegetativas de las bacterias , y más lentamente a las esporas; su actividad antibacteriana no es modificada mucho en presencia de materia orgánica . Se ha utilizado también para cauterizar heridas infectadas . Para aplicar en animales se debe utilizar en una concentración no mayor , ya que es muy irritante del 2% . Los fenoles sintéticos se utilizan para desinfección de paredes, pisos, locales y para tapetes sanitarios (Carter, 1992) .

Ventajas . Agente activo contra bacterias Gram(+) , Gram(-) y hongos. Actúa contra virus lipofílicos y tiene marcada actividad contra micoplasmas. Se puede utilizar para desinfección de materia fecal debido a que su mecanismo de acción no es alterado en gran medida en presencia de materia orgánica . Se utiliza como estándar de comparación con otros desinfectantes, particularmente los de estructura química similar (Coeficiente Fenólico) (Sumano, 1988).

Desventajas . Su olor es rápidamente absorbido por los alimentos , puede causar irritación de la piel y mucosas aplicado en forma concentrada, penetra con

facilidad en los tejidos y puede producir envenenamiento, agudo o crónico. Su actividad antimicrobiana disminuye en presencia de álcalis y sales aniónicas que pueden generar su precipitación. Necesita de 6 a 12 horas para matar bacterias y de 2 a 4 días para destruir esporas al 0.5 % (Arguero, 1996 ; Clark, 1993 ; Carter, 1992; Dulbecco, 1990).

Formaldehído

Se encuentra en el comercio en forma de solución acuosa al 37% (Formol) . El formaldehído puede ser utilizado en forma de gas para esterilizar superficies secas. En solución (0.1%) ha sido utilizado durante mucho tiempo para inactivación de bacterias y toxinas sin que pierdan su antigenicidad (Clark,1993) .

El formaldehído pertenece a los agentes alquilantes, los cuales son bactericidas muy eficaces en forma gaseosa, tanto en objetos y soluciones como sobre bacterias suspendidas en el aire . Estas sustancias tienen la propiedad de ser relativamente más eficaces para destruir esporas bacterianas que otros desinfectantes y su actividad es bactericida (Dulbecco, 1990) .

Mecanismo de acción . Los agentes alquilantes son muy reactivos con diversos grupos funcionales de ácidos nucleicos y proteínas , por ejemplo : - NH₂ , OH , COOH y -SH. La actividad bactericida probablemente resulte de la alquilación de estos grupos funcionales en macromoléculas funcionales (Freeman, 1983) .

Ventajas : A diferencia de otros desinfectantes es casi tan activo contra formas vegetativas como frente a las esporas, debido quizá a que no posee cargas y penetra fácilmente en la célula y no precisan de agua para su acción .

Desventajas : Requiere una humedad relativamente elevada para un buen mecanismo de acción, es irritante para piel y mucosas, necesita tiempo para una desinfección eficaz. (Carter, 1992 ; Freeman , 1983) .

Alcalis (Hidróxido de sodio)

Tanto los ácidos fuertes como los alcalinos, o sea los muy disociados , ejercen intenso efecto bactericida.

Mecanismo de acción : la acción desinfectante de los álcalis como el hidróxido de sodio conocida comúnmente como resulta proporcional al grado de disociación, actúan alterando la permeabilidad y coagulando proteínas (Freeman, 1983).

Indicaciones : se emplea para la desinfección de establos y locales, tiene acción

germicida y esporicida. En concentración demasiado baja para matar bacterias rápidamente, suelen aumentar la actividad de otros agentes desinfectantes. Se emplea del 2 al 3% en agua caliente, y puede aumentar su potencia al combinarla con cal viva, actúa despidiendo gran cantidad de calor (Carter, 1992).

Ventajas : Actúa contra la mayoría de bacterias, parásito y virus. Es germicida y esporicida.

Desventajas : tiene aplicación limitada debido a su naturaleza cáustica y corrosiva. No es efectivo contra micobacterias (Carter, 1992; Dulbecco, 1990; Freeman, 1983).

Colorantes

Los colorantes se utilizan mucho en bacteriología para teñir y como indicadores. Además muchos de ellos muestran actividad bacteriostática o bactericida, que a menudo se dirige específicamente contra una especie bacteriana, las bacterias Gram(-) en su mayor parte son mucho menos sensibles a los colorantes que las Gram(+). La actividad de estos compuestos se ve afectada por el pH; la toxicidad de los colorantes ácidos aumenta con la acidez, y la de los colorantes básicos con la alcalinidad (Dulbecco, 1990).

Mecanismo de acción : cierto número de colorantes derivados del trifenilmetano son inhibidores en diluciones altas. Las propiedades bacteriostáticas de las llamadas rosanilinas, parecen estar relacionadas con la sustitución de grupos alquilo en las cadenas laterales amido. El violeta de metilo mezcla de tetra, penta y hexametilparrosanilina, es un bacteriostático e inhibe completamente el crecimiento de bacterias como estafilococos y el bacilo diftérico. El violeta de genciana es una mezcla más o menos impura de violeta de metilo y dextrina. El cristal violeta, hexametil-p-rospanilina, es uno de los constituyentes del violeta de metilo (Dulbecco, 1990).

Ventajas : actividad específica contra algunos microorganismos, antisépticos de uso rutinario fácilmente adquiridos.

Desventajas : no tienen actividad importante contra bacterias Gram (-), manchan la piel y superficies (Freeman, 1983; Sumano, 1988).

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS DESINFECTANTES Y ANTISEPTICOS

Roberto Koch (1881) fue el pionero en comparar la actividad de los desinfectantes mediante pruebas *in vitro*. Geeper en 1889, confirmó las investigaciones de Koch , pero criticó y modificó sus métodos . Los alemanes Kröning y Paul (1897) publicaron un trabajo clásico en el que, basándose en consideraciones fisicoquímicas, describen los métodos para el estudio cuantitativo de la desinfección , e indicaron que por la acción de los desinfectantes en las poblaciones bacterianas no todas las bacterias mueren instantáneamente , sino que mueren a una tasa logarítmica , que además es directamente proporcional a la concentración del desinfectante , de tal manera que se obtiene un conjunto de curvas para diferentes concentraciones del desinfectante . Por tanto, llegaron a la conclusión de que no todas las bacterias son igualmente sensibles al desinfectante ; en relación con el tiempo de desinfección observaron que se requieren períodos determinados para que el desinfectante actúe. A continuación se mencionaran alguna técnicas utilizadas actualmente en la evaluación de soluciones desinfectantes y antisépticas (Dulbecco, 1990 ; Arguero, 1996).

- 1. Técnica de dilución en tubo .** Primero se realizan diferentes diluciones del agente químico. El mismo volumen de cada dilución se coloca en tubos estériles . A cada tubo se le añade la misma cantidad de una suspensión del microorganismo utilizado como prueba . A determinados intervalos de tiempo se transfiere una alícuota de cada tubo a otro tubo que contenga medio de cultivo. Estos tubos inoculados se incuban a la temperatura óptima de crecimiento de microorganismo utilizado como prueba durante 24 a 48 horas . Al cabo de este tiempo se examina el crecimiento del microorganismo mediante la aparición de turbidez en el tubo (crecimiento +) o ausencia de turbidez (crecimiento -). Aquellos tubos que no presenten crecimiento, indican la dilución a la cual ese agente químico mata al microorganismo utilizado como prueba cuando este microorganismo es expuesto al agente químico en este período de tiempo (Talaro, 1993 ; Mateos, 1996).
- 2. Técnica de la placa de agar .** Se inocula una placa de agar que contenga medio de cultivo sólido con el microorganismo utilizado como prueba . El agente químico se coloca en el centro de la placa , ya sea dentro de un cilindro o impregnado en un disco de papel. Después de 24 a 48 horas se observan zonas de inhibición (crecimiento negativo) alrededor del agente químico . Una modificación de ésta técnica es la incorporación del agente químico en el medio de cultivo antes de verterlo sobre la placa . Una vez solidificado se inocula con el microorganismo utilizado como prueba , se incuba y se examina el crecimiento bacteriano (Bruch, 1996; Cremiux and Fleurette; 1996; Mateos, 1996 ; Ramírez, 1995) .

3. Técnica del coeficiente fenólico . Rideal y Walker (1903) , en Gran Bretaña, introdujeron por primera vez el método conocido como "Índice fenólico " o "Coeficiente fenólico " para determinar una cifra que expresara la eficiencia de un desinfectante comparada con la del fenol, probados en condiciones idénticas . Las muestras de prueba se diluyen y las diluciones se disponen en una serie decreciente de concentraciones ; a cada una de estas se agrega determinada cantidad de un microorganismo de prueba cultivado en caldo; al final de períodos fijos de tiempo, se transfiere a un medio nutritivo una pequeña cantidad de la mezcla desinfectante-microorganismo y se incuba a 37° C . La falta de crecimiento en el medio de cultivo indica que los microorganismos han muerto por la acción del desinfectante. La mayor dilución del desinfectante que mata en un período definido de tiempo se divide por la mayor dilución del fenol que mata en el mismo lapso para encontrar la cifra que corresponde al coeficiente fenólico. A partir de 1903, el método de Rideal Walker ha sido modificado en varias ocasiones con el propósito de mejorar la exactitud y adaptarlo a otras condiciones de operación (Dulbecco, 1990; Freeman, 1983).

4. Técnica de Chick Martin . Compara la acción de un desinfectante con la del fenol y proporciona un cociente fenólico , es una modificación del anterior pero presenta la característica de valoración en presencia de materia orgánica. Ambos métodos son aplicables para soluciones desinfectantes de origen fenólico , por lo consiguiente no son adecuados cuando se aplican a productos desinfectantes de otro origen (Bruch, 1996).

5. Técnica del Microensayo (Método de Gardner) . Tiene muchas ventajas sobre los métodos anteriores y es de los más recomendables para realizar en la práctica veterinaria . En esta se valoran una serie de factores que contribuyen a que los resultados obtenidos durante su ensayo, la hagan un método de comprobación ideal.

Factores considerados en la técnica de Gardner :

- concentración de la solución utilizada
- tipo de microorganismo empleado
- temperatura de aplicación del producto
- presencia de materia orgánica
- tipo de superficie donde será aplicado el producto.

El método de Gardner se realiza bajo condiciones de esterilidad estrictas y se evalúa por ausencia o presencia de crecimiento bacteriano , después de haber incubado la prueba a 37° C . Podemos establecer que esta técnica cumple con los requerimientos necesarios que nos permitirán seleccionar el o los desinfectantes ideales para el establecimiento de medidas de prevención y control de las enfermedades (Carter, 1992) .

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL :

Evaluar la sensibilidad que presentan cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* a diferentes desinfectantes empleados comúnmente en las explotaciones pecuarias.

OBJETIVOS PARTICULARES :

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

Realización de la Técnica de la Placa de Agar y la Técnica del Microensayo (Gardner) empleando varios desinfectantes en las cepas aisladas, para poder determinar cual o cuáles de las soluciones utilizadas es más eficaz contra *C. pseudotuberculosis*.

MATERIAL Y MÉTODO

1) MATERIAL

a) Colección de Muestras

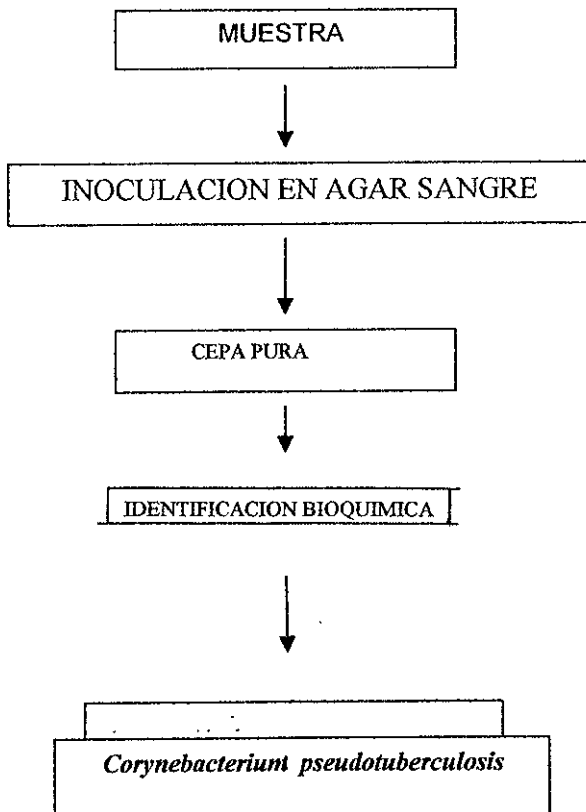
Se acudió al Rastro TIF localizado en San Lorenzo , Edo. de México para la recolección de muestras sospechosas de linfadenitis casosa a partir de ovinos provenientes de Texas . La toma de muestras se llevó a cabo en el momento de la inspección post-mortem y los sitios de elección fueron aquellos que contenían abscesos siendo principalmente nodos linfáticos mediastínicos , hígado y pulmón, las cuales fueron inmediatamente transportadas al Laboratorio de Microbiología (L-514) de la FESC , C-4 , en donde se realizó la inoculación en medios de cultivo adecuados para permitir el aislamiento de *Corynebacterium pseudotuberculosis* ; otras muestras fueron obtenidas a partir de algunos casos clínicos que llegaron al servicio de diagnóstico y que provenían principalmente de nodos linfáticos prescapulares abscedados en ovinos.

b) Medios de Cultivo. Para el aislamiento primario se empleó el agar sangre y la caracterización bioquímica se realizó de acuerdo a García (1980). Las pruebas de placa en agar y microensayo se llevaron a cabo en Muller Hinton y caldo de infusión cerebro y corazón respectivamente.

c) Otros: calibrador vernier, sensidiscos de papel filtro estériles de 0.6 cm de diámetro, madera (0.5 X 1.5 cm), alambre calibre 16, yodo, hidróxido de sodio, violeta de genciana, formol, isodine, benzal concentrado y al 10%.

2) METODO

- a) Medios de cultivo . La preparación de los medios de cultivo para aislamiento primario y para la caracterización bioquímica fue realizada de acuerdo a las especificaciones marcadas para cada uno de ellos. Para el caso del agar sangre y el agar Muller Hinton se les agregó sangre desfibrinada de bovino después del proceso de esterilización , cuando alcanzaron una temperatura de 45° C aproximadamente. A los medios utilizados para las pruebas bioquímicas se les adicionó suero, para permitir un desarrollo adecuado del microorganismo.
- b) Aislamiento y caracterización bioquímica. A partir de las muestras clínicas se realizó el aislamiento de la bacteria en agar sangre y la identificación bioquímica se realizó de acuerdo a García, 1980 . (Fig. 1)
- Fig. 1



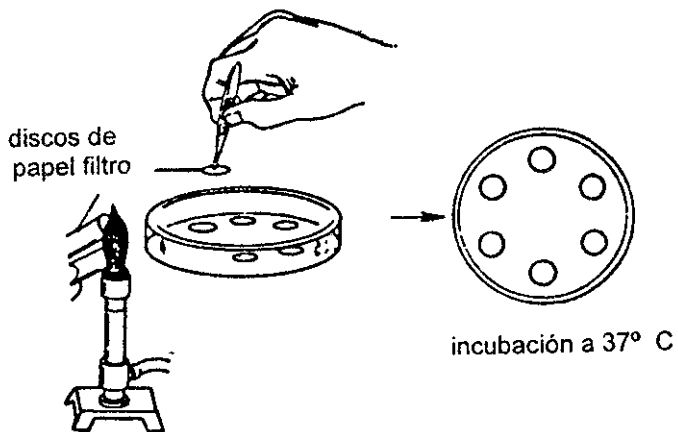
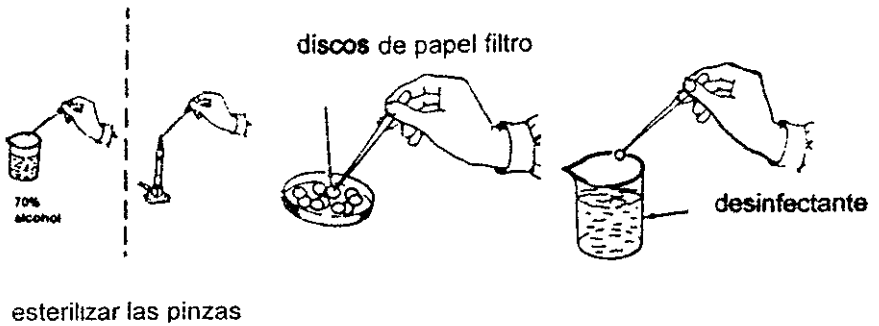
c) Cultivos bacterianos . Para la Técnica de la Placa en Agar las diferentes cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* fueron inoculadas en tubos con 2.5 ml de caldo BHI con 0.1 ml de suero estéril de equino y se incubaron a 37° C durante 48 horas . Posteriormente la turbidez se ajustó con caldo estéril hasta tener una densidad comparable con un estándar de sulfato de bario (escala de Mc Farland) , el cual 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 Mc Farland. El estándar corresponde aproximadamente a 100,000,000 microorganismos por mililitro .

Para la Técnica de Microensayo (Gardner) también fueron utilizados estos cultivos de la bacteria en caldo.

d) Técnica de la Placa en Agar .

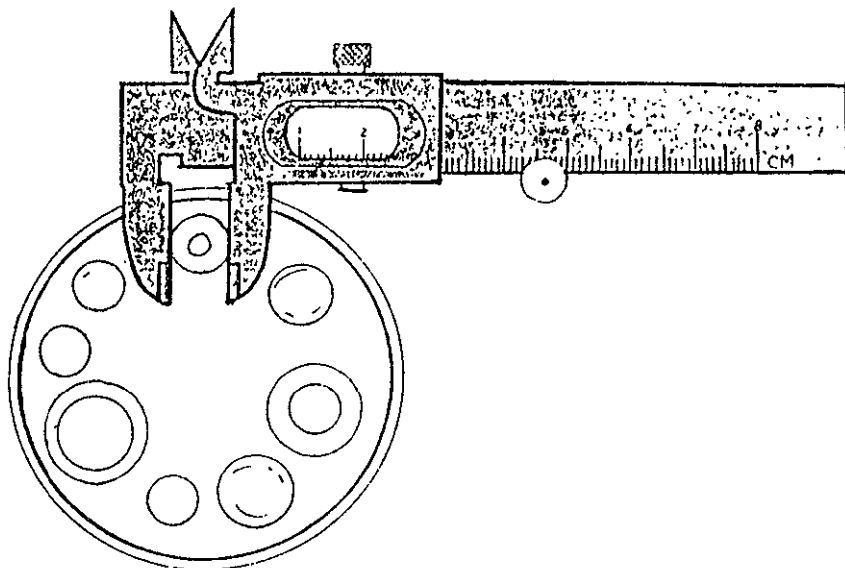
- Inoculación del agar Muller Hinton : para inocular el agar se utilizó un hisopo estéril, el cual se humedeció en la suspensión, se eliminó el exceso de caldo presionando y girando el hisopo sobre la pared interna del tubo, por arriba del nivel del caldo . Se inoculó el medio en tres direcciones sobre 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 a 5 minutos) se procedió a colocar los discos impregnados con los desinfectantes.
- Colocación de los discos : en condiciones asépticas se tomó un disco de papel filtro y se impregnó con el agente químico a probar, se eliminó el exceso de solución por escurrimiento y se colocó el disco impregnado en el medio inoculado previamente . Con las pinzas se presionó ligeramente el disco sobre la superficie del agar . Este paso fue realizado con cada uno de los agentes químicos a evaluar . Se previno una superposición de las zonas de inhibición con distribución adecuada de los discos con un espacio no menor de 15 mm de los bordes de la placa (Fig. 2) . Después de 15 minutos de haber colocado los discos , se invirtieron las cajas de petri y se incubaron a 37° C durante 48 horas (Mateos, 1996 ; Ramírez, 1995) .

Fig. 2 . Método de aplicar un desinfectante a una placa inoculada con bacterias



- Las medidas de los halos de inhibición se realizaron con un calibrador vernier , el punto final del sistema de lectura fue una completa inhibición del crecimiento determinada visualmente (Fig. 3) .

Fig. 3 Método para determinar las zonas de inhibición de crecimiento



e) Microensayo (Método de Gardner) :

- Colocar 0.1 ml del cultivo bacteriano a cada una de las superficies que se van emplear.
- Incubar por espacio de 5 minutos en la estufa bacteriológica a 37° C .
- Adicionar con una pipeta estéril 0.1 ml de la solución desinfectante a cada material.
- Incubar por espacio de 10 minutos en la estufa bacteriológica.
- Con las pinzas estériles , tomar cada una de las superficies y depositarlas por separado en un tubo con caldo BHI .
- Incubar los tubos a 37° C durante 48 horas .

Las lecturas fueron realizadas inicialmente en forma visual por la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano (turbidez) y posteriormente fué determinada la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de 400 nm.

RESULTADOS

1) Técnica de la placa en agar (sensibilidad en disco) .

La Tabla No. 1 muestra las medidas de los halos de inhibición que presentaron las 30 cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* a los diversos desinfectantes empleados en este trabajo. Los resultados obtenidos en los halos de inhibición , los promedios y la desviación estándar se pueden observar en las Gráficas No. 1 y No. 3. De acuerdo a esto, los desinfectantes que presentaron mayor actividad inhibitoria en las diferentes cepas fueron el benzal al 10%, el yodo al 2%, el hidróxido de sodio (NaOH) al 2% y el formol al 2%. Siguiendo en orden decreciente en la inhibición se observa que la presentación comercial del benzal 1:100, la forma comercial de del violeta de genciana y el fenol al 2% son menos activos sobre la bacteria y finalmente el que presentó los halos de inhibición mas bajos fue la presentación comercial de yodo povidona (isodine).

2) Técnica de Microensayo (Gardner)

Los cultivos en caldo, en los cuales se desarrolló el microorganismo aún en presencia de la solución desinfectante fue determinada la absorbancia en el espectrofotómetro (400 nm), como control positivo se seleccionaron 3 cepas al azar para cultivarlas en medio líquido sin desinfectante y determinar también su absorbancia, los resultados se muestran en la Tabla No. 2. Se puede observar en la Gráfica No. 2, que el desinfectante con mayor efectividad fue el formol al 2% sobre la superficie de metal y el hidróxido de sodio (NaOH) al 2% sobre la misma superficie, estos mismos desinfectantes fueron también eficaces sobre la madera otra superficie empleada y con menor actividad sobre la bacteria se encuentra el fenol al 2% que fue mas activo cuando se colocó sobre el metal que sobre la madera. El control como puede observarse presenta la máxima absorbancia.

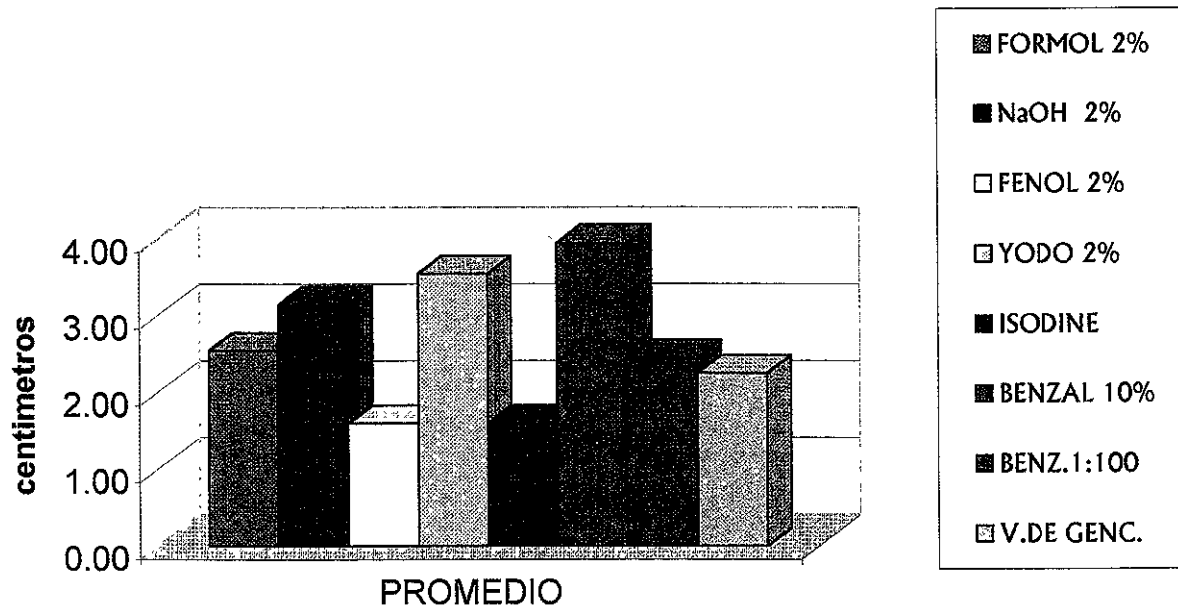
La Gráfica No. 4 muestra los promedios y la desviación estándar obtenida para los desinfectantes utilizados en esta prueba.

El benzal al 10%, el yodo al 2% así como las presentaciones comerciales de benzal, yodo-povidona y violeta de genciana no fueron utilizadas en esta técnica debido a que comúnmente se utilizan como soluciones antisépticas y en esta prueba se trató de determinar el efecto de la solución desinfectante sobre la bacteria cuando ésta se encuentra en diferentes superficies (lisa y porosa) que pueden encontrarse en las explotaciones y son susceptibles de ser contaminadas.

1.2	1.1	1.2	2	1	4.9	1.6	1.2
1.8	2	1.1	3.8	1.1	4.3	2.1	1.2
2.1	5.3	1.8	3.7	1	5.8	1.6	2.3
2.4	3.7	1.5	3.4	1	4.7	1.7	1.9
2.8	2.7	1.4	5.1	1	4	1.8	1.6
3.1	3.4	1.5	4.2	1.1	5.9	1.8	1.9
2.3	1.8	1.6	5.1	1.4	2.5	3.3	2.3
2	1.5	1.8	3.8	1.1	3.5	2.5	2.9
3	2.7	3.2	5.1	1	5.2	2.5	2.3
2.1	1.9	1.4	2.9	1	4.5	1.6	1.9
2.4	2.6	2	3.1	1	3.8	1.9	2
1.7	2.3	1.4	5.1	1	3.7	2.9	2.3
1.9	2.2	2.3	4.3	1	5.2	2.1	2.2
1.5	1.3	1.3	3.1	1	3.5	3.3	2.5
2.1	2.8	2.2	3.6	1	5.2	1.8	1.8
1.7	2.7	1.3	2.9	1	3.1	2.7	2.7
2.2	1.8	2.5	5.1	1.6	5.3	2.1	3.2
1.8	1.7	1.6	2.6	1	4.6	1.9	1.8
2.4	2.7	2.2	4.5	1.2	2.5	2.4	2.2
1.3	1.6	1.7	2.4	1	3.1	1.7	1.7
1.8	1.9	2	3.2	1	3.5	2.2	2.2
2.1	1.6	1.7	2.7	2	2.9	2.5	3
2.2	2.5	2.4	2.9	1.8	3.3	1.9	2
3.9	2.6	2.2	3.1	1	2.6	2.3	2.8
1.7	1	1.7	3.2	2	2	3.1	3.3
2.8	1.5	1.3	2.8	1.8	2.3	1.9	1.9
3.1	1.9	0	2.5	1.1	2.6	3	3.1
2.8	1.9	2.4	3.6	2.2	3.2	2.1	2.2
2.1	2.4	1.5	3	1	2.4	2.2	2
3.1	2.4	2.9	4.9	1	5.2	2.3	2.3

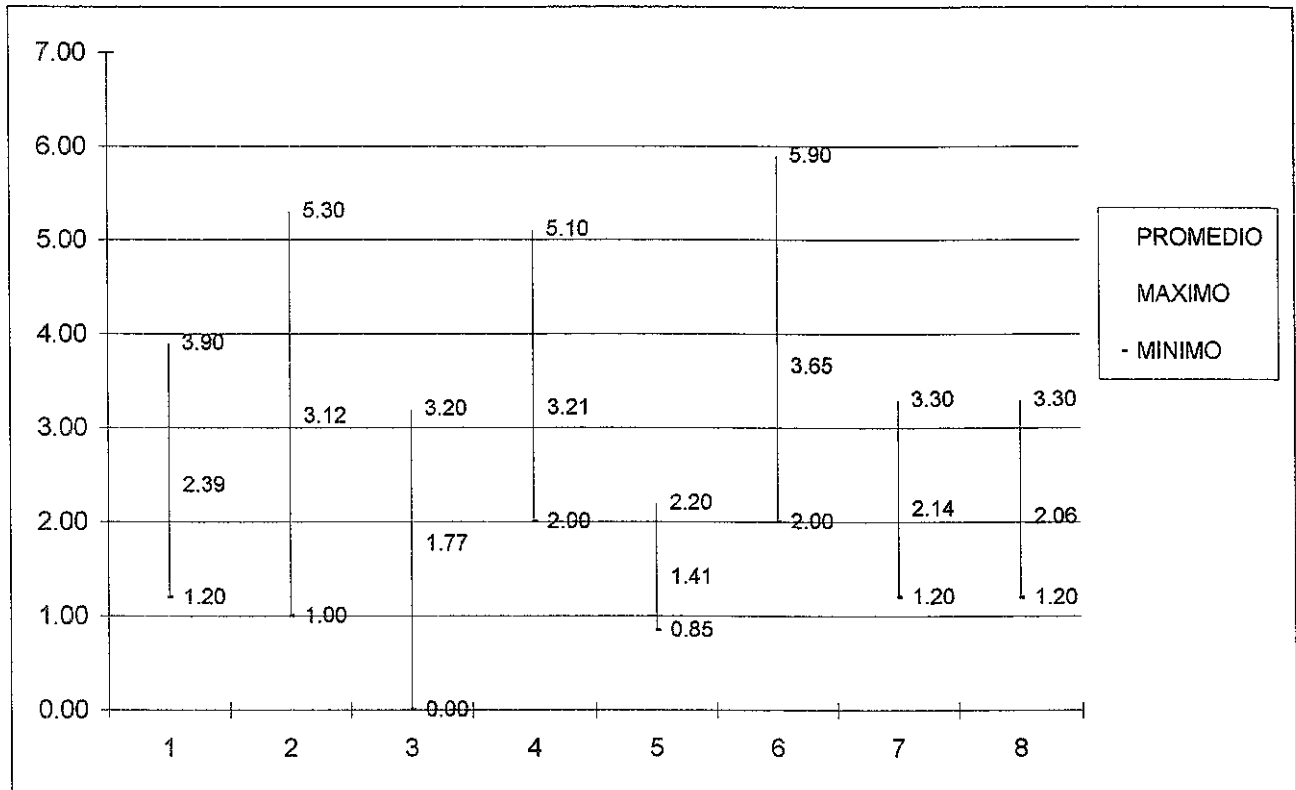
TABLA 1: FRECUENCIA DE SENSIBILIDAD EN DISCO A DIFERENTES Dosis DE INFECCIONANTES
EN CEPAS DE *Corynebacterium pseudotuberculosis*

PROMEDIO	2.25	2.25	1.77	3.59	1.21	3.84	2.23	2.22
DESV. EST.	0.61	0.86	0.61	0.93	0.37	1.15	0.50	0.53
MAXIMO	3.90	5.30	3.20	5.10	2.20	5.90	3.30	3.30
MINIMO	1.20	1.00	0.00	2.00	1.00	2.00	1.60	1.20



GRAFICA 1. RESULTADOS OBTENIDOS EN LA TÉCNICA DE PLACA EN AGAR (SENSIBILIDAD EN DISCO) A DIFERENTES DESINFECTANTES EN CEJAS DE *Corynebacterium pseudotuberculosis*

	FORMOL 2%	NaOH 2%	FENOL 2%	YODO 2%	ISODINE	BENZAL 10%	BENZ.1:100	V.DE GENC.
PROMEDIO	2.39	3.12	1.77	3.21	1.41	3.65	2.14	2.06
DES.V. EST.	1.15	1.76	1.35	1.44	0.62	1.70	0.93	0.94
MÁXIMO	3.90	5.30	3.20	5.10	2.20	5.90	3.30	3.30
MÍNIMO	1.20	1.00	0.00	2.00	0.85	2.00	1.20	1.20



GRAFICA 3. Promedio y Desviación Estandar de la Pba. de sensibilidad en disco en cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en diferentes desinfectantes

	FORMOL 2%	NaOH 2%	FENOL 2%	YODO 2%	ISODINE	BENZAL: 10%	BENZ: 1:100	V.DE GENC.
PROMEDIO	2.39	3.12	1.77	3.21	1.41	3.65	2.14	2.06
DES. EST.	1.15	1.76	1.35	1.44	0.62	1.70	0.93	0.94
MAXIMO	3.90	5.30	3.20	5.10	2.20	5.90	3.30	3.30
MINIMO	1.20	1.00	0.00	2.00	0.85	2.00	1.20	1.20

DISCUSION

En base a los resultados obtenidos en la prueba de placa en agar (sensibilidad en disco) el yodo al 2% y el benzal al 10% fueron las soluciones químicas que dieron los mayores halos de inhibición en el desarrollo de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, lo cual indica que son sustancias que difundieron bien en el medio y que tienen una actividad antimicrobiana importante sobre la bacteria utilizada en la prueba, esto coincide con los trabajos de Serikawa y col. (1993 y 1994), en los cuales rociaron tintura de yodo en todas las heridas visibles producidas después de la esquila en los ovinos de 2 explotaciones que fueron estudiadas, resultando 3 meses después de la esquila una significativa reducción en el número de animales positivos a linfadenitis caseosa utilizando como diagnóstico serológico la prueba de ELISA .

El benzal al 10% presentó también un efecto inhibitorio importante sobre el cultivo bacteriano, de hecho los máximos halos de inhibición (5.9 cm) en forma general fueron obtenidos en los sensibilizadores impregnados con esta sustancia química que comúnmente es utilizada como solución antiséptica, cuando el benzal fue utilizado en una presentación comercial a una concentración de 1:100, resultaron halos de inhibición mas bajos, teniendo la medida máxima de inhibición en 3.3 cm, lo que indica que esta presentación de benzal a esta concentración no es muy activa sobre el microorganismo. La forma comercial de violeta de genciana tuvo una actividad mas baja que el benzal pero, actúa también inhibiendo el desarrollo bacteriano con un halo de inhibición máximo similar al benzal 1:100 de 3.3 cm.

Sin embargo, es de llamar la atención que el fenol y el isodine (forma comercial de yodo-povidona) presentaron los menores halos de inhibición en el crecimiento bacteriano. Por un lado el fenol es considerado el patrón oficial para evaluación de la efectividad de soluciones desinfectantes y por otro es de los desinfectantes que su mecanismo de acción no es alterado en forma importante en presencia de materia orgánica, por lo que uno de los motivos que pudo originar esta menor eficacia sobre *Corynebacterium pseudotuberculosis* posiblemente sea debido a que el fenol no tuvo una difusión adecuada en el medio de cultivo, lo que interfirió su actividad sobre la bacteria, puesto que en la prueba de sensibilidad en caldo se observó una buena actividad del fenol sobre todo cuando el desinfectante fue aplicado directamente sobre la bacteria en una superficie lisa (metal) y su actividad decreció cuando se colocó la bacteria en una superficie porosa como lo es la madera, pero aún así el fenol fue menos efectivo que el NaOH al 2% y el formol al 2% en ambas superficies; es posible que el tiempo de exposición del fenol tenga que ser mayor que el de los otros desinfectantes para

que se pueda tener un resultado similar a los mismos, ya que a todos se les dio el mismo tiempo de contacto con la bacteria.

En lo que respecta al isodine que es una combinación de yodo-povidona utilizada comúnmente para incrementar la duración del efecto antibacteriano, debería supuestamente dar una actividad similar o mejor que el yodo, sin embargo fue en el desinfectante en el que se tuvieron los halos de inhibición más pequeños, el máximo fue de 2.2 cm en una sola cepa identificada como "X" y en la cual el yodo al 2% dio una inhibición del crecimiento bacteriano de 3.6 cm. Esta diferencia quizá sea debida a que la povidona de alguna manera interfiere también en la difusión del yodo, puesto que en sí la povidona es un surfactante no iónico que no tiene efecto antibacteriano solo se emplea en esta combinación para que tenga una mejor difusión cuando es aplicado sobre la piel, pero esta combinación resultó no ser activa en forma eficiente sobre *Corynebacterium pseudotuberculosis* aunque la bacteria sí muestra sensibilidad importante cuando se emplea la solución de yodo preparada con alcohol etílico.

En la prueba de Microensayo (sensibilidad en caldo) se pudo apreciar en general que la superficie en la que tuvieron mayor efectividad las soluciones desinfectantes fue el metal, es decir una superficie lisa, la actividad de estos desinfectantes se redujo cuando fueron aplicados sobre la misma bacteria en una superficie porosa como la que presenta la madera, quizá sea debido a que el desinfectante es adsorbido a tal grado que la concentración de la solución se reduce notablemente y puede llegar a disminuir por debajo de su umbral bactericida.

En las Gráficas 3 y 4 se muestran los promedios y la desviación estándar para los diferentes desinfectantes en las 2 pruebas utilizadas (sensidisco y caldo) y se puede apreciar nuevamente que las soluciones desinfectantes que tienen una actividad efectiva sobre *C. pseudotuberculosis* en la prueba de placa en agar son el benzal al 10% y el yodo al 2% y para la prueba en caldo son el formol y el NaOH al 2% , por el contrario el isodine y el fenol permanecen constantes en su actividad lo cual indica que su eficacia sobre la bacteria es estas pruebas realizadas no es la adecuada.

Es interesante mencionar que existen varios trabajos encaminados a determinar la susceptibilidad de la bacteria a los antibióticos, aún cuando el tratamiento de la infección que produce no siempre tiene un pronóstico favorable con el empleo de los mismos , sin embargo es importante conocerla puesto que con estos resultados se pueden tener marcadores genéticos; para el caso de los desinfectantes no se contaba con este tipo de estudios de susceptibilidad que pueden arrojar también datos importantes al igual que con los antibióticos y también con respecto a la resistencia bacteriana.

CONCLUSIONES

- De acuerdo a los resultados obtenidos en la prueba de Placa en Agar (sensibilidad en disco), los desinfectantes con mayor actividad sobre ***Corynebacterium pseudotuberculosis*** son el yodo al 2% y el benzal al 10%.
- En la prueba de Microensayo (Gardner), los mejores desinfectantes resultaron ser el formol al 2% y el hidróxido de sodio al 2% cuando fueron aplicados a una superficie lisa (metal) contaminada con la bacteria y su actividad disminuyó sobre la madera, sin embargo en ambos casos fueron los 2 mejores desinfectantes.
- En este trabajo se observó que a pesar de que el fenol es considerado como uno de los mejores desinfectantes, su eficacia sobre ***Corynebacterium pseudotuberculosis*** fue menor que los otros desinfectantes empleados en la técnica de Microensayo.
- Los desinfectantes eficaces sobre la bacteria son el formol y el hidróxido de sodio al 2% cuando son aplicados sobre superficies lisas y su actividad se ve reducida en superficies porosas.

RECOMENDACIONES

Los desinfectantes recomendados como soluciones antisépticas para ser aplicadas en heridas producidas durante la esquila o heridas accidentales en animales susceptibles a infecciones por *C. pseudotuberculosis* son : el yodo al 2% y el benzal al 10%.

En superficies inanimadas contaminadas pueden ser útiles el formol y el hidróxido de sodio al 2%.

LITERATURA CITADA

Agustine J.L. (1984) . Bacteriologic, ecologic, serologic and immunogenetic studies of *Corynebacterium pseudotuberculosis* induced Caseous Lymphadenitis in small ruminants. **Agric. Animal Pat . Vol. 46: 156 pp.**

Aldridge Martin (1995) . *Corynebacterium pseudotuberculosis* . Internet. <http://www.massey.ac.nz/wwwvet/muusa/ass/micro/pseudo.htm>.

Alonso J.L. ; Simon M.C.; Girones O.; García J. (1992) . The effect of experimental infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* on reproduction in adult ewes. **Res. Vet. Sci. 52: 3 : 267-272 .**

Arguero S. I. (1996) . Monografías de antisépticos y desinfectantes de uso más común en hospitales . Internet . webmaster hnn.sa.cr . El Hospital Nacional de Niños de San José Costa Rica.

Batey R. G.; Speed C. M. (1990) . Prevalence and distribution of caseous lymphadenitis in feral goats. **Aust. Vet. J. Vol. 63 (2) .**

Burrell D. H. (1981) . Caseous Lymphadenitis in goats . **Aust. Vet. J. Vol. 57 : 105-110 .**

Bruch M. K. (1996) . Methods of Testing Antiseptics: in disinfection, sterilization and preservation. Seymour S. Block . Ed. Lea & Febiger. Fourth edition. London . pp . 1028-1037.

Carter G. R. (1992) . Desinfectantes en : Fundamentos de Bacteriología y Micología Veterinaria . Editorial Acibia . pp. 111-119.

Clark Wesley G. (1993) . Desinfectantes en : Farmacología Médica . 1ª Edición . Ed. Mosby . pp. 686-688.

Creminix A. and Fleurette J. (1996) . Methods of testing disinfectants in disinfection, sterilization and preservation . Seymour S. Block . Editorial Lea & Febiger . Fourth Edition . London . pp. 1009-1013 .

Chandiramani N. K.; Garg, D.N. (1982) . *Corynebacterium ovis* infection in sheep with special reference to epidemiology , pathogenesis , diagnosis and immunity . **Dep. Vet. Public Health , Haryana Agric. University.**

Dulbecco D. ; Ginsberg E. (1990) . Desinfectantes en: Tratado de Microbiología . 3ª edición . Salvat Ed. pp. 1024-1028.

Elad D. ; Shlomovitz S. ; Bernstein M. (1991). Sensitivity pattern of bacteria isolated during 1990, as determined by a standadized in vitro antibacterial disc sensitivity test. *Israel J. Vet. Med.* **46: 2; 60-63.**

Ellis T. M.: Sutherland S.S. : Wilkinson F.C. (1987) . The role of *Corynebacterium pseudotuberculosis* lung lesions in transmission of this bacterium of other sheep. *Aust. Vet. J.* Vol. **64 : 9 ; 261-266 .**

Favier B.: Oudar R.: Borges E. (1990) . Étude Baectéiologique de 58 souches de *Corynebacterium pseudotuberculosis* . *Revue Med. Vet.* **142: 1 ; 43-47 .**

Freeman B.A.. (1983) . Desinfectantes en : Tratado de Microbiología de Burrows. 21ª edición. Editorial Interamericana. pp. 126-132 .

García V. S. (1980) . Aislamiento y caracterización de corinebacterias de ovinos y caprinos de México . Tesis de Licenciatura . M.V.Z. ENEP - Cuautitlán .

Girones O.; Simon M. C.; Muzquiz J. L. (1993) . Experimental demonstration of the clinical and epidemiological effects of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in breeding ewes and newborn lambs. *Med. Vet.* **8: 9; 490-503 .**

Harker D. B. (1990) . *Goat Vet. Soc. Journal.* **11 :2 ; 52-54 .**

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 (8) ; 1110-1113 .**

Hodgson A . L . ; Tachedjian M. ; Corner L. A. (1994) . Protection of sheep against caseous lymphadenitis by use of a single oral dose of live recombinant *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infect, and Imm.* Vol:**62 (12) ; 5275-5280 .**

Holstad G. J. ; Teige J. (1989) . *Corynebacterium pseudotuberculosis* Infection in goats VIII . *Acta Vet. Scand.* Vol **30 (3) ; 275-283 .**

Jensen and Swifts (1988) . Diseases of sheep . 3ª Ed. Lea & Febiger. Philadelphia. 374-377.

Judson R. And Songer Glenn (1991) . *Corynebacterium pseudotuberculosis* in vitro susceptibility to 39 antimicrobial agents. *Vet. Microbiol.* **270 : 145-150 .**

- Kuria J. ; Holstad G. (1989) . Serological investigation of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep correlation between the hemolysis inhibition test and the ELISA test . **Acta Vet. Scand.** **30: 1 ; 109-110 .**
- Laak E ; Schrender B. (1991) . Serological diagnosis of Caseous Lymphadenitis in goats and sheep. **Vet. Record . 128 : 18**
- Lindsay H.J.; Lloyd S. (1991) . Diagnosis of Caseous Lymphadenitis in goats. **Vet. Record, 128 : 86.**
- Márquez Q. N. (1970) . Estudio clínico de linfadenitis caseosa en caprinos en Venezuela criollos e importados. Revista de Medicina Veterinaria y Parasitología. Vol. XXIII.
- Mateos Pedro F. (1996) . Control de las poblaciones microbianas . Esterilización y Desinfección . Departamento de Microbiología y Genética. Facultad de Farmacia . Universidad de Salamanca .
- Miers K.C. and Ley W. B. (1980) . *Corynebacterium pseudotuberculosis* Infection in horse . **J. Am. Vet. Med. Assoc. Vol : 177 (3) .**
- Nagy G. (1976) . Casous Lymphadenitis in sheep . Methods of infection . **J.S. Afr. Vet. Assoc. 47(3): 197-199 .**
- Paton M.W. ; Rose I.R.; Hart R.A. (1994) . New infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* reduces wool production . **Aus. Vet. J. 71 (2) : 47-49**
- Paton M. W.; Suttherland S.S.; Rose I.R. (1995) . the spread of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection to unvaccinated and vaccinated sheep . **Aust. Vet. J. Vol. 72: 7 ; 266-269 .**
- Pepin M.; Bisrame A. and Marly J. (1989) . *Corynebacterium pseudotuberculosis* biochemical properties, production of toxin and virulence of ovine and caprine strains . **Ann. Rech . Vet. 20: 111-115 .**
- Pijoan P. Y Tórtora, J. (1985) . Linfadenitis caseosa en : Principales Enfermedades de los ovinos y caprinos . 1ª Edición . Editores Pijoan y Tórtora .
- Ramírez Gama Rosa Ma. (1995) . Manual de Prácticas de Microbiología General. Laboratorio de Microbiología Experimental . Facultad de Química, U.N.A.M.
- Redondo E.; Roncero V.; Durán E. (1988) . Consideraciones sobre la pseudotuberculosis ovina . **Act. Med. Vet. 34 : 191-198 .**

SAGAR ; CONETB ; Fed. MVZ . (1995) . Manual de actualización técnica para la aprobación de Médicos Veterinarios en tuberculosis bovina y brucelosis . Fed. M.V.Z.

Serikawa S.; Ito S.; Hatta T. Kusakari N. (1993) . Seroepidemiological evidence that shearing wounds are mainly responsible for *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep . **J. Vet. Med. Science ; 55 (4) .**

Serikawa S.; Ito S.; Hatta T.; Kusakari N. (1994) . Protection from caseous lymphadenitis in sheep by spraying iodine tincture of shearing wounds. **J. Vet. Med. Science ; 56 (2) : 411-412 .**

Shpigel N. Y.; Elad D.; Yeruham I.; Saran A. (1993) . An outbreak of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in An israeli dairy heryd . **Vet. Rec. (4) : 89-94 .**

Smith Mary (1994) . Caseous lymphadenitis in Goat Medicine . Lea & Febiger . 46-49 .

Sumano L. H. y Ocampo C.L. (1988) . Desinfectantes y antisépticos en: Farmacología Veterinaria. 1ª Edición. McGraw-Hill . 192-227.

Shuterland S.; Speijer E.; Andrés B. (1989) . Comparison of the exotoxins of four strains od *Corynebacterium pseudotuberculosis* . **Res. Vet. Science . 47: 190-194 .**

Sutherland S. S. (1993). Biotype analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats . **Aust. Vet. J. Vol. 70 (12) : 454-456 .**

Talero K .; Talero A. (1993) . Physical and chemical control of microbes in Foundations in Microbiology . Wm. C. Brown Publishers . 265-270 .

Vázquez L. A. (1986) . Estudio Sanitario y del Funcionamiento del Rastro y Frigorífico de Ferrería en el Departamento de ovinos y caprinos. Tesis de Licenciatura . FES Cuautitlán.

Walkwer J.; Jackson A., Eggleton D.G. (1994) . Identification of a novel antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis* that ptoects sheep against caseous lymphadenitis . **Infect. and Imm. Vol. 62 (6): 2562-2567 .**

Yeruham I.; Elad D.; Ham Van (1997) . *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in israeli cattle: clinical and epidemiological studies . **Vet. Rec. 140 : 423-427 .**

Zaituon A. M.; Bayoumi A.H. (1994) . Some epidemiological studies on ovine pseudotuberculosis . **Assiut Vet. Med. J.** Vol. 31 (61) : 238-350 .

Zhao H.K.; Morimura H.; Hiramune T. (1991) . Antimicrobial susceptibility of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from lesions of caseous lymphadenitis in sheep in Hokkaido Japan. **J. Vet. Med. Science.** 53(2): 355-356 .