

16
24

EVALUACION IN VITRO DE LA EFECTIVIDAD DE TETRACICLINA,
LINCOMICINA Y ESPECTINOMICINA CONTRA Mycoplasma bovis
AISLADO DE MASTITIS BOVINA

TESIS PRESENTADA ANTE LA DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES
DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA DE LA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

PARA LA OBTENCION DEL TITULO DE MEDICO VETERINARIO
ZOOTECNISTA

POR
GUILLERMO ARROYO GOMEZ

ASESORES: Q.F.B. Laura Hernández Andrade
M.V.Z. Graciela Tapia Pérez
M.V.Z.-PhD. Marcelo Pérez Domínguez

México, D. F.

1989

TESIS CON
PALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

C O N T E N I D O

| | Página |
|--------------------------|--------|
| RESUMEN | 1 |
| INTRODUCCION | 2 |
| OBJETIVOS | 15 |
| MATERIAL Y METODOS | 16 |
| RESULTADOS | 24 |
| DISCUSION | 26 |
| LITERATURA CITADA | 30 |
| CUADROS | 37 |

R E S U M E N

ARROYO GOMEZ GUILLERMO. Evaluación in vitro de la efectividad de lincomicina, tetraciclina y espectinomina contra Mycoplasma bovis aislado de mastitis bovina, (bajo la dirección de: Laura Hernández Andrade, Graciela Tapia Pérez y Marcelo Pérez Domínguez).

La mastitis por micoplasma se caracteriza por presentarse en forma de brotes que afectan un gran número de animales dentro de los hatos, disminuyendo notablemente la cantidad y calidad de la leche producida. - Otro importante rasgo ha sido su pobre o nula respuesta al tratamiento. En efecto, en los brotes reportados, una gran variedad de antibióticos ha sido utilizada sin éxito. Sin embargo, lincomicina y espectinomina que han probado su eficiencia contra micoplasmas aviáres, porcinos, e incluso contra M. bovis en semen bovino, no son utilizados preferentemente para el tratamiento de la mastitis causada por éste microorganismo. En el presente trabajo se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por el método de microdilución en placa, y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) por el método de dilución en tubo, para lincomicina, tetraciclina y espectinomina contra Mycoplasma bovis. El 83.3% de las cepas fue altamente sensible a lincomicina (CMI de 0.32 a 0.64 $\mu\text{g/ml}$); aunque el 16.6% fue muy resistente (CMI $\geq 40.96 \mu\text{g/ml}$). Frente a tetraciclina el 83.3% de las cepas fue sensible (CMI de 1.28 a 2.56 $\mu\text{g/ml}$) o medianamente sensible (CMI de 3.41 $\mu\text{g/ml}$). Espectinomina fue el antibiótico menos eficaz, ya que 75% de las cepas mostraron baja sensibilidad (CMI de 5.12 $\mu\text{g/ml}$). Así, lincomicina fue el antibiótico que mostró mayor actividad in vitro frente a M. bovis, seguido de tetraciclina y espectinomina. Para la Concentración Mínima Bactericida (CMB) los antibióticos no mostraron diferencias significativas entre sí mostrándose en general altamente eficientes. En todos los casos -- existió variabilidad entre las cepas ensayadas.

Sin embargo, las levaduras son cada vez más frecuentes, encontrándose desde 7.8% de aislamientos en los análisis rutinarios de muestras de leche mastítica (4), hasta 26% en estudios específicos de aislamiento para éstos microorganismos (39).

Por otro lado, nocardias y micoplasmas, que normalmente no son aislados en casos de mastitis, pueden encontrarse en un alto porcentaje de animales en hatos infectados.

Si bien, en vacas de desecho se encontró que 3.6% de animales estaban infectados por nocardia (12), en los brotes de mastitis debidos a este patógeno, el porcentaje de vacas afectadas, y de cuyas leches es posible aislar al microorganismo puede ser de hasta 44% (2).

Del mismo modo, brotes de mastitis por micoplasma dan lugar a aislamientos en 6 a 77% de los animales de los hatos afectados, aunque la mayor parte de los brotes tienen rangos de 10 a 40% (10).

Sin duda, la mastitis es la enfermedad mas importante a la que debe enfrentarse la industria lechera (8), y los estudios sobre pérdidas económicas que apoyan tal afirmación son numerosos (17, 19, 29, 50). La mastitis por micoplasma, aunque poco frecuente, sobresale en este aspecto debido a lo severo de su presentación.

El primer aislamiento de micoplasma a partir de leche fue dado a conocer por Alström en 1955 (citado en 27) y los primeros casos de mastitis por micoplasma fueron descritos por Stuart y col. en 1960 (59) y 1963 (citado en 14 y 26) y por Hale y col. en 1962 (23). A partir de entonces los reportes de casos de mastitis debida a estos microorganismos

han sido numerosos en todo el mundo (5, 7, 13-16, 21, 37, 46, 52, 57).

En México, desde 1982 se trataron de establecer las técnicas para su aislamiento a partir de leche (40), y durante el año siguiente se lograron recuperar varias cepas (a). En 1983, Avila y col. informan sobre el aislamiento de Mycoplasma spp en un hato lechero (3), y en 1984, Hernández y col. reportan un brote de mastitis causado por Mycoplasma bovis (26), lo cual indica que nuestro país no está exento de este problema.

b). LOS MICOPLASMAS.

Los micoplasmas son los microorganismos de vida libre más pequeños que se conocen. Su tamaño (200 nm o menos) hace posible su paso a través de filtros que retienen a las bacterias (48). A diferencia de los virus y las rickettsias, son capaces de multiplicarse en medios libres de células y, a diferencia de las bacterias, carecen de pared celular (18, 33). Esta carencia explica:

- Que estos organismos sean altamente pleomórficos, presentando formas redondeadas, ovaladas, filamentosas, discoidales, vesiculares, etc. (27, 31, 33).

- Que posean gran plasticidad. Esto explica a su vez, la tenden-

(a). Hernández, A. L., CIFAP-MEXICO. Comunicación personal sobre notas de trabajo.

cia a penetrar en el agar formando las típicas colonias en forma de huevo frito (31).

- Que sean resistentes a los antibióticos que inhiben la síntesis de pared celular (27).

- Que sean organismos muy delicados, susceptibles de lisarse por detergentes, alcoholes y anticuerpos específicos (27).

- Que no reviertan a formas con pared celular, a diferencia de las formas "L" (33).

Debido a sus características, los micoplasmas no pueden ser estudiados por los métodos bacteriológicos usuales (33). Son mal teñidos por los colorantes de anilina, son de lento crecimiento (2-6 días), producen colonias muy pequeñas (20-500 μ m), requieren de medios enriquecidos con suero y extracto de levadura para su crecimiento, (31, 33). Son anaerobios facultativos, pero crecen mejor en condiciones de velobiosis (27).

Los micoplasmas se han asociado a diversas enfermedades en el hombre, los animales y las plantas. En los animales, estas involucran al tracto respiratorio, glándula mamaria, sistemas urinario y genital, articulaciones, mucosa bucal y conjuntival (18, 20).

Algunas de las características bioquímicas de los micoplasmas involucrados en mastitis bovina son:

Las vacas pueden ser susceptibles a la infección a cualquier edad, ya sea en período seco o de lactación. Se cree que en vacas secas la enfermedad es menos severa que en animales lactantes, pero que puede persistir durante más tiempo (27).

Todas las mastitis por micoplasma son similares, pero la producida por M. bovis es usualmente más severa que las otras (32).

Generalmente, la mastitis por micoplasma es de presentación súbita. La producción láctea se ve notablemente disminuida (hasta 90% de un ordeño a otro) y el aspecto de la leche marcadamente alterado (8, 10, 13, 21).

La infección de la ubre puede ser subclínica, algunas veces sin altos conteos celulares. La infección clínica en su fase aguda es claramente característica.

En tales casos se observan uno o más cuartos tensos e inflamados; pero ni calor ni dolor están presentes (10, 11, 43), lo que ayuda a diferenciar este tipo de mastitis, de las mastitis agudas causadas por otros microorganismos (43).

La secreción láctea en los casos más severos es amarillenta o cafésosa y de consistencia acuosa o serosa con presencia de grumos. En los casos menos severos la leche es aparentemente normal, pero al dejarla reposar, rápidamente se deposita un sedimento de grumos finos, quedando un sobrenadante más o menos claro (10, 11).

La secreción puede retornar a la normalidad en solo algunas sema-

nas, pero en muchos animales ésta puede persistir hasta la siguiente lactación; en éste caso el nivel de producción es generalmente mucho menor al esperado (11).

Usualmente los animales no presentan signos generales de enfermedad y siguen comiendo normalmente (10, 32), no hay fiebre ni malestar aparentes (43). Sin embargo, algunos animales pueden desarrollar cojeras articulares o problemas respiratorios (10, 11, 32).

La distribución de Mycoplasma bovis por vía sistémica ocurre, y éste microorganismo se ha aislado de nódulos linfáticos, útero, fetos viables y abortados, pulmón, riñón, vagina, orina, sangre, ojos, nariz y líquido sinovial cuando la vía de infección ha sido la glándula mamaria (32).

En la infección por vía oral se produce distribución hacia mucosa nasal, sangre, líquido sinovial y pulmón (32). De éste modo se ha asociado a neumonías en becerros, por lo que se recomienda no ofrecer leche contaminada con estos microorganismos a menos de que se hierva (43).

Cabe mencionar que en México ya se han reportado neumonías en becerros causadas por Mycoplasma bovis (30).

En algunos animales la infección se elimina espontáneamente después del mejoramiento clínico. Pero en muchos otros puede persistir hasta la siguiente lactación, en la que puede ser subclínica y manifestarse clínicamente después de muchos meses de aparente recuperación (11).

Los animales recuperados pueden permanecer como portadores, excre-

tando micoplasma por espacios de hasta 13 meses (10).

El diagnóstico de mastitis por micoplasma puede intentarse por aislamiento del agente causal, lo que definitivamente no es fácil. La alternativa está representada por pruebas serológicas tales como: Inhibición del crecimiento, Inhibición de la película, Hemoaglutinación indirecta o fijación del complemento (27, 10).

El control de la enfermedad está basado en la identificación y segregación del ganado infectado, el cual debe ser ordeñado al final o bien eliminado (10, 32); así como en el reforzamiento de las medidas de higiene y manejo del hato (10, 32, 43).

El muestreo de los animales en busca de nuevas infecciones debe realizarse al inicio de su lactación, y repetirse cada 4 semanas (10). Cuando el hato haya evolucionado satisfactoriamente, los muestreos pueden hacerse cada 6 meses a nivel de tanque (43).

d). TRATAMIENTO DE MASTITIS POR MICOPLASMA

Un importante rasgo de la mastitis por micoplasma, y que ha sido señalado como característico por varios autores (8, 10, 11, 32, 52), es su pobre o nula respuesta al tratamiento; del mismo modo, en los reportes de casos de mastitis por éste microorganismo, ha quedado establecida la ineficiencia de los tratamientos utilizados.

Así, Hernández y col. (1984) indican que "todo tipo de tratamientos fue utilizado sin éxito" en un hato que sufrió un brote de mastitis por M. bovis. Aunque no indica el tipo de tratamiento utilizado.

Antes, Bar-Moshe (1964) reportó un caso en el cual el tratamiento con antibióticos fue ineficaz, indicando que sólo después de un estricto programa de higiene en el ordeño, y de la separación de animales afectados, la enfermedad pudo ser controlada, mencionando que un año - después las ubres estaban libres de micoplasmas.

Por otra parte, Ruhnke (1976) concluye después de un estudio de la enfermedad que "ninguna vaca responde al tratamiento con ninguna de la gran variedad de preparaciones intramamarias usadas por los granjeros".

También Pomerat y col. (1985) describen un brote de mastitis por M. bovis en el cual se utilizaron cloxacilina, espiramicina y tilosina - sin éxito.

En 1978, Counter reporta un caso de mastitis por M. bovigentialium y A. laidlawii en el que fueron afectadas 75 de 200 vacas. En éste caso se utilizaron diversos tratamientos intramamarios tanto solos como en combinaciones que incluían: cloranfenicol, cloxacilina, nitrofurazona y eritromicina. Después de 4 meses, solo 8 vacas habían respondido dentro de la primera semana de tratamiento; 7 retornaron a la normalidad en un periodo largo y variable; 14 vacas habían sido retiradas del hato; 8 estaban en tratamiento todavía, pero 38 no habían tenido respuesta. 20 vacas perdieron la leche durante el resto de la lactación incluyendo 8 vacas y 3 vaquillas dentro de los primeros 2 meses postparto. Todo esto produjo pérdidas de entre 8000 y 10000 galones de leche durante el brote.

Así mismo, Gourley y Wyld (1978) reportando un brote de mastitis por M. canadense, indican que el tratamiento más efectivo fue oxitetraciclina

aplicada tanto intramamaria como parenteralmente. Aunque también hubo respuesta a cloxacilina y a ampicilina/cloxacilina. Sin embargo, la enfermedad continuó difundiéndose y hubo incluso recurrencias en casos - tratados.

Boughton y col. (1978) mencionan que no existe un tratamiento de - valor práctico y que se ha sugerido que ciertas preparaciones intrama- marias pueden exacerbar la enfermedad.

Jasper (1977), sostiene la misma opinión, señalando que el trata- miento parece no tener efecto para curar el cuadro clínico o eliminar al organismo; y especifica que las preparaciones de antibióticos sus- pendidos en emulsión aceite en agua incrementan la severidad de la mag- titis.

Por otro lado, estudios in vitro arrojan resultados muy variables para eritromicina, oxitetraciclina, clortetraciclina, neomicina, espi- ramicina, estreptomina y dihidroestreptomina evaluados frente a - M. bovis. Sin embargo, se reporta que éste ha sido encontrado sensible a tilosina, tetraciclina, kanamicina, nitrofurazona, novobiocina y tian- fenicol (10).

Estudios en la farmacocinética de algunos antibióticos han sugerido que la infusión intramamaria de eritromicina, espiramicina y tetraci- cina (500 mg en solución acuosa) han tenido efectos micoplasmicidas - por algún tiempo (10).

Ziv (citado en 10) estudió los niveles de tetraciclina y espectino

micina, encontrando que éstos fueron suficientes para ser efectivos contra algunos micoplasmas al ser aplicados intramuscularmente.

Diversos tratamientos en los que se ha utilizado tilosina, ya sea sola o combinada, por vía intramuscular y/o intramamaria, han sido ensayados y en general son largos, costosos y de poco valor (10). No obstante, tetraciclina sigue recomendándose para casos de mastitis por micoplasma (8, 53), y tilosina sigue utilizándose sin éxito (46).

Ahora bien, resulta curioso que antibióticos como lincomicina y espectinomicina, que son recomendados ampliamente contra afecciones micoplásmicas por los laboratorios farmacéuticos (51), no hayan sido utilizados preferentemente para el tratamiento de la mastitis causada por micoplasma.

Estos antibióticos han probado su eficiencia contra micoplasmas - aviares (24), porcinos (22, 35), e incluso contra M. bovis cuando son adicionados a semen bovino (25, 61), por lo que bien podrían ser considerados como drogas de elección para el tratamiento de éste tipo de mastitis.

Lincomicina y espectinomicina, así como tetraciclina, interfieren en la síntesis proteica de las bacterias y son consideradas bacteriostáticas (42).

El parámetro que determina la susceptibilidad de los microorganismos a los agentes antimicrobianos se denomina Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) (47, 58, 61). La CMI es la menor concentración de un an-

tibiótico capaz de inhibir el desarrollo visible de un microorganismo (34). Otro indicador utilizado es la Concentración Mínima Bactericida (CMB), la cual se define como la mínima concentración de antibiótico - capaz de "matar" a los microorganismos (34), esto es inhibir irreversiblemente su crecimiento. Ambos se determinan in vitro y, aunque existen variaciones entre los estudios in vitro y los resultados in vivo - (64), resulta obviamente necesario conocer el valor de la CMI de las - drogas para los patógenos que se estén tratando y considerarlo esencial para establecer algún esquema terapéutico (58).

En efecto, al determinar la CMI de una droga se subestiman los - efectos bactericidas del suero, enlace del antibiótico a proteínas plasmáticas y a iones (p.ej. calcio), inactivación del antibiótico por destritus tisulares (p.ej. pus), entre otros (47).

Sin embargo, se demanda que las preparaciones farmacéuticas contengan antibióticos activos contra los microorganismos (11), lo cual se logra sólo si la CMI es alcanzada en el sitio de infección (34).

El valor de la CMI es reconocido por las siguientes razones:

1.- Nos proporciona información sobre la susceptibilidad o resistencia de un microorganismo a un determinado antibiótico (34), lo cual nos ayuda a encontrar fármacos más efectivos (41).

2.- Las concentraciones del antibiótico pueden ser medidas en sangre, orina, leche, etc., de manera que se tenga una relación entre dosis administrada y concentración alcanzada, de éste modo se pueden determinar dosis terapéuticas (41).

3.- Se puede encontrar la variabilidad de sensibilidad de diferentes aislamientos de bacterias de la misma especie a determinado antibiótico (34).

4.- Se puede establecer una relación entre sensibilidad in vitro y respuesta clínica (34).

Por lo anteriormente expuesto, se reconoce la necesidad de aportar mayores conocimientos sobre la eficiencia de diversos antibióticos sobre los patógenos causantes de mastitis, y en éste caso particular, la eficiencia de lincomicina, espectinomina y tetraciclina - contra Mycoplasma bovis.

OBJETIVOS

- 1.- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la -
concentración mínima Bactericida (CMB) de tetraciclina, lin-
comicina y espectinomina contra Mycoplasma bovis.
- 2.- Establecer la diferencia de sensibilidad de los diferentes -
aislamientos de M. bovis a cada uno de los antibióticos estu-
diados.
- 3.- Establecer in vitro cual de los antibióticos evaluados es más
adecuado para el tratamiento de mastitis causada por M. bovis.

MATERIAL Y METODOS:

1. MICROORGANISMO DE PRUEBA.

Se utilizaron 11 aislamientos de M. bovis obtenidos previamente a partir de leche de vacas con mastitis (26), y la cepa de referencia M. bovis 201 (a).

1.1. PREPARACION DE LA SUSPENSION DE M. bovis.

Como medida de la densidad del inóculo se determinaron el número de unidades Cambiadoras de Color (UCC) (55), y el número de Unidades formadoras de Colonias (UFC) (18).

a). Número de UCC. Para determinar el número de UCC se realizaron diluciones dobles de la siguiente manera:

En placas de microtitulación de 96 pozos, fondo en "U" (Nunc), y utilizando una pipeta Pasteur calibrada (25 μ l/gota), se depositaron 25 μ l de medio Friis con tetrazolio en todos los pozos excepto el primero de cada hilera.

- Se agregaron al primero y segundo pozos 25 μ l de cultivo de M. bovis en fase logarítmica de crecimiento (5-7 días). Cada cepa se trabajó por triplicado.

(a) Enviada por los Dres. Donald E. Jasper y Fidel Infante, de la Universidad de California, Davis. Ca.

- Con un microdiluctor de $25 \mu\text{l}$ (Dynatech Laboratories INC), y -- empezando por el segundo pozo, se diluyó el microorganismo a través de -- todos los pozos excepto el número 12.

- Se agregaron a todos los pozos $175 \mu\text{l}$ de medio Friis con tetra-- zolio.

- Las microplacas se cubrieron y se incubaron a 37°C en condiciones de microaerofilia y atmósfera húmeda por 5 - 7 días, después de los cua-- les se hizo la lectura.

- El número de UCC determinado fue ajustado de modo que fuese más práctica la preparación de las diluciones del microorganismo para la -- realización de la prueba.

b). Número de UFC. Este se determinó paralelamente al de UCC. A partir del cultivo de M. bovis, se realizaron diluciones decimales (has-- ta 10^{-4}) en medio Friis con tetrazolio.

- A partir de cada una de estas diluciones se tomaron $10 \mu\text{l}$ y se depositaron sin extender sobre una placa de agar Friis (por duplicado).

- Las placas se incubaron en condiciones de microaerofilia y at-- mósfera húmeda, a 37°C por 5 - 7 días.

- El conteo de UFC se realizó observando directamente las placas -- bajo el microscopio estereoscópico (25 X).

El cultivo de M. bovis se sirvió en viales de 2 ml y se almacenó en congelación a -70°C hasta su uso.

2. MEDIOS DE CULTIVO

a). Medio líquido de Friis (27), modificado:

| | |
|---|--------|
| Caldo PPLO sin cristal violeta (Difco) | 5.0 g |
| Caldo Infusión Cerebro Corazón (Bioxon) | 5.0 g |
| Extracto de Levadura (Bioxon) | 2.0 g |
| Sol. Balanceada de Hanks | 304 ml |
| Agua destilada | 500 ml |

Se mezclan los componentes y se esteriliza en autoclave a 121°C , 15 lbs de presión durante 15 minutos, se deja enfriar hasta una temperatura de $45-50^{\circ}\text{C}$ y en forma aséptica se adicionan 200 ml de suero estéril de caballo, inactivado por calor (56°C , 30 minutos), penicilina G sódica y 5 g de cloruro de 2, 3, 5 -Trifeniltetrazolio (rojo de tetrazolio) disuelto en 18 ml de agua destilada y esterilizado por filtración ($0.22 \mu\text{m}$, Millipore).

Posteriormente se sirve en frascos de 100 ml con tapón de rosca y se incuban por 24 hrs a 37°C para asegurar su esterilidad. Finalmente se almacena a -20°C hasta su uso.

b). Agar Friis (27).

| | |
|--|-------|
| Caldo PPLO sin cristal violeta (Difco) | 5.0 g |
|--|-------|

| | |
|---|--------|
| Agar noble (Difco) | 10.0 g |
| Caldo Infusión Cerebro Corazón (Bioxon) | 5.0 g |
| Extracto de levadura (Bioxon) | 2.0 g |
| Glucosa (Merck) 100% P/v | 10 ml |
| Rojo de fenol (Merck) 0.1% P/v | 8 ml |
| Agua destilada | 500 ml |

- Una vez esterilizado y enfriado a 45-50°C se adicionan 200 ml de suero estéril de caballo, inactivado por calor (56°C, 30 minutos) y penicilina G sódica, se sirve en cajas de Petri, 10 x 100 mm y se incuba para asegurar su esterilidad, posteriormente se almacena en refrigeración a 4°C hasta su uso.

3. ANTIBIOTICOS.

Se evaluó la eficiencia de tetraciclina, lincomicina y espectinomicina contra Mycoplasma bovis.

Preparación de las soluciones stock de antibióticos (38, 62). Se pesó con exactitud la porción de antibiótico necesario para disolverse en 10 ml del solvente adecuado (ver mas adelante), hasta alcanzar una concentración inicial de 1 mg/ml. A continuación se diluyó hasta alcanzar una concentración final que fue 8 veces la más alta concentración a probar (56). La solución se esterilizó por filtración (0.22 μ m, Millipore) y se utilizó dentro del tiempo límite indicado en el siguiente cuadro:

| ANTIBIOTICO | POTENCIA | SOLVENTE DILUENTE | CONC. MAS ALTA A PROBAR | TIEMPO MAXIMO a 4°C |
|---|-----------------------------|------------------------|-------------------------------|------------------------|
| Clorhidrato de Lincomicina (a) | 835 $\mu\text{g}/\text{mg}$ | H ₂ O dest. | 20.48 $\mu\text{g}/\text{ml}$ | 30 días |
| Clorhidrato de Tetraciclina (b) | 550 $\mu\text{g}/\text{mg}$ | HCl 0.1 N | 20.48 $\mu\text{g}/\text{ml}$ | 24 horas |
| Sulfato tetrahi- dratado de espec- tinomicina (a) | 640 $\mu\text{g}/\text{mg}$ | H ₂ O dest. | 20.48 $\mu\text{g}/\text{ml}$ | 30 días |

(a) Upjohn de México, S. A. de C. V.

(b) Laboratorio Central de Salud Pública, Sec. Salud.

A. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA (CMI)

(55, 56).

En placas para microtitulación de 96 pozos, fondo en "U" (Nunc), y utilizando una pipeta Pasteur calibrada (25 μl /gota), se sirven 25 μl de medio Friis con tetrazolio en cada uno de los pozos excepto al primero de cada hilera. Se agregan al primero y segundo pozos 25 μl de la solución stock del antibiótico a probar.

- Usando un microdilutor de 25 μl , y empezando por el segundo pozo, se diluyó el antibiótico a través de todos los pozos excepto el número 12.

- Se inoculan todos los pozos con 175 μl del medio conteniendo al

organismo de prueba en fase logarítmica de crecimiento, el cual ha sido descongelado y estandarizado a 2 UCC; (cada cepa se trabaja por triplicado).

- Se cubren las placas y se incuban a 37°C por 5-7 días en condiciones de microaerofilia y atmósfera húmeda, después de lo cual se realiza la lectura.

La CMI es la máxima dilución de antibiótico en la que no se presenta cambio de color en el medio.

Control de título de cultivo de M. bovis. En placas de microtitulación de las ya descritas, se realizaron diluciones del cultivo de M. bovis equivalentes a 2, 1, 0.5 y 0.25 UCC, con el fin de verificar que el título de los cultivos no sufrió modificaciones. Sólo se permitió una variación de una dilución doble (55) para considerar válida la CMI determinada.

B. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION MINIMA BACTERICIDA (CMB).
(56)

A partir de las placas en las que se determinó la CMI, se transfirieron 0.1 ml de aquellos pozos que mostraron inhibición del crecimiento a un vial conteniendo 2 ml de medio Friis con tetrazolio. Se transfirieron también 0.1 ml del pozo control (sin antibiótico). Los viales fueron incubados a 37°C por un tiempo 2 veces mayor al que requirió el control para reducir el tetrazolio y cambiar el color del medio.

ANALISIS ESTADISTICO

Los resultados del experimento se evaluaron bajo los siguientes -
modelos:

a). Para la CMI

$$Y_{ijkl} = \mu + C_j + A_k + (CA)_{jk} + e_{(ijk)l}$$

Donde: Y_{ijkl} es la variable dependiente (CMI).

μ es la media general

C_j es el efecto de la j -ésima cepa.

$$j = 1, 2, \dots, 12$$

A_k es el efecto del k -ésimo antibiótico.

$$k = 1, 2 \text{ y } 3$$

$(CA)_{jk}$ es el efecto de la interacción entre cepas
y antibiótico.

$e_{(ijk)l}$ es el error aleatorio dentro del modelo.

$$e \sim NI(0, \sqrt{e})$$

b). Para la CMB

$$Y_{ijk} = \mu + C_i + A_j + (CA)_{ij} + e_{(ij)k}$$

Donde: Y_{ijk} es la k -ésima CMB del j -ésimo antibiótico
contra la i -ésima cepa.

μ es la media general

C_i es el efecto de la i -ésima cepa

$$i = 1, 2, \dots, 12$$

- Λ_j es el efecto del j -ésimo antibiótico
 $j = 1, 2 \text{ y } 3$
- $(CA)_{ij}$ es el efecto de la interacción entre cepa
y antibiótico.
- $e_{(ij)k}$ es el error aleatorio dentro del modelo
 $e \sim NI(0, \sigma^2_e)$.

- A cada uno de estos modelos se les realizó análisis de varian-
za por el método de cuadrados mínimos descrito por Searle (54), con el
paquete SAS (Statistical Analysis System) para microcomputadoras.

El criterio utilizado para clasificar a las cepas en base a su -
sensibilidad, fue determinado por el nivel de significancia de la in-
teracción cepa x antibiótico.

RESULTADOS.

Para la concentración mínima inhibitoria (CMI), el análisis de varianza efectuado mostró que tanto cepa y antibiótico, como la interacción entre ambos, fueron altamente significativos dentro del experimento realizado (cuadro 2).

El análisis de medias mínimo cuadráticas para la CMI (cuadro 3), muestra la variabilidad en la sensibilidad de las cepas. Se puede apreciar claramente una cepa muy sensible, nueve cepas de sensibilidad media, y dos más que mostraron baja sensibilidad frente a los antibióticos probados.

En todos los casos, el nivel de significancia de la interacción cepa x antibiótico sirvió de base para la clasificación de las cepas por su sensibilidad.

Frente a lincomicina, particularmente, el 83.33% de las cepas se mostró altamente sensible (CMI de 0.32 a 0.64 $\mu\text{g/ml}$). Sin embargo, el 16.66% fue muy resistente (CMI \geq 40.96 $\mu\text{g/ml}$) (cuadro 4).

Frente a tetraciclina, el 83.33% de las cepas fue sensible o medianamente sensible (CMI entre 1.28 y 3.41 $\mu\text{g/ml}$); una cepa fue altamente sensible (CMI de 0.85 $\mu\text{g/ml}$), y una cepa de baja sensibilidad (CMI de 5.12 $\mu\text{g/ml}$) (cuadro 5).

Frente a espectinomina el 75% de las cepas mostró baja sensibilidad (CMI de 5.12 $\mu\text{g/ml}$), y sólo tres cepas fueron sensibles (CMI entre 1.79 y 2.56 $\mu\text{g/ml}$) (cuadro 6).

El análisis de varianza efectuado para la Concentración Mínima Bactericida (CMB) muestra que no existió diferencia significativa entre los antibióticos ensayados (cuadro 7).

También al determinar dosis bactericidas, se encontró que las cepas mostraron variabilidad en su sensibilidad a los antibióticos probados (cuadro 8); sin embargo, casi todas, a excepción de dos cepas resistentes frente a lincomicina, fueron altamente sensibles.

Así, el 83.33%, 91.66% y 83.33% de las cepas fue altamente sensible frente a lincomicina, espectinomicina y tetraciclina respectivamente, con CMB de 0.64 a 2.98 $\mu\text{g/ml}$ para el primer caso, 2.13 a 5.12 $\mu\text{g/ml}$ en el segundo, y 1.28 a 5.12 $\mu\text{g/ml}$ en el último caso (cuadros 9, 10 y 11).

La densidad del inóculo utilizado para la determinación de la CMI y la CMB se indica en el cuadro 1.

DISCUSION.

El antibiótico para el cual se obtuvieron los valores mas bajos para la CMI fue lincomicina, seguida de tetraciclina y espectinomicina.

La media determinada para la CMI de lincomicina ($7.31 \mu\text{g/ml}$) enmascara esta observación, sin embargo al excluir dos cepas altamente resistentes, este valor desciende hasta $0.58 \mu\text{g/ml}$, bastante menor que $2.65 \mu\text{g/ml}$ y $4.38 \mu\text{g/ml}$ determinados para tetraciclina y espectinomicina respectivamente.

La presencia de cepas de micoplasmas aviarensis resistentes es reportada por Handy y Blanchard (1970), quienes encontraron valores para la CMI de $\geq 20 \mu\text{g/ml}$ en 15.38% de las cepas enfrentadas a espectinomicina. Valores de $\geq 20 \mu\text{g/ml}$ para la CMB fueron encontrados en 55% de las cepas enfrentadas a lincomicina y en 40% de las cepas enfrentadas a espectinomicina.

En 1971, Handy y Miller reportan valores $\geq 20 \mu\text{g/ml}$ para la CMB en 40% de las cepas de Mycoplasma bovis enfrentadas a lincomicina y en 100% de las cepas enfrentadas a espectinomicina.

En ambos trabajos los valores de la CMI y de la CMB para Lincomicina y espectinomicina fueron más altos que los determinados en el presente trabajo. Pero en todos los casos Lincomicina fue más eficiente que espectinomicina.

La combinación de Lincomicina y Espectinomicina en los trabajos citados hizo descender significativamente los valores de la CMI y la

CMB y eliminó la resistencia de las cepas.

También la CMI determinada para tetraciclina ($2.65 \mu\text{g/ml}$) fue menor al $5.5 \mu\text{g/ml}$ encontrado por Poumerat y col. (1985).

La existencia relativamente frecuente de cepas de micoplasma resistentes a antibióticos, podría haber influido de algún modo en la poca eficiencia de los tratamientos en los casos de mastitis. Y dada la alta capacidad de difusión de éste microorganismo, bien podría esperarse que cepas resistentes reinfectaran ubres tratadas, que previamente hayan alojado cepas sensibles a los antibióticos utilizados para controlar los brotes. Sin embargo, éste hecho no ha sido discutido en ninguno de los estudios realizados a la fecha.

Así mismo, el tejido fibroso que se desarrolla rápidamente en éste tipo de mastitis (10) disminuye la accesibilidad de los antibióticos a las áreas afectadas (58).

Está ampliamente demostrado que no hay control de mastitis mediante el uso exclusivo de antibióticos sin embargo, es bien conocida su valiosa ayuda en los tratamientos (43).

Se ha mencionado la importancia de la CMI para el estudio de la sensibilidad de los microorganismos a los antibióticos (34, 41, 58). Sin embargo, también se considera esencial el conocimiento de la farmacocinética de las drogas para la institución de regímenes terapéuticos adecuados (58).

Se reconoce así mismo, que la farmacocinética de las drogas en la

glándula mamaria no está suficientemente entendida (58), por lo que estudios al respecto son requeridos.

La mastitis por micoplasma es un padecimiento poco común en México (63), sin embargo el riesgo de que se incremente está latente dadas las importaciones de ganado que, en el período 1975-1985 alcanzaron las 100,000 cabezas de ganado especializado en la producción de leche, y que llega básicamente de Canadá y Estados Unidos (44).

Es importante por lo tanto alertar a ganaderos y veterinarios, con el fin de que tengan un conocimiento más amplio sobre éste tipo de mastitis, y puedan actuar rápida y eficientemente en presencia de un posible brote (43), ya que, de lo contrario, se corre el riesgo de no poderlo controlar oportunamente.

En general, los laboratorios de diagnóstico veterinario no realizan pruebas de aislamiento para micoplasma de una manera rutinaria en casos de mastitis. Menos aún, se corren pruebas serológicas para determinar la infección por éstos microorganismos. Por lo que los signos clínicos son muy importantes para orientar el diagnóstico (10, 32).

Aunque se ha considerado el tratamiento como ineficaz en casos de mastitis por micoplasmas, la lincomicina ofrece una importante y aún no suficientemente valorada alternativa, del mismo modo que la combinación lincomicina/espectinomicina, cuya sinergia ha sido comprobada (24, 25).

Estudios farmacocinéticos de éstas drogas en la glándula mamaria y las observaciones después de la aplicación práctica en casos especifi-

cos podrían finalmente hacer concluir que estas drogas son o no lo suficientemente eficaces para el tratamiento de mastitis por micoplasma.

LITERATURA CITADA

1. Alcayde Orraca, J. C.: Estudio comparativo de los principales agentes etiológicos causantes de mastitis en la zona de la Laguna, ocurrencia de cuartos afectados y sensibilidad a agentes quimioterapéuticos. Tesis de Lic. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. (1982).
2. Arroyo, G. G., Hernández, A. L. y Pérez, D. M.: Aislamiento de Nocardia asteroides de un brote de mastitis y su sensibilidad a los antibióticos. Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México. pag 35. México, D. F. (1987).
3. Avila, S., Domínguez, J., Ruíz, H., Valdivieso, A. y De la Peña, A.: Evaluación de un brote de mastitis por Mycoplasma bovis y otros agentes etiológicos en un hato productor de leche. Memorias IX Congreso Nacional de Buiatría. p 99. Puebla, Pue., México (1983)
4. Báez Castillo, J. O.: Frecuencia de resistencia a los antibióticos contra diversos patógenos causantes de mastitis. Memorias del VI Congreso Latinoamericano de Buiatría y XIII Congreso Nacional de Buiatría. pag 215-217. México, D. F. (1987).
5. Bar-Moshe, B.: The isolation of Mycoplasma from an outbreak of bovine mastitis in Israel. Refauh Vet. 21: 97-99 (1964).
6. Bennett, R. H. and Jasper, D. E.: Factors associated with differentiation between cattle resistant and susceptible to intramammary challenge exposure with Mycoplasma bovis. Am. J. Vet. Res. 139: 407-416 (1978).
7. Biancardi, G.: Mastite micoplasmica bovina: contributo casistico. Atti. Soc. Ital. Sci. Buiatria 2: 513-517 (1970).
8. Blood, D. C., Henderson, Ja. A. y Rodostits, O. M.: Medicina Veterinaria, 5ta. edición. Nueva Editorial Interamericana. México. (1983).
9. Soethby, J. T., Jasper, D. E. and Thomas, C. E.: Experimental in-

- tramammary inoculation with Mycoplasma bovis in vaccinated and unvaccinated cows: effect on the mycoplasmal infection and cellular inflammatory response. Cornell Vet. 76: 188-197 (1986).
10. Boughton, E.: Mycoplasma bovis mastitis. Vet. Bull. 49: 377-387 (1979).
 11. Boughton, E., and Wilson, C. D.: Mycoplasma bovis mastitis. Vet. Rec. 103: 70-71 (1978).
 12. Chavira Sevilla, F. J.: Frecuencia de mastitis por nocardia en vacas Holstein-Friesan de desecho. Tesis de Lic. Fac. de Med. Vet y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. (1981).
 13. Cottew, G. S.: Mycoplasmas isolated from cattle in Australia. Aust. Vet. J. 46: 378-381 (1970).
 14. Counter, D. E.: A severe outbreak of bovine mastitis associated with Mycoplasma bovigenitalium and Acholeplasma laidlawii. Vet. Rec. 103: 130-131 (1978).
 15. Davidson, I. and Stuart, P.: Isolation of a Mycoplasma-like organism from an outbreak of bovine mastitis. Vet. Rec. 72: 766 (1960).
 16. Davies, A. and Boughton, E.: Mastitis caused by M. agalactiae var. bovis in North Wales. Vet. Rec. 99: 322 (1976).
 17. Dobbins, C. N.: Mastitis losses. J. Am. Vet. Med. Ass. 170: 1129-1132 (1977).
 18. Fallon, R. J. and Whittlestone, P.: Isolation, cultivation and maintenance of mycoplasmas. En Methods in Microbiology Vol. 3-B, p. 211-267. Ed. Norris Ribbons. Academic Press INC. New York. (1969).
 19. García Montoya, J. E.: Estimación de la pérdida de leche producida por la mastitis bovina en los establos de la cuenca del Valle de México. Tesis de Lic. Fac. de Med. Vet y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. (1979).
 20. Gourlay, R. N. and Howard, C. J.: Recovery and identification of bovine mycoplasmas. En Methods in Mycoplasmology vol. II. Ed.

- Razin, S. and Tully, J. G. Academic Press INC. New York. (1983).
21. Gourlay, R. N. and Wyld, S.: Isolation of Mycoplasma canadense - from an outbreak of bovine mastitis in England. Vet. Rec. 103: - 74-75 (1978).
 22. Graham, R., Leus, S. and Jasenger, L.: The effect of Lincomycin - as medicated feed on reduction of incidence and severity of Mycoplasma pneumonia in growing swine. International Pig Veterinary - Society, Ghent, Belgium. (1984).
 23. Hale, H. H., Helmboldt, C. F., Plastridge, W. M. and Stula, E. F.: Bovine mastitis caused by a Mycoplasma species. Cornell Vet. 52: 582-591 (1962).
 24. Hamdy, A. H. and Blanchard, C. J.: In vitro activity of lincomycin and spectinomycin against serotypes of avian mycoplasmas. Appl. - Microbiol. 20: 20-30 (1970).
 25. Hamdy, A. H. and Miller, C. C.: Antibiotics for bovine mycoplasmas. J. Dairy Sci. 54: 1541-1544 (1971).
 26. Hernández, A. L., González, G. A., Campos, R. V., Payan, R. M., - Jaramillo, M. L., y Pérez, D. M.: Reporte sobre un brote de mastitis causado por Mycoplasma bovis en un hato lechero. Memoria X Congreso Nacional de Buiatría, pag. 608-612. Acapulco, Gro., México - (1984).
 27. Hernández, A. L.: Comparación de tres técnicas para el diagnóstico de mastitis causada por Mycoplasma bovis. Tesis de Lic. Facultad - de Estudios Superiores Cuautitlán (FES-C). Universidad Nacional - Autónoma de México. Cuautitlán Izcalli, Edo. de México. (1987).
 28. Jain, N. C.: Common mammary pathogens and factors in infection and mastitis. J. Dairy Sci. 62: 128-139 (1979).
 29. Janzen, J. J.: Economic losses resulting from mastitis. A review. J. Dairy Sci. 53: 1151-1161 (1970).
 30. Jaramillo, M. L., Aguilar, R. F., Salas, T. E.: Aislamiento de Mycoplasma bovis de neumonías en becerros. Memorias Reunión de In-

- vestigación Pecuaria en México. México, D. F. (1986).
31. Jaramillo, M. L.: Aislamiento y caracterización de micoplasmas obtenidos de pulmones neumónicos de cabras. Tesis de Lic. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FES-C). Universidad Nacional Autónoma de México. Cuautitlán Izcalli, Edo. de México. (1987).
 32. Jasper, D. E.: Mycoplasma and mycoplasma mastitis. J. Am. Vet. Med. Ass. 170: 1167-1172 (1977).
 33. Jawtz, E. Melnick, J. L. y Adelberg, E. A.: Manual de Microbiología Médica, 9a. ed. El Manual Moderno. México, D. F. (1981).
 34. Koneman, E. W.: Diagnóstico Microbiológico. Ed. Médica Panamericana México. (1983).
 35. Lincoporcin (premezcla). Manual técnico de Upjohn de México S. A. de C. V. Tuco División Veterinaria. México, D. F. (sin año de publicación).
 36. Madariaga Aguilar, D. E. y López Alvarez, J.: Bacterias asociadas con la mastitis bovina en establos lecheros que abastecen al Valle de México, D. F. y su sensibilidad a agentes quimioterapéuticos. Memorias del 1er. curso de actualización sobre mastitis bovina. - Fac. de Med. Vet y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México México, D. F. (1978).
 37. Marcos Barrado, A. y Sanz, P.: Aislamiento de Mycoplasma a partir de leche mastítica. Rev. Lat. Am. Microbiol. Parasit. 9: 21-22 - (1967)
 38. Merino Alcántara, M.: Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos, 4ta. ed. Secretaría de Salubridad y Asistencia. México. (1974).
 39. Murillo Saldaña, E.: Aislamiento e identificación de levaduras en leche de vacas clínicamente afectadas por mastitis. Tesis de Lic. Fac. de Med. Vet y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. (1978).
 40. Murillo, S. E., Pérez, D. M. y Jaramillo, M.-L.: Informes de Inves

- tigación (no publicados). Inst. Nac. de Invest. Pec. (INIP). México (1982).
41. Pérez, D.: Mastitis en Ganado Lechero. En Manual sobre ganado lechero. Ed. Pérez, D. M., pag 697-770. Editorial Diana. México - (1982).
 42. Pérez, D. M., Campos, R. V.: Algunos procedimientos para la prevención y tratamiento de mastitis. Manual sobre la glándula mamaria. No. 5 fascículo 2. Ed. Pérez, D. M. Técnica y Productos Agropecuarios Texcoco, S. A., Texcoco, Edo. de México. (1964).
 43. Pérez, D. M. y Hernández, A. L.: Mastitis causada por micoplasma México-Holstein 18: 30-34 (1986).
 44. Pérez, D. M. y Payan, R. M.: La Ganadería lechera en México y en el Mundo, Estadísticas, hechos, Programas de desarrollo, INIFAP - SARH. México (1985)
 45. Pérez, M. J.: Principales gérmenes aislados en México como causas de mastitis. Memorias del Ier. curso de actualización sobre mastitis bovina. Fac. de Med. Vet y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. (1978).
 46. Pourmarat, F., Perrin, M., Martel, J. L. et. Lacombe, J. P.: Etude D'un foyer de mammites à Mycoplasma bovis. Rec. Vet. Med. 161: 649 654 (1965).
 47. Prescott, J. F. and Baggot, J. D.: Antimicrobial susceptibility - testing and antimicrobial drug dosage. J. Am. Vet. Med. Ass. 187: 363-368 (1985).
 48. Razin, S.: The mycoplasmas. Microbiol. Rev. 42: 414-470 (1978).
 49. Razin, S. and Tully, J. G.: Methods in Mycoplasmaology, vol II - pags. 495-497. Academic Press INC. New York (1983).
 50. Rivera González, F. E.: Pérdidas económicas por mastitis. Tesis de Lic. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. (1977).
 51. Rosenstein, E.: Prontuario de especialidades Veterinarias, 9a. ed.

- Centro Profesional de Publicaciones, S. A., México. (1985).
52. Ruhnke, H. L., Thawley, D. and Nelson, F. C.: Bovine mastitis in Ontario due to Mycoplasma agalactiae subsp. bovis. Can. J. Comp. Med. 40: 142-148 (1976).
 53. Schalm, O. W., Carroll, E. J. and Jain, N. C.: Bovine mastitis - Lea and Febiger. Philadelphia. (1971).
 54. Searle, S. R. Linear models. John Wiley and Sons INC. New York - (1971).
 55. Senterfit, L. E.: Tetrazolium reduction inhibition. En Methods in Mycoplasmaology, vol I. ed. Razin, S. and Tully, J. G. Academic Press INC. New York. (1983).
 56. Senterfit, L. B.: Antibiotic sensitivity testing of mycoplasmas. En Methods in Mycoplasmaology, vol II. Ed. Razin, S. and Tully, J. G. Academic Press INC. New York. (1983).
 57. Shinizu, T. and Nagatomo, H.: Isolation of Mycoplasma and unstable L-forms from sporadic bovine mastitis. Jap. J. Vet. Sci. 39: 581-585 (1977).
 58. Soback, S.: Therapeutic success or failure in mastitis therapy. A pharmacokinetic approach. 26th. Annual Meeting. pags. 20-23 National Mastitis Council INC. Orlando, Flo. (1987).
 59. Stuart, P., Davidson, I., Salun, G., Edgson, F. A. and Howell, D.: Bovine mastitis caused by Mycoplasma. Vet. Rec. 75: 59-64 (1960).
 60. Thomas, C. B., Jasper, D. E.: Mycoplasma mastitis and the herd size factor. Can. Vet. 36: 15-16 (1982).
 61. Truscott, R. B. and Ruhnke, H. L.: The effect of antibiotics against bovine mycoplasmas and ureaplasmas. Can. J. Comp. Vet. 48: 171-174 (1984).
 62. United States Pharmacopoeial Convention: The United States Pharmacopoeia, 20th ed. United States Pharmacopoeial Convention INC. Rockville Md. (1980).

63. Valdés, O. O.-y De la Fuente, E. G.: Políticas oficiales para el control de la mastitis bovina en la República Mexicana. Memorias del 1er. curso de actualización sobre mastitis bovina. Fac. de - Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México D. F. (1978).
64. Ziv, G.-M.: Pharmacokinetic aspects of mastitis, therapy, I. Parenteral treatment. Veterinary Medicine/ Small Animal Clinician. Agri. Practice. 75: 277-290 (1979).

CUADRO 1. Densidad de inóculo utilizado para la determinación de la CMI y la CMB.

| CEPA | 2 UCC* | No. UFC* |
|------|-------------|-----------|
| 3 | 1:7500 | 150.66 |
| 22 | 1:235000 | 5400.0 |
| 54 | 1:235000 | 17940 |
| 117 | 1:102400 | 25500 |
| 135 | 1:6400 | 1200 |
| 201 | 1:512000 | 24000 |
| 242 | 1:152900000 | 9400000 |
| 318 | 1:1024000 | 69829.1 |
| 323 | 1:19100000 | 959263 |
| 568 | 1:9500 | 2201.82 |
| 659 | 1:135000 | 103820.8 |
| 605 | 1:170000 | 87158.211 |

* Ajustado.

El título (1 UCC) es la dilución más alta en la cual el microorganismo fué capaz de reducir el tetrazolio.

Tanto el número de UFC, como el de UCC son el promedio de las repeticiones.

CUADRO 2. Concentración mínima inhibitoria, análisis de varianza.

| ORIGEN DE LA VARIACION | GRADOS DE LIBERTAD | CUADROS MEDIOS | SIGNIFICANCIA |
|------------------------|--------------------|----------------|---------------|
| CEPA | 11 | 219.27 | ** |
| ANTIBIOTICO | 2 | 199.54 | ** |
| CEPA X ANTIBIOTICO | 22 | 266.1 | ** |
| ERROR | 72 | 0.978 | |
| TOTAL CORREGIDO | 107 | | |

** Altamente significativo ($P < 0.01$).

CUADRO 3. Conc. Mínima inhibitoria (CMI), medias mínimo cuadráticas - de las cepas.

| CEPA | MEDIAS MINIMO CUADRATICAS | ERROR ESTANDAR | SIGNIFICANCIA |
|------|---------------------------|----------------|---------------|
| 3 | 1.058 | 0.329 | a |
| 22 | 3.05 | 0.329 | b |
| 54 | 3.62 | 0.329 | b |
| 117 | 15.64 | 0.329 | c |
| 135 | 2.45 | 0.329 | b |
| 201 | 2.77 | 0.329 | b |
| 242 | 14.86 | 0.329 | c |
| 318 | 2.48 | 0.329 | b |
| 323 | 3.02 | 0.329 | b |
| 568 | 2.24 | 0.329 | b |
| 605 | 3.05 | 0.329 | b |
| 659 | 3.05 | 0.329 | b |

a, b, c, Literales diferentes denotan diferencia significativa ($P < 0.05$).

- 39 -
 INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
 DIVISION DE LA QUIMICA ORGANICA

CUADRO 4. Efecto de cepa por antibiótico para Lincomicina (CMI)

| ANTIBIOTICO | CEPA | MEDIA | SIGNIFICANCIA | SENSIBILIDAD | ERROR ESTANDAR |
|-------------|------|-------|---------------|--------------|----------------|
| Lincomicina | 568 | 0.32 | a | +++ | 0.57 |
| | 3 | 0.533 | ab | +++ | 0.57 |
| | 135 | 0.533 | ab | +++ | 0.57 |
| | 323 | 0.533 | ab | +++ | 0.57 |
| | 22 | 0.64 | ab | +++ | 0.57 |
| | 54 | 0.64 | ab | +++ | 0.57 |
| | 201 | 0.64 | ab | +++ | 0.57 |
| | 318 | 0.64 | ab | +++ | 0.57 |
| | 605 | 0.64 | ab | +++ | 0.57 |
| | 659 | 0.64 | ab | +++ | 0.57 |
| | 117 | 40.96 | f | - | 0.57 |
| | 242 | 40.96 | f | - | 0.57 |

a, b, f, Literales diferentes denotan diferencia significativa ($P < 0.05$).

+++ Muy sensible

- Muy resistente

CUADRO 5. Efecto de cepa por antibiótico para Tetraciclina (CMI).

| ANTIBIOTICO | CEPA | MEDIA | SIGNIFICANCIA | SENSIBILIDAD | ERROR ESTANDAR |
|--------------|------|-------|---------------|--------------|----------------|
| Tetraciclina | 3 | 0.85 | ab | +++ + | 0.57 |
| | 568 | 1.28 | abc | +++ + | 0.57 |
| | 242 | 1.49 | abc | +++ + | 0.57 |
| | 135 | 1.70 | abc | +++ + | 0.57 |
| | 318 | 1.70 | abc | +++ + | 0.57 |
| | 201 | 2.56 | cd | +++ + | 0.57 |
| | 22 | 3.41 | d | ++ | 0.57 |
| | 117 | 3.41 | d | ++ | 0.57 |
| | 323 | 3.41 | d | ++ | 0.57 |
| | 605 | 3.41 | d | ++ | 0.57 |
| | 659 | 3.41 | d | ++ | 0.57 |
| | 54 | 5.12 | e | + | 0.57 |

a, b, c, d, e, Literales diferentes denotan diferencia significativa (P <0.05)

+++ + Muy sensible

+++ Sensible

++ Medianamente sensible

+ Baja sensibilidad

CUADRO 6. Efecto de cepa por antibiótico para Espectinomicina (CMI)

| ANTIBIOTICO | CEPA | MEDIA | SIGNIFICANCIA | SENSIBILIDAD | ERROR ESTANDAR |
|-----------------|------|-------|---------------|--------------|----------------|
| Espectinomicina | 3 | 1.79 | abc | +++ | 0.57 |
| | 242 | 2.13 | bcd | +++ | 0.57 |
| | 117 | 2.56 | cd | +++ | 0.57 |
| | 22 | 5.12 | e | + | 0.57 |
| | 54 | 5.12 | e | + | 0.57 |
| | 135 | 5.12 | e | + | 0.57 |
| | 201 | 5.12 | e | + | 0.57 |
| | 318 | 5.12 | e | + | 0.57 |
| | 323 | 5.12 | e | + | 0.57 |
| | 568 | 5.12 | e | + | 0.57 |
| | 605 | 5.12 | e | + | 0.57 |
| 659 | 5.12 | e | + | 0.57 | |

a, b, c, d, e, Literales diferentes denotan diferencia significativa ($P < 0.05$).

+++ Sensible

+ Baja sensibilidad.

CUADRO 7. Concentración mínima Bactericida, Análisis de varianza.

| ORIGEN DE LA VARIACION | GRADOS DE LIBERTAD | CUADROS MEDIOS | SIGNIFICANCIA |
|------------------------|--------------------|----------------|---------------|
| Cepa | 11 | 247.71 | ** |
| Antibiótico | 2 | 61.74 | |
| Cepa por antibiótico | 22 | 365.04 | ** |
| Error | 72 | 34.56 | |
| Total corregido | 107 | | |

** Altamente significativo

(P < 0.01)

CUADRO 8. Conc. Mínima Bactericida medias mínimo cuadráticas de cepas.

| CEPAS | MEDIAS MINIMO CUADRATICAS | ERROR ESTANDAR | SIGNIFICANCIA |
|-------|---------------------------|----------------|---------------|
| 3 | 11.52 | 1.95 | b |
| 22 | 11.44 | 1.95 | b |
| 54 | 3.76 | 1.95 | a |
| 117 | 16.21 | 1.95 | b |
| 135 | 2.70 | 1.95 | a |
| 201 | 3.27 | 1.95 | a |
| 242 | 14.86 | 1.95 | b |
| 318 | 2.77 | 1.95 | a |
| 323 | 3.41 | 1.95 | a |
| 568 | 2.70 | 1.95 | a |
| 605 | 3.05 | 1.95 | a |
| 659 | 3.84 | 1.95 | a |

a, b, Literales diferentes denotan diferencia significativa. ($P < 0.05$).

CUADRO 9. Efecto de cepa por antibiótico para Lincomicina (CMB).

| ANTIBIOTICO | CEPA | MEDIA | SIGNIFICANCIA | SENSIBILIDAD | ERROR ESTANDAR |
|-------------|------|-------|---------------|--------------|----------------|
| Lincomicina | 605 | 0.64 | a | ++++ | 3.39 |
| | 135 | 0.85 | a | ++++ | 3.39 |
| | 22 | 1.06 | a | ++++ | 3.39 |
| | 54 | 1.06 | a | ++++ | 3.39 |
| | 3 | 1.28 | a | ++++ | 3.39 |
| | 318 | 1.49 | a | ++++ | 3.39 |
| | 323 | 1.70 | a | ++++ | 3.39 |
| | 568 | 1.70 | a | ++++ | 3.39 |
| | 201 | 2.13 | a | ++++ | 3.39 |
| | 659 | 2.98 | a | ++++ | 3.39 |
| | 242 | 40.96 | d | - | 3.39 |
| | 117 | 40.96 | d | - | 3.39 |

a, d, Literales diferentes denotan diferencia significativa. ($P < 0.05$).

++++ Muy sensible

- Resistente

CUADRO 10. Efecto de cepa por antibiótico para Tetraciclina (CMB).

| ANTIBIOTICO | CEPA | MEDIA | SIGNIFICANCIA | SENSIBILIDAD | ERROR ESTANDAR |
|--------------|------|-------|---------------|--------------|----------------|
| Tetraciclina | 568 | 1.28 | a | ++++ | 3.39 |
| | 242 | 1.49 | a | ++++ | 3.39 |
| | 318 | 1.70 | a | ++++ | 3.39 |
| | 135 | 2.13 | a | ++++ | 3.39 |
| | 201 | 2.56 | a | ++++ | 3.39 |
| | 323 | 3.41 | a | ++++ | 3.39 |
| | 605 | 3.41 | a | ++++ | 3.39 |
| | 659 | 3.41 | a | ++++ | 3.39 |
| | 117 | 4.20 | a | ++++ | 3.39 |
| | 54 | 5.12 | a | ++++ | 3.39 |
| | 22 | 16.21 | b | + | 3.39 |
| | 3 | 30.72 | c | - | 3.39 |

a,b, c, Literales diferentes denotan diferencia significativa. ($P < 0.05$).

++++ Muy sensible + baja sensibilidad - Resistente

CUADRO 11. Efecto de cepa por antibiótico para espectinomicina (CMB).

| ANTIBIOTICO | CEPA | MEDIA | SIGNIFICANCIA | SENSIBILIDAD |
|-----------------|------|-------|---------------|--------------|
| Espectinomicina | 242 | 2.13 | a | ++++ |
| | 3 | 2.56 | a | ++++ |
| | 117 | 3.41 | a | ++++ |
| | 54 | 5.12 | a | ++++ |
| | 135 | 5.12 | a | ++++ |
| | 201 | 5.12 | a | ++++ |
| | 318 | 5.12 | a | ++++ |
| | 323 | 5.12 | a | ++++ |
| | 568 | 5.12 | a | ++++ |
| | 605 | 5.12 | a | ++++ |
| | 659 | 5.12 | a | ++++ |
| | 22 | 17.06 | b | + |

a, b, Literales diferentes denotan diferencia significativa. ($P < 0.05$).

++++ Muy sensible

+ baja Sensibilidad