

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA  
*IN VITRO* DE LA INFUSIÓN DE HOJAS DE ORÉGANO  
(*Lippia graveolens* HBK) SOBRE LAS PRINCIPALES  
BACTERIAS AISLADAS DE ENTERITIS EN LECHONES**

**DIEGO MAXIMILIANO AGREDA GIRÓN**

**Médico Veterinario**

**GUATEMALA, MARZO DE 2015**

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE  
LA INFUSIÓN DE HOJAS DE ORÉGANO (*Lippia graveolens* HBK)  
SOBRE LAS PRINCIPALES BACTERIAS AISLADAS DE ENTERITIS  
EN LECHONES**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN**

**PRESENTADO A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD**

**POR**

**DIEGO MAXIMILIANO AGREDA GIRÓN**

Al conferírsele el título profesional de

Médico Veterinario

**En el grado de Licenciado**

GUATEMALA, MARZO DE 2015

**UNIVERSIDAD SAN CARLOS DE GUATEMALA**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**  
**JUNTA DIRECTIVA**

DECANO:	M.Sc. Carlos Enrique Saavedra Vélez
SECRETARIO:	M.V. Blanca Josefina Zelaya de Romillo
VOCAL I:	Lic. Sergio Amílcar Dávila Hidalgo
VOCAL II:	M.Sc. Dennis Sigfried Guerra Centeno
VOCAL III:	M.V. Carlos Alberto Sánchez Flamenco
VOCAL IV:	Br. Javier Augusto Castro Vásquez
VOCAL V:	Br. Andrea Analy López Garcia

**ASESORES**

M.A. DORA ELENA CHANG CHANG  
M.V. BLANCA JOSEFINA ZELAYA DE ROMILLO  
M.A. JAIME ROLANDO MÉNDEZ SOSA

## **HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR**

En cumplimiento con lo establecido por los reglamentos y normas de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración el trabajo de graduación titulado:

### **EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE LA INFUSIÓN DE HOJAS DE ORÉGANO (*Lippia graveolens* HBK) SOBRE LAS PRINCIPALES BACTERIAS AISLADAS DE ENTERITIS EN LECHONES**

Que fuera aprobado por la Honorable Junta Directiva de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Como requisito previo a optar al título de:

**MÉDICO VETERINARIO**

## **ACTO QUE DEDICO A:**

- A MIS PADRES:** Lourdes del Rosario Girón de Agreda Y Cesar Augusto Agreda Godínez.
- A MIS HERMANOS:** Pedro Miguel Agreda Girón y Pablo Javier Agreda Girón.
- A MIS ABUELOS:** Guadalupe Rivas Telles de Girón Y †Benigno Girón Pereira; †Maximiliano Agreda Luna Y †Transito Godínez de Agreda.
- A MI FAMILIA:** Cuñadas, Sobrinos, Primos, Tíos: José Benigno Girón Rivas Y Mayra Lam De Girón.
- A MIS ALUMNOS:** que conocí durante mi tiempo de auxiliatura en la Facultad.
- A MI SEGUNDA FAMILIA:** Marta Julia Morales, Doña Magda Irias De Morales, †Don Fidencio Morales.
- A MIS AMIGOS:** Sofía, Diegos, Ana Lucia, Denise, Diana, Rocío, Celeste y los demás presentes.
- AL DEPARTAMENTO DE CITOLOGIA CCQQ:** M.A. Isabel Gaitán.

**AL DEPARTAMENTO DE  
MICROBIOLOGÍA FMVZ:**

Martín, Henry, Hugo, Lucky.

**AL DEPARTAMENTO DE  
BROMATOLOGÍA FMVZ:**

Marinita, Charly, Hans, José Antonio, Lic.  
Miguel Rodenas y Dr. Hugo Pérez.

**A LA ESCUELA DE  
ZOOTECNIA:**

Lic. Edgar Pimentel, M.Sc. Raúl Villeda,  
M.Sc. Karen Hernández, M.Sc. Astrid Va-  
lladares y demás compañeros de trabajo.

**COMUNIDAD SALQUIL  
GRANDE, NEBAJ, QUICHÉ:**

Familia López Raymundo,  
Don Pedro Ceto De Paz.

## **AGRADECIMIENTOS:**

### **A MIS PADRES:**

por ayudarme en cada paso de mi vida, ser mi inspiración y motivarme siempre a seguir adelante.

### **A MIS HERMANOS:**

por su apoyo, amor y cariño. Recuerden que este logro es resultado de nuestras luchas.

### **A MIS ABUELOS:**

quienes fueron mi ejemplo de lucha y su enseñanza de vida me motivó a salir adelante.

### **A MI FAMILIA:**

en especial a mis tíos Mayra y Benigno, que se tomaron el tiempo de aconsejarme y apoyarme en el transcurso de la carrera.

### **A QUIÉN CONSIDERÉ FAMILIA:**

Doña Magda, Don Fidencio, Martita e hijos de ustedes nació el sueño de seguir esta profesión.

### **AL DEPARTAMENTO CITOHISTOLOGIA CCQQ:**

M.A. Isabel Gaitán, quien me ayudo a realizar este trabajo de investigación.

### **AL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA FMVZ**

todo el personal administrativo y docente, quienes me permitieron culminar esta investigación y compartieron su amistad.

**AL DEPARTAMENTO DE  
BROMATOLOGÍA FMVZ**

por compartir buenos momentos de alegría, amistad, consejos y enseñanzas para desempeñarme como mejor profesional.

**A MIS ASESORES:**

por su ayuda, tiempo y entrega, pero sobre todo, por creer en el proyecto.

**A LA ESCUELA DE ZOOTECNIA:**

por dejarme formar parte en sus actividades y enseñarme a desempeñarme como mejor profesional para la sociedad.

**A MIS MAESTROS:**

por compartir sus conocimientos durante toda mi formación profesional.

**A MIS ALUMNOS:**

por compartir su amistad y apoyo durante mi tiempo de auxiliatura y con quienes aprendí más de lo que creí enseñar.

**A LA COMUNIDAD SALQUIL  
GRANDE, NEBAJ:**

el tiempo que compartí durante el EPS me enseñaron a ser una mejor persona y enfocar de una mejor manera mi profesión para el desarrollo del país.

**A MIS AMIGOS:**

gracias por compartir ese tesoro tan invaluable, su tiempo, alegrías y amistad. Este logro que hoy culmino es de ustedes también.

# ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>II. HIPÓTESIS</b> .....	3
<b>III. OBJETIVOS</b> .....	4
3.1 Objetivo General.....	4
3.2 Objetivo Específico.....	4
<b>IV. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	5
4.1 Enteritis en lechones.....	5
4.2 Desarrollo de las especies de la microflora del tracto digestivo en lechones.....	6
4.3 Destete.....	6
4.4 Flora.....	7
4.5 Diarrea colibacilar del lechón.....	7
4.5.1 Epidemiología.....	8
4.5.2 Características microbiológicas.....	8
4.5.3 Patogénesis.....	9
4.5.3.1 Enterotoxinas y su mecanismo de acción.....	10
4.5.4 Signos clínicos.....	11
4.5.5 Lesiones.....	11
4.5.6 Diagnóstico.....	12
4.5.7 Diagnóstico diferencial.....	13
4.5.8 Tratamiento.....	13
4.5.9 Prevención.....	13
4.6 Salmonelosis.....	14
4.6.1 Epidemiología.....	15
4.6.2 Características microbiológicas.....	16
4.6.3 Patogénesis.....	17
4.6.4 Signos clínicos.....	17

4.6.5	Lesiones.....	18
4.6.6	Diagnóstico.....	19
4.6.7	Diagnóstico diferencial.....	19
4.6.8	Tratamiento.....	19
4.6.9	Control y prevención.....	19
4.7	Infección por <i>Clostridium perfringens</i> .....	20
4.7.1	Epidemiología.....	21
4.7.2	Características microbiológicas.....	21
4.7.3	Patogénesis.....	22
4.7.4	Signos clínicos.....	22
4.7.5	Lesiones.....	23
4.7.6	Diagnóstico.....	23
4.7.7	Tratamiento y prevención.....	24
4.8	Resistencia a los medicamentos antimicrobianos.....	25
4.8.1	Resistencia natural o intrínseca.....	26
4.8.2	Mutación.....	26
4.8.3	Adquirida.....	26
4.8.4	Resistencia asociada.....	27
4.8.5	Resistencia cruzada.....	27
4.8.6	Origen genético.....	27
4.8.6.1	Transducción.....	28
4.8.6.2	Transformación.....	28
4.8.6.3	Conjugación.....	28
4.8.6.4	Transposición.....	28
4.8.7	Elementos que participan en la transferencia de genes de resistencia.....	29
4.8.7.1	Plásmidos.....	29
4.8.7.2	Transposones.....	29
4.8.7.3	Integrines.....	30
4.8.8	Limitación.....	32

4.8.9	Implicaciones clínicas de la resistencia a los medicamentos.....	33
4.8.9.1	Bacterias entéricas gramnegativos.....	33
4.9	Resistencia antimicrobiana en la producción porcina.....	34
4.10	Métodos de detección de resistencia antibiótica.....	35
4.10.1	Dilución en agar.....	35
4.10.2	Dilución en caldo.....	36
4.10.3	Determinación de la CIM para la técnica de microdilución en placa.....	36
4.10.4	Factores que afectan la actividad antimicrobiana.....	36
4.10.4.1	pH del medio.....	36
4.10.4.2	Componentes del medio.....	37
4.10.4.3	Estabilidad de los medicamentos.....	37
4.10.4.4	Tamaño del inóculo.....	37
4.10.4.5	Duración de la incubación.....	37
4.10.4.6	Actividad metabólica de los microorganismos.....	38
4.11	Orégano.....	38
4.11.1	Sinónimos.....	38
4.11.2	Nombres populares.....	38
4.11.3	Descripción botánica.....	38
4.11.4	Habitat.....	39
4.11.5	Historia.....	39
4.11.6	Agricultura.....	39
4.11.7	Usos medicinales atribuidos.....	40
4.11.8	Infusión.....	40
4.11.9	Fitoquímica.....	40
4.11.10	Principios activos.....	41
4.11.11	Etnofarmacología.....	42
4.11.12	Indicaciones terapéuticas.....	44
<b>V.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>46</b>
5.1	Materiales.....	46

5.1.1	Material microbiológico.....	46
5.1.2	Material vegetal.....	46
5.1.3	Material de laboratorio.....	46
5.1.4	Medios de cultivo.....	47
5.1.5	Equipo de laboratorio.....	47
5.1.6	Área de trabajo.....	47
5.1.7	Recursos humanos.....	48
5.2	Metodología.....	48
5.2.1	Diseño del estudio.....	48
5.2.2	Obtención de las bacterias.....	48
5.2.3	Selección del antibiótico.....	48
5.2.4	Selección de la planta.....	49
	5.2.4.1 Obtención del material vegetal.....	49
	5.2.4.2 Preparación de la infusión.....	49
5.2.5	Preparación del agar planta.....	50
5.2.6	Preparación del inóculo con <i>E. coli</i> , <i>Salmonella sp.</i> y <i>Clostridium sp.</i> .....	50
5.2.7	Siembra en agar planta.....	50
5.2.8	Preparación del control positivo (a la inhibición).....	51
5.2.9	Preparación del control negativo (a la inhibición).....	51
5.2.10	Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM).....	51
	5.2.10.1 Técnica de macrodilución.....	52
5.2.11	Análisis de datos.....	52
<b>VI.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>53</b>
<b>VII.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>59</b>
<b>VIII.</b>	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>60</b>
<b>IX.</b>	<b>RESUMEN.....</b>	<b>61</b>
	<b>SUMMARY.....</b>	<b>62</b>
<b>X.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>63</b>
<b>XI.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>70</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

### **Cuadro No. 1**

Nombre científico, nombre común, número de herbario y procedimiento de la planta.....49

### **Cuadro No. 2**

Eficacia in vitro de infusión de hojas y tallos de Orégano (*Lippia graveolens* HBK) en contracción de 1.5% frente a las principales bacterias causantes en enteritis en lechones.....54

### **Cuadro No. 3**

Control de la actividad antimicrobiana de la infusión de hojas de Orégano sobre las principales bacterias causantes de enteritis en lechones.....56

### **Cuadro No. 4**

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) de hojas y tallos de Orégano (*Lippia graveolens* HBK) frente a las principales bacterias causantes de enteritis en lechones .....57

### **Cuadro No. 5**

Patrón utilizado para la siembra en placa de agar planta para la técnica de macrodilución.....77

### **Cuadro No. 6**

Patrón utilizado para la siembra en placa de agar planta para la técnica de macrodilución.....78

### **Cuadro No.7**

Controles comparativos para las principales bacterias causantes de enteritis en lechones.....78

### **Cuadro No.8**

Control negativo de la evaluación del crecimiento bacteriano.....79

### **Cuadro No. 9**

Control positivo de la evaluación del crecimiento bacteriano.....79

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura No. 1</b> Preparación de la infusión.....	71
<b>Figura No. 2</b> Preparación de placas con agar planta.....	71
<b>Figura No. 3</b> Agar planta.....	72
<b>Figura No. 4</b> Plantilla utilizada como guía para la inoculación en la placa de agar planta para la técnica de macrodilución.....	72
<b>Figura No. 5</b> Inoculación en agar planta para determinación de eficacia antibacteriana.....	73
<b>Figura No. 6</b> Placas de agar planta sembradas con <i>Salmonella sp</i> y <i>Escherichia coli</i> para determinación de eficacia antibacteriana. Comparación con controles positivos (izquierda) y negativos (derecha).....	73
<b>Figura No. 7</b> Placas de agar planta y placa de agar Müeller Hinton sembradas con <i>Clostridium sp.</i> para control.....	74
<b>Figura No. 8</b> Esquema para la inoculación de las cepas para determinación de la CIM.....	74
<b>Figura No. 9</b> Placa cuadrilate para determinación de CIM.....	75

**Figura No. 10**

Resultado de CIM para *Salmonella sp.* habiendo crecimiento en concentraciones de 0.75%, 0.375% y control (negativo a inhibición), no así en concentración de 1.5% (positivo a inhibición).....75

**Figura No. 11.**

Resultado de CIM para *E. coli* habiendo crecimiento en concentraciones de 1.5%, 0.75%, 0.375% y control (negativo a inhibición).....76

**Figura No. 12.**

Resultado de CIM para *Clostridium sp.* positivo a inhibición, habiendo crecimiento únicamente en control, y concentraciones de 0.75% y 0.375%.....76

## I. INTRODUCCIÓN

Las enteritis en lechones representan una de las infecciones típicas en las explotaciones porcinas. Su etiología se encuentra comprendida por muchos factores y complejos en donde interactúan microorganismos, humedad, falta de ingestión de calostro, estrés, medio ambiente y condiciones del hospedador, principalmente en sus primeras semanas de vida; los cuales producen altos índices de morbilidad y mortalidad, y su significado económico varía entre granjas, en las que muchas veces depende del sistema de manejo y grado de intensificación de la cría. Estas pérdidas económicas en la explotación se representan con las muertes de los lechones, así como por los costos de tratamiento. Son muchos los agentes bacterianos responsables de diarrea en cerdos, entre los cuales destacan *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella cholerae suis* y otros serotipos, entre otros.

La Etnoveterinaria es el uso de plantas medicinales de la región, para el control de enfermedades y brindando terapias alternativas más económicas que puedan ser aplicables a la población animal de las comunidades de escasos recursos, debido a la dificultad que tienen muchas personas para acceder a fármacos comerciales de uso veterinario.

Estudios han demostrado la actividad antimicrobiana que poseen los componentes activos de las hojas de Orégano (*Lippia graveolens*) contra *E. coli*, *S. typhi*, *S. aureus*, *S. pneumoniae* y *S. pyogenes*. Los aceites esenciales que brindan la actividad antibacteriana son el Carvacrol y Timol, los cuales tienen la capacidad de destruir la estructura de la membrana celular, causando el incremento de su permeabilidad y por consiguiente la salida de iones inorgánicos, ATP, ácidos nucleicos y aminoácidos, liberando lipopolisacáricos entre otros.

Esta investigación se enfoca en apoyar modelos alternativos de producción ecológicamente sostenible, el cual permita impulsar el desarrollo rural, evaluando la efectividad *in vitro* de la infusión de hojas de Orégano (*Lippia graveolens*, HBK) como antibiótico sobre las principales bacterias aisladas de enteritis en lechones.

## II. HIPÓTESIS

La infusión de la hoja de Orégano (*Lippia graveolens* HBK) es efectiva *in vitro* contra las principales bacterias que causan enteritis en lechones.

### III. OBJETIVOS

#### 3.1 General

Generar información científica referente al uso de infusión de hojas de Orégano (*Lippia graveolens* HBK) para el control de las principales bacterias que causan enteritis en lechones.

#### 3.2 Específicos

Comprobar la eficacia *in vitro* de hojas de Orégano (*Lippia graveolens* HBK) en concentración al 1.5% frente a las principales bacterias causantes de diarrea en lechones.

Determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de la infusión de hojas de Orégano (*Lippia graveolens* HBK) frente a las principales bacterias causantes de diarrea en lechones.

Determinar la bacteria que presente mayor sensibilidad *in vitro* a la infusión de hojas de Orégano (*Lippia graveolens* HBK).

## IV. REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1 Enteritis en lechones

Las enteropatías son constituyentes de las infecciones que ocurren con mayor frecuencia en las granjas de explotación porcina a nivel global. Es de carácter multifactorial, en donde interactúan los microorganismos, el medio ambiente y las condiciones del hospedador. Los lechones se encuentran expuestos, con mayor riesgo, durante sus primeras semanas de vida, produciendo altos índices de morbilidad y mortalidad. Esto genera variaciones en el valor económico de las granjas muchas veces es dependiente al sistema de manejo y del grado de intensificación de la cría. (Pineda, 1992.)

Las pérdidas económicas que generan estas enfermedades se deben en parte a las muertes de los lechones y al costo que se tiene por tratamiento. Por lo que la base para tener un buen control de las enfermedades radica principalmente en el buen manejo y condiciones sanitarias adecuadas para las instalaciones. (Pineda, 1992)

Los agentes etiológicos descritos como causantes de diarreas en los cerdos encontramos a las bacterias, los virus y los parásitos, aunque no siempre tienen la misma participación. Por lo que muchas infecciones pueden darse por un agente individual o bien una combinación de los mismos. Recientemente se ha demostrado que la patogenicidad de las bacterias tiene una fuerte interacción entre la virulencia de cada especie bacteriana, factores del huésped y su medio ambiente. De los agentes bacterianos se encuentran muchos que son responsables de causar diarreas en cerdos, de los que se pueden destacar *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella choleraesuis* y otros serotipos, entre otros. (Pineda, 1992)

## **4.2 Desarrollo de las especies de la microflora del tracto digestivo en lechones**

Los lechones tienen el tubo digestivo estéril al nacer, por lo que se trata de un medio idóneo para el crecimiento rápido de bacterias que se adquieren del medio. Pasadas tres horas de vida se puede detectar el desarrollo de una pequeña población microbiana en el intestino. (Varley, 1995)

Los primeros organismos que colonizan el tracto digestivo de los lechones comienzan con cepas apatógenas de *Escherichia coli*, Estreptococos, Clostridios y Lactobacilos. Conforme las bacterias aerobias facultativas consumen el oxígeno del medio, progresivamente los anaerobios se convierten en dominantes. Los principales microorganismos presentes en el quimo de los lechones son *Escherichia coli*, *Clostridium welchii*, Estreptococos, Lactobacilos y *Bacteroides*. (Varley, 1995)

El lechón recién nacido está expuesto sucesivamente al canal del parto, las heces maternas y al ambiente de crianza, este conjunto generan fuentes potenciales de microorganismos. Siendo entre estas la mayor fuente bacteriana para los lechones las heces maternas. (Varley, 1995)

## **4.3 Destete**

Dado a que en los sistemas de producción es un acontecimiento repentino, la flora intestinal del lechón debe adaptarse rápidamente al cambio abrupto de la dieta. Este periodo se caracteriza por darse una alta mortalidad asociada a diarreas. Se ha demostrado que el número de *E. coli* hemolíticos y Rotavirus aumenta considerablemente en el intestino delgado de los lechones al destete. (Varley, 1995)

La principal causa de diarreas bacterianas en el lechón lactante en todo el mundo es la Colibacilosis enterotoxigénica causada por *Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET), aunque también puede darse por otras bacterias tales como *Salmonella*, *Campylobacter* y *Clostridium perfringens*, el protozoo *Cryptosporidium* y varios virus como Rotavirus, virus de la gastroenteritis transmisible, Adenovirus porcino y Coronavirus. (Varley, 1995)

Los lechones tienen cierta protección durante sus primeras semanas de vida dadas por los anticuerpos presentes en el calostro materno, por lo que el destete tiende a privarlo de esta protección. (Varley, 1995)

#### **4.4 Flora bacteriana del intestino del cerdo**

Los lactobacilos que se han reportado como dominantes en el contenido cecal del cerdo son *Lactobacillus acidophilus* y *L. fermentum*. También se han identificado *Streptococcus bovis* y *S. faecium*. Los estreptococos predominantes en el lechón lactante son *S. alivarius*, *S. faecium* y *S. faecalis*, los cuales tienden a ser suplantados por *S. bovis* y *S. equinus* tras el destete. Los *Lactobacillus acidophilus*, *L. fermentum* y *L. salivarius* prevalecían en lechones lactantes y destetados. (Varley, 1995)

#### **4.5 Diarrea colibacilar del lechón**

La colibacilosis porcina es una enfermedad infecciosa causada por *Escherichia coli*, que causa grandes pérdidas económicas en las explotaciones porcinas debido a disminución de peso, retraso en el desarrollo, menor conversión alimenticia y muerte en muchos casos. Se le atribuyen valores de un 40 hasta un 80% de las diarreas porcinas previas al destete. (Castillo, 1986; López, s.f.)

En lechones, *E. coli* es responsable de septicemia, diarrea y la enfermedad

de los edemas. Los lechones más afectados son aquellos de 2 a 3 horas de nacidos hasta el destete. (Castillo, 1986)

La diarrea colibacilar se produce cuando los lechones ingieren tipos de patógenos de colibacterias en gran cantidad, con las que se infectan. Estas bacterias se asientan en el intestino delgado y de allí es cuando generan la enfermedad al no contar los lechones durante sus primeras horas de vida ningún tipo de inmunidad por parte del calostro materno. (Dannenber, 1975)

#### **4.5.1 Epidemiología**

Para generarse la enfermedad se requiere que se den ciertos complejos etiológicos tales como: el que el contenido de anticuerpos brindados por parte del calostro materno sea demasiado escaso contra los diversos tipos de colibacilos; la calidad de las instalaciones sea deficiente en el manejo higiénico y tenga alta contaminación fecal. (Dannenber, 1975)

Se debe distinguir la colibacilosis previa y posterior al final del primer día de vida. La diarrea observada durante el primer día se debe probablemente a un síndrome precoz de disgalaxia muy temporal de la cerda, que menudo es autolimitante o debido falta de ingesta de calostro por algún lechón en particular. Tras el primer día de vida, la colibacilosis puede ser la consecuencia de una falta de inmunidad calostrual adecuada desde un punto de vista cualitativo (principalmente en primíparas no vacunadas) o cuantitativo (problemas de lactación por parte de la cerda, camada numerosa, entre otras). (Varley, 1995)

#### **4.5.2 Características microbiológicas**

La *E. coli* es un bacilo pequeño, gramnegativo, en forma de bastón, crece

fácilmente en los medios habituales de cultivo del laboratorio y no forma esporas. Forma colonias características con centro negrozco en agar eosina-azul de metileno, y en rojo de metilo positivo, indol positivo, Voges-Proskauer negativo y citrato negativo. (Dunne, 1967)

### **4.5.3 Patogénesis**

La *E. coli* basa su patogenicidad en dos mecanismos en su capacidad para adherirse a las células epiteliales del intestino delgado (colonización) y la producción de enterotoxinas que provoquen al intestino delgado a secretar fluidos y electrolitos hacia la luz intestinal, lo que produce diarrea, deshidratación y acidosis. (Castillo, 1986)

La capacidad del bacilo de adherirse a los enterocitos y luego colonizar el epitelio intestinal, está mediada por estructuras presentes en las cepas enteropatógenas, llamadas “pili” o “fimbrias”. Estos corresponden a apéndices filamentosos no flagelares, distribuidos en la periferia de la célula bacteriana, y que solo son visibles bajo microscopios electrónicos. (Castillo, 1986)

Los tipos de antígenos fimbriales comunes asociados con la patogenicidad son K88, K99, 987 y F41. Las cepas K88 y 987P suelen producir la infección neonatal, mientras que la colibacilosis posdestete casi siempre se debe a la cepa K88. (Merck, 2000)

La razón por la cual se da la colonización intestinal en el lechón es debido a su pH estomacal puede ser tan alto que llega a alcanzar valores cercanos a la neutralidad, por lo que la *E. coli* es capaz de multiplicarse en este medio, pasando en grandes cantidades hacia el intestino delgado. (López, s.f.)

#### 4.5.3.1 Enterotoxinas y su mecanismo de acción

Las *E. coli* enterotoxigénicas (ECET) se caracterizan por su capacidad para producir enterotoxinas que tienen la propiedad de alterar el flujo de líquidos y electrolitos en el intestino por lo que dan lugar a diarreas acuosas. Las enterotoxinas producen una toxina termolábil (LT) y dos termoestables (STa y STb). La LT es una proteína inmunógena de gran tamaño con muchas subunidades que simulan a la colerotoxina producida por *Vibrio cholerae*. (Varley, 1995)

Las enterotoxinas se unen a receptores específicos localizados en la membrana apical de los enterocitos, para luego penetrar por endocitosis a la mucosa intestinal. La LT activa el adenilato ciclasa de los enterocitos produciendo un incremento de adenosin monofosfato cíclico (AMPc) que activa la proteína quinasa dependiente de AMPc. Esto llega a alterar los procesos fisiológicos de secreción y absorción de agua y electrolitos (principalmente cloro) por lo que da lugar a una salida neta de líquido al lumen intestinal, y disminuyendo la absorción de cloruro de sodio, así como alteraciones en los niveles de calcio intracelular, dando paso a la diarrea acuosa. (López, s.f.; Varley 1995)

Los lechones de más de dos semanas de edad son menos sensibles a la acción de la ST. La ST provoca hipersecreción de  $\text{HCO}_3^-$  e induce a una atrofia de las vellosidades intestinales. La diarrea hipersecretora provocada por los ECET se caracteriza por las heces acuosas muy abundantes que son isotónicas con el plasma y de reacción alcalina por la secreción de  $\text{HCO}_3^-$ . (López, s.f.)

El efecto que resulta en los lechones afectados es la rápida deshidratación y sufren de acidosis. Aunque no se ve afectado el mecanismo que enlaza la absorción de sodio con la glucosa y aminoácidos. Por lo tanto, los lechones que

sufren de diarrea se pueden mantener mediante la terapia líquida oral que contenga sodio y glucosa. (López, s.f.)

#### **4.5.4 Signos clínicos**

Se enferman de diarrea colibacilar con preferencia los lechones de 1 a 15 días de edad, pero muchas veces también lechones de mayor edad. Exhiben diarrea pastosa blanca amarillenta o acuosa, debilidad general y coloración gris sucia de la piel. Con frecuencia se conserva el deseo de mamar. Sin un tratamiento adecuado mueren la mayoría de los lechones al cabo de 1 a 3 días. En casos agudos los lechones mueren antes de que los signos clínicos aparezcan. El número de camadas afectadas, así como el de lechones enfermos dentro de cada una, pueden variar muchas veces. (Dannenberg, 1975)

En los casos subagudos se observan lechones deprimidos y lentos, piel azulada o gris (similar a la salmonelosis o la septicemia, proyección de los huesos por la deshidratación, abdomen flácido y hundido, pelo hirsuto y vómito en algunas ocasiones (Dunne, 1967)

Cuando son severos los casos de colibacilosis se aprecia deshidratación, acidosis metabólica y muerte. La diarrea neonatal se puede presentar a las 2 a 3 horas posteriores al parto, siendo más común que se de en uno o varios lechones que provienen de cerdas primerizas y es caracterizado por ser de color amarillo pálido, profusa aguda y caseosa (Dunne, 1967)

#### **4.5.5 Lesiones**

Las alteraciones que se encuentran son enteritis catarral, que puede ser moderada o grave y que se caracteriza por congestión de los vasos mesentéricos anteriores y posteriores. El estómago puede contener cantidades variables de

leche coagulada, pero por lo general no presenta alteraciones hemorrágicas notables. El intestino contiene a menudo una sustancia acuosa, amarillenta y gaseosa. Los ganglios linfáticos mesentéricos pueden estar aumentados de tamaño y edematosos. (Dunne, 1967)

En cualquier edad se pueden encontrar complicaciones como neumonías, peritonitis y pleuritis. En los casos de septicemia, la piel puede presentar cierta coloración, que casi siempre es moderada. Los abscesos de las articulaciones se presentan a veces después de que la septicemia ha declinado. (Dunne, 1967)

#### **4.5.6 Diagnóstico**

La presencia de enteritis o de gastroenteritis moderada del recién nacido, sin signos de enfermedad en las cerdas, es muy sugestivo de infección por *E. coli*. La ausencia de lesiones hemorrágicas en el estómago de los cerdos infectados puede ayudar a diferenciarla de la gastroenteritis transmisible. (Dunne, 1967)

La confirmación diagnóstica se basa en la demostración de una colonización intensa del intestino delgado por *E. coli*. Las muestras para diagnóstico de laboratorio deben proceder de lechones vivos en los que la diarrea haya comenzado menos de 24 horas antes y que no hayan sido tratados con antibióticos. (Varley, 1995)

El aislamiento de una alta concentración de *E. coli* del contenido intestinal es muy útil pero se debe completar con el serotipado de antígenos somáticos y fimbriales. La determinación de la enterotoxigenicidad no se realiza rutinariamente por ser muy compleja y requiere de mucho tiempo. (Varley, 1995)

La valoración del pH de las heces puede ser de valor diagnóstico ya que en caso de colibacilosis el pH está a menudo por encima de 7 debido a la secreción

de grandes cantidades de bicarbonato. (Varley, 1995)

#### **4.5.7 Diagnóstico diferencial**

Se debe realizar el diagnóstico diferencial con Gastroenteritis Transmisible, Rotavirus, Clostridiasis, Coccidiosis y en afecciones diarreicas de origen alimentario. (Dannenberg, 1975)

#### **4.5.8 Tratamiento**

Los lechones afectados se deben tratar precozmente y vigilar las demás camadas susceptibles por edad. Habitualmente se aconseja tratar el resto de la camada. Los lechones se pueden tratar con ampicilina, trimetoprim-sulfonamida, gentamicina y enrofloxacin que habitualmente presentan actividad frente a los *E. coli* productores de diarrea. (Varley, 1995)

Se aconseja realizar antibiograma sobre las cepas aisladas debido a que las cepas de *E. coli* pueden desarrollar resistencia adquirida a algunos antibióticos. Los antibióticos se deben administrar preferiblemente por vía oral, pero en la práctica se aplican a menudo por vía intramuscular. La administración oral de electrolitos asociados a glucosa y aminoácidos es también muy eficaz. También puede aplicarse gammaglobulinas. El tratamiento se debe acompañar de una mejora de las condiciones ambientales. (Varley, 1995)

#### **4.5.9 Prevención**

Junto a la corrección de los factores predisponentes, el método más eficaz para prevenir la diarrea por ECET en lechones recién nacidos es la vacunación de las cerdas gestantes. La vacunación estimula la producción de anticuerpos

específicos en el calostro y en la leche que protegen pasivamente los lechones frente a las infecciones intestinales. (Varley, 1995)

Los antígenos más adecuados para el desarrollo de vacunas son las enterotoxinas y los antígenos fimbriales. La mayoría de las cepas ECET que provocan diarrea neonatal expresan uno o más de los antígenos fimbriales K88, K99, 987P Y F41. Las vacunas comerciales constan de cuerpos bacterianos completos inertes que expresan tales antígenos o de dichos antígenos purificados asociados a veces a toxoide LT. (Varley, 1995)

Las vacunas se administran por vía intramuscular. En las cerdas nulíparas se deben inyectar dos veces, unas 6 y 2 semanas antes del parto. Con el objeto de mantener altos niveles de anticuerpos calostrales, es aconsejable realizar revacunaciones antes de cada parto, pero habitualmente no se realizan en el campo. (Varley, 1995)

#### **4.6 Salmonelosis**

En 1885 Salmon y Smith aislaron la *Salmonella choleraesuis* (antes llamada *Bacterium suispestifer*) de casos de “cólera porcino”. Por medio de cultivos de este microorganismo produjeron un estado de enfermedad que se parecía al cólera porcino en algunos aspectos. Durante años se le consideró como causante del cólera porcino, hasta que se comprendió que era erróneo, al descubrirse la etiología vírica de la peste del cerdo. (Dannenbergh, 1975; Dunne, 1967)

De la gran variedad de salmonellas presentes en muchas especies animales y causantes de enfermedades (en especial bovinos y aves), así como en el humano al provocar intoxicaciones cármicas, sólo revisten algunas especies con importancia por ser causantes de enfermedad en el cerdo, en particular la

*Salmonella choleraesuis* y más rara vez la *Salmonella typhisuis*, *S. dublin* y *S. typhimurium*. (Dannenberg, 1975)

Los cerdos pueden ingerir con el pienso otras especies de salmonellas sin enfermar por ello, para luego al ser sacrificados, causar intoxicaciones alimentarias en el humano. En algunas explotaciones de engorde, se presentan salmonelosis crónicas que no sólo motivan trastornos en la salud de los animales, sino también decomisos de carnes de cerdos enfermos de salmonelosis. (Dannenberg, 1975)

En caso de que el cerdo ingiera dosis infectivas bajas o tras la recuperación incompleta de un cuadro agudo, se produce una infección subclínica que no se asocia a ninguna sintomatología y pasa de forma desapercibida. Estos portadores asintomáticos pueden excretar de forma intermitente *Salmonella* en las heces. En condiciones de estrés, muy habituales en las condiciones de explotación intensivas (alta densidad, temperatura extrema, ventilación inadecuada, destete, parto, tratamientos con corticosteroides, transporte, entre otras), aumenta la proliferación de *Salmonella* y por tanto su excreción a la vez que incrementa la susceptibilidad de los animales expuestos. (Pascual & Fuentes, s.f.)

#### **4.6.1 Epidemiología**

La dosis infectante varía en función del serotipo, la edad del cerdo y su estado inmunitario, siendo las heces la vía más frecuente de eliminación y la de mayor importancia epidemiológica. (Pascual & Fuentes, s.f.)

Algunos cerdos portadores de la enfermedad, albergan la *Salmonella* en el intestino y vesícula biliar como la *S. choleraesuis*. En cuanto a la *Salmonella typhisuis* sólo motiva enfermedad tras su ingreso en la población, ya sea por la introducción de nuevos cerdos al lote. Otras especies de samonelas pueden

ingresar mediante piensos contaminados o con aves migratorias. Por lo general se requiere de factores que disminuyan la resistencia para que se produzca la enfermedad. Entre los que se cuentan las instalaciones inadecuadas (sucios, húmedos, sobrepoblaciones, suelos irregulares y mojados), raciones insuficientes o desequilibradas (carencias de vitaminas y proteínas, entre otras), intenso padecimiento de otras enfermedades o diversas parasitosis. (Dannenberg, 1975)

La enfermedad en un cerdo ocasiona la multiplicación masiva y la exaltación de la virulencia de las salmonelas, por lo que al recibir el contagio los animales inmediatos, sobre los que también actúan las influencias debilitantes, pueden enfermar en gran número. La *Salmonella* también puede ser excretada mediante la orina, así como con las gotas expulsadas al toser. Los roedores y las moscas juegan un papel importante como vehículos para la salmonela en las instalaciones que exista un cerdo infectado. El tiempo que transcurre entre el contagio y la explosión de la enfermedad es por lo general de sólo pocos días. (Dannenberg, 1975)

#### **4.6.2 Características microbiológicas**

Es un bacilo gramnegativo, aerobio facultativo, por lo general móvil, con cuatro a cinco flagelos peritricos; siempre se encuentra aislado. La temperatura óptima de crecimiento es de 37°C. No licua la gelatina. En el agar, las colonias son húmedas, traslúcidas y grisáceas. En la leche tornasolada produce ligera acidez que es seguida por marcada alcalinidad. La *Salmonella choleraesuis* no produce hidrógeno sulfurado, pero la variedad *kunzendorf* se caracteriza por producirlo. (Dunne, 1967)

Produce ácido y gas con la glucosa, fructosa, manosa, xilosa, maltosa, glicerol, manito, dulcita, ramnosa, sorbitol y dextrina. No tiene efecto sobre la

lactosa, sucrosa, arabinosa, inositol, salicilina, inulina, rafinosa y trehalosa. (Dunne, 1967)

La clasificación de las Salmonellas se basa principalmente en la estructura antigénica y en las propiedades bioquímicas del grupo, las cuales fueron determinadas por Bruner y Edwards en 1940. El microorganismo se destruye en una hora a 56°C, en veinte minutos a 58°C, y en quince o veinte minutos por los desinfectantes comunes. (Dunne, 1967)

#### **4.6.3 Patogénesis**

Las salmonelosis habitualmente se transmiten por vía fecal-oral. Tras la ingestión de una dosis suficiente, capaz de atravesar la barrera gástrica, puede llegar al intestino y adherirse por medio de fimbrias al epitelio intestinal, penetrando por endocitosis y diseminándose a tejido linfoide donde se producirá la multiplicación bacteriana. La dosis infectante varía en función del serotipo, la edad del cerdo y su estado inmunitario, siendo las heces la vía más frecuente de eliminación. (Pascual & Fuentes, s.f.)

#### **4.6.4 Signos clínicos**

Por lo general, sólo resultan afectados los cerdos jóvenes, en particular los lechones lactantes de más edad y los próximos al destete, así como los cerdos de recría hasta los cinco meses. La enfermedad aguda cursa como septicemia. Los animales atacados presentan pérdida de apetito, se esconden, tienen fiebre, diarrea y coloración azulada de las orejas, patas y abdomen. La muerte se produce entre uno y cuatro días. (Dannenberg, 1975)

También es posible un curso más crónico, en el cual los cerdos muestran diarrea castaño amarillenta, que muchas veces es hemorrágica y fétida, tosen,

pierden condición corporal, y exhiben eczemas costrosos. Suelen morir o bien superar la enfermedad con prolongado desmedro subsiguiente, en cuya fase los animales expulsan salmonelas patógenas. (Dannenberg, 1975)

La septicemia aguda y la neumonía, que ocurren con infecciones con *S. choleraesuis* pueden causar fiebre, inapetencia, dificultad respiratoria, depresión, tos, enrojecimiento de la piel. La piel de las extremidades se observan con coloración azul. También se puede observar ictericia a consecuencia de daño hepático y cojera por la artritis séptica. (Dannenberg, 1975; Dunne, 1967; Pascual & Fuentes, s.f.)

Los animales que sobreviven pueden quedar como portadores asintomáticos, ya que la bacteria se aloja en la vesícula biliar y nódulos linfáticos mesentéricos, con lo que el hospedero elimina la bacteria en forma intermitente. (Dannenberg, 1975; Dunne, 1967)

#### **4.6.5 Lesiones**

Los lechones infectados por *S. typhimurium* presentan inflamación y ligero engrosamiento de íleon y colon y generalmente aparecen restos necróticos en la superficie de la mucosa. Las lesiones causadas por *S. typhisuis* son características y típicamente se trata de úlceras amarillas y redondas (en botón) en colon, ciego y, con menor frecuencia, íleon. La ulceración de la mucosa puede ser o no evidente. A veces pueden producirse estenosis rectales. (Carranza et. al., 2006; MERCK, 2000)

La manifestación de salmonelosis crónica es enteritis ulcerosa caseificante junto con un infarto ganglionar de los ganglios linfáticos mesentéricos, y neumonía. (Dannenberg, 1975)

#### **4.6.6 Diagnóstico**

A veces el microorganismo se puede obtener mediante el cultivo de las heces o de la mucosa intestinal en un medio selectivo; sin embargo, las *Salmonellas spp* se aíslan con frecuencia a partir de los ganglios linfáticos mesentéricos agrandados, por impronta directa (frotis), teñidos con Gram, y así como su cultivo sobre un medio selectivo, como el agar verde brillante o por inoculación en medios enriquecidos. El examen histológico del intestino e hígado afectados es un procedimiento adicional valioso para diferenciar la salmonelosis de la enteritis proliferante y de la disentería porcina. (Merck, 2000)

#### **4.6.7 Diagnóstico diferencial**

Peste porcina, mal rojo, disentería, pasteurelosis por los signos digestivos, cutáneos y respiratorios y enteritis proliferante. (Dannenberg, 1975)

#### **4.6.8 Tratamiento**

La administración parenteral de fármacos antibacterianos a lechones agudamente enfermos y la medicación del grupo afectado a través del agua o los alimentos, puede disminuir la gravedad del brote infeccioso. La neomicina, las nitrofurazonas y la lincomicina-espectinomicina son los medicamentos más frecuentemente utilizados en el agua. (MERCK, 2000)

Es importante tener en cuenta la resistencia que *S. choleraesuis* y *S. typhimurium* han desarrollado a muchos de los antibióticos usados en cerdos. La elección del antibiótico debe basarse en la susceptibilidad del agente por medio de un antibiograma, dado que la medicación debe comenzarse antes, debe acudirse a los medicamentos efectivos en ensayos controlados. En ocasiones se aplican

antiinflamatorios a los animales extremadamente enfermos para combatir los efectos de la endotoxina. (Carranza et. al., 2006)

#### **4.6.9 Control y prevención**

El tratamiento exitoso se basa en procedimientos de manejo rutinarios recomendados para el control de enfermedades infecciosas como lo son: la eliminación y aislamiento de animales enfermos; minimizar la exposición al material infeccioso a través de la limpieza y desinfección de las instalaciones; restricción del movimiento de animales (como roedores) o de personas de áreas potencialmente contaminadas hacia áreas limpias; disminución del estrés, cambiando la ejecución de ciertas actividades y factores de manejo y medio ambiental. (Carranza et. al., 2006)

La vacunación preventiva de los lechones en dos aplicaciones a partir de la 5<sup>a</sup> semana de vida y eventualmente de las cerdas en gestación avanzada con vacuna de *Salmonella choleraesuis*, acompañada de todas las medidas higiénicas, permite disminuir sustancialmente la cuantía de animales enfermos y muertos en los siguientes meses de vida. (Dannenberg, 1975)

#### **4.7 Infección por *Clostridium perfringens***

La infección del intestino delgado por cepas del tipo C de *Cl. perfringens* produce una enteritis necrohemorrágica altamente letal. Afecta con mayor frecuencia a lechones de 1 a 5 días de vida, pero puede afectar a lechones de hasta 3 semanas. (MERCK, 2000)

Los *Clostridium* son formadores de esporas. Las formas esporuladas son muy resistentes a numerosos agentes físicos - químicos. *Cl. Perfringens* puede producir diversas toxinas muy potentes. Algunas de éstas (alfa, beta, épsilon, iota)

pueden provocar un daño irreversible en los tejidos animales. Todos los tipos de *Cl. perfringens* producen toxina  $\alpha$ . El tipo C produce también la toxina  $\beta$ . La inactivación de la toxina  $\beta$  por la tripsina contribuye a la aparición de la enfermedad en lechones muy jóvenes debido a la baja actividad de la tripsina en tales animales. (Varley, 1995)

#### **4.7.1 Epidemiología**

Se ha señalado la existencia de enteritis por *Clostridium perfringens* tipo C en muchos países. La compra de cerdas portadoras es la fuente de infección más probable. Pueden suceder brotes en un gran número de granjas y se caracterizan por alta morbilidad y mortalidad. (Varley, 1995)

Los brotes duran normalmente 2 a 3 meses y son autolimitantes. No obstante, en algunas granjas positivas a infecciones, los problemas pueden durar más tiempo y requerir de fuertes medidas de control. En granjas contaminadas, las cerdas excretan el organismo en sus heces y contaminan las parideras. Los organismos esporulados pueden persistir en el ambiente por más de un año. Los lechones se pueden infectar por la ingestión tanto de formas vegetativas como esporuladas. Los lechones recién nacidos se infectan en las primeras 12 a 24 horas de vida. (Varley, 1995)

#### **4.7.2 Características microbiológicas**

Generalmente, las células vegetativas tienen forma de bacilos, ancho y corto con apariencia de ladrillo. Pueden aparecer sueltos, en parejas o en cadenas. Es anaerobio Gram positivo, formador de esporas. Es inmóvil. (Miranda & Rojo, s.f.)

Las colonias son grandes, opacas, tienden a extenderse, sin velo y presentan doble halo de hemólisis. (Miranda & Rojo, s.f.)

### 4.7.3 Patogénesis

En ausencia de adecuada inmunidad calostrál, las bacterias se multiplican activamente y penetran entre las células absorbentes del yeyuno proximal y produce una  $\beta$ -toxina, que es una exotoxina sensible a la tripsina, termolábil y potente, que causa necrosis de todos los componentes estructurales de las vellosidades. La inflamación necrosante normalmente se extiende a las criptas de la mucosa. La infección puede prolongarse distalmente y afectar al íleon y, rara vez, al colon. La mucosa se acompaña de salida de sangre a la pared y luz intestinales. (MERCK, 2000; Varley, 1995)

### 4.7.4 Signos clínicos

*Clostridium perfringens* tipo C provoca una enteritis necrótica mortal en lechones no inmunes de menos de 1 semana de edad. La mortalidad puede acontecer ya a las 12 horas de vida (forma sobreaguda), pero aparece frecuentemente entre los 2 y 3 días de vida (forma aguda). (Varley, 1995)

En la forma sobreaguda, los lechones afectados pueden aparecer muertos sin que se observen signos de diarrea. (Varley, 1995)

La forma aguda de la enfermedad se caracteriza por heces líquidas marrón – rojizas que contienen material necrótico. Los lechones afectados clínicamente mueren por lo general y la tasa de mortalidad en algunas camadas puede ser del 100%. La morbilidad puede variar dependiendo de la granja. Las camadas posteriores de una cerda que ha tenido una camada enferma normalmente no se ven afectadas. (Varley, 1995)

Las características epidemiológicas incluyen: región, granjas, aspectos clínicos, patrón de mortalidad y lesiones macroscópicas. A menudo basta con

éstas para realizar un diagnóstico presuntivo de enteritis por *Cl. perfringens* tipo C. Los casos subagudos o crónicos se pueden confundir con *Cl. perfringens* tipo A, pero el historial de gravedad de la enfermedad son distintos. (Varley, 1995)

#### **4.7.5 Lesiones**

En lechones afectados de forma aguda, el intestino delgado, especialmente el yeyuno, está inflamado y presenta un color rojo púrpura. El contenido intestinal es pastoso, teñido de sangre y contiene materiales necróticos. (Varley, 1995)

En casos más crónicos, la mucosa intestinal se recubre de capas difteroides y su contenido es más acuoso. Los signos clínicos y lesiones son habitualmente muy indicativos. En improntas del contenido intestinal se pueden encontrar numerosos bacilos gram positivos. Los casos menos agudos los animales comienzan a excretar heces líquidas parduscas a los 3 a 5 días. (Varley, 1995)

En cortes histológicos se puede ver descamación de las vellosidades del yeyuno y presencia de numerosos bacilos gram positivos en la base de las criptas. La descamación de las células epiteliales necróticas va seguida de proliferación de los *Clostridium* a lo largo de la membrana basal de las vellosidades dando lugar a necrosis completa de la lámina propia. (Varley, 1995)

#### **4.7.6 Diagnóstico**

Los hallazgos de la necropsia normalmente son suficientes para establecer el diagnóstico en la forma hemorrágica hiperaguda y en la forma aguda con enfisema yeyunal. (MERCK, 2000)

Se puede establecer un diagnóstico presuntivo rápido evidenciando la presencia de bacilos grandes en improntas de mucosa teñidas por el método de

Gram. (MERCK, 2000; Varley, 1995)

Para su confirmación es suficiente la observación histológica de necrosis de las vellosidades con colonización de la mucosa por numerosos bacilos gram positivos grandes. Las formas subaguda y crónica de la enfermedad en lechones de 6 a 14 días de vida se confunden fácilmente en la necropsia con la enteritis producida por *Isospora suis*, pero el diagnóstico normalmente se puede establecer mediante el examen histopatológico de yeyuno e íleon o por la observación de clostridios en el frotis de mucosa teñidos por Gram o Giemsa. (MERCK, 2000)

Las pruebas de ELISA pueden confirmar la presencia de toxina  $\beta$  en el contenido intestinal o en filtrados de cultivo. No obstante, tal determinación no se realiza como rutina. (Varley, 1995)

#### **4.7.7 Tratamiento y prevención**

El tratamiento de los lechones con signos clínicos es de poca utilidad, porque cuando comienza la diarrea las lesiones ya son normalmente irreversibles. La administración preventiva por vía intramuscular poco después del nacimiento de antisuero de cordero frente a la disentería (debida a *Cl. perfringens* tipo B) puede proporcionar protección. Sin embargo, dicho tratamiento es probablemente demasiado caro como para que resulte rentable. (Varley, 1995)

En un brote agudo, la administración profiláctica de antitoxina tipo C o antibióticos (o combinación de ambos) parenterales u orales, confiere protección si se efectúa en las dos primeras horas de vida de los lechones. (MERCK, 2000)

En granjas endémicas afectadas, la vacunación de cerdas nulíparas y adultas gestantes con toxoide de *Cl. perfringens* tipo C aplicada 6 y 2 semanas antes del parto parece ser una medida de control eficaz. La vacunación confiere

una cierta inmunidad lactogénica pasiva a la futura camada, siempre que los lechones consuman el calostro poco después de nacer. Una vez inmunizadas con dos dosis de toxoide bacteriano, las cerdas deben recibir una dosis 3 semanas antes de cada uno de los siguientes partos. (MERCK, 2000; Varley, 1995)

#### **4.8 Resistencia a los medicamentos antimicrobianos**

La extrema versatilidad y adaptabilidad de los microorganismos han impedido que la eficacia de las quimioterapias bacterianas sea total; muchas bacterias han ido desarrollando en los últimos años mecanismos que las protegen contra diversos fármacos. (Sumano, 2007)

Incluso Paul Ehrlich, al introducir por primera vez la quimioterapia contra protozoarios, se dio cuenta que algunas cepas desarrollaban resistencia al fármaco durante el transcurso del tratamiento. (Sumano, 2007)

La presión selectiva que causa la aplicación de antibacterianos ha propiciado una verdadera supervivencia darwiniana de los más aptos, favoreciendo la diseminación de aquellas cepas microbianas con mecanismos de resistencia que en muchas ocasiones dificultan el adecuado tratamiento clínico. (Sumano, 2007)

Cada antibiótico se caracteriza por un espectro natural de actividad antibacteriana. Este espectro comprende las especies bacterianas que en su estado natural se ven inhibidas en su proliferación por concentraciones de antibióticos a los cuales son susceptibles. A estas especies bacterianas se les denomina sensibles a dicho antibiótico. Las especies bacterianas que no se encuentran incluidas dentro de dicho espectro se denominan naturalmente resistentes. (Sumano, 2007)

El antibiótico no crea resistencia, sino que selecciona las bacterias resisten-

tes eliminando las sensibles. A esto se le conoce como presión de selección. El aumento de la frecuencia de aparición de cepas resistentes casi siempre va unido al uso intensivo del antibiótico específico. Existen muchos mecanismos diferentes, mediante los cuales los microorganismos podrían exhibir resistencia a los medicamentos. Los cuales ya están bien comprobados: (Brooks, 2002; Sumano, 2007)

#### **4.8.1 Resistencia natural o intrínseca**

Es la consecuencia de la estructura y la fisiología natural de la especie, y está codificada en el cromosoma de todas las cepas. Los mecanismos de resistencia natural pueden producirse por impermeabilidad al antibiótico, eflujo o presencia de enzimas inactivantes. La membrana externa de los gramnegativos supone una barrera natural, que hace que muchas bacterias de este grupo sean insensibles a varios antibióticos. (Stanchi, 2007; Sumano, 2007)

#### **4.8.2 Mutación**

Es la derivada de mutaciones espontáneas en la información contenida en el cromosoma (por alteración de la secuencia natural de nucleótidos en el ADN). Las mutaciones pueden ocurrir en genes preexistentes en las células o en genes adquiridos. (Stanchi, 2007; Sumano, 2007)

#### **4.8.3 Adquirida**

Es la adquisición de un carácter de la resistencia previamente ausente en la bacteria. Las resistencias adquiridas son evolutivas y su frecuencia depende a menudo de la utilización de los antibióticos. (Stanchi, 2007; Sumano, 2007)

#### **4.8.4 Resistencia asociada**

Es cuando afecta a varios antibióticos de las familias diferentes. En general, se debe a la asociación de varios mecanismos de resistencia (p. ej., la resistencia de los estafilococos a la oxacilina que va frecuentemente asociada a quinolonas, aminoglucósidos, macrólidos y ciclinas). (Sumano, 2007)

#### **4.8.5 Resistencia cruzada**

Los microorganismos resistentes a cierto medicamento pueden serlo también a otros medicamentos que compartan algún mecanismo de acción (p. ej., la resistencia a la oxacilina en los estafilococos, que se cruza con todos los betalactámicos). Esta relación existe principalmente entre agentes con estructuras químicas análogas o que tiene un modo semejante de fijación o de acción. En algunas clases de medicamentos, el núcleo activo de la sustancia química es tan semejante entre muchos congéneres, que es de esperarse una resistencia cruzada completa. En ciertos casos, puede afectar antibióticos de familias diferentes (p. ej., la resistencia por impermeabilidad a las ciclinas se cruza con la resistencia a cloranfenicol y a trimetoprim). (Brooks, 2002; Sumano, 2007)

#### **4.8.6 Origen genético**

La mayor parte de los microorganismos resistentes a medicamentos surgen a consecuencia de cambios genéticos y de los procesos subsiguientes de selección por los medicamentos antimicrobianos. (Brooks, 2002)

La transferencia del material genético responsable de la resistencia, puede ocurrir por conjugación, transducción y transformación, procesos básicos de transferencia de genes entre bacterias. (Stanchi, 2007; Sumano, 2007)

Los elementos genéticos que participan en la transferencia de genes de resistencia son los plásmidos, los trasposones, ADN de bacteriófagos y recientemente los integrones y casetes genéticos de resistencia. (Stanchi, 2007; Sumano, 2007)

#### **4.8.6.1 Transducción**

El plásmido de ADN es encerrado en un bacteriófago y transferido por el virus a otra bacteria de la misma especie. El plásmido que porta el gen para la producción de  $\beta$ -lactamasa puede transferirse de un estafilococo resistente a la penicilina a otro que sea sensible al medicamento, si es transmitido por algún bacteriófago adecuado. Una transducción semejante ocurre en las salmonelas. Este mecanismo de transferencia de ADN es un poco importante en la diseminación de resistencia, debido a la especificidad de los bacteriófagos. (Brooks, 2002; Stanchi, 2007)

#### **4.8.6.2 Transformación**

El ADN desnudo pasa de una célula de una especie a otra célula, alterando, por lo tanto, su genotipo. Las células deben ser competentes para poder incorporar el ADN, clivarlo y recombinarlo. En general se produce entre géneros muy relacionados, debido a la necesidad de una alta homología de secuencias de nucleótidos para que ocurra la recombinación. Se presenta principalmente en los géneros *Streptococcus spp* y *Neisseria spp*. Esto puede ocurrir a través de la manipulación del laboratorio o tal vez espontáneamente. (Brooks, 2002; Stanchi, 2007)

#### **4.8.6.3 Conjugación**

Ocurre una transferencia unilateral de material entre las bacterias del mismo

género o de diferente, durante el proceso de conjugación. Esta transferencia es medida por un factor de fertilidad que resulta en la extensión de los pelos sexuales de la célula donadora al receptor. El plásmido o algún otro ADN es transferido a través de estos túbulos de proteína del donador al receptor. Una serie de genes estrechamente ligados, determina cada uno la resistencia a un medicamento, pudiendo entonces transferirse de una bacteria resistente a una sensible. Este es el método más común por el cual se propaga la resistencia a múltiples medicamentos entre los diferentes géneros de bacterias gramnegativas. La transferencia de plásmidos resistentes también puede producirse entre algunos grampositivos. (Brooks, 2002; Stanchi, 2007)

#### **4.8.6.5 Transposición**

La transferencia de secuencias cortas de ADN ocurre entre un plásmido y otro, o entre un plásmido y una porción del cromosoma bacteriano dentro de alguna célula bacteriana. (Brooks, 2002)

#### **4.8.7 Elementos que participan en la transferencia de genes de resistencia**

##### **4.8.7.1 Plásmidos**

Son ADN circulares extracromosómicos y: 1) se automultiplican; 2) son heredables; 3) pueden tener otras funciones: factores de virulencia, cambios metabólicos; resistencia a metales pesados; 4) pueden estar presentes en bacteria filogenéticamente distintas. (Brooks, 2002; Stanchi, 2007)

##### **4.8.7.2 Transposones**

Son secuencias cortas de ADN, conocidas como “genes saltarines”. Pasan de un plásmido a otro, de un plásmido al cromosoma o viceversa. (Stanchi, 2007)

La propiedad de todos los elementos transportables en la capacidad de moverse e integrarse dentro de secuencias del ADN extraño, mediante una recombinación no homóloga. Este tipo de recombinación determina que el mismo transposón pueda estar en plásmidos o cromosomas de bacterias no emparentadas, con genes de antibiotorresistencia idénticos. (Brooks, 2002; Stanchi, 2007)

La mayor parte de los transposones están contenidos en plásmidos, los que pueden ser pasados entre especies bacterianas, con una rápida diseminación de resistencia. (Stanchi, 2007)

#### **4.8.7.3 Integrones**

Son una familia de elementos genéticos móviles, capaces de integrar y expresar genes de resistencia a antibióticos. (Stanchi, 2007)

Los integrones no pueden realizar autotransposición, pero se asocian a plásmidos y transposones que median como vehículos, para su transmisión intra o interespecie. (Stanchi, 2007)

Los casetes genéticos contienen un gen de antibiotorresistencia y un sitio de recombinación específico. Las integrasas catalizan la integración o ecisión del casete de resistencia en el sitio específico del integrón. (Stanchi, 2007)

En el integrón, existen dos promotores: uno transcribe la integrasa y otro, dirige la transcripción de los casetes genéticos integrados. Hasta el momento no se han encontrado casetes con promotores propios. (Stanchi, 2007)

Los casetes genéticos codifican resistencia para antibióticos  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos, sulfas, eritromicina, tetraciclinas, y rifampicina. (Stanchi, 2007)

Los mecanismos de resistencia bacteriana para cada grupo de antimicrobianos se describen a continuación, junto con los mecanismos básicos de acción. (Stanchi, 2007)

Lo que logran las bacterias con los mecanismos antes expuestos es:

- Producen enzimas que destruyen el medicamento. Los estafilococos resistentes a la penicilina G producen una beta lactamasa que destruye el medicamento. Los bacilos gramnegativos producen otras  $\beta$ -lactamasas. Las bacterias gramnegativas resistentes a los aminoglucósidos (debido a los plásmidos) producen enzimas adenilantes, fosforilantes o acetilantes que destruyen el medicamento. Las bacterias gramnegativas pueden ser resistentes al cloranfenicol si producen una cloramfenicolacetiltransferasa. (Jawetz, 1990; Sumano, 2007)
- Cambian su permeabilidad al medicamento. La resistencia a las polimixinas está asociada también con un cambio en la permeabilidad a estos medicamentos; los estreptococos tienen una permeabilidad que funciona como barrera natural contra los aminoglucósidos. Esta puede superarse en parte por la presencia simultánea de algún medicamento activo contra la pared celular; por ejemplo, la penicilina. La resistencia a la amikacina y a algunos otros aminoglucósidos puede depender de la falta de permeabilidad a los medicamentos, al parecer debido a un cambio en la membrana externa que altera el transporte activo al interior de la célula. (Brooks, 2002; Sumano, 2007)

- Desarrollan un blanco estructural alterado para el medicamento. La resistencia a los aminoglucósidos está asociada con la pérdida o alteración de alguna proteína específica sobre la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, el cual sirve como sitio eslabonante en microorganismos sensibles. Los microorganismos resistentes a la eritromicina tienen un receptor alterado sobre la unidad 50S del ribosoma receptor resultante de la metilación de un ARN ribosómico 23S. La resistencia a algunas penicilinas y cefalosporinas puede depender de la pérdida o alteración de las PBP. (Brooks, 2002; Sumano, 2007)
- Desarrollan una vía metabólica alterada que funciona como atajo (derivación) de la reacción la cual es inhibida por el medicamento. Algunas bacterias resistentes a las sulfonamidas no requieren PABA extracelular, sino que, a semejanza de las células de los mamíferos, pueden utilizar el ácido fólico preformado. (Brooks, 2002; Sumano, 2007)
- Desarrollan una enzima alterada que todavía puede ejecutar su función metabólica, pero que es afectada mucho menos por el medicamento que la misma enzima en un microorganismo sensible. En algunas bacterias sensibles a las sulfonamidas, la tetrahidropteroicosintetasa tiene una mayor afinidad para las sulfonamidas que para el PABA. En las mutantes resistentes a las sulfonamidas sucede lo opuesto. En bacterias resistentes al trimetoprim, la ácido dihidrofólico reductasa se inhibe, con mucha menor eficiencia que en bacterias susceptibles a trimetoprim. (Brooks, 2002; Sumano, 2007)

#### **4.8.8 Limitación**

La emergencia de la resistencia a los medicamentos en las infecciones puede reducirse al máximo en las formas siguientes:

- Manteniendo cifras suficientemente elevadas del medicamento en los tejidos para inhibir la población original y a los mutantes iniciales
- Administrar simultáneamente 2 medicamentos que no tengan resistencia cruzada, cada uno de los cuales retardará la emergencia de mutantes resistentes al otro medicamento, y;
- Evitar la exposición de microorganismos a algún medicamento particularmente valioso, restringiendo su uso sobre todo en los alimentos para animales. (Brooks, 2002)

#### **4.8.9 Implicaciones clínicas de la resistencia a los medicamentos**

##### **4.8.9.1 Bacterias entéricas gramnegativas**

La mayor parte de la resistencia a medicamentos de las bacterias entéricas se puede atribuir a la extensa transmisión de plásmidos de resistencia entre los diferentes géneros. (Brooks, 2002)

Más o menos la mitad de las cepas de la especie *Shigella* en muchas partes del mundo, son ahora resistentes a varios medicamentos. (Brooks, 2002)

Las salmonelas transportadas por animales han desarrollado resistencia, en particular a medicamentos incorporados en los alimentos para el ganado y las aves de corral, práctica que originó un desarrollo más rápido en los animales, pero que se acompañó de un incremento en los microorganismo entéricos resistentes a medicamentos en la flora fecal de los trabajadores de las granjas. (Brooks, 2002)

Los plásmidos portadores de genes de resistencia a medicamentos existen en numerosas bacterias gramnegativas de la flora intestinal normal. El uso abundante de antimicrobianos origina la supresión de los microorganismos sensibles a los medicamentos en la flora intestinal y favorece la persistencia y

crecimiento de bacterias resistentes, incluyendo a *Enterobacter*, *Klebsiela*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Serratia* y hongos. Estos microorganismos representan problemas particularmente difíciles en los pacientes inmunodependientes. (Brooks, 2002)

#### **4.9 Resistencia antimicrobiana en la producción porcina**

La resistencia de las bacterias ante los antimicrobianos ha sido estudiada con mucha especificidad, que para poder ser entendidos por el uso desmedido que se les han dado. Para poder comprender los cambios, se han recurrido a análisis de los códigos genéticos y determinar donde se dio la mutación de la bacteria.

Bischoff (2002) en su estudio de “Caracterización de la resistencia del Cloranfenicol en *Escherichia coli* beta-hemolítica asociada con diarrea en cerdos neonatales” donde tomó muestras de lechones con diarrea de múltiples granjas en la ciudad de Oklahoma entre los años 1998 y 1999. Los resultados demostraron que un 73 por ciento de los aislamientos de *E. coli* fueron resistentes a cinco o más antibióticos. Entre estos se determinó que la resistencia para cloranfenicol fue de un 53 por ciento.

Maynard (2003) estudió la resistencia antibacteriana en los genes de *Escherichia coli* O149:K91 enterotoxigénica aislada de cerdos, por un periodo de 23 años. Logró determinar que un 60 por ciento de los aislamientos poseían un integrón clase 1, demostrando la importancia de los integrones en la epidemiología de la resistencia antibacteriana en cepas de *E. coli* de cerdos. 35% de los aislamientos fueron resistentes a neomicina y 38% fueron resistentes a kanamicina. Llegaron a la conclusión que el aumento del uso de gentamicina o sulfametoxazol-trimetoprim en la producción porcina pudo haber generado resistencia cruzada al cloranfenicol.

Mathew (1999) analizó la resistencia antibacteriana de *Escherichia coli* en diferentes granjas de cerdos. Para ello las clasificó en dos grupos, Granjas de bajo uso de antibióticos, siendo estas aquellas que no usaban antibióticos en los alimentos en dosis subterapéuticas. Y granjas de alto uso de antibióticos, en las que el uso de antibióticos en los alimentos eran en dosis subterapéuticas o inyectados. Los resultados demostraron que las granjas que tenían bajo uso de los antibióticos, los aislamientos microbianos tuvieron una resistencia antibacteriana menor que los de las granjas de alto uso de antibióticos. Ningún cultivo de *E. coli* de granjas de bajo uso de antibióticos demostró resistencia a apramicina. Se estableció que el incremento del uso de antibióticos se da en cerdos destetados, donde también hay un incremento de la colonización de patógenos, en tal caso la resistencia ocurre más comúnmente que los microorganismos comensales.

#### **4.10 Métodos de detección de resistencia antibiótica**

Los métodos de susceptibilidad antimicrobiana o antibiogramas son métodos *in vitro* que determinan las susceptibilidades de los microorganismos a una variedad de agentes antimicrobianos, bajo condiciones de laboratorio específicas y estandarizadas. La meta principal por la que se realiza es proveer al clínico algunas recomendaciones sobre la terapia que puede ser más apropiada en pacientes con una infección específica. Aunque no haya una correlación exacta entre los resultados *in vitro* y la respuesta clínica es muchas veces difícil de predecir, ya que muchos factores influyen en la interacción de agentes antimicrobianos y microorganismos en un determinado paciente. (Castro, 2009)

##### **4.10.1 Dilución en agar**

Es considerado el método de referencia. En este método, se trabaja incubando una bacteria en una placa de agar Müeller-Hinton, inmediatamente se coloca una serie de discos estandarizados conteniendo una determinada

concentración de un antibiótico, donde son inoculados con los microorganismos en estudio y luego incubadas por 16 a 18 horas. Después de la incubación, se examina si el organismo crece o no en cada una de las placas, alrededor del disco o taxo de antibiótico, con lo cual se determina la concentración mínima inhibitoria (CIM) para el antibiótico. (Castro, 2009)

#### **4.10.2 Dilución en caldo**

En este caso, tubos (macrodilución) o microplacas (microdilución) contienen concentraciones crecientes de un determinado antibiótico. El microorganismo en estudio es inoculado en los diferentes tubos o pocillos de la microplaca y la CIM es determinada después de la incubación, de la misma forma como se realiza en el método de dilución en agar. (Castro, 2009)

#### **4.10.3 Determinación de la CIM por la técnica de microdilución en placa**

La CIM es la mínima concentración del agente antimicrobiano que inhibe la multiplicación y producción de un crecimiento visible de una cepa bacteriana dada en el sistema de prueba. Se determina la concentración en el laboratorio incubando una cantidad conocida de bacterias con diluciones definidas del agente antimicrobiano. Las pruebas de la CIM pueden ser realizadas usando como medios de cultivo en caldo o agar, pero la microdilución en caldo es el método más utilizado en los laboratorios clínicos. (Castro, 2009)

#### **4.10.4 Factores que afectan la actividad antimicrobiana**

Entre los diversos factores que pueden afectar la actividad antimicrobiana in vitro, deben considerarse los siguientes, ya que influyen significativamente en el resultado de las pruebas. (Jawetz, 1990)

#### **4.10.4.1 pH del medio**

Algunos medicamentos son más activos a pH ácido; otros a pH alcalino (aminoglucósidos, sulfonamidas). (Jawetz, 1990)

#### **4.10.4.2 Componentes del medio**

El sulfonato de polianetol sódico y otros detergentes aniónicos inhiben a los aminoglucósidos notoriamente. PABA en extractos tisulares antagoniza a las sulfonamidas. Las proteínas séricas fijan a las penicilinas en grado variable. (Jawetz, 1990)

#### **4.10.4.3 Estabilidad de los medicamentos**

A la temperatura de la incubadora varios agentes antimicrobianos pierden su actividad. La penicilina se inactiva lentamente mientras que los aminoglucósidos son bastante estables por largos periodos. (Jawetz, 1990)

#### **4.10.4.4 Tamaño del inóculo**

En general, cuanto más grande sea el inóculo bacteriano, más baja será la sensibilidad aparente del microorganismo. Las grandes poblaciones bacterianas se inhiben en forma menos rápida y completa que las pequeñas; además, es posible que una mutante resistente surja en grandes poblaciones. (Jawetz, 1990)

#### **4.10.4.5 Duración de la incubación**

En muchos casos los microorganismos no mueren cuando se exponen un tiempo corto a los agentes antimicrobianos, sino que solamente se inhibe su multiplicación. Cuanto más tiempo se prolonga la incubación, mayor es la

oportunidad que tienen de presentarse los mutantes resistentes o mayor es la oportunidad de los miembros menos sensibles de la población bacteriana de empezar a multiplicarse tan pronto como el medicamento se descompone. (Jawetz, 1990)

#### **4.10.4.6 Actividad metabólica de los microorganismos**

En general, los microorganismos que crecen rápida y activamente son más sensibles a la acción de los medicamentos que aquéllos que se encuentran en la fase de reposo. Las bacterias persistentes son aquellas metabólicamente inactivas, las cuales sobreviven a exposiciones largas a los medicamentos, pero cuya descendencia es completamente susceptible al mismo medicamento. Una forma especializada de microorganismos persistentes pueden ser las formas L de las bacterias. Bajo el tratamiento con ciertos medicamentos inhiben la formación de la pared celular, las formas deficientes en la misma pueden desarrollarse en algunos tejidos que poseen propiedades osmóticas adecuadas. (Jawetz, 1990)

### **4.11 Orégano**

*Lippia graveolens HBK*

#### **4.11.1 Sinónimos**

*Lantana organoides, L. berlandieri, Gniostachyum graveolens.*

#### **4.11.2 Nombres populares**

Mejorana, Orégano de monte, Orégano mexicano

#### **4.11.3 Descripción botánica**

La especie *Lippia graveolens* HBK, denominado comúnmente como orégano mexicano pertenece a la familia Verbenaceae.

*L. graveolens* es un arbusto delgado hasta 2 metros de alto, ramas con pubescencia cortamente pilosa. Hojas en peciolo 5 – 10 mm de largo, oblongas a elípticas, 2 – 4 cm de largo, obtusas o redondas en el ápice, subcordadas a la base, densamente pilosas, suaves al tacto, densamente tomentosas. Flores subglobosas a oblongas, 4 – 12 mm de largo, brácteas ovado-lanceoladas, agudas; cáliz 1 – 2 mm de largo, glandular; corola blanca, 3 – 6 mm de largo. (Cáceres, 1996)

#### **4.11.4 Hábitat**

*L. graveolens* es nativa del sur de Texas a Nicaragua, se encuentra en bosques secos y montes espinosos subtropicales, en pendientes pedregosas muy secas, en matorrales húmedos o secos y planicies hasta 350 msnm. En Guatemala se ha descrito en El Progreso, Petén y Zacapa. (Cáceres, 1996)

#### **4.11.5 Historia**

Con el nombre de Orégano se conocen más de 53 plantas de diferentes especies e incluso familias, que por sus aceites esenciales de aromas parecidos han sido usados indistintamente. Es usado con fines culinarios y medicinales desde los tiempos de griegos y romanos; Plinio recomendaba las cataplasmas para tratar picaduras de escorpiones, Dioscorórides en el siglo I y Gerard en el siglo XVI describen varias especies de oréganos medicinales. (Cáceres, 1996)

#### **4.11.6 Agricultura**

*L. graveolens* es principalmente recolectada en sus lugares de crecimiento silvestre, se recomienda su manejo y siembra comercial para garantizar su aprovisionamiento sostenido. Se propaga por semilla o estacas de madera suave. Las hojas se colectan en plena floración y se secan a la sombra. (Cáceres, 1996)

#### **4.11.7 Usos medicinales atribuidos**

La decocción o infusión de hojas se usa para tratar anemia, afecciones gastrointestinales (amebiasis, cólico, diarrea, disentería, dispepsia, estreñimiento, indigestión) y respiratorias (asma, bronquitis, catarro, influenza, laringitis, pleuresía, resfrío, tos, tuberculosis. Un jarabe de hojas secas se usa para tratar diabetes, disentería, catarro y resfríos. (Cáceres, 1996)

Se le atribuye propiedad antioxidante, antiséptica, aromática, calmante, carminativa, cicatrizante, desinflamante, digestiva, emenagoga, espasmolítico, estimulante, estomáquica, y expectorante. (Cáceres, 1996; Luna, 1994)

#### **4.11.8 Infusión**

Es la forma de preparación más frecuente y sencilla, también llamado apagado o té, forma parte de una cultura de consumo de hierbas aromáticas que se usan no sólo con fines medicinales. Consiste en dejar en contacto por algunos minutos a la parte medicinal de la planta con agua hirviendo. Por no usar calor directo garantiza que sus partes no sufran deterioro. Se utiliza para hacer preparaciones de las partes suaves como flores y hojas. (Cáceres, 1996; Luna, 1994)

#### 4.11.9 Fitoquímica

El tamizaje fitoquímico de hojas de *L. graveolens* contiene: aceite esencial (1.8%), glicósidos saponínicos, taninos y terpenos, celulosa, pigmento y elementos minerales; la corteza y raíz contienen glicósidos saponínicos, aceite esencial y taninos. Las hojas contienen además flavononas (pinocembrina, naringenina) y lapachenol. (Cáceres, 1996)

Los aceites esenciales de especies de *Lippia* contienen limoneno,  $\beta$ -cariofileno,  $p$ -cimeno, canfor, linalol,  $\alpha$ -pineno, y timol, los cuales pueden variar de acuerdo al quimiotipo. (Arcila et. al., 2004)

Los aceites esenciales son metabolitos secundarios de las plantas por lo que un metabolismo más activo puede asociarse con una mayor producción de aceites. En los aceites esenciales se pueden encontrar hidrocarburos alicíclicos y aromáticos, así como sus derivados oxigenados, sustancias azufradas y nitrogenadas. Los compuestos más frecuentes se derivan del ácido mevalónico y se les clasifica en monoterpenoides y sesquiterpenoides. (Arcila et. al., 2004)

Las variaciones que se pueden encontrar en las composiciones químicas de los aceites esenciales es debida a diversos factores, tales como el medio ambiente, estación del año en la que se realizó el corte y a la cantidad de agua usada en el riego, o bien a la cantidad de luz artificial o natural usada en el cultivo de la planta en el invernadero. (Arcila et. al., 2004; Arana et. al., 2010)

Los métodos convencionales que se han utilizado para la extracción de aceites esenciales son la destilación con arrastre de vapor y el uso de solventes orgánicos. Se han logrado identificar 56 compuestos, y se han encontrado diferencias cuantitativamente significativas en sólo dos fenoles isoméricos, carvacrol (0.1 – 56.6%) o fenol no cristalizabile y timol (7.9 – 53.6 %) o fenol

cristalizable; incluyendo sus precursores biosintéticos el  $\gamma$ -terpineno y el  $p$ -cimeno. (Arcila et. al, 2004)

#### **4.11.10 Principios activos**

El principio activo del efecto antibiótico del Orégano es el aceite esencial, del cual sus componentes más importantes son el Carvacrol y Timol. (Lambert et. al., 2001)

El Timol y Carvacrol tienen la capacidad de destruir la estructura de la membrana celular, causando el incremento de su permeabilidad y por consiguiente la salida de iones inorgánicos, ATP, ácidos nucleicos y aminoácidos, liberando lipopolisacáricos entre otros. (Chávez et. al., 2008; Hernández et. al., 2009; Oliveira et. al., 2007)

Los aceites esenciales pueden coagular el citoplasma. Daños en la pared celular y la membrana puede dar lugar a la filtración de macromoléculas y la lisis de la bacteria. (Hernández et. al., 2009)

#### **4.11.11 Etnofarmacología**

En la literatura médica son abundantes los estudios farmacológicos que se han realizado con las diferentes plantas de orégano, entre las que se encuentran la actividad antibacteriana de las hojas de extractos acuosos, etanólicos, e hidroalcohólicos frente a *Salmonella enteritidis* como lo demostró Govaris *et al* (2010) al comparar el efecto antibiótico de los aceites esenciales versus nisina y combinaciones de nisina con aceites esenciales de orégano, en carnes picadas de oveja. Concluyendo en que los tratamientos combinando los aceites esenciales al 0.6% con nisina a una concentración de 500 UI/g son efectivos contra *Salmonella Enteritidis*.

En otros estudios la tintura de hojas de *L. graveolens* demostraron que es activa contra *E. coli*, *P. aureginosa*, *S. typhi*, *S. choleraesuis*, *S. flexneri*, *S. aureus*, *S. pneumoniae* y *S. pyogenes*, pero inactiva contra *H. influenzae*; La infusión de hojas demostró actividad contra los mismos organismos. La CIM del extracto diclorometánico contra bacterias es de 10 mg/ml y del etanol es de 1.75 mg/ml (Albado et. al., 2001; Cáceres, 1996; Hernández, et. al. 2009)

Chávez *et al* (2008) evaluó el efecto de los aceites esenciales de orégano Carvacrol y Timol en cultivos de *Escherichia coli* en comparación con tratamientos con Gentamicina. Demostró en sus resultados una actividad antimicrobiana significativa al comparar el halo de inhibición de crecimiento del extracto de orégano al 75% fue mayor al halo de inhibición de crecimiento producido por la Gentamicina en los cultivos de *Escherichia coli*. (Chávez, 2008)

Michiels *et al* (2009) analizó la actividad antimicrobiana *in vitro* de algunos componentes del aceite esencial y combinaciones en contra de la flora intestinal del cerdo. Para el experimento utilizó los aceites Carvacrol, Timol, Tugenol y trans-Cinámico y un modelo *in vitro* de incubación simulando la flora y la fermentación en diferentes secciones del tracto gastrointestinal del cerdo. Los resultados que encontraron en la simulación gástrica, fueron que el Timol tuvo la mayor actividad antibacteriana mostrando una significativa disminución de la población total de bacterias anaerobias y coliformes a una concentración de 100 a 500 mg /L; el Carvacrol significativamente mostro actividad antibacteriana a una concentración de 500 mg/L. En la simulación del Yeyuno se reveló que el Carvacrol y Timol tienen una fuerte actividad antimicrobiana a una concentración de 1000 mg/L, reduciendo el número de Estreptococos y Lactobacilos significativamente. La simulación cecal demostró tener reducciones significativas de las bacterias al tratamiento con una concentración de 1000 mg/L. (Michiels, 2009)

Chávez (2010) evaluó la actividad antibacteriana y antimicótica de seis plan-

tas medicinales guatemaltecas, donde demostró la actividad de *L. graveolens* contra las cepas de *Staphylococcus intermedius*, *Streptococcus sp* y *Proteus mirabilis*, a una concentración de 250 µg/ml pero no contra *Pseudomona aeruginosa*. En cuanto a la actividad antimicótica presentó actividad contra los hongos *Microsporum canis* a concentración de 30 µg/ml, *Microsporum gypseum* a concentración de 125 µg/ml, y *Tricophyton mentagrophytes* a concentración de 60 µg/ml. (Chávez, 2010)

Otros estudios antimicóticos demuestran que los extractos con diclorometano y etanol son activos contra *C. albicans*, *A. flavus*, *E. floccosum*, *M. gypseum* y *T. rubrum*. (Cáceres, 1996)

#### **4.11.12 Indicaciones terapéuticas**

Por su acción antiséptica digestiva y expectorante está indicado su uso por vía oral en el tratamiento de inapetencia, digestión lenta, meteorismo, tos, faringitis, sinusitis, bronquitis y amenorrea. Se recomienda administrar tres veces al día en dosis de 2 a 4 gramos en infusión, 1 – 3 ml de extracto fluido, 4 – 6 gotas de esencia 1- 2 cápsulas de 50 mg, y 0.1 a 0.4 gramos en supositorios. Por su acción antiséptica puede combinarse con eucalipto, nance, tomillo y zarzaparrilla; por su acción digestiva con el anís, hierbabuena, manzanilla y pericón. (Cáceres, 1996)

Tópicamente se aplican inhalaciones húmedas y aerosoles para tratar afecciones respiratorias. Por sus propiedades antisépticas y cicatrizantes la infusión y esencia en linimento y pomadas están indicadas para tratar heridas, tinea y dolores reumáticos; el cataplasma se aplica en los abscesos varias veces al día. (Cáceres, 1996; Morataya, 2006)

En baños se usa para aliviar el prurito y la sarna y como calmante; el cata-

plasma para madurar abscesos, calmar neuralgias, cáncer y tumores y se aplica para la cicatrización de heridas. (Morataya, 2006)

El aceite esencial de Orégano está contraindicado durante la gestación, padecimientos con gastritis, colitis y úlcera péptica. Su administración durante el embarazo puede producir aborto. Cabe mencionar, que existen escasos estudios en los que se reporte el uso de infusiones de las hojas y tallos de esta planta. (Cáceres, 1996)

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Materiales

#### 5.1.1 Material microbiológico

Cepas bacterianas aisladas en casos de lechones con enteritis:

- *Escherichia coli*
- *Clostridium sp.*
- *Salmonella sp.*

#### 5.1.2 Material vegetal

- Infusión de hojas y tallos deshidratadas de Orégano (*Lippia graveolens*, HBK)

#### 5.1.3 Materiales de laboratorio

- Asa bacteriológica
- Cajas de Petri descartables.
- Cajas de Petri cuadrilate
- Cristalería (probetas, beakers, erlenmeyers, tubos de ensayo)
- Papel filtro.
- Guantes.
- Gasas estériles
- Micropipetas automáticas unicanal.
- Puntas amarillas de 200  $\mu$ L.
- Puntas azules de 1000  $\mu$ L.
- Plantilla para siembra.

- Disolventes: agua desmineralizada.

#### **5.1.4 Medios de cultivo**

- Agar MacConkey.
- Agar Sangre.
- Agar Müeller-Hinton.
- Caldo Trypticosa soya.

#### **5.1.5 Equipo de laboratorio**

- Autoclave.
- Incubadora a 36 y 37 °C.
- Campana con flujo laminar.
- Nefelometro
- Balanza analítica.
- Mechero.
- Gradillas.
- Colador metálico estéril
- Pipetas automáticas.
- Refrigeradora.
- Asas de aislamiento.
- Cámara fotográfica.
- Útiles de oficina (lápiz, lapicero, computadora, impresora, hojas, tinta, marcador permanente)

#### **5.1.6 Área de trabajo**

- Laboratorio de Microbiología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zoo-

tecnia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

- Laboratorio de Bioensayos, Departamento de Citohistología, Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

### **5.1.7 Recursos humanos**

- Estudiante Investigador.
- Asesores para el análisis del caso.
- Personal de Laboratorio.

## **5.2 Metodología**

### **5.2.1 Diseño del estudio**

Estudio preclínico para evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de la infusión de hojas de orégano (*Lippia graveolens*, HBK) sobre las principales bacterias aisladas de enteritis en lechones.

### **5.2.2 Obtención de las bacterias**

- Las cepas bacterianas fueron referidas del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia aisladas a partir de casos reportados de lechones con enteritis.

### **5.2.3 Selección del antibiótico**

Se determinó la relación dosis efecto de antibióticos, para lo cual se realizó un antibiograma de cada cepa para determinar qué antibiótico se iba a utilizar

como control positivo. Por presentar mayor susceptibilidad, se eligió Enrofloxacina al 5% para *Salmonella sp.* y *E. coli*, y Amoxicilina con Ácido Clavulánico para *Clostridium sp.*

#### 5.2.4 Selección de la planta

La selección de la planta que se utilizó se hizo con base a:

- Que sea nativa de Guatemala.
- Su amplia distribución en el país.
- La actividad antimicrobiana comprobada en estudios realizados en cultivos bacterianos de enfermedades entéricas en medicina humana.

##### 5.2.4.1 Obtención del material vegetal

- El material vegetal se obtuvo del Laboratorio de Productos Naturales, FARMAYA, S. A. en donde se encuentra la muestra de referencia del herbario institucional.

**Cuadro No. 1. Nombre científico, nombre común, número de herbario y procedencia de la planta**

<b>Nombre Científico</b>	<b>Nombre común</b>	<b>No. de herbario</b>	<b>Procedencia</b>
<i>Lippia graveolens HBK</i>	Orégano	604	San José Calderas, Chimaltenango

Fuente: (Chávez, 2010)

##### 5.2.4.2 Preparación de la infusión

Se puso a calentar 150 ml de agua destilada hasta que hirvió, luego se

apagó el fuego. De ella se midieron 100 ml y se le agregaron 15 gramos de material deshidratado de hojas y tallos de Orégano (Figura 1). Se dejó reposar durante 10 minutos para que el Orégano liberara sus compuestos. Se esperó que estuviera tibio y se filtró la infusión para eliminar sólidos.

### **5.2.5 Preparación del agar planta**

Se tomó como base el método de dilución de Mitscher et. al., mezclando al Agar Müeller Hinton el extracto de Orégano de la siguiente manera:

Se prepararon tubos de ensayo estériles con 13.5 ml de agar Müeller-Hinton en forma líquida con 1.5 ml de infusión de hoja de Orégano (*Lippia graveolens*, HBK), para obtener una concentración de 15 mg/ml (1.5 %). Se homogenizó y se vertió en cajas de Petri estériles (Figuras 2 y 3); se incubaron a 36 °C por 24 horas para controlar la esterilidad.

### **5.2.6 Preparación del inóculo con *E. coli*, *Salmonella sp.* y *Clostridium sp.***

Para la preparación del inóculo se purificaron las cepas bacterianas, se sembraron en agar sangre y se incubaron por 24 horas (*E. coli* y *Salmonella sp.*) y 48 horas (*Clostridium sp.*) en jarra de anaerobiosis.

Luego se tomó una asada de cada cultivo, y se inoculó en caldo Tripticasa Soya incubándolos a 36°C por 24 horas (*E. coli* y *Salmonella sp.*) y 48 horas (*Clostridium sp.*). De estas soluciones se tomaron 0.05 ml y se diluyeron cada una en 4.95 ml de solución salina estéril (1:100), y se homogenizaron.

### **5.2.7 Siembra en agar planta**

Se sembró en el agar-planta una asada de cada uno de los inóculos diluidos

en solución salina de forma radial (Figura 4 y 7), haciendo cinco radios por microorganismo (Figuras 5 y 6). Se dejó reposar de 5 – 10 minutos y se incubaron a 37 °C por 24 horas la *Escherichia coli* y la *Salmonella sp.*, y 48 horas el *Clostridium sp.* Los resultados fueron interpretados de acuerdo al crecimiento obtenido (Figuras 7 y 8). (Chávez, 2010)

#### **5.2.8 Preparación del control positivo (a la inhibición)**

Los controles positivos se prepararon mezclando 13.5 ml de agar Müeller-Hinton y 1.5 ml del antibiótico seleccionado en las cajas de Petri, se homogenizaron y dejaron enfriar a temperatura ambiente, para posteriormente incubarlos por 24 horas a 36 °C. En el control positivo no debe haber crecimiento bacteriano (Figura 7).

#### **5.2.9 Preparación del control negativo (a la inhibición)**

Los controles negativos se prepararon mezclando 13.5 ml de agar Müeller-Hinton y 1.5 ml de agua desmineralizada estéril en las cajas de Petri, se homogenizaron y dejaron enfriar a temperatura ambiente para posteriormente incubarlos por 24 horas a 36°C. En el control negativo debe haber crecimiento bacteriano (Figura 7 y 8).

#### **5.2.10 Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)**

La actividad antimicrobiana de extractos de plantas se determinaron mediante la evaluación de la menor concentración de la infusión de Orégano necesaria para inhibir el crecimiento bacteriano; este valor es conocido como Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) y se hace mediante la técnica de macrodilución. (Hernández et. al., 2009)

### **5.2.10.1 Técnica de macrodilución**

Se utilizaron cajas cuadriláteras, haciendo diluciones seriadas hasta encontrar la concentración mínima a la que las bacterias son inhibidas. El procedimiento se detalla a continuación:

Se prepararon tubos de ensayo con 4, 3.6, 3.8 y 3.9 ml de agar Müller-Hinton, posteriormente fueron esterilizados y enfriados en baño María a 37 °C. Se agregaron los 4 ml de agar en el cuadrante superior derecho de la caja cuadrilátera como control de crecimiento; en el cuadrante superior izquierdo se agregaron 3.6 ml de agar Müller-Hinton más 400 µl (0.4 ml) de la infusión de hoja de Orégano, lo que corresponde a 1.5%. En el cuadrante inferior izquierdo se agregaron 3.8 ml de agar Müller-Hinton más 200 µl (0.2ml) de infusión de Orégano, correspondiendo a 0.75% y en el cuadrante inferior derecho se agregaron 3.9 ml de agar Müller-Hinton más 100 µl (0.1ml) de infusión de Orégano lo que corresponde al 0.375%. (Figuras 9 y 10).

### **5.2.11 Análisis de datos**

Para determinar la existencia de actividad antibiótica de la infusión de hojas de Orégano (*Lippia graveolens*, HBK) se utilizó estadística descriptiva y la presentación de resultados se realizó por medio de tablas.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para esta investigación se decidió comprobar la eficacia antimicrobiana de la infusión de Hojas y tallos de Orégano (*Lippia graveolens* HBK) sobre las principales bacterias aisladas de enteritis en lechones, por medio de la técnica de macrodilución, tomando como base el método de dilución descrito por Mitscher et al. 1972.

La técnica de dilución se compone de dos fases: la etapa de pretamizaje y la etapa de diluciones seriadas para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM).

El pretamizaje es una serie de ensayos biológicos generalmente *in vitro* que dan una idea preliminar de la posible bioactividad de un extracto crudo, fracción purificada o principio activo puro. Las técnicas de pretamizaje pretenden orientar al investigador con técnicas relativamente sencillas, que no involucren animales y que pueda realizarse un número grande de muestras en forma rápida, sencilla, reproducible y de bajo costo. (Cáceres, 1996)

Se determinó que la eficacia de la infusión de hojas y tallos de Orégano, inhibió el 22% del crecimiento de *Escherichia coli*. Lo cual no es completamente efectivo como antimicrobiano debido a que de las 18 siembras realizadas en total, solo hubo inhibición de 4 (Cuadro No. 2).

**Cuadro No. 2. Eficacia *in vitro* de infusión de hojas y tallos de Orégano (*Lippia graveolens* HBK) en concentración de 1.5 % frente a las principales bacterias causantes de enteritis en lechones**

Microorganismos	Infusión al 1.5%				Total de siembras	Eficacia (%)
	Inhibe		No Inhibe			
	No. de siembra	%	No. de siembra	%		
<i>E. coli</i>	4	22	14	78	18	<b>22</b>
<i>Salmonella sp.</i>	13	72	5	28	18	<b>72</b>
<i>Clostridium sp.</i>	13	72	5	28	18	<b>72</b>

Fuente: Elaboración propia

Aunque Cáceres (2011) demostrara actividad contra el crecimiento de *E. coli* mediante el uso de infusiones y tinturas de la hoja (2 mg/ml), así también lo describe Hernández (2009), mediante el uso de los aceites esenciales obtenidos por destilación.

La variación de resultados se debe a la capacidad que tiene la *Escherichia coli* de generar resistencia a los antibióticos convencionales debido a la administración desmesurada en las explotaciones porcinas, tanto para tratamiento de enfermedades como los aditamentos en la alimentación que favorecen el crecimiento de los animales. (Mathew, 1999)

Tal como lo describe Mathew (1999), donde se realizaron varios análisis de la resistencia antibiótica en aislamientos de *Escherichia coli* se determinó que los aislamientos obtenidos de las granjas porcinas de elevado uso de antibióticos, resultaron ser resistentes a antibióticos como la Oxitetraciclina, Apramicina, Neomicina y Gentamicina, en comparación con las granjas que tenían bajo uso de los antibióticos que no mostraron mucha resistencia a los fármacos.

En lo que respecta a la resistencia a los antibióticos de *Escherichia coli* existe una gran variedad de estudios, con distintos enfoques. Bischoff et al. (2002) demostró que un 53% de los aislamientos de *E. coli* beta hemolítica, obtenida de diferentes lechones con diarrea en múltiples granjas de la ciudad de Oklahoma, resultaron ser resistentes a Cloranfenicol. Maynard et al. (2003) concluye que los integrones forman parte importante de la epidemiología para generar resistencia antibiótica por parte de la *E. coli* en cerdos.

Boerlin et al. (2005) describe que la resistencia antibacteriana se encuentra con más frecuencia en las cepas patogénicas de *E. coli* porcino que cualquier otra cepa. El uso de agentes antimicrobianos puede hacer selección de bacterias portadoras de genes de alta virulencia, lo cual podría acelerar la propagación de la población bacteriana e incrementar la virulencia. En algunas granjas el tratamiento de diarreas con antibióticos, es un factor para exacerbar las diarreas.

*E. coli* es una bacteria que tiene capacidad de adaptarse a las condiciones ambientales y adquirir resistencia a los antibióticos con mucha mayor facilidad que otras bacterias, por lo que en este estudio la infusión de hojas y tallos de Orégano presentó baja actividad antimicrobiana.

Por lo contrario, para *Salmonella sp.* se obtuvo 72% de actividad antimicrobiana, debido a que de las 18 siembras realizadas, 13 de estas no tuvieron crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo (Cuadros No. 2 y 3). Esto significa que la infusión de orégano tiene efecto sobre *Salmonella sp.* y, por tratarse de una bacteria constantemente reportada en casos de diarreas en lechones, la infusión de Orégano puede ser apta para administrarse en el campo.

**Cuadro No. 3. Control de la actividad antimicrobiana de la infusión de hojas de Orégano sobre las principales bacterias causantes de enteritis en lechones**

<i>Lippia graveolens</i> HBK	Caja A								Caja B								Caja C								
	Aerobiosis																Anaerobiosis								
	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8	
<i>E. coli</i>	+	+		+																					
<i>Salmonella sp.</i>			+		+					+		+	+												
<i>Clostridium sp.</i>																				+	+	+		+	+

**(-) Hay crecimiento; (+) hay inhibición de crecimiento.**

Fuente: Elaboración propia

En el caso de *Clostridium sp.*, los resultados obtenidos demostraron una actividad antimicrobiana de 72%, siendo similar a la de *Salmonella sp.* en las cuales de las 18 siembras realizadas en totalidad, 13 no hubo crecimiento alrededor del inóculo en ninguna de las cinco posiciones (Cuadros No. 2 y 3). Se demostró que la infusión de Orégano fue efectivo sobre esta bacteria en la fase *in vitro*, por lo que se espera tenga los mismos resultados en futuros experimentos *in vivo*.

La Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de la infusión de hojas y tallos de Orégano (*Lippia graveolens* HBK) no pudo ser determinada sobre *E. coli*, debido a que la bacteria creció en la concentración base propuesta (Cuadros 3 y 2; Figuras 7 y 12). Cáceres (2011) recomienda no exceder la dosis de 1.6% en infusiones. El efecto adverso que puede presentarse es de estupefaciente, además de poseer entre sus componentes Lapachenol, al cual se le atribuye actividad carcinogénica.

**Cuadro No. 4: Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) de hojas y tallos de Orégano (*Lippia graveolens* HBK) frente a las principales bacterias causantes de enteritis en lechones**

Microorganismos	Control de crecimiento		Infusión 0.375%		Infusión 0.75%		Infusión 1.5%		Total de siembra
	N	I	N	I	N	I	N	I	
<i>E. coli</i>	3	0	3	0	3	0	3	0	12
<i>Salmonella sp.</i>	3	0	3	0	3	0	0	3	12
<i>Clostridium sp.</i>	3	0	3	0	3	0	0	3	12

N = no inhibe; I = inhibe.

Fuente: Elaboración propia

La *Salmonella sp.* presentó eficacia antimicrobiana, y se determinó que la CIM para esta bacteria fue de 1.5% (Figura 11), siendo necesario 15 mg/ml de Orégano (*Lippia graveolens* HBK) para controlar su crecimiento. Comprobando al igual que Hernández (2009), Arcila (2004) y Cáceres (2011) quienes reportan en varios estudios *in vitro*, sobre las hojas de Orégano, actividad contra el crecimiento de diferentes especies de *Salmonella*, entre las que se mencionan *S. typhi*, *S. flexneri*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* y *S. enterica*.

Al igual que *Salmonella sp.* la CIM para *Clostridium sp.* fue de 1.5% (Figura 13), siendo necesario 15 mg/ml de infusión de hojas y tallos de orégano para controlar el desarrollo del microorganismo causante de diarreas en lechones. (Cuadro No.4)

Se determinó que las bacterias más sensibles a la infusión de Orégano (*Lippia graveolens* HBK), tomando como base los resultados obtenidos de la concentración inhibitoria mínima (CIM) fueron *Clostridium sp.* y *Salmonella sp.*, debido a que requirieron de la menor concentración para el control de su crecimiento (Cuadro No. 4 y 3)

Los aceites esenciales obtenidos de las hojas de Orégano pueden ser utilizados para el desarrollo de fitofármacos para el tratamiento de las disfunciones más comunes del aparato gastrointestinal principalmente las diarreas bacterianas. (Arcila, 2004; Cáceres, 2011)

En este estudio se comprobó que la infusión de Hoja de Orégano (*Lippia graveolens* HBK) posee actividad antimicrobiana sobre *Salmonella sp.* y *Clostridium sp.*, las principales bacterias aisladas en enteritis en lechones, por lo tanto es una alternativa económica, de fácil acceso y preparación en las comunidades de escasos recursos en donde pueda implementarse la medicina alternativa en los animales.

## VII. CONCLUSIONES

- La infusión de Orégano (*Lippia graveolens* HBK) fue eficaz en la actividad antimicrobiana *in vitro* sobre *Salmonella sp.* y *Clostridium sp.*, no fue eficaz contra *Escherichia coli*; principales bacterias que causan diarrea en lechones.
- La Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de la infusión de hojas y tallos de Orégano (*Lippia graveolens* HBK) para *Salmonella sp.* y *Clostridium sp.* fue de 1.5% (15 mg/ml).
- La Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de la infusión de hojas y tallos de Orégano (*Lippia graveolens* HBK) para *Escherichia coli* no pudo ser determinada debido a que presentó resistencia a antimicrobianos en las diluciones evaluadas.
- Las bacterias que presentaron mayor sensibilidad a la infusión de Orégano (*Lippia graveolens* HBK) fueron *Clostridium sp.* y *Salmonella sp.*, donde se obtuvo el 72% de efectividad.

## VIII. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios *in vivo* para comprobar la eficacia antibacteriana de la infusión de hojas y tallos de Orégano para el control de enteritis bacteriana en lechones.
- Realizar estudios *in vitro* para comprobar la eficacia antibacteriana de la infusión de hojas y tallos de Orégano para el control de otros agentes patógenos causantes de diarreas en lechones y otras especies.
- Analizar la eficacia del sinergismo antimicrobiano con infusiones, combinando diferentes especies de plantas medicinales que tengan efecto antimicrobiano.

## IX. RESUMEN

Las enteritis en lechones representan una de las infecciones típicas en las explotaciones porcinas. Su etiología se encuentra comprendida por muchos factores y complejos en donde interactúan microorganismos. Los altos índices de morbilidad y mortalidad, representan pérdidas económicas con las muertes de los lechones, y por los costos de tratamiento. Son muchos los agentes bacterianos responsables de diarrea en cerdos, entre los cuales destacan *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella cholerae suis* y otros serotipos, entre otros.

Esta investigación se enfoca en apoyar modelos alternativos de producción, el cual permita impulsar el desarrollo rural, evaluando la efectividad *in vitro* de la infusión de hojas de Orégano (*Lippia graveolens*, HBK) como antibiótico sobre los principales microorganismos causantes de enteritis en lechones, aislados en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria.

El estudio consistió en evaluar la infusión de Orégano (*Lippia graveolens*, HBK) al 1.5 %, mediante la técnica *in vitro* de Mitscher et. Al., para la determinación de la efectividad en la inhibición de crecimiento contra *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* y *Clostridium sp.*, agentes bacterianos causantes de diarrea en lechones.

Los resultados obtenidos revelan que la infusión de hojas de Orégano (*Lippia graveolens* HBK) es efectiva contra *Clostridium sp.* y *Salmonella sp.* sin embargo, *E. coli* demostró ser resistente. La CIM para *Clostridium sp.* y *Salmonella sp.* fue de 1.5%. Siendo estas últimas las más sensibles, ya que fueron inhibidas con la concentración más baja de 15 mg/ml.

## SUMMARY

The enteritis in piglets represent one of typical infections in pig farms. Its etiology it is taken by many factors and complex where organisms interact. The high rates of morbidity and mortality, represent economic losses with the deaths of piglets, and for the costs of treatment. Many bacterial agents are the responsible for diarrhea in pigs, including *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella cholera suis* and other serotypes, among others.

This research focuses on supporting alternative models of production, which allows to promote rural development, evaluating the *in vitro* effectiveness of Oregano leaves infusion (*Lippia graveolens*, HBK) as antibiotic on the main pathogen microorganisms of enteritis in piglets, isolated in the laboratory of Microbiology on the Faculty of Veterinary Medicine.

The study consisted of evaluating the infusion from Oregano (*Lippia graveolens*, HBK) 1.5%, using the *in vitro* technique of Mitscher et. al., for the determination of the effectiveness on the inhibition of growth against *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* and *Clostridium sp.*, bacterial agents that cause diarrhea in piglets.

The results obtained reveal that the infusion of leaves of Oregano (*Lippia graveolens* HBK) is effective against *Clostridium sp.* and *Salmonella sp.* however, *E. coli* proved resistance. The CIM for *Clostridium sp.* and *Salmonella sp.* was 1.5%. This are the most sensitive bacteria, since they were inhibited with the lowest concentration of 15 mg/ml.

## X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Albado Plaus, E; Saez Flores, G; Grabiél Ataucusi, A. 2001. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano) (en línea). Consultado 28 ago. 2011. Disponible en <http://www.scielo.org.pe/pdf/rmh/v12n1/v12n1ao3.pdf>
2. Arana Sánchez, A; Estarrón Espinosa, M; Obledo Vázquez, EN; Padilla, Camberos, E; Silva Vázquez, R; Lugo Cervantes, E. 2010. Antimicrobial and antioxidant activities of Mexican oregano essential oils (*Lippia graveolens* H. B. K.) with different composition when microencapsulated in  $\beta$ -cyclodextrin (en línea). Consultado 17 sep. 2011. Disponible en <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1472-765X.2010.02837.x/abstract>
3. Arcila Lozano, CC; Loarca Piña, G; Lecona Uribe, S; González de Mejía, E. 2004. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes (en línea). Consultado 17 sep. 2011. Disponible en [http://www2.bvs.org.ve/scielo.php?pid=S0004-06222004000100015&script=sci\\_arttext&tlng=es](http://www2.bvs.org.ve/scielo.php?pid=S0004-06222004000100015&script=sci_arttext&tlng=es)
4. Bischoff, K.M; White, DG; McDermott, PF; Zhao, S; Gaines, S; Maurer, JJ; Nisbet, DJ. 2002. "Characterization of Chloramphenicol Resistance in Beta-Hemolytic *Escherichia coli* Associated with Diarrhea in Neonatal Swine" (en línea). Consultado 24 mar. 2014. Disponible en <http://jcm.asm.org/content/40/2/389.full.pdf+html>

5. Boerlin, P; Travis, R; Gyles, CL; Reid-Smith, R; Janecko, N; Lim, H; Nicholson, V; McEwen, SA; Friendship, R; Archambault, M. 2005. "Antimicrobial Resistance and Virulence Genes of *Escherichia coli* Isolates from Swine in Ontario" (en línea). Consultado 24 mar. 2014. Disponible en <http://aem.asm.org/content/71/11/6753.full.pdf+html>
6. Brooks, GF; Butel, JS; Morse, SA. 2002. Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 17ª ed. México, MX. Manual Moderno. 844 p.
7. Cáceres, A. 1996. Plantas de uso medicinal en Guatemala. Guatemala, GT, Universitaria. p. 287-289
8. Cáceres, A. 2011. Evaluación de la actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa por diez especies medicinales y aromáticas nativas como posible fuente para el tratamiento de afecciones de la memoria. Guatemala, GT. SENACYT. P. 89 - 93
9. Carranza, AI; Corrales, JP. 2006. Enfermedades que producen diarrea en cerdos en las etapas de desarrollo y terminación (en línea). Consultado 16 oct. 2011. Disponible en [http://www.produccion-animal.com.ar/producción\\_porcina/00-v-congreso\\_prod\\_porcina/13-carranza\\_101.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/producción_porcina/00-v-congreso_prod_porcina/13-carranza_101.pdf)
10. Castillo, D; Arriagada, M; González, G; García, M; Peralta, W. 1986. Anticuerpos "anti-pili" de *Escherichia coli* enteropatógena en suero, calostro leche y heces de cerdos clínicamente sanos (en línea). Consultado 24 oct. 2011. Disponible en <http://www.Claridad.uchile.cl/index.php/ACV/article/viewFile/4442/10712>

11. Castro Peláez, LM. 2009. Actividad Antibacteriana de plantas medicinales en Cepas de enterobacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido. *Tesis Mag. Sc. QB*. Guatemala, GT USAC/FCQF. 87p.
12. Chávez López, JJ. 2010. Actividad antimicrobiana *in vitro* de seis plantas de uso medicinal sobre las principales cepas de bacterias y hongos que afectan piel y oído en perros. *Tesis Lic. Med. Vet.* Guatemala, GT USAC/FMVZ. p. 8-9, 18-33.
13. Chávez Torres, L; Díaz Castañeda, F; Escalante Rosadio, G; Estrada Montañez, E. 2008. Efecto sinérgico del aceite esencial de *Origanum vulgare* a la Gentamicina en cultivos de *Escherichia coli* (en línea). Consultado 17 sep. 2011. Disponible en <http://revistas.concytec.gob.pe/pdf/cimel/v13n2/a03v13n2.pdf>
14. Dannenberg, HD; Richter, W; Wesche, WD. 1975. Enfermedades del Cerdo. Trad. JF. Escobar. 2 ed. Zaragoza, ES. Acribia. p. 147-263
15. Dunne, HW. 1967. Enfermedades del Cerdo. Trad. J. Pérez Lías, A. Beltrán. 2 ed. México, MX. Hispanoamericana. p. 421-430, 499-504.
16. Gallardo de López, A; Polanco, J; Pineda de Mora, Y; Méndez de Aponte, F. 1988. Serotipos de Salmonellas aislados en suinos (en línea). Consultado 25 oct. 2011. Disponible en [http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas\\_ci/VeterinariaTropical/vt13/texto/agallardo.htm](http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_ci/VeterinariaTropical/vt13/texto/agallardo.htm)
17. Govaris, A; Solomakos, N; Pexara, A; Chatzopoulou, PS. 2009. The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella Enteritidis* in minced sheep meat during refrigerated storage (en línea). Consultado 30 sep. 2011. Disponible en <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160509006709>

18. Hariharan, H; Coles, M; Poole, D; Page, R. 2004. "Antibiotic resistance among enterotoxigenic *Escherichia coli* from piglets and calves with diarrhea" (en línea). Consultado 24 mar. 2014. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.gov/pmc/articles/PMC548641/pdf/cvj45pg605.pdf>
19. Hernández, T; Canales, M; Avila, JG; García, AM; Meraz, S; Caballero, J; Lira, R. 2009. Composition and antibacterial activity of essential oil of *Lippia graveolens* H.B.K. (Verbenaceae) (en línea). Consultado 13 sep. 2011. Disponible en <http://journals.indexcopernicus.com/abstracted.php?level=5&icid=892161>
20. Janz, JAM; Morel, PCH; Wilkinson, BHP; Purchas, RW. 2007. Preliminary investigation of the effects of low-level dietary inclusion of fragrant essential oils and oleoresins on pig performance and pork quality (en línea). Consultado 28 sep. 2011. Disponible en <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0309174006002233>
21. Lambert, RJW; Skandamis, PN; Coote, PJ; Nychas, GJE. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol (en línea). Consultado 12 sept. 2011 Disponible en <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x/pdf>
22. López Álvarez, MSJ. s.f. *Escherichia coli*: mecanismos de patogenicidad (en línea). Consultado 24 oct. 2011. Disponible en <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol1/CV1v1c01.pdf>
23. Luna, A. 1994. Enciclopedia médica naturalista. México, MX. Editores Mexicanos Unidos. p. 7, 264.

24. Mathew, AG; Saxton, AM; Upchurch, WG; Chattin, SE. 1999. "Multiple Antibiotic Resistance Patterns of *Escherichia coli* Isolates from Swine Farms" (en línea). Consultado 24 mar. 2014. Disponible en <http://aem.asm.org/content/65/6/2770.full.pdf+html>
25. Maynard, C; Fairbrother, JM; Bekal, S; Sanschagrín, F; Levesque, RC; Brousseau, R; Masson, L; Larivière, S; Harel, J. 2003. "Antimicrobial Resistance Genes in Enterotoxigenic *Escherichia coli* O149:K91 Isolates Obtained over a 23-Year Period from Pigs" (en línea). Consultado 24 mar. 2014. Disponible en <http://aac.asm.org/content/47/10/3214.full.pdf+html>
26. Michiels, J; Missotten, JAM; Fremaut, D; De Smet, S; Dierick, NA. 2009. In vitro characterisation of the antimicrobial activity of selected essential oil components and binary combinations against the pig gut flora (en línea). Consultado 28 sep. 2011. Disponible en <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840109000042>
27. Miller, AB. 2010. Antimicrobial and anticancer activity of essential oils from Guatemala medicinal plants (en línea). Master of Science Thesis. Utah, US. Brigham Young University / Biology. 46p. Disponible en <http://contentdm.lib.byu.edu/ETD/image/etd4056.pdf>
28. Miranda, C; Rojo, MD. s.f. *Clostridium perfringens*: Infecciones de piel y tejidos blandos (en línea). Consultado 16 oct. 2011. Disponible en <http://www.seimc.org/control/revisiones/bacteriologia/Clostper.pdf>
29. Miranda, C; Rojo, MD. s.f. *Clostridium perfringens*: Infecciones de Piel y tejidos blandos (en línea) Consultado 23 oct. 2011. Disponible en <http://www.seimc.org/control/revisiones/bacteriologia/Clostper.pdf>

30. Morataya Morales, MA. 2006. Caracterización Farmacopéica de cuatro plantas aromáticas nativas de Guatemala Albahaca de monte (*Ocimum micranthum*), Orégano (*Lippia graveolens*), Salvia sija (*Lippia alba*) y Salviyá (*Lippia chiapasensis*). Tesis Lic. QB. Guatemala, GT. USAC /FCQF. 68 p.
31. Oliveira, DR; Leitão, GG; Bizzo, HR; Lopes, D; Alviano, DS; Alviano, CS; Leitão, SG. 2007. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. (en línea). Consultado 15 oct. 2011. Disponible en <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814606000781>
32. Ortiz Beteta, GH. 2006. Actividad antifungica de los extractos etanolicos de la flor de *Bourreria huanita* y la hoja de *Lippia graveolens* y sus particiones hexanica, clorofórmica, acetato de etilo y acuosa contra los hongos *Sporothrix schenckii* y *Fonsecaea pedrosoi*. Tesis Lic. QB. Guatemala, GT USAC/FCQF. 70 p.
33. Pascual Castellón, V; Fuentes Cot, P. s.f. Estrategias nutricionales para el contro de Salmonella en porcino (en línea). Consultado 25 oct. 2011. Disponible en <http://www.seporlorca.com/pdf/ponencias09/VICTORIA-PASCUAL-Y-PABLO-FUENTES.pdf>
34. Pineda, Y; Gallardo, A; Polanco, J; Clavijo, A; Méndez, F. 1992. Etiología bacteriana de la diarrea en cerdos de Venezuela (en línea). Consultado 16 oct. 2011. Disponible en [http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas\\_ci/VeterinariaTropical/vt17/texto/ypineda.htm](http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_ci/VeterinariaTropical/vt17/texto/ypineda.htm)
35. Pineda, Y; Gallardo, A; Polanco, J; Clavijo, A; Méndez, F. 1992. Etiología bacteriana de la diarrea en cerdos de Venezuela (en línea). Consultado 23 sep. 2011. Disponible en [http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas\\_ci/VeterinariaTropical/vt17/texto/ypineda.htm](http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_ci/VeterinariaTropical/vt17/texto/ypineda.htm)

36. Stanchi, NO; Martino, PE; Gentilini, E. 2007. Microbiología Veterinaria. 2 ed. Buenos Aires, AR. Editorial Inter-médica. 572 p.
37. Sumano, HS; Ocampo, L. 2006. Farmacología Veterinaria. 3 ed. México, MX. McGraw-Hill Interamericana Editores. 1082 p.
38. Torres, LC; Díaz Castañeda, FM; Escalante Rosadio, G; Estrada Montañez, E. 2008. Efecto sinérgico del aceite esencial de *Origanum vulgare* a la Gentamicina en cultivos de *Escherichia coli* (en línea). Consultado 29 ago. 2011. Disponible en [http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/cimel/v13\\_n2/pdf/a03v13n2.pdf](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/cimel/v13_n2/pdf/a03v13n2.pdf)
39. Varley, MA. 1995. El lechón recién nacido: Desarrollo y supervivencia. Zaragoza, ES. Acribia. p. 159 – 172, 247 – 261.
40. Yang, H; Chen, S; White, DG; Zhao, S, McDermott, P; Walker, R; Meng, J. 2004. “Characterization of Multiple-Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Diseased Chickens and Swine in China” (en línea). Consultado 24 mar. 2014. Disponible en <http://jcm.asm.org/content/42/8/3483.full.pdf+html>

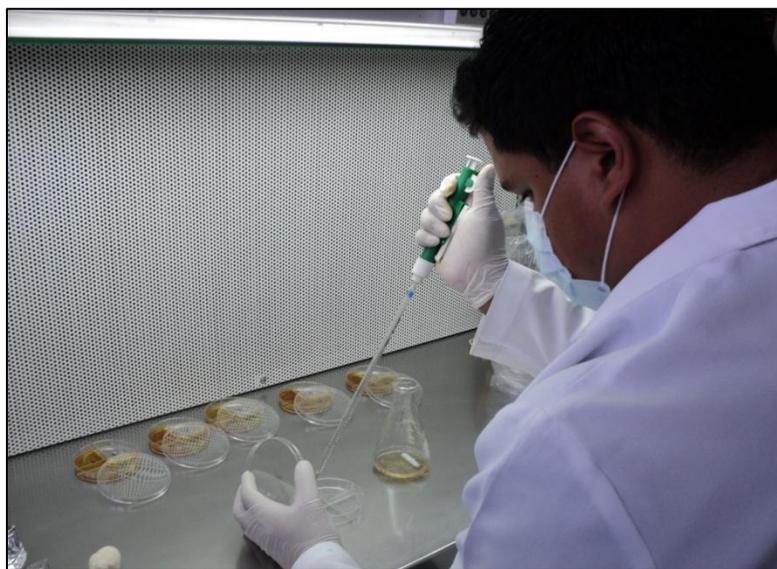
# **XI. ANEXOS**

**Figura 1. Preparación de la infusión**



Fuente: Elaboración propia

**Figura 2. Preparación de placas con agar planta**



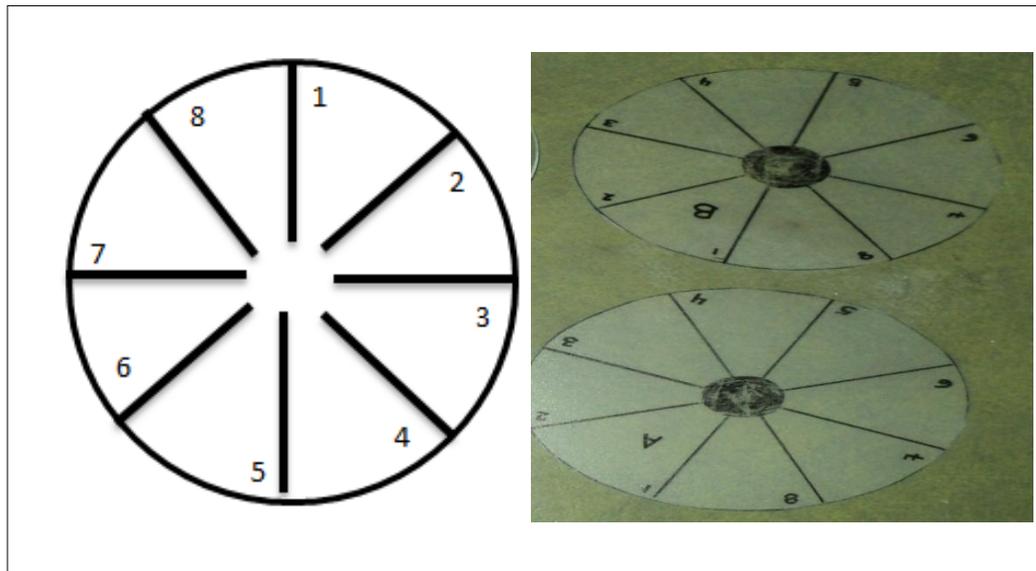
Fuente: Elaboración propia

**Figura 3. Agar planta**



Fuente: Elaboración propia

**Figura 4. Plantilla utilizada como guía para la inoculación en la placa de agar planta para la técnica de macrodilución**



Fuente: Elaboración propia

**Cuadro 5. Patrón utilizado para la siembra en placa de agar planta para la técnica de macrodilución**

<u>Patrón de siembra</u>	Caja A								Caja B								Caja C								
	Aerobiosis																Anaerobiosis								
	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8	
<i>E. coli</i>	■	■		■						■			■												
<i>Salmonella sp.</i>			■		■					■		■	■												
<i>Clostridium sp.</i>																			■	■	■		■		■

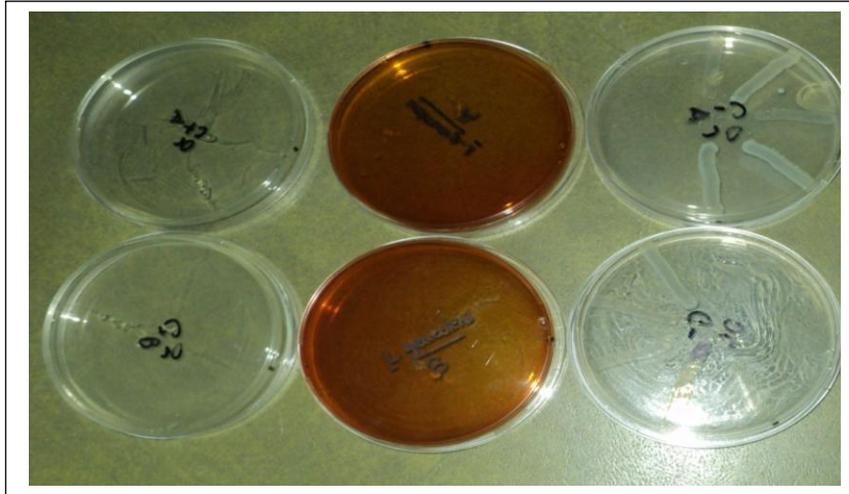
Fuente: Elaboración propia

**Figura 5. Inoculación en agar planta para determinación de eficacia antibacteriana**



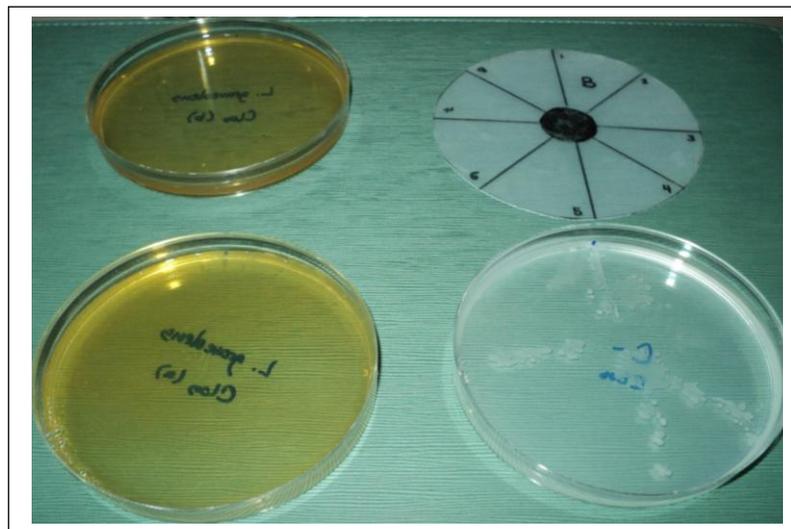
Fuente: Elaboración propia

**Figura 6. Placas de agar planta sembradas con *Salmonella sp* y *Escherichia coli* para determinación de eficacia antibacteriana. Comparación con controles positivos (izquierda) y negativos (derecha)**



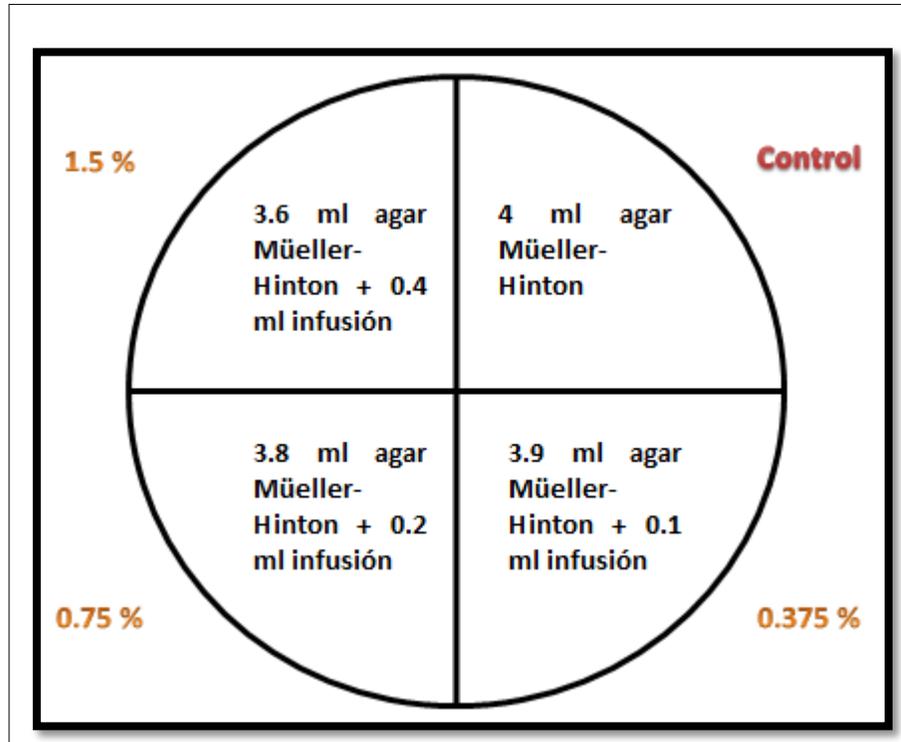
Fuente: Elaboración propia

**Figura 7. Placas de agar planta y placa de agar Müeller Hinton sembradas con *Clostridium sp.* para control**



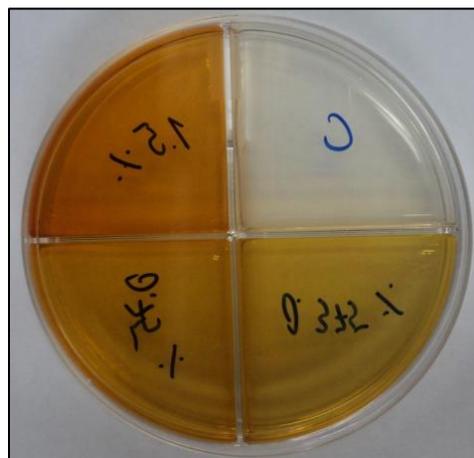
Fuente: Elaboración propia.

**Figura 8. Esquema para la inoculación de las cepas para determinación de la CIM**



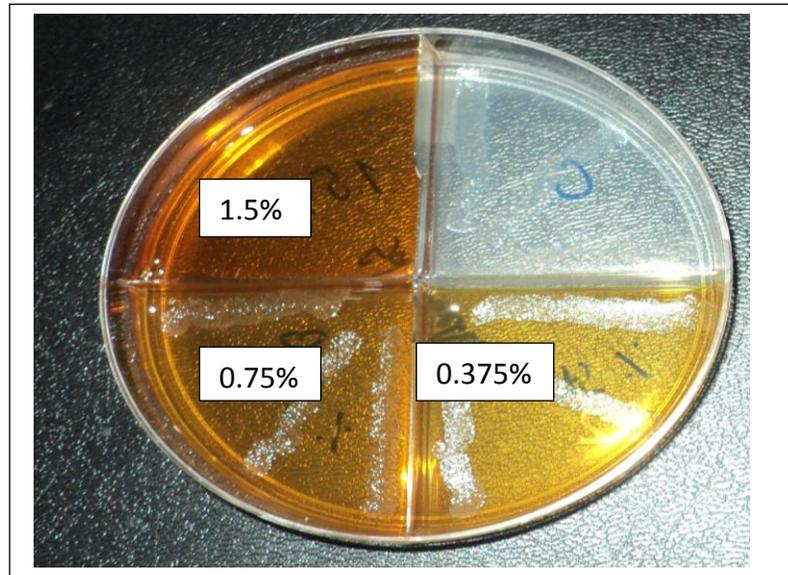
Fuente: Elaboración propia

**Figura 9. Placa cuadrante para determinación de CIM**



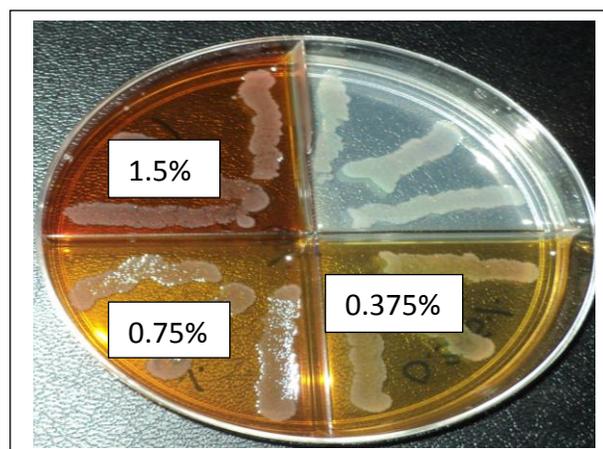
Fuente: Elaboración propia

**Figura 10. Resultado de CIM para *Salmonella sp.* habiendo crecimiento en concentraciones de 0.75%, 0.375% y control (negativo a inhibición), no así en concentración de 1.5% (positivo a inhibición)**



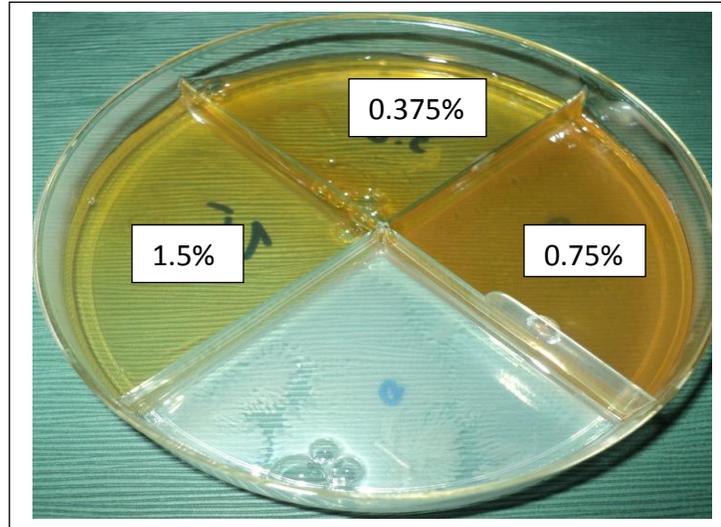
Fuente: Elaboración propia

**Figura 11. Resultado de CIM para *E. coli* habiendo crecimiento en concentraciones de 1.5%, 0.75%, 0.375% y control (negativo a inhibición)**



Fuente: Elaboración propia

**Figura 12. Resultado de CIM para *Clostridium sp.* positivo a inhibición, habiendo crecimiento únicamente en control, y concentraciones de 0.75% y 0.375%**



Fuente: Elaboración propia

**Cuadro No. 6: Eficacia *in vitro* de infusión de hojas y tallos de Orégano (*Lippia graveolens* HBK) en concentración de 1.5 % frente a las principales bacterias causantes de enteritis en lechones**

Microorganismos	Infusión al 1.5%				Total de siembras
	Inhibe		No Inhibe		
	No. de siembra	%	No. de siembra	%	
<i>E. coli</i>	4	27	11	73	15
<i>Salmonella sp.</i>	10	67	5	33	15
<i>Clostridium sp.</i>	10	67	5	33	15

Fuente: Elaboración propia

**Cuadro No. 7: Controles comparativos para las principales bacterias causantes de enteritis en lechones**

Microorganismos	Control Negativo**		Control Positivo*		Total siembra
	N	I	N	I	
<i>Escherichia coli</i>	5	0	0	5	10
<i>Salmonella sp.</i>	5	0	0	5	10
<i>Clostridium sp.</i>	5	0	0	5	10

I = inhibe                      N= no inhibe

\* Siembra de las bacterias en placas con Agar Müeller Hinton con aditamento de Antibiótico (ver metodología).

\*\* Siembra de las bacterias en placas con Agar Müeller Hinton, sin aditamentos.

Fuente: Elaboración propia

**Cuadro No. 8. Control negativo de la evaluación del crecimiento bacteriano**

<b>Control negativo</b>	Caja A								Caja B								Caja C							
	Aerobiosis																Anaerobiosis							
	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>E. coli</i>	-	-		-						-			-											
<i>Salmonella sp.</i>			-		-					-	-	-												
<i>Clostridium sp.</i>																		-	-	-		-		-

**(-) Hay crecimiento; (+) hay inhibición de crecimiento.**

Fuente: Elaboración propia

**Cuadro No. 9. Control positivo de la evaluación del crecimiento bacteriano**

<b><u>Control</u></b> <b><u>positivo</u></b>	Caja A								Caja B								Caja C							
	Aerobiosis																Anaerobiosis							
	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>E. coli</i>	+	+		+						+				+										
<i>Salmonella sp.</i>			+		+					+		+	+											
<i>Clostridium sp.</i>																			+	+	+		+	+

**(-) Hay crecimiento; (+) hay inhibición de crecimiento.**

Fuente: Elaboración propia

