

22  
2oje



**Universidad Nacional Autónoma  
de México**



**Facultad de Estudios Superiores  
CUAUTITLAN**

**“Determinación de la Concentración mínima inhibitoria  
de tres Quinolonas para Actinobacillus pleuropneumoniae  
(serotipo 1, 3, 5, y 7)”**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE**  
**QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**  
**P R E S E N T A**  
**OLIVIA ESTELA HERNANDEZ MORALES**

**DIRECTORES**  
**DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO**  
**M. en C. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA**

Cuautitlán Izcalli, Edo. de México  
**TESIS CON**  
**FALLA DE ORIGEN**

1994  
**TESIS CON**  
**FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

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



ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES  
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN  
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Caballos  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la F.E.S. - C.

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

" Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria  
de tres Quinolonas para Actinobacillus pleuropneumoniae  
( serotipo 1, 3, 5 y 7)."

que presenta la pasante: Olivia Estela Hernández Morales  
con número de cuentas: 8539921-5 para obtener el TITULO de:  
Química Farmacéutica Biológica.

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

A T E N T A M E N T E .  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 24 de Marzo de 1994

PRESIDENTE	<u>M.V.Z Gerardo Cruz Jiménez</u>	
VOCAL	<u>Q.F.I. Andrea Becerril Osnaya</u>	
SECRETARIO	<u>M. en C. Susana E. Mendoza Elvira</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>M.V.Z Tonatihu Cruz Sánchez</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>M. en C. Stella Maris Reginensi Rivero</u>	

## DEDICATORIAS

A mi Madre

En especial a ella, por su apoyo y amor brindado durante mi formación como mujer y profesionista.

Recuerdo a mis abuelitos Catalina y Venancio que gracias a su comprensión y cariño he realizado una de mis metas.

Y a todas aquellas personas que en algún momento de mi camino, me brindarán apoyo y confianza.

## AGRADECIMIENTOS

De manera muy especial a la Dra Susana E. Mendoza Elvira y al Dr. Abel Ciprián Carrasco, que confiarón en mí, mil gracias.

A todos los maestros que me brindaron sus conocimientos durante mi estancia en esta facultad.

A quienes quien con su ayuda contribuyeron a este trabajo mil gracias a, Q.F.B Carolina Moreno (por su asesoría en el Espectrofotometro) Q.F.B Rafael Hernández (por su diseño en la gráficas), Q.F.B Jacobo Garibay y al Sr. Rodolfo Robles (por su apoyo en el material fotográfico, al Sr Ignacio Garcia (por su ayuda en la revisión bibliográfica) y al Sr. Gabino Sánchez Galindo (por su ayuda incondicional).

A mis amigas de esta facultad por su amistad gracias, Angelica, Araceli, Edith, Lolita, Lupita y Rosalinda.

El presente trabajo se realizó en la Coordinación General de Estudios de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México. En el laboratorio de Virología, bajo la dirección de la Dr. Susana Mendoza Elvira y el Dr. Abel Ciprian Carrasco.

Proyecto financiado por Avimex S.A de C.V.

# I N D I C E

Pag No

Resumen.....	1
I. INTRODUCCION.....	1
1.1. Definición.....	1
1.2. Distribución e Importancia.....	1
1.3. Patogenia.....	3
1.4. Etiología.....	4
1.5. Propiedades Morfológicas y Bioquímicas.....	6
1.6. Composición y Factores de Virulencia.....	9
1.6.1. Cápsula.....	9
1.6.2. Fimbrias citoadherentes.....	11
1.6.3. Lipopolisacáridos.....	12
1.6.4. Proteínas de membranas.....	13
1.6.5. Exotoxinas.....	14
1.6.7. Hemolisinas.....	15
1.6.8. Pleurotoxina.....	16
1.6.9. Otros factores.....	17
1.7. Quimioterapia para la Pleuroneumonía Contagiosa Porcina (PCP).....	19
1.7.1. Quinolonas.....	21
1.7.1.1. Espectro de actividad.....	24
1.7.1.2. Mecanismo y Resistencia Bacteriana.....	25
1.7.1.3. Toxicidad.....	26
II. OBJETIVOS.....	28
III. Materiales y Métodos.....	29
3.0. Material Biológico.....	29
3.1. Medios de Cultivo.....	29
3.2. Preparación del antibiótico.....	30
3.3. Preparación del microorganismo.....	30
3.4. Desarrollo experimental.....	31
3.5. Valoración Microbiológica por el Método Cilindro- Placa.....	32
3.6. Valoración Microbiológica por el Método Turbidimétrico.....	32
3.7. Estudio Estadístico.....	33
IV. RESULTADOS.....	34
V. DISCUSION.....	59
VI. CONCLUSIONES.....	71
VII. BIBLIOGRAFIA.....	72

## RESUMEN

En este trabajo se determinó la actividad microbiológica de tres antimicrobianos sobre el microorganismo de prueba A. pleuropneumoniae. Se utilizaron tres quimioterapéuticos:

(A) FLOXACIN\*\* (quinolona de tercera generación); (B) FX-PLUS\*\* y

(C) CRONI-MEX\*\* (quinolonas de segunda generación), (M.R. AVIMEX,

S.A. DE C.V.). Se trabajaron con 4 serotipos de A. pleuropneumoniae

1, 3, 5 y 7; Los medios de cultivo utilizados fueron placas de

Agar infusión cerebro corazón o caldo soya tripticasa con extracto

de levadura. Con los 3 antibióticos se prepararon las

concentraciones de 10 a 100 ug/ml, tomando en cuenta la

concentración del principio activo. La metodología empleada para la

valoración microbiológica fue, Cilindro-placa y Turbidimetría para

determinar el MIC 90. De acuerdo al estudio estadístico de ANOVA y

la prueba de Tukey, el antibiótico que dio mejores resultados por

el método cilindro placa fue: para el serotipo 1 el A, para el

serotipo 3 el A y B, para los serotipos 5 y 7 el A. Con el método

turbidimétrico, se encontró que para el serotipo 1 los tres

antibióticos presentaron una semejante actividad; para los

serotipos 3 y 5 fueron los antibióticos A y B, mientras que para el

serotipo 7 fue el antibiótico A; El serotipo que así presentó

mayor sensibilidad a estos antimicrobianos fue el 5. Los

compuestos de tercera generación representan una esperanza para

solucionar los problemas respiratorios bacterianos, como la

Pleuropneumonia Contagiosa Porcina, dado el desarrollo mostrado a

la fecha, pronto aparecerán nuevas quinolonas.

## I. INTRODUCCION

### 1. PLEURONEUMONIA CONTAGIOSA PORCINA

#### 1.1 Definición

La Pleuroneumonía Contagiosa Porcina (PCP) es una enfermedad devastadora, produce en los cerdos susceptibles una alta mortalidad y pérdidas económicas, debido a una pobre conversión alimenticia en los animales infectados crónicamente. La enfermedad puede variar desde un curso hiperagudo hasta el crónico, en donde la lesión aguda característica es una neumonía hemorrágica necrosante, asociada a una pleuritis fibrinosa, mientras que la lesión crónica se distingue por un tejido pulmonar consolidado, infartado y encapsulado.

#### 1.2 DISTRIBUCION e IMPORTANCIA

La (PCP), esta ampliamente distribuida en muchos países, en los cuadros 1 y 2 se muestra los lugares que han aislado, identificado y tipificado los diferentes serotipos de Actinobacillus pleuropneumoniae. En algunos países como Dinamarca se han encontrado casi todos los serotipos (1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11 y 12), prevaleciendo el serotipo 2; en algunos otros países como: Argentina, Irlanda, Rumania, Taiwan y Venezuela han identificado solo un serotipo (1, 8, 5, 5 y 7 respectivamente); mientras que en muchos países no se han identificado.

El impacto que la PCP tiene, radica en los altos costos de producción, que dependiendo de la morbilidad y de la mortalidad, se incrementa por el costo del tratamiento, por el efecto en el crecimiento, por la eficiencia alimenticia y por el decomiso de la canal. Esto varia de acuerdo al serotipo, y a la virulencia de las cepas involucradas, a la sensibilidad a los antimicrobianos disponibles y el precio de estos, condiciones ambientales proporcionadas a los cerdos y el "status" inmunológico de los animales expuestos.

Cuadro 1. Distribución en Norte América de los serotipos de Actinobacillus pleuroneumoniae

PAIS	SEROTIPO							
CANADA	1a	2	3	4	5a	6	7	
E.U.A.	1a	3	4	5a	7			
MEXICO	1a	2	3b	4c	5a	6b	7c	8

Cuadro 2. Distribución en Sudamérica de los serotipos de Actinobacillus pleuroneumoniae

PAIS	SEROTIPO			
ARGENTINA	1a			
VENEZUELA	7			
BRASIL	1	3	4	5a

### 1.3 PATOGENIA

La entidad patológica de la pleuroneumonía del cerdo está claramente definida. Las primeras observaciones de esta enfermedad fueron realizadas por Pattison et, al. (1957), Matthews y Pattison (1961), Olander (1963) y por último Shope (1964).

Desde 1963, A. pleuropneumoniae ha sido aislado con frecuencia como el agente de la Pleuropneumonia severa, y se considera a la PCP como la causa sanitaria de mayor importancia en la baja de productividad de los cerdos, en la etapa de finalización de la engorda. Su epidemiología esta muy relacionada con la industrialización de la producción porcina. Los cinco continentes se encuentran afectados por esta enfermedad, especialmente en las últimas décadas. La enfermedad es fácilmente difusible por el aire, se transmite principalmente por contacto directo de cerdo a cerdo, siendo susceptibles a la misma enfermedad los cerdos de todas las edades. Dependiendo de cada situación la mortalidad puede variar de 0.4 a. 100% (Leman et al 1981).

#### **1.4 ETIOLOGIA.**

En Abril de 1961, un brote de una enfermedad respiratoria severa frecuentemente fatal, fué observado en la Plata, Argentina, donde 4000 cerdos que se encontraban distribuidos en tres granjas separadas, fallecieron aproximadamente 260 animales en un período de 5 semanas (Shope, 1964). Algunos murieron sin haber mostrado signos de enfermedad. La terapia a base de Terramicina fué efectiva. Los animales enfermos que se recuperaron fueron aquellos en que los signos no se mostraban particularmente marcados y en general los animales que sobrevivieron durante 4 días, eventualmente se recuperaron. En Argentina, el Dr. Oscar Massini realizó las necropsias de los cerdos y el análisis de las lesiones macroscópicas mostró que

todos los pulmones tenían neumonía lobular extensa acompañada de pleuritis fibrinosa. La consistencia de la lesión del pulmón al corte, fué firme, edematosa, sanguinolenta y en el primer estadio de hepatización roja. La pleura tenía gran cantidad de fluido teñido de sangre sin fibrina aparente. El otro pulmón estaba relativamente normal.

Shope, con el propósito de completar los 4 postulados de Koch para incriminar al organismo pleomórfico como el agente etiológico de la Pleuroneumonía de Argentina, transfirió tres veces en medio de cultivo el aislamiento de este último pulmón y después lo inoculó a otro cerdo. Este cerdo también se enfermó, murió y desarrollo la misma neumonía lateral del cerdo anterior. Con estos experimentos entre otros, Shope demostró que el agente causante de la enfermedad respiratoria fatal ocurrida en los cerdos de Argentina fué una bacteria del género Haemophilus, llamada Haemophilus pleuropneumoniae últimamente clasificada cómo Actinobacillus pleuropneumoniae y que ningún virus está asociado con esta enfermedad.

Dadas las características de la manifestación patológica de la enfermedad, que es evidentemente contagiosa y porque tiene una entidad etiológica definida Shope la llamo: Pleuroneumonía Contagiosa Porcina (PCP).

### 1.5 PROPIEDADES MORFOLOGICAS Y BIOQUIMICAS

El agente causal fué designado inicialmente como Haemophilus parahemolyticus por sus características similares al H. parahaemoliticus del humano (Greenway, 1981).

Antes de 1978, no se diferenciaba A. pleuropneumoniae del comensal humano, H. parahaemoliticus. Una reacción CAMP positiva y la fermentación de xilosa, ribosa, manosa, galactosa y manitol por A. pleuropneumoniae lo diferencia de H. parahaemolyticus. Además, A. pleuropneumoniae es indol negativo, ureasa y nitrato positivo; la oxidasa es variable (Kilian, 1984). Debido a los estudios realizados sobre las bases fenotípicas y sobre el ácido desoxirribonucleico (ADN) de estas bacterias, hicieron que se transfiriera de la especie Haemophilus pleuropneumoniae a la especie Actinobacillus pleuropneumoniae biovariedad 1 si es dependiente de nicotinamida adenin dinucleotido (NAD) y la especie Pasteurella haemolytica like a la especie Actinobacillus pleuropneumoniae biovariedad 2 si no es dependiente de NAD (Pohl et al, 1983).

El A. pleuropneumoniae es un cocobacilo fermentativo, gram negativo y pleomorfo, con formas filamentosas ocasionales. Generalmente se observa como un bacilo corto y encapsulado que mide de 0.5 a 1.5  $\mu\text{m}$  de largo por 0.3  $\mu\text{m}$  de ancho. Es una bacteria que carece de flagelos no produce esporas, posee fimbrias citoadherentes.

Actinobacillus pleuropneumoniae es una bacteria aerobia o anaerobia, una característica fundamental de este microorganismo

es la de depender de NAD, factor de crecimiento conocido como V, el cual tiene la siguiente fórmula:  $C_{11}, H_{17}, N_1, O_{14}, P_1$ ; no requiere de hemina, conocido como factor de crecimiento X presente en los medios enriquecidos con sangre.

Para los aislamientos primarios es importante que el NAD se lo proporcione "in situ" otro microorganismo, mediante una estria sobre el cultivo sospechoso de Actinobacillus pleuropneumoniae, dicho fenómeno se conoce como satelitismo. Entre los microorganismos que sirven como cepas nodrizas se encuentran: Staphylococcus aureus; Staphylococcus albus; Streptococcus faecalis; especies del género Bacillus y especies del género Pseudomona. El empleo de Staphylococcus aureus nos permite observar además de la dependencia, el fenómeno de Christie, Atkins y Munch Petersen (CAMP), en donde la beta hemolisis de la toxina de la toxina B del Staphylococcus actúa en forma sinérgica con la cohemolisina de Actinobacillus pleuropneumoniae sobre placas de agar sangre (Frey J et al, 1989).

Las colonias en agar infusión cerebro corazón (BHI) con la cepa nodriza, suelen ser muy pequeñas (menores a un milímetro), blanquecinas, brillantes y mucoides; las colonias en agar BHI suplementado con extracto fresco de levadura o NAD se observan de mayor tamaño; se reconocen dos variantes coloniales, una lisa u otra rugosa y a veces adherentes al medio sólido. (Biberstein, 1977).

Cuadro 3. Características Bioquímicas de  
Actinobacillus pleuropneumoniae

Factor V	+
Factor X	-
Catalasa	d
Nitratos	+
Oxidasa	d
Urea	+
Indol	-
Citratos	-
Hemolisis B	+
Xilosa	+
Dextrosa	+
Fructuosa	+
Inositol	-
Fosfatasa alcalina	+

## 1.6 COMPOSICION Y FACTORES DE VIRULENCIA

### 1.6.1 CAPSULA

La cápsula de A. pleuropneumoniae serotipos 1 a 7 ha sido purificada por precipitación del sobrenadante del cultivo, con bromuro hexadeciltrimetilamonio, seguido por la extracción con NaCl, fenol y cromatografía. Cada una está compuesta de unidades repetidas de dos o tres azúcares, tales como glucosa, galactosa, N-acetilglucosamina y N-acetilgalactosamina.

Los grupos fosfatos son responsables de la carga negativa en la mayoría de las cápsulas, excepto en el caso del serotipo 5, que tiene una carga negativa debido al grupo de ácido carboxílico de DMO (Altman y Brisson, 1987).

La cápsula es la responsable de la especificidad del serotipo, en la actualidad se reconocen diez serotipos designados con números arábigos del 1 al 10, se han designado otros dos serotipos 11 y 12, pero aún el estatus del serotipo 11 no está claro.

La cápsula de A. pleuropneumoniae, al igual que las de otras bacterias son inertes biológicamente, no activan la cascada de complemento y no demuestran actividad tóxica por medio de una reacción dérmica de Schwartzman, actividad pirógena, mortalidad de embrión de pollo, o blastogénesis de los linfocitos de la sangre periférica de cerdos no inmunes ( Fenwich y Cullor, 1989).

La cápsula es el componente principal que protege a la célula de la defensa del huésped. A. pleuropneumoniae encapsulado es resistente a la muerte bactericida por parte del anticuerpo y del complemento, aún con el antisuero hiperinmune. En el suero hormonal (que contiene complemento activo), A. pleuropneumoniae es resistente también a la fagocitosis por leucocitos polimorfonucleares.

Como se mencionó antes, la cápsula es responsable de la especificidad del serotipo; en el caso de A. pleuropneumoniae. Los anticuerpos a la cápsula proporcionan protección contra la muerte, pero la protección es inadecuada contra la infección y la enfermedad crónica.

La protección proporcionada por las vacunas muertas es también seroespecífica y se le atribuye a los anticuerpos de la cápsula (Nielsen, 1984). Ciertos serotipos aparentemente son más virulentos que otros. Las variaciones en la virulencia puede relacionarse a la composición y estructura de la cápsula o la cantidad de cápsula adherente a la célula (Jacques et al, 1988), mostrarán que los serotipos más virulentos tienen cápsulas adherentes más grandes, lo que puede detectarse por microscopía electrónica.

Mientras que es claro que se requiere la cápsula para que haya virulencia en A. pleuropneumoniae, todavía no se conoce completamente el mecanismo por el cual la cápsula contribuye a la virulencia.

### 1.6.2 FIMBRIAS CITOADHERENTES

En México se han realizado una serie de trabajos que mostraron que al ser inoculados por nebulización con A. pleuropneumoniae (en una cámara de aerosoles) a cerdos, conejos, ratones y cuyes, solo los cerdos se infectaron y murieron con inoculos que variarón de  $2 \times 10$  hasta  $2 \times 10$  unidades formadoras de colonias/ml (UFC/ml). Estas evidencias muestran la alta especificidad de especie de A. pleuropneumoniae hacia el cerdo, sugiriendo probablemente, que el cerdo posee receptores específicos hacia el factor de adherencia de esta bacteria.

En otros estudios se han identificado A. pleuropneumoniae estructuras semejantes a fimbrias o pilis citoadherentes, denominadas también adhesinas. Sin embargo, no se han encontrado estos apéndices extracelulares en A. pleuropneumoniae cultivados in vitro, y al parecer solo la bacteria expresa estos antígenos en el cerdo. Recientemente se han identificado estas estructuras mediante microscopia electrónica y estudios de patogenicidad en cerdo SPF, en donde se demuestra que A. pleuropneumoniae tiene y presenta factores de adherencia o pilis citoadherentes en el cerdo, mientras que solo se mantienen estos pilis en los primeros pases de la bacteria en medios de cultivo in vitro.

### 1.6.3 LIPOPOLISACARIDO

Las bacterias Gram negativas se caracterizan por presentar una membrana externa, que estructuralmente es idéntica a la membrana celular o interna, solo que en la membrana externa o envoltura celular se encuentra enclavado el lipopolisacárido (LPS).

Se conoce que la mitad de carbohidrato se extiende dentro del ambiente del organismo, mientras que el componente de lípido A es el lípido primario en la hojuela externa de la membrana externa. La composición de la mitad de carbohidratos de los patógenos respiratorios gram negativos (v.g. *Haemophilus* sp) es diferente de la de las bacterias gram negativas entéricas; una diferencia principal es la falta de cadenas laterales O en las primeras.

Altman et al (1987) sin embargo han reportado la estructura de las cadenas laterales O de *A. pleuropneumoniae* serotipos 1, 2, 3 y 6. Para cada serotipo se aislaron cadenas laterales O separadas, oligosacáridos del núcleo y DMO (ácido 3-deoxidimanno-2-octulosónico) libre, después de una hidrólisis ácida leve.

La composición y la estructura de las cadenas laterales "O" del LPS varía entre los serotipos, pero está compuesta de azúcares comunes, galactosa, ramnosa, N-acetilglucosamina y N-acetilgalactosamina. Se ha reportado que existe glucosa y DMO en los oligosacáridos del núcleo de los serotipos 1 y 7. El componente lípido A consiste predominantemente de ácidos grasos, formando aproximadamente el 9.2% del LPS total.

Las propiedades biológicas del LPS se resumen en las siguientes actividades: tiene la actividad biológica clásica de una endotoxina de los gram negativos; el LPS de A. pleuropneumoniae gelifica a los amebocitos del género *Limulus*, induce una reacción positiva en las reacciones dérmicas de Schwartzman, respuestas pirógenas, mortalidad en embriones de pollo y respuestas blastogénicas de los linfocitos de la sangre periférica. El LPS purificado de los diferentes serotipos de *A. pleuropneumoniae*, induce una infiltración de células inflamatorias cuando se inócula a ratones y cerdos por vía respiratoria, observándose una neumonía intersticial multifocal y no la neumonía fibrinohemorrágica necrótica clásica de la PCP. Es probable que el LPS actúe sinérgicamente para intensificar las lesiones causadas por otras tóxicas.

#### 1.6.4 PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA.

El perfil de las proteínas localizadas en la membrana externa, se ha estudiado en todos los serotipos de A. pleuropneumoniae. Basandose en la movilidad de estas proteínas, la migración ocurrió de la siguiente manera: en las regiones de 39 a 44 Kd (kilodaltons); de 16 a 16.5 Kd y en la región de 29 Kd correspondiente a una proteína modificable por el calor, por lo que se han identificado 7 patrones de nueve serotipos probados. Las proteínas de la membrana externa se los serotipos 1 y 9 fueron idénticas (éstos serotipos presentan reacción cruzada por sus antígenos capsulares), así como los serotipos 2 y 6 ( estos

serotipos no cruzan por sus antígenos capsulares), los serotipos 3, 4, 5, 7 y 8 presentaron perfiles proteínicos diferentes, estos serotipos solo cruzan por antígenos capsulares de la siguiente manera: el 3 con el 8, el 4 con el 7 y el 5 que no cruza con los demás.

### 1.6.5 EXOTOXINAS

En los sobrenadantes de los cultivos de A. pleuropneumoniae se ha encontrado actividad tóxica sobre diferentes células, tales como linfocitos y macrófagos alveolares pero principalmente contra glóbulos rojos, esta actividad funcional ha determinado que a esos factores tóxicos se le denominen "hemolisinas" o "citolicinas". Se han identificado tres tipos distintos de actividad en las citotoxinas de A. pleuropneumoniae: Citolicina I (Cly I); Citolicina II (Cly II) y Citolicina III (Cly III). Se han encontrado cepas que son citotóxicas pero no hemolíticas. Se ha encontrado que la citolicina I la producen los serotipos 1, 5, 9 y 11; así mismo la citolicina II la producen prácticamente todos los serotipos (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12); mientras que la citolicina III la producen los serotipos (2, 3, 4, 6 y 8). (Kamp, 1991).

Estas hemolisinas no muestran diferencias antigénicas entre serotipos, aunque son antigénicamente diferentes entre ellas. La actividad hemolítica de esta proteína es probablemente la responsable de las lesiones iniciales de la PCP, caracterizadas por ser hemorrágicas y necróticas.

Se ha descrito una prueba de neutralización de la hemolisina, usando sobrenadante de A. pleuropneumoniae como fuente de hemolisina. Esta prueba ha mostrado varias ventajas sobre las pruebas convencionales como serían: no son serotipo-específicas; permiten diferenciar entre animales vacunados y no vacunados y tienen buena sensibilidad. Sin embargo, tiene problemas de especificidad porque la HLI muestran reacciones cruzadas con una variedad de bacterias en las que se incluyen Escherichia coli, Pasteurella haemolytica y Actinobacillus suis.

El grupo de la Universidad de Minnesota ha modificado esta prueba y la hicieron más simple y específica, la prueba determina anticuerpos neutralizantes de la hemolisina, la presencia de dichos anticuerpos se interpreta como una infección por cepas de campo, diferenciándolos de aquellos anticuerpos producidos por una vacunación.

Aunque no se sabe la importancia práctica, esta prueba se puede realizar fácilmente en laboratorios con pocos recursos técnicos. (Pijoan, 1985).

#### 1.6.7 HEMOLISINAS

Varios investigadores han mostrado que las células de A. pleuropneumoniae y los sobrenadantes en los cultivos son tóxicos para los eritrocitos, macrófagos pulmonares, linfocitos y varias otras células (Bendixen et al, 1981). Aún cuando el sobrenadante de los cultivos es tanto citotóxico como hemolítico, aún no ha quedado claro cuántas toxinas están involucradas en la

toxicidad. Se han identificado cepas que son citotóxicas, pero no hemolíticas. (Rycroft, 1991).

Serológicamente, se ha reportado que la actividad hemolítica es homogénea, mientras que se han identificado 4 tipos distintivos de actividad citotóxica.

La actividad hemolítica en el sobrenadante de los cultivos de A. pleuropneumoniae es altamente inestable, es inactivada por calor, formalina y enzimas proteolíticas y es producida predominantemente en la fase logarítmica media ( Maudsley et al, 1986). Se piensa que la actividad hemolítica extracelular es responsable de las lesiones hemorrágicas y necróticas características de la pleuropneumonía ( Udeze, 1987).

Una cohemolisina que produce un efecto semejante a CAMP en presencia de B tóxica de Staphylococcus ha sido identificada como una proteína de 27 Kd y su gene fue clonado en E. coli. clonaron también esta proteína de un peso molecular semejante (29.5K) y podría ser la misma proteína. La relación de esta hemolisina semejante a CAMP y la actividad hemolítica aún no es conocida.

#### 1.6.8 PLEUROTOXINA

También se ha encontrado durante la fase de crecimiento, en los sobrenadantes de cultivo de A. pleuropneumoniae, efecto tóxico en células adherentes de lavados pulmonares (macrófagos), así como en monocitos circulatorios, pero su efecto es menor sobre células testiculares. Su producción se inhibe por el

oxígeno y el colesterol, es termolábil, es hemolítica y tóxica para los neutrófilos (PMN), es sensible a las proteasas, es una proteína inmunogénica que es neutralizada por los sueros de cerdos convalescientes a PCP.

#### 1.6.9 OTROS FACTORES

Actinobacillus pleuropneumoniae, así como otras especies en el género *Haemophilus*, es extremadamente específico en cuanto al huésped y no se sabe que cause infecciones en otros organismos que no sean los de los cerdos. Aún cuando se han usado ratones como modelos para la forma aguda de la enfermedad, no se ha establecido una verdadera enfermedad y es probable que los ratones mueren debido a los efectos de varias toxinas (Inzana et al, 1988).

La especificidad de A. pleuropneumoniae en cerdos sugeriría que las bacterias tienen factores altamente específicos de adherencia. Sin embargo, todavía no se han identificado tales factores.

Se han identificado estructuras semejantes a pili en las células de A. pleuropneumoniae que han sido fagocitadas por leucocitos polimorfonucleares (Inzana, Workman, 1988), pero tales estructuras no han sido identificadas en las bacterias cultivadas in vitro.

La hemaglutinación es una propiedad de algunos aislados de A. pleuropneumoniae, aún cuando no de todos. La hemaglutinación no es específica de las células sanguíneas de una especie animal dada; de hecho, se han reportado siete diferentes patrones de hemaglutinación, basado en las especies animales de las células sanguíneas aglutinadas. La hemaglutinación no parece ser mediada por los pilis o una superficie hidrofóbica.

Hasta ahora muchos esfuerzos han sido realizados para controlar esta enfermedad, una de ellas es la vacunación, algunas de estas vacunas han sido probadas experimentalmente para proteger de la enfermedad, sin embargo la efectividad de estas vacunas comerciales no han dado buenos resultados en la producción porcícola. La vacunación con células completas, bacterinas, extracto capsular, LPS y proteínas de membrana externa, pueden reducir la mortalidad y morbilidad, pero no previenen la infección o el desarrollo de la enfermedad crónica y no protege contra todos los serotipos.

No se sabe si, la falla de estas vacunas para proveer una protección completa sea debida a la falta de una cantidad suficiente de anticuerpos, falta de anticuerpos antígeno-específico, falta de isotipos apropiados, falta de repuesta local o una combinación de estos factores.

### 1.7 QUIMIOTERAPIA PARA LA PCP

La Quimioterapia para la PCP ha sido reportada por varios autores dando buenos resultados (Libal, 1982), y se considera como uno de los métodos más útiles para controlar la enfermedad.

La susceptibilidad a antibióticos "in vitro" han demostrado que cepas de A. pleuropneumoniae generan resistencia rápidamente. Diversos estudios sugieren que algunas de las cepas resistentes a algunos de los antibióticos llevan un plásmido de resistencia (Watanabe y Fukasawa, 1961). La multiresistencia bacteriana de la quimioterapia de drogas por el descubrimiento del plasmido "R" es un factor extracromosomal, el cual es genéticamente responsable de este fenómeno, dando las primeras observaciones de la transferencia del plasmido R entre bacterias Gram (-). (Mitsuhashi, 1977).

Se han reportado diversos estudios de la susceptibilidad de A. pleuropneumoniae a un gran número de antibióticos como son: penicilina, ampicilina, cefaloxina, estreptomina, kanamicina, furadomicina, gentamicina, cloramfenicol, tiamulina, tilosina etc.

Estudios realizados en Japón sobre la susceptibilidad de A. pleuropneumoniae demostraron que la mayoría de las cepas fueron altamente sensibles a penicilina, ampicilina, cloramfenicol, oxitetraciclina, rifampicina y trimetoprim; Por otra parte estas cepas fueron resistentes a aminoglucósidos, macrólidos, tiamulina y sulfamometoxina.

Así la sensibilidad de A. pleuropneumoniae fue diferente a la observada por enterobacterias y similar para otras especies de Haemophilus (Inoue y Yamamoto, 1984).

Por otra parte se reporta que cepas aisladas entre (1985-1986) mostrarán resistencia a algunos de los antibióticos tales como aminoglucósidos, carbadox, tetraciclinas y tilosina. Las cepas de A. pleuropneumoniae usadas en este estudio mostrarán que los MIC obtenidos tienen una distribución bimodal a Kanamicina, estreptomycin, tetraciclina o tilosina. Los resultados sugieren que algunas de las cepas llevan un plásmido de resistencia (Misubishi, 1977).

Otro estudio llevado a cabo en México (Colmenares, 1988), revela la sensibilidad "in vitro" de varios antimicrobianos y se analizó la presencia de plásmidos en 20 aislamientos de Actinobacillus pleuropneumoniae serotipo 1, obtenidos de cerdos de abasto con pleuroneumonía contagiosa porcina crónica. Todas las cepas fueron 100% resistentes a: ácido oxolínico, ampicilina, clindamicina, cloxacilina, colistina, exitromicina, gentamicina, lincomicina, neomicina, polimixina B y sulfametoxazol-trimetoprim. Las cepas fueron sensibles a ácido nalidíxico (100%).

La resistencia a los antimicrobianos mostrada en estas cepas no estuvo relacionada con plásmidos. La resistencia de A. pleuropneumoniae se debe en algunos casos al uso comercial de antibióticos en la alimentación de los animales para aumentar la ganancia de peso y la eficiencia alimenticia. Esta presión

intensa selectiva por los antibióticos en las granjas han conducido a un aumento para que la bacteria contenga el plasmido R.

En la actualidad la mayoría de los medicamentos que ingresan al mercado veterinario tienen un origen sintético, o por lo menos biosintético. Para que se cuente con una nueva molécula original y con actividad farmacológica superior se requiere haber estudiado por lo menos unas 3,000 moléculas por año en laboratorio de desarrollo, con sistemas de diseño por computadora y retroalimentación de este paso con los bioensayos in vitro e in vivo. Con un equipo especializado se requiere un promedio de 5 años para liberar un medicamento al mercado veterinario. En este momento se conocen los detalles relevantes de la farmacocinética del nuevo fármaco en la especie particular en la que será aplicado, incluyendo también detalles de toxicidad, biodisponibilidad, velocidad de depuración, sinergias y antagonismos, estabilidad, irritación a tejidos, espectro antibacteriano, y muchos otros detalles que permiten liberar una indicación específica.

### 1.7.1 QUINOLONAS

Estas consideraciones son relevantes a las Quinolonas y fluoroquinolonas en función de que en este momento, este grupo representa el rubro comercialmente más productivo de la industria farmacéutica veterinaria.

Leshner citado por ( Albrecht, 1977), puso a la disposición de la comunidad médica en 1960 la primera Quinolona antibacteriana, el ácido nalidíxico que actuaba en las infecciones de las vías urinarias. Con el tiempo se encontró que generaba rápidamente resistencia bacteriana, lo que limitó su uso.

De cualquier manera, el ácido nalidíxico ha sido de gran valor para la quimioterapia de las enfermedades bacterianas en virtud de haber contribuido con el núcleo básico de los compuestos de mayor impacto en la última década, las fluoroquinolonas.

El núcleo básico de las fluoroquinolonas se presenta en la fig 1., en la que se señalan los sitios en los que es posible añadir algún otro radical para buscar nuevas acciones antibacterianas. En la Posición 6, las sustituciones a este nivel con H, F, Cl, Br, CH<sub>3</sub>, CN y NO<sub>2</sub>, indudablemente que el F representó el avance más importantes de las quinolonas de primera generación, haciéndolas de segunda fig 2. Si se quiere hacer una división en las quinolonas tal sustitución es una verdadera marca, ya que con ella se mejora la unión a la ADN girasa en 2 a 17 veces y la penetración celular en 1 a 70 veces con respecto a las quinolonas que no tienen F en la posición 6 (Domagala, J.M 1986).

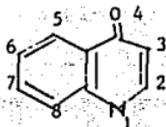


Fig 1. Anillo 4-quinolínico.

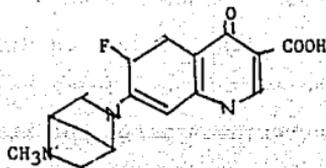


Fig 2. Danofloxacin.

En la posición 7 se han intentado numerosas manipulaciones con mayor o menor éxito. Así como el F en posición 6 distingue a las Quinolonas de segunda generación, en esta posición se distinguen las quinolonas de tercera generación.

Se ha visto que la afinidad por la ADN girasa aumenta de manera directamente proporcional con lo voluminoso del sustituyente. Esto es, moléculas lineales en este radical muestran menos potencia que radicales cíclicos como el de la enrofloxacin y la danofloxacin; esta última es muy voluminosa y liposoluble en función de su grupo diazabicycloalquilo en esta posición (Chu, 1986). Las quinolonas de segunda generación como la norfloxacin, enoxacin y ciprofloxacina tienen un radical piperazin-1-il, mientras que quinolonas de tercera generación, como la ofloxacin, amifloxacin y fleroxacin tienen un anillo 4-metilo-piperazin-1-il.

Hoy día las Quinolonas como antibacterianos son un grupo farmacológico muy importante.

Estos fármacos tienen una potencia prominentemente antibacteriana la cuál es directamente proporcional a su generación, que es; la primera generación de Quinolonas fueron antibacterianos menos potentes que los fármacos obtenidos en la tercera generación. En México se usan 2 quinolonas de tercera generación en medicina veterinaria: la enrofloxacin y la danofloxacin. Posiblemente ingresen en un futuro no lejano otras quinolonas de tercera generación como la sarafloxacin, la lomefloxacin, la fleroxacin, etc.

La farmacocinética de las quinolonas sigue un desarrollo cronológico bien definido; de aquí que, en comparación con la primera y segunda generación de quinolonas, los fármacos de la tercera generación tienen una mejor distribución en tejidos y una vida media más prolongada, lo cuál hace que sean útiles en muchas enfermedades bacterianas. Presentando además pocos efectos adversos, a excepción de daño en cartilago juvenil en perros y caballos particularmente.

#### **1.7.1.1. ESPECTRO DE ACTIVIDAD**

En general las quinolonas de primera generación tienen una actividad limitada y suelen ser activas únicamente contra algunas bacterias Gram negativas. El espectro se aumenta en las de segunda generación, siendo la flumequina la más débil in vitro y sin efecto sobre micoplasmas y quizá la ciprofloxacina la más potente con importante efecto antimicoplasmico in vitro.

En el caso de las Quinolonas de segunda generación hay actividad importante contra Pseudomonas spp, Haemophilus spp, Campylobacter spp, Mycobacterium spp y Staphylococcus spp.

Indudablemente, en medicina veterinaria las más potentes son la fluoroquinolonas de tercera generación. Estas son activas contra todas las bacterias mencionadas y contra Brucella spp, Rickettsias y Plasmodium falciparum. Nuevamente su actividad es menor contra Streptococcus spp y Nocardia spp y casi nula para anaerobios.

Algunas evidencias indican que las fluoroquinolonas pueden tener efectos importantes contra Nocardia asteroides; la ciprofloxacina fue activa contra 50% de las cepas probadas en un estudio y la tosufloxacina (3a generación) fue 100% eficaz contra Nocardia spp. (Hooper, 1985).

#### 1.7.1.2. MECANISMO DE ACCION Y RESISTENCIA BACTERIANA

El sitio de acción de todas las quinolonas y fluoroquinolonas es la ADN girasa o topoisomerasa II, una enzima esencial para la replicación del material genético bacteriano.

Contiene dos subunidades A y dos B. La función de la ADN-girasa es vital para la replicación de los ácidos nucleicos bacterianos.

De manera muy simplificada, se puede decir que dicho material se encuentra apelonado y que la función de la ADN-girasa consiste en convertir en linear dicho material y girarlo en sentido

contrario a la torsión normal de la doble hélice para permitir que el material genético se replique, transcriba, repare y recombine.

Así, la inhibición de estos procesos generará el bloqueo de múltiples funciones celulares, muchas de ellas vitales, de ahí el carácter bactericida de las Quinolonas (Georgopapadaku, 1987). La resistencia bacteriana a agentes como el ácido nalidixico se genera a nivel del locus productor de las fracciones A, de tal suerte que la enzima que se genera no puede ser inhibida por el ácido nalidixico, con resistencia cruzada a otras quinolonas de primera generación y algunas de segunda. No obstante, la acción de agentes 4-quinolínicos con un anillo 6-fluoro-7-piperazínico (esto es, algunas fluoroquinolonas de segunda generación y casi todas las de tercera generación), también incluye la subunidad B, haciendo hipersensible a la ADN-girasa (Cornett y Wagner, 1985).

#### 1.7.1.3. TOXICIDAD

En la actualidad se sabe poco de la toxicidad potencial de las fluoroquinolonas de segunda y tercera generación en animales domesticos productivos como aves, cerdos y bovinos (adultos o becerros). Como dato se comenta que se necesitan más de 5 frascos de 100 ml de las presentaciones comerciales de enrofloxacina o donofloxacina para inducir efectos tóxicos en un cerdo de 10 Kg.

Tampoco se ha detectado que alguna asociación aumente la toxicidad de estos medicamentos en condiciones prácticas en veterinaria. En todo caso, los antiácidos disminuyen la absorción de estos compuestos por quelación limitando su eficacia (Christ, 1988). Aunque se ha descrito la inducción de artropatías o alteraciones de la morfología del cartilago articular en forma de erosiones en animales en crecimiento, esto no ha logrado adquirir relevancia en animales productivos (cerdos, aves y becerros). Más bien, esto tiene particular relevancia en cachorros, gatos en crecimiento y potrillos. Además, el efecto se relaciona generalmente con dosificaciones elevadas y de manera crónica, aunque el inicio de la lesión se puede detectar desde la segunda dosis (Burkhandt, 1990). En la información técnica relacionada con la danofloxacin y la enrofloxacin se especifica que se han hecho pruebas de teratogenicidad, embriotoxicidad y mutagenicidad con resultados de completa inocuidad. En conclusión, las quinolonas son muy poco tóxicas para los animales, en particular bajo las condiciones habituales de su uso.

## II OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL:

Determinar la actividad microbiológica de 3 Quinolonas para Actinobacillus pleuropneumoniae serotipos 1, 3, 5 y 7.

### OBJETIVOS PARTICULARES:

2.1 - Efectuar el método cilindro placa y el método turbidimétrico para determinar la actividad microbiológica de estos antibióticos sobre los serotipos 1, 3, 5 y 7 de A. pleuropneumoniae.

2.2 - Mediante un análisis estadístico ANOVA, se determinara el rango de sensibilidad estos antibióticos contra los diferentes serotipos de A. pleuropneumoniae.

### III. MATERIALES Y METODOS

#### 3.0 MATERIAL BIOLÓGICO.

Los serotipos utilizados fueron donados por "College of Veterinary Medicine", Iowa State University. ATCC 1 p 10, 8-11-88; ATCC 3 p9, 5-8-91; ATCC 5 SCI p7, 1-25-88; Ser 7, 7-7-88, WF 83, SCI AP 6. Se trabajó con 4 serotipos de Actinobacillus pleuropneumoniae, 1, 3, 5 y 7. Las cepas se conservaron a -70 C. y una cepa nodriza de Staphylococcus aureus.

#### 3.1 MEDIOS DE CULTIVO.

a) Los medios de cultivo utilizados fueron placas de Agar sangre, Agar de infusión cerebro corazón y Agar para antibióticos No 11, caldo soya tripticasa (CST) y extracto de levadura.

b) Extracto de levadura (Carter, 1975), 50g de levadura fresca de panadería se suspendieron en 100 ml de KH PO 0.2 M. Se calentó a 80-85 C durante 20 minutos, se clarificó mediante la filtración con cartuchos Millipore "Lifegard" CP-15, se ajustó el pH a 7.6 con una sol. 1 N de NaOH. Se esterilizó por filtración (membranas Millipore, 0.22 um de diámetro) y se almacenó a -20 C hasta su uso.

c) Agar sangre: Se preparó con sangre de carnero desfibrinada al 5%.

### 3.2 PREPARACION DEL ANTIBIOTICO

#### ANTIBIOTICO

A	Floxacin
B	FX-Plus
C	Croni-Mex.

De los tres antibioticos se prepararon las concentraciones correspondientes de 10 a 100 ug/ml, usando como medio diluyente agua destilada, tomando en cuenta la concentración del principio activo indicado en el marbete.

### 3.3 PREPARACION DEL MICROORGANISMO DE PRUEBA.

a) Cepas: de A. pleuropneumoniae (serotipo 1, 3, 5 y 7) se sembraron en Agar de infusión cerebro corazón (BHI), posteriormente se colocó una estria de Staphylococcus aureus, con el objeto de observar la prueba de satelitismo. Después del período de incubación, de estas cajas se tomó una asada y se sembro en cajas de BHI con extracto de levadura.

b) Estandarización de la suspensión.

Después del crecimiento del microorganismo se determinó el factor de dilución con el que se obtenga el 25 % de transmitancia a 530 nm, y se determino la cantidad de (UFC/mL) requerida que debe añadirse a cada 100 ml del medio y mantenido de 45 C a 50 C. El

inoculo se preparo en tubos de caldo soya tripticasa (CST), tomando 1 ml de aquí y colocarlo en una celda se fue ajustando hasta obtener una D.O de 1.5 a 530 nm, dicha densidad representa 10 cfu/ml.

### 3.4 DESARROLLO EXPERIMENTAL

Se emplearon 2 métodos generales de valoración microbiológica: el cilindro placa o de "placa" y el turbidimétrico o de "tubo". El primero se basa en la difusión del antibiótico contenido en un cilindro vertical o disco de papel filtro, a través de una capa de agar solidificado en una caja de petri o placa, en una extensión tal, que el crecimiento del microorganismo agregado se detenga en una área circular o "zona" alrededor del cilindro que contiene la solución del antibiótico. El método turbidimétrico se basa en la inhibición del crecimiento de un cultivo microbiano en una solución uniforme del antibiótico, en un medio fluido que favorece su desarrollo rápido en ausencia del antibiótico. La cinética de la acción bactericida puede realizarse monitoreando el crecimiento de la bacteria con la lectura de densidad óptica o nefelometría. Tales métodos utilizan la habilidad de la dispersión de la luz a través de la turbidez del caldo y puede detectar pequeños cambios en el crecimiento de la bacteria.

CC:

S:

LS:

### 3.5 VALORACION MICROBIOLOGICA POR EL METODO CILINDRO PLACA

Las placas se prepararon en dos etapas. 1.- La capa base consta de 21 ml de ( medio para antibióticos No 11 ), cada caja dejar solidificar sobre una superficie lisa y nivelada, se adicionan 4 ml de medio BHI con levadura el cual es inoculado previamente con 1 ml de la cepa de A. pleuropneumoniae la cual ha sido ajustada a una D.O de 1.5. La segunda capa es distribuida uniformemente en la superficie de la primera capa base una vez solidificado, se colocaron en cada caja 6 penicilindros (USP) a intervalos de 60 en un radio de 2.8 cm, llenando cada cilindro con las diluciones del antibiótico correspondiente y previamente filtrado, se taparon las cajas con tapas adecuadas que absorban la humedad; se incubaron a 37 C por 18 a 24 hrs, se midieron los halos de inhibición con un bernier de aproximación 0.1 mm.

### 3.6 VALORACION MICROBIOLOGICA POR EL METODO TURBIDIMETRICO

Se preparó un stock de 100 ml para cada uno de los antibióticos con una concentración de 100 ug/ml. La preparación del microorganismo prueba es igual como en el paso 3.4. En el día de prueba, se prepararon las concentraciones necesarias por dilución de la solución stock. Se trabajó en serie de tres de diez tubos cada una, las diluciones correspondientes de 10 a 100 ug/ml se realizaron con el medio de cultivo (CST-Levadura), a continuación se agrega el antibiótico y el inculo de la bacteria. Se incluyo un tubo control a cada gradilla, conteniendo 0.5 ml de bacteria sin antibiótico y

un tubo blanco con caldo no inoculado.

Después de 18 ó 24 horas de incubación, se leyó la absorbancia de los tubos de cada gradilla a 530 nm, ajustando previamente el espectrofotómetro en absorbancia cero con un blanco, hasta que se alcanzó estabilidad en la lectura (30 segundos).

### 3.7. ESTUDIO ESTADISTICO

Para interpretar el tamaño de la zona de inhibición, este debe primero estar relacionado con un M.I.C. Los datos obtenidos de las zonas de inhibición fueron graficados contra las concentraciones usadas del antibiótico, realizandose después un estudio estadístico, regresión lineal y analisis de varianza.

## RESULTADOS

## Cilindro-Placa.

En relación a los resultados obtenidos mediante este método para A. pleuropneumoniae serotipo 1 (Cuadro 1A y Gráfica 1, 2 y 3), se muestra el análisis de varianza (ANOVA) para determinar el grado de actividad biológica de los 3 antimicrobianos probados. Para la prueba de Tukey, se utilizaron los resultados obtenidos mediante el ANOVA, los promedios del halo de inhibición, se muestran en el cuadro 1B, que sirvieron para determinar las diferencias entre el grupo de antimicrobianos A, B y C; el orden de magnitud del halo de inhibición fue el siguiente: A (2.67 cm) > B (2.13 cm) > C (1.24 cm), existiendo diferencia significativa. Para determinar el comportamiento de las concentraciones de los tres antimicrobianos, también se realizó la prueba de Tukey con los datos obtenidos de la prueba de ANOVA, que se muestran en el Cuadro 1C y en las Gráficas 1, 2 y 3, en donde se obtuvieron 3 grupos predominantes, el primero fue de 10 a 20 ug/ml; el segundo de 30-40 hasta 70-80 ug/ml y el tercero de 90 a 100 ug/ml.

En relación al A. pleuropneumoniae serotipo 3 (ver Cuadro 2A y Gráfica 4, 5 y 6), se muestra el análisis de varianza (ANOVA) para determinar el grado de actividad biológica de 3 antimicrobianos. Para la prueba de Tukey, se utilizarón los resultados del ANOVA y los promedios del halo de inhibición, se muestran en el Cuadro 2B, que sirvieron para determinar si hubo diferencia significativa entre el grupo de antimicrobianos A, B y

C; el orden de magnitud que existió fue el siguiente: A (2.81 cm) y B (2.67 cm) > C (1.42 cm), en donde para A y B no hubo diferencia significativa con respecto al antimicrobiano C. Para determinar el comportamiento de las concentraciones de los tres antimicrobianos, también se realizó la prueba de Tukey con los datos obtenidos de la prueba de ANOVA, se muestran en el Cuadro 2C y en las gráficas 4, 5 y 6, en donde se obtuvieron 3 grupos importantes, estos fueron: uno de 10 ug/ml, el segundo de 20-80 ug/ml y el tercero de 40-100 ug/ml.

A continuación se muestra el análisis de varianza (ANOVA) para determinar el grado de actividad biológica de 3 quimioterapéuticos contra A. pleuropneumoniae serotipo 5 (ver Cuadro 3A y Gráficas 7, 8 y 9). Al realizarse la prueba de Tukey se utilizaron los resultados obtenidos del ANOVA Cuadro 3A y los promedios del diámetro de inhibición, se muestran en el Cuadro 3B, que sirvieron para determinar las diferencias entre el antimicrobiano A, B y C; el orden de magnitud que se dio fue: A (3.46 cm) > B (2.82 cm) > C (1.61 cm), encontrándose diferencias significativas. Para determinar el comportamiento de las concentraciones de los tres antimicrobianos, también se realizó la prueba de Tukey con los datos de la prueba de ANOVA, que se muestran en el Cuadro 3C y en las Gráficas 7, 8 y 9; originando 3 grupos predominantes, el primero comprendió de 10-20 ug/ml, el segundo de 30-80 ug/ml y el tercero de 50-100 ug/ml.

Para A. pleuropneumoniae serotipo 7 (ver Cuadro 4A y Gráficas 10, 11 y 12), se muestra el análisis de varianza (ANOVA) para determinar el grado de actividad biológica de 3 quimioterapéuticos. Al realizar la prueba de Tukey se utilizaron los resultados obtenidos del ANOVA Cuadro 4A y los promedios del diámetro de inhibición, se muestran en el Cuadro 4B que sirvieron para determinar si hubo diferencia significativa entre los antimicrobianos A, B y C, el orden de magnitud fue el siguiente: A (2.27 cm) > B (1.86 cm) > C (0.86 cm), en el que hubo diferencias significativas para los 3. Para determinar el comportamiento de las concentraciones de los tres antimicrobianos de igual forma se realizó la prueba de Tukey con los datos de la prueba de ANOVA, que se muestran en el Cuadro 4C y en las Gráficas 10, 11 y 12; en donde se obtuvieron 2 grupos predominantes estos fueron: de 10-20 ug/ml y de 30-100 ug/ml.

#### **Turbidimetría.**

En relación a los resultados obtenidos mediante el método turbidimétrico para A. pleuropneumoniae serotipo 1 (ver Cuadro 5A y Gráfica 1, 2 y 3), se muestra el análisis de varianza (ANOVA) para determinar el grado de actividad bactericida de los 3 antimicrobianos probados. Para la prueba de Tukey, se utilizaron los resultados obtenidos mediante el ANOVA y los promedios de las unidades de absorbancia (densidad óptica: DO), se muestran en el Cuadro 5B, que sirvieron para determinar las diferencias entre el

grupo de antimicrobianos A, B y C; el orden de magnitud de la inhibición de crecimiento fue el siguiente: A (0.16 DO) = B (0.16 DO) = C (0.18 DO), no existiendo diferencias significativas. Para determinar el comportamiento de las concentraciones de los tres antimicrobianos, también se realizó la prueba de Tukey con los datos obtenidos de la prueba de ANOVA, y se muestran en el Cuadro 5C y en las Gráficas 1, 2 y 3, en donde se obtuvieron 2 grupos predominantes, el primero que fue de 10 a 20 ug/ml; el segundo de 30-100 ug/ml.

De la misma forma, se muestra el análisis de varianza (ANOVA) para A. pleuropneumoniae serotipo 3 (ver Cuadro 6A y Gráfica 4, 5 y 6), para determinar el grado de actividad bactericida de 3 quimioterapéuticos. Para la prueba de Tukey, se utilizaron los resultados obtenidos mediante el ANOVA y los promedios de las densidades ópticas los cuales se muestran en el Cuadro 6B que permitieron para determinar diferencias significativas entre estos antimicrobianos en estudio; el orden de magnitud de la inhibición de crecimiento fue el siguiente: B (0.16 DO) = A (0.14 DO) y B (0.16 DO) = C (0.19 DO), en donde no hay diferencias significativas de B con A y C. Para determinar el comportamiento de las concentraciones de los tres quimioterapéuticos, también se realizó la prueba de Tukey con los datos obtenidos de la prueba de ANOVA, y se muestran en el Cuadro 6C y en las Gráficas 4, 5 y 6, en donde se obtuvieron 3 grupos importantes, el primero fue de 10-20 ug/ml, el segundo de 20 -50 ug/ml y el tercero de 50 -100 ug/ml.

A continuación se muestran el análisis de varianza (ANOVA), (ver Cuadro 7A, Gráfica 7, 8 y 9), para conocer el grado de actividad bactericida de los 3 antimicrobianos probados contra A. pleuropneumoniae serotipo 5. En la prueba de Tukey, se utilizarán los resultados obtenidos mediante el ANOVA mostrándose los promedios de las densidades ópticas en el Cuadro 6B, con el objeto de determinar diferencias significativas entre estos antimicrobianos; el orden de magnitud de la inhibición de crecimiento fue el siguiente: A (0.14 DO) = B (0.19 DO) y < C (0.31 DO). Resultando que entre A y B no existió diferencia estadística significativa. Se realizó también la prueba de Tukey para determinar el comportamiento de las concentraciones de los tres antimicrobianos utilizando los datos de la prueba de ANOVA, y se muestran en el Cuadro 7C y en las gráficas 7, 8 y 9, en el que se obtuvieron tres grupos predominantes, el primero fue de 10-40 ug/ml, el segundo de 40-80 ug/ml y el tercero de 60-100 ug/ml.

Finalmente se realizó el análisis de varianza ANOVA para A. pleuropneumoniae serotipo 7 (ver Cuadro 8A, Gráfica 10, 11 y 12), para determinar el grado de actividad bactericida que ofrecen estos antimicrobianos. Para la prueba de Tukey, se utilizarán los resultados obtenidos mediante el ANOVA, mostrándose los promedios de las densidades ópticas en el Cuadro 6B, que servirán para determinar diferencias significativas entre estos antimicrobianos; el orden de magnitud de la inhibición de crecimiento fue el siguiente: A (0.095 DO) = B (0.13 DO) y < C (0.18 DO). Resultando que A y B fueron estadísticamente diferentes con respecto al

antimicrobiano C. De igual forma se realizó la prueba de Tukey para determinar el comportamiento de las concentraciones de estos tres antimicrobianos utilizando los datos de la prueba de ANOVA, se muestran en el cuadro 8C y en las Gráficas 10, 11 y 12, obteniéndose 2 grupos importantes que fueron: el primero de 10-30 ug/ml y el segundo de 40-100 ug/ml.

Los resultados obtenidos, después de su análisis estadístico se resumen a continuación en las siguientes gráficas tanto para el método cilindro-placa como para el método turbidimétrico.

Los datos obtenidos de la Valoración Microbiológica por ambos métodos cilindro-placa y turbidimétrico, se graficarón, por serotipo, con cada uno de los tres quimioterapéuticos probados.

En donde se puede observar en general en el caso de turbidimetría a la concentración de 0 ug/ml existe una absorbancia que corresponde al crecimiento de la bacteria en un tiempo de 18 hrs.

Para A. pleuropneumoniae (App) serotipo 1, en el punto correspondiente a 10 ug/ml del quimioterapéutico, se hace presente la inhibición del crecimiento la absorbancia disminuye a casi la mitad, a partir de 20 a 80 ug/ml las absorbancias son muy parecidas formándose una meseta, de 70 a 100 ug/ml disminuye paulatinamente a casi cero de densidad óptica. Las densidades parten de 0.67 hasta 0.009. Y el diametro de la zona de inhibición se incrementa paulatinamente estos van de 2.25 a 3.023 cm.

Para el antibiótico B gráfica 2, el descenso de la absorbancia de 0 a 10 ug/ml disminuye rápidamente y a partir de esta concentración

permanecen casi constante las unidades de absorbancia; las densidades ópticas son de 0.878 a 0.038. Los diámetros de las zonas de inhibición comprende de 1.8cm a 2.39cm. Con el quimioterapéutico C, gráfica 3, la absorbancia disminuye rápido al existir la concentración de 10 ug/ml del antimicrobiano y desciende un poco más en 20 ug/ml, a partir de aquí permanecen casi constante las absorbancias. Las absorbancias van de 0.77 a 0.06 unidades. En cilindro-placa la gráfica se semeja a un crecimiento bacteriano tipo sigmoidea, los halos van de 0.6cm a 1.84cm.

Con APP 3, en la Gráfica 4 para el antimicrobiano A, el descenso de la absorbancia del punto máximo de crecimiento al punto de 10 ug/ml es muy rápido; siendo que a partir de aquí las absorbancias son muy semejantes hasta 80 ug/ml y después desciende hasta casi cero unidades de absorbancia, estas absorbancias van de 0.681 a 0.007 unidades respectivamente. En cilindro placa las zonas de inhibición son de 2.35cm a 3.14cm. La Gráfica 5 nos muestra el comportamiento que sigue el antimicrobiano B, existe un descenso rápido del punto máximo de crecimiento hasta 10 ug/ml y a partir de aquí descienden paulatinamente las unidades de absorbancia que comprenden de 0.81 a 0.011 respectivamente. Y los halos de inhibición de 2.12cm a 3.01cm. En la Gráfica 6 para el antimicrobiano C de igual forma desciende rápidamente en 10 ug/ml y a partir de este punto desciende un poco más hasta 30 ug/ml permaneciendo casi iguales las absorbancias a partir de esta

concentración. Las densidades comprenden de 0.85 a 0.05

respectivamente. En cilindro-placa a diferencia de las otras gráficas, aquí parte de cero la gráfica siguiendo un comportamiento lineal hasta aproximadamente 25 ug/ml, formandose a continuación una meseta donde los diámetros se incrementan paulatinamente. Estos comprenden de 0.00 cm a 1.95cm.

Continuando con APP 5 en la Gráfica 7, el decremento de la absorbancia del punto máximo de crecimiento al punto de 10 ug/ml es notable, a partir de este punto permanece casi constante hasta 70 ug/ml, siguiendole un descenso hasta casi cero de absorbancia.

En cilindro-placa, ocurre un comportamiento diferente a las otras gráficas, siendo que aquí, los diámetros de las zonas de inhibición están por arriba de 3cm y a partir de 40 ug/ml son constantes los halos de inhibición que van de 3.00 a 3.56cm.

Para el antibiótico B, Gráfica 8, las unidades de absorbancia descienden conforme aumenta la concentración del antibiótico y permanece casi constante de 80 a 100 ug/ml. Las absorbancias van de 0.601 a 0.027, mientras que en cilindro-placa son de 2.11 a 3.19mm.

La Gráfica 9 muestra el comportamiento del quimioterapéutico C, se observa un cruce de ambas gráficas en aproximadamente 30 ug/ml que corresponden a cada uno de los métodos cilindro-placa y turbidimétrico. En donde para el primero a diferencia de las otras gráficas, la absorbancia no desciende rápido sino paulatinamente, y en 90 ug/ml alcanza una absorbancia que en gráficas anteriores la alcanza en 10 ug/ml. Las absorbancias comprenden de 0.590 a 0.044.

Los halos de inhibición aumentan paulatinamente conforme a la concentración del antimicrobiano que comprenden de 1.125cm a 2.096cm.

La Gráfica 10 muestra el comportamiento que sigue el antimicrobiano A para APP 7, en la que se observa la casi completa inhibición del crecimiento de la bacteria al existir 10 ug/ml y es la primer gráfica en donde a partir de 90 ug/ml da absolutamente 0 unidades de absorbancia, que inicialmente parte de 0.759 a 0.000. Y en cilindro-placa las zonas de inhibición van de 1.936cm a 2.393cm. Con el antimicrobiano B, Gráfica 11, la absorbancia disminuye rápidamente al presentarse 10 ug/ml, en 80 ug/ml las lecturas son de 0 unidades de absorbancia, que van de 0.763 a 0.000 respectivamente. Y para las zonas de inhibición comprenden de 1.383cm a 2.143cm. Finalmete la Gráfica 12, en Turbidimetria, ocurre un descenso rápido de la absorbancia en 10 ug/ml y continua descendiendo hasta 50 ug/ml, que apartir de este punto no hay mucha variación sino hasta 90 ug/ml en donde toca el cero, las absorbancias van de 0.759 a 0.000. Por último las zonas de inhibición que comprenden de 0.000cm a 1.246cm, por segunda vez esta gráfica parte de cero, es de tipo sigmoidea que apartir de 40 ug/ml se forma una meseta.

Los valores del MIC 90 que se dan en la tabla 1, fueron obtenidos mediante el uso de la regresión lineal.

Cilindro-Placa	A(Floxacin)	B(Fx-plus)	C(Cronimex)
<b>Serotipo</b>			
1	61.47	58.21	88.96
3	57.48	59.44	112.82
5	29.94	59.03	81.27
7	35.42	63.09	158.38
<b>Turbidimetría</b>			
<b>Serotipo</b>			
1	71.85	64.37	75.69
3	66.33	57.76	71.16
5	70.77	83.79	101.2
7	10.81	49.22	69.19

Tabla 1. Distribución de los valores del MIC 90 (ug/ml), para Floxacin, Fx-plus y Cronimex, obtenidos de diferentes cepas de *A. pleuropneumoniae*.

(A) FLOXACIN\*\* (quinolona de tercera generación); (B) FX-PLUS\*\* y

(C) CRONI-MEX\*\* (quinolona de segunda generación); MR por Avimex, S.A. DE C.V.

CUADRO No 1A ANALISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA EL GRADO DE  
ACTIVIDAD BACTERICIDA DE 3 DIFERENTES ANTIMICROBIANOS  
(QUINOLONAS) SOBRE *A. pleuropneumoniae* SEROTIPO 1  
METODO CILINDRO PLACA

FV	gl	SC	CM	Fc
A (TRAT)	2	18.465	5.2327	515.428
B (TRAT)	9	1.828	.2032	28.812
ERROR	18	.183	.0181	
TOTAL	29	12.476		

CUADRO No 1B PRUEBA DE TUKEY ( $\alpha=0.05$ ) PARA DETERMINAR  
DIFERENCIAS ENTRE EL GRUPO DE ANTIMICROBIANOS REALIZADA CON  
LOS RESULTADOS DEL ANOVA DEL CUADRO 1A.

ANTIBIOTICO	No. TRAT	PROMEDIO	GRUPOS HOMOGENEOS
C	18	1.2388	*
B	18	2.1333	**
A	18	2.6788	**

PROGRAMA ESTADISTICO: STATGRAPHICS V 2.6

CUADRO No 1C PRUEBA DE TUKEY ( $\alpha=0.05$ ) PARA DETERMINAR  
DIFERENCIAS ENTRE GRUPO DE CONCENTRACIONES.

CONC.	No. TRAT	PROMEDIO	GRUPOS HOMOGENEOS
18	3	1.552888	*
28	3	1.727888	**
38	3	1.873888	**
48	3	1.952333	***
58	3	2.087666	**
68	3	2.849667	**
78	3	2.881333	**
88	3	2.147666	**
98	3	2.331666	**
108	3	2.428666	*

PROGRAMA ESTADISTICO: STATGRAPHICS V 2.6  
\* LAS BARRAS ENEN A LOS GRUPOS ENTRE LOS QUE NO SE DIO  
DIFERENCIA SIGNIFICATIVA.

CUADRO No 2A ANALISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA DETERMINAR EL GRADO  
ACTIVIDAD BACTERICIDA DE 3 DIFERENTES ANTIMICROBIANOS  
(QUINOLONAS) SOBRE *A.pleuropneumoniae* SEROTIPO 3.  
METODO CILINDRO PLACA

FU	gl	SC	CM	Fc
A (TRAT)	2	11.625	5.8127	143.961
B (TRAT)	9	3.873	.3415	8.458
ERROR	16	.726	.0483	
TOTAL	29	15.426		

CUADRO No 2A PRUEBA DE TUKEY ( $\alpha=0.05$ ) PARA DETERMINAR  
DIFERENCIAS ENTRE EL GRUPO DE ANTIMICROBIANOS REALIZADA CON LOS  
RESULTADOS DEL ANOVA DEL CUADRO 2A.

ANTIBIOTICO	No. TRAT	PROMEDIO	GRUPOS HOMOGENEOS
C	18	1.4248	*
B	18	2.6658	*
A	18	2.8118	*

PROGRAMA ESTADISTICO: STATGRAPHICS V 2.6

CUADRO No 2C PRUEBA DE TUKEY ( $\alpha=0.05$ ) PARA DETERMINAR  
DIFERENCIAS ENTRE GRUPOS DE CONCENTRACIONES.

CONC.	No. TRAT	PROMEDIO	GRUPOS HOMOGENEOS
18	3	1.498000	*
29	3	2.876666	*
38	3	2.287888	**
48	3	2.286888	**
58	3	2.332666	**
68	3	2.371888	**
78	3	2.458888	**
88	3	2.522666	**
98	3	2.565888	**
108	3	2.781666	*

PROGRAMA ESTADISTICO: STATGRAPHICS V 2.6  
- LAS BARRAS UNEN A LOS GRUPOS ENTRE LOS QUE NO SE DIO  
DIFERENCIA SIGNIFICATIVA.

CUADRO No 3A ANALISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA EL GRADO DE ACTIVIDAD BACTERICIDA DE 3 DIFERENTES ANTIMICROBIANOS (QUINOLONAS) SOBRE *A. pleuropneumoniae* SEROTIPO 5.  
METODO CILINDRO PLACA

FV	gl	SC	CM	Fc
A (TRAT)	2	17.663	8.8314	522.985
B (TRAT)	9	2.127	.2363	13.996
ERROR	18	.384	.0168	
TOTAL	29	28.894		

CUADRO No 3B PRUEBA DE TUKEY ( $\alpha=0.05$ ) PARA DETERMINAR DIFERENCIAS ENTRE EL GRUPO DE ANTIMICROBIANOS REALIZADA CON LOS RESULTADOS DEL ANOVA DEL CUADRO 3A.

ANTIBIOTICO	No. TRAT	PROMEDIO	GRUPOS HOMOGENEOS
C	18	1.6181	*
B	18	2.8287	*
A	18	3.4685	*

PROGRAMA ESTADISTICO: STATGRAPHICS V 2.6

CUADRO No 3C PRUEBA DE TUKEY ( $\alpha=0.05$ ) PARA DETERMINAR DIFERENCIAS ENTRE GRUPOS DE CONCENTRACIONES.

CONC.	No. TRAT	PROMEDIO	GRUPOS HOMOGENEOS
18	3	2.888333	*
28	3	2.245000	**
38	3	2.583888	**
48	3	2.586333	**
58	3	2.712888	***
68	3	2.764333	***
78	3	2.781888	***
88	3	2.812888	***
98	3	2.871666	**
108	3	2.948666	*

PROGRAMA ESTADISTICO: STATGRAPHICS V 2.6  
\*LAS BARRAS UNEN A LOS GRUPOS ENTRE LOS QUE NO SE DIO DIFERENCIA SIGNIFICATIVA.

CUADRO No 4A ANALISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA EL GRADO DE ACTIVIDAD BACTERICIDA DE 3 DIFERENTES ANTIMICROBIANOS (QUINOLONAS) SOBRE *A. pleuropneumoniae* SEROTIPO 7 METODO CILINDRO PLACA

	FV	gl	SC	CM	Fc
A (TRAT)	2	18.549	5.2747	182.144	
B (TRAT)	9	2.243	.2492	8.688	
ERROR	18	.521	.8289		
TOTAL	29	13.314			

CUADRO No 4B PRUEBA DE TUKEY ( $\alpha=0.05$ ) PARA DETERMINAR DIFERENCIAS ENTRE EL GRUPO DE ANTIMICROBIANOS REALIZADA CON LOS RESULTADOS DE EL ANOVA DEL CUADRO 4A.

ANTIBIOTICO	No. TRAT	PROMEDIO	GRUPOS HOMOGENOS
C	18	8.8554	*
B	18	1.8587	*
A	18	2.2667	*

PROGRAMA ESTADISTICO: STATGRAPHICS V 2.6

CUADRO No 4C PRUEBA DE TUKEY ( $\alpha=0.05$ ) PARA DETERMINAR DIFERENCIAS ENTRE GRUPOS DE CONCENTRACIONES.

CONC.	No. TRAT	PROMEDIO	GRUPOS HOMOGENOS
18	3	1.186333	*
28	3	1.191888	**
38	3	1.536333	**
48	3	1.688667	*
58	3	1.719666	*
68	3	1.793333	*
78	3	1.828666	*
88	3	1.854888	*
98	3	1.985333	*
108	3	1.927333	*

PROGRAMA ESTADISTICO: STATGRAPHICS V 2.6  
 \*\*LAS BARRAS UNEN A LOS GRUPOS ENTRE LOS QUE NO SE DIO DIFERENCIA SIGNIFICATIVA.

CUADRO No 5A ANALISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA EL GRADO DE  
ACTIVIDAD BACTERICIDA DE 3 DIFERENTES ANTIMICROBIANOS  
(QUINOLONAS) SOBRE *A.pleuropneumoniae* SEROTIPO 1  
METODO TURBIDIMETRICO

	FV	gl	SC	CM	Fc
A (TRAT)	2	0.883	0.8814	0.743	
B (TRAT)	18	1.284	.1284	65.158	
ERROR	28	.839	.8819		
TOTAL	32	1.326			

CUADRO No 5B PRUEBA DE TUKEY ( $\alpha=0.05$ ) PARA DETERMINAR  
DIFERENCIAS ENTRE EL GRUPO DE ANTIMICROBIANOS REALIZADA CON LOS  
RESULTADOS DE EL ANOVA DEL CUADRO 5A.

ANTIBIOTICO	No. TRAT	PROMEDIO	GRUPOS HOMOGENOS
B	11	0.1614	*
A	11	0.1688	*
C	11	0.1839	*

PROGRAMA ESTADISTICO: STATGRAPHICS V 2.6

CUADRO No 5C PRUEBA DE TUKEY ( $\alpha=0.05$ ) PARA DETERMINAR  
DIFERENCIAS ENTRE GRUPOS DE CONCENTRACIONES.

CONC.	No. TRAT	PROMEDIO	GRUPOS HOMOGENOS
180	3	0.835666	*
90	3	0.854666	**
80	3	0.876888	**
70	3	0.885888	**
60	3	0.898888	**
50	3	0.115888	**
40	3	0.122888	**
30	3	0.129333	**
20	3	0.149333	**
10	3	0.245666	*
0	3	0.772888	*

PROGRAMA ESTADISTICO: STATGRAPHICS V 2.6  
\* LAS PARÁMETROS DE LOS GRUPOS ENTRE LOS QUE NO SE DIO  
DIFERENCIA SIGNIFICATIVA.

CUADRO No 6A ANALISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA EL GRADO DE ACTIVIDAD BACTERICIDA DE 3 DIFERENTES ANTIMICROBIANOS (QUINOLONAS) SOBRE *A. pleuropneumoniae* SEROTIPO 3 METODO TURBIDIMETRICO

FV	gl	SC	CM	Fc
A (TRAT)	2	0.817	0.8884	5.865
B (TRAT)	18	1.395	.1395	96.643
ERROR	28	.828	.8814	
TOTAL	32	1.441		

CUADRO No 6B PRUEBA DE TUKEY ( $\alpha=0.05$ ) PARA DETERMINAR DIFERENCIAS ENTRE EL GRUPO DE ANTIMICROBIANOS REALIZADA CON LOS RESULTADOS DEL ANOVA DEL CUADRO 6A.

ANTIBIOTICO	No. TRAT	PROMEDIO	GRUPOS HOMOGENEOS
A	11	0.1397	*
B	11	0.1552	**
C	11	0.1936	*

PROGRAMA ESTADISTICO: STATGRAPHICS V 2.6

CUADRO No 6C PRUEBA DE TUKEY ( $\alpha=0.05$ ) PARA DETERMINAR DIFERENCIAS ENTRE GRUPOS DE CONCENTRACIONES.

CONC.	No. TRAT	PROMEDIO	GRUPOS HOMOGENEOS
100	3	0.823666	*
90	3	0.832333	**
80	3	0.852333	***
70	3	0.864333	***
60	3	0.888888	***
50	3	0.896666	****
40	3	0.115333	***
30	3	0.128333	**
20	3	0.175666	**
10	3	0.238666	*
0	3	0.784333	*

PROGRAMA ESTADISTICO: STATGRAPHICS V 2.6  
-LAS BARRAS UNEN A LOS GRUPOS ENTRE LOS QUE NO SE DIO DIFERENCIA SIGNIFICATIVA.

CUADRO No 7A ANALISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA EL GRADO DE ACTIVIDAD BACTERICIDA DE 3 DIFERENTES ANTIMICROBIANOS (QUINOLONAS) SOBRE *A. pleuropneumoniae* SEROTIPO 5 METODO TURBIDIMETRICO

IV	gl	SC	CM	Fc
A (TRAT)	2	0.161	0.0806	24.215
B (TRAT)	18	0.788	0.0788	23.439
ERROR	28	.066	0.0033	
TOTAL	32	1.008		

CUADRO No 7B PRUEBA DE TUKEY ( $\alpha=0.05$ ) PARA DETERMINAR DIFERENCIAS ENTRE EL GRUPO DE ANTIMICROBIANOS REALIZADA CON LOS RESULTADOS DEL ANOVA DEL CUADRO 7A.

ANTIBIOTICO	No. TRAT	PROMEDIO	GRUPOS HOMOGENOS
A	11	0.1417	*
B	11	0.1944	*
C	11	0.3891	*

PROGRAMA ESTADISTICO: STATGRAPHICS V 2.6

CUADRO No 7C PRUEBA DE TUKEY ( $\alpha=0.05$ ) PARA DETERMINAR DIFERENCIA ENTRE GRUPO DE CONCENTRACIONES.

CONC.	No. TRAT	PROMEDIO	GRUPOS HOMOGENOS
100	3	0.026666	*
90	3	0.051666	**
80	3	0.097333	***
70	3	0.148000	****
60	3	0.158000	****
50	3	0.188000	****
40	3	0.227000	****
30	3	0.258666	***
20	3	0.297333	**
10	3	0.322666	*
0	3	0.607000	*

PROGRAMA ESTADISTICO: STATGRAPHICS V 2.6  
 \* LAS BARRAS VENEN A LOS GRUPOS ENTRE LOS QUE NO SE DIO DIFERENCIA SIGNIFICATIVA.

CUADRO No BA TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA ( ANOVA) PARA EL GRADO  
ACTIVIDAD BACTERICIDA DE 3 DIFERENTES ANTIMICROBIANOS  
(QUINOLONAS) SOBRE A.pleuropneumoniae SEROTIPO 7.  
METODO TURBIDIMETRICO

TV	gl	SC	CM	Fc
A (TRAT)	2	8.835	0.8176	13.387
B (TRAT)	18	1.426	0.1426	188.439
ERROR	28	.826	0.0813	
TOTAL	32	1.488		

CUADRO No BB PRUEBA DE TUKEY ( $\alpha=0.05$ ) PARA DETERMINAR  
DIFERENCIAS ENTRE EL GRUPO DE ANTIMICROBIANOS REALIZADA CON LOS  
RESULTADOS DEL ANOVA CUADRO BA.

ANTIBIOTICO	No. TRAT	PROMEDIO	GRUPOS HOMOGENEOS
A	11	0.8954	*
B	11	0.1281	*
C	11	0.1751	*

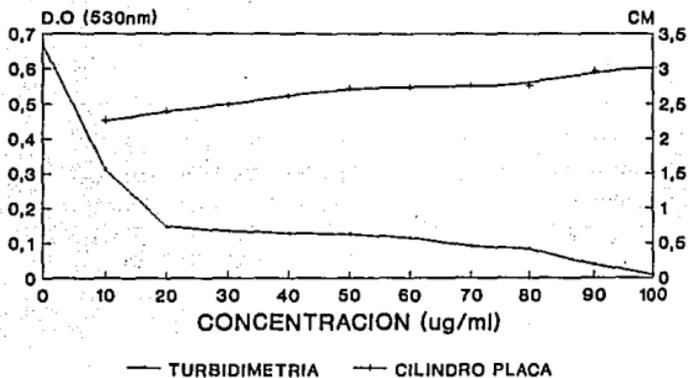
PROGRAMA ESTADISTICO: STATGRAPHICS V 2.6

CUADRO No BC PRUEBA DE TUKEY ( $\alpha=0.05$ ) PARA DETERMINAR  
DIFERENCIAS ENTRE GRUPO DE CONCENTRACIONES.

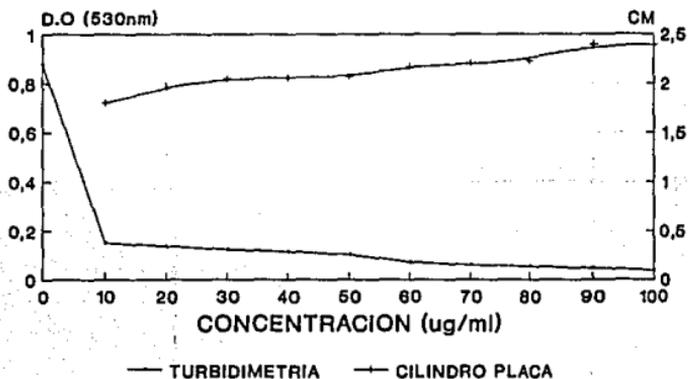
CONC.	No. TRAT	PROMEDIO	GRUPOS HOMOGENEOS
100	3	0.888888	*
90	3	0.865888	*
80	3	0.825666	**
70	3	0.836666	**
60	3	0.848666	**
50	3	0.858333	***
40	3	0.888333	***
30	3	0.111888	***
20	3	0.145333	**
10	3	0.184888	*
0	3	0.767888	*

PROGRAMA ESTADISTICO: STSTGRAPHICS V 2.6  
-LAS BARRAS UNEN A LOS GRUPOS ENTRE LOS QUE NO SE DIO  
DIFERENCIA SIGNIFICATIVA.

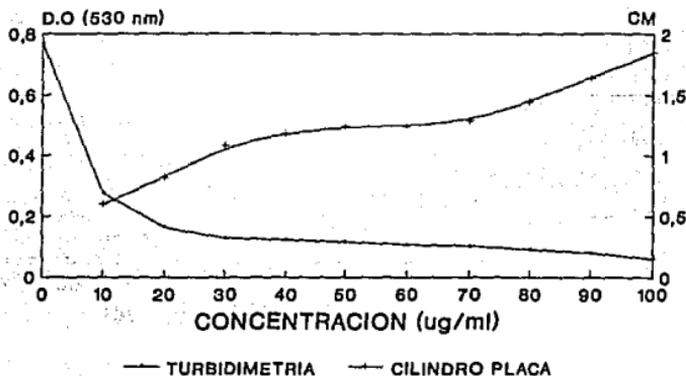
GRAFICA 1. VALORACION MICROBIOLÓGICA  
CON EL ANTIBIÓTICO "A" PARA *A. pleuropneumoniae* Ser. 1



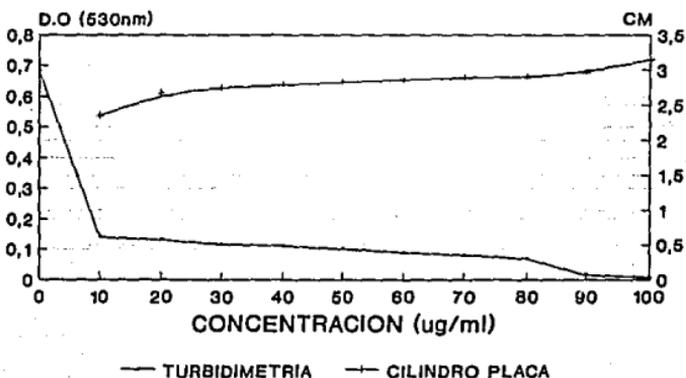
GRAFICA 2. VALORACION MICROBIOLÓGICA  
CON EL ANTIBIÓTICO "B" PARA *A. pleuropneumoniae* Ser. 1.



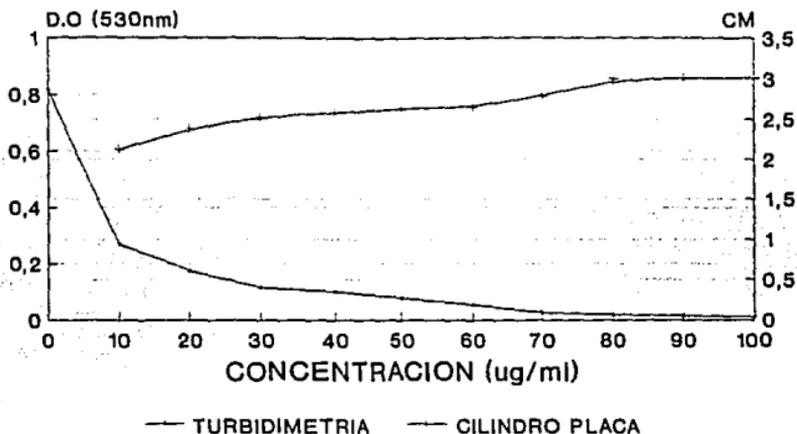
GRAFICA 3. VALORACION MICROBIOLÓGICA  
CON EL ANTIBIÓTICO "C" PARA *A. pleuropneumoniae* Ser 1.



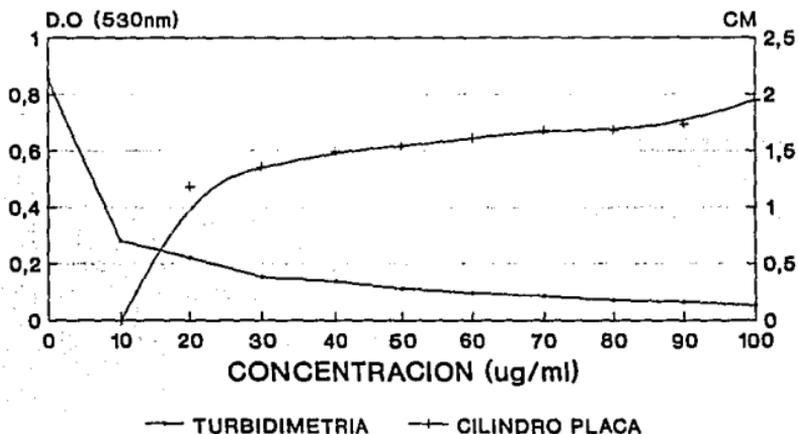
GRAFICA 4. VALORACION MICROBIOLÓGICA  
CON EL ANTIBIÓTICO "A" PARA *A. pleuropneumoniae* Ser 3.



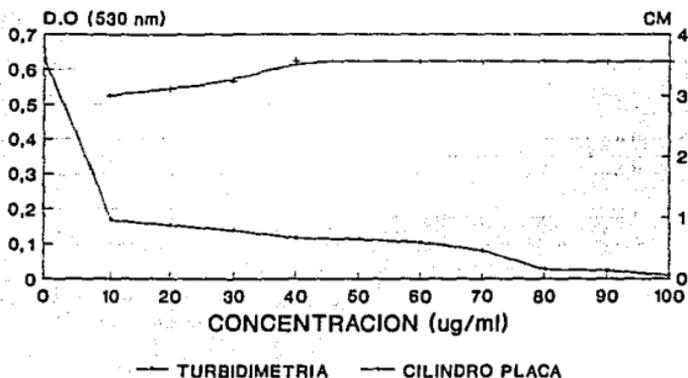
GRAFICA 5 VALORACION MICROBIOLOGICA  
CON EL ANTIBIOTICO "B" PARA *A.*  
*pleuropneumoniae* Ser 3.



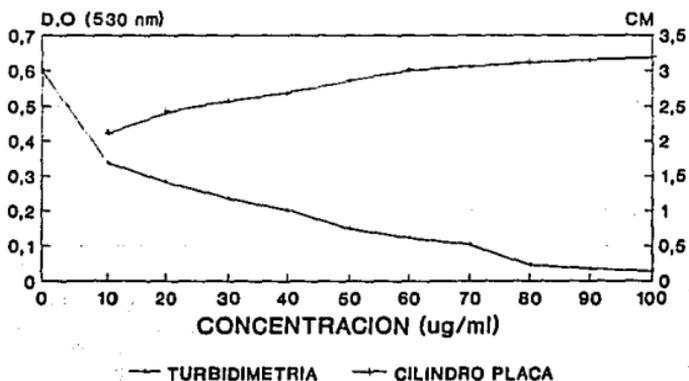
GRAFICA 6. VALORACION MICROBIOLOGICA  
CON EL ANTIBIOTICO "C" PARA *A.*  
*pleuropneumoniae* Ser 3.



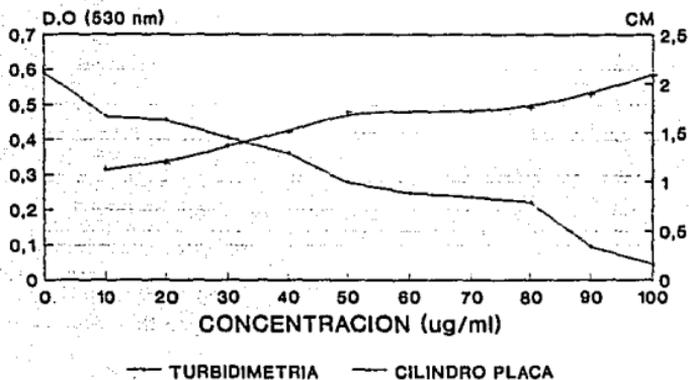
GRAFICA 7. VALORACION MICROBIOLÓGICA  
CON EL ANTIBIÓTICO "A" PARA *A. pleuropneumoniae* Ser 5.



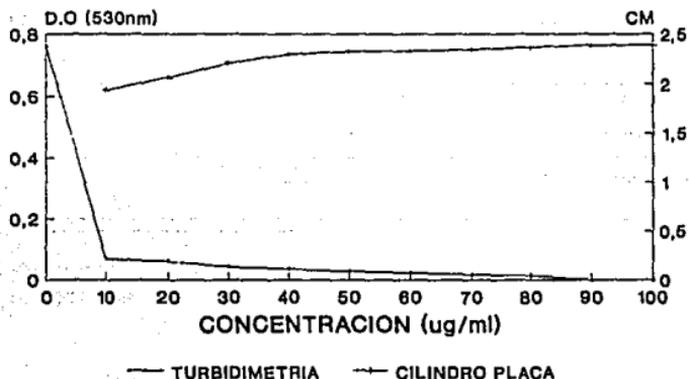
GRAFICA 8. VALORACION MICROBIOLÓGICA  
CON EL ANTIBIÓTICO "B" PARA *A. pleuropneumoniae* Ser 5.



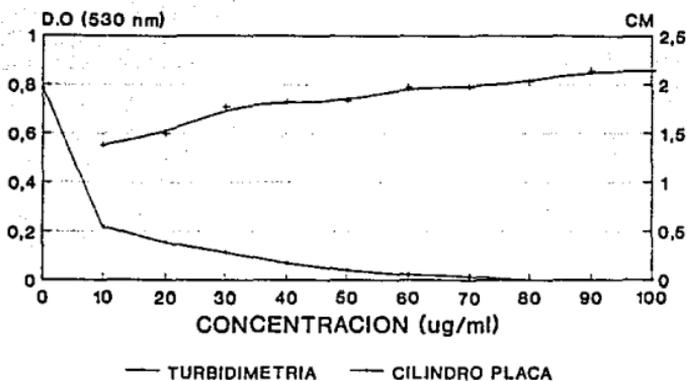
GRAFICA 9. VALORACION MICROBIOLÓGICA  
CON EL ANTIBIÓTICO "C" PARA *A.*  
*pleuropneumoniae* Ser 5.



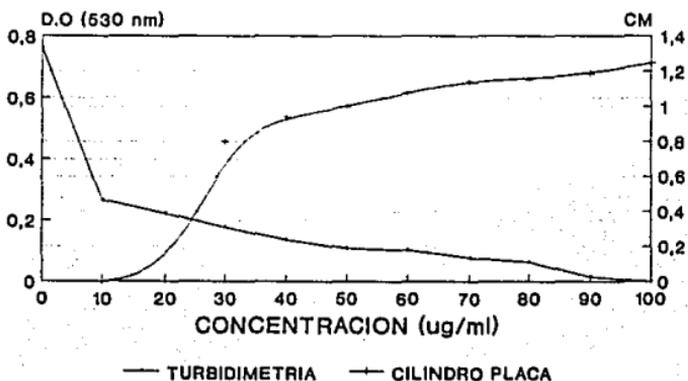
GRAFICA 10. VALORACION MICROBIOLÓGICA  
CON EL ANTIBIÓTICO "A" PARA *A.*  
*pleuropneumoniae* Ser 7.



GRAFICA 11. VALORACION MICROBIOLÓGICA  
CON EL ANTIBIÓTICO "B" PARA *A. pleuropneumoniae* Ser 7.



GRAFICA 12. VALORACION MICROBIOLÓGICA  
CON EL ANTIBIÓTICO "C" PARA *A. pleuropneumoniae* Ser 7.



## DISCUSION

La Pleuropneumonia Contagiosa Porcina (PCP) es una enfermedad devastadora, produce en los cerdos susceptibles una alta mortalidad y en los animales crónicos pérdidas económicas. La antibioterapia contra la PCP en brote, se ha reportado por muchos autores y han encontrado resultados variables (Libal, 1982), también el uso de antibióticos en el alimento se ha considerado como uno de los métodos útiles para controlar la enfermedad. Los estudios sobre de la susceptibilidad de A. pleuropneumoniae han mostrado un gran número de antibióticos a los cuales son resistentes como: penicilina, ampicilina, cefaloxina, estreptomycin, kanamicina, furadomicina, gentamicina, tilosina, tiamulina, entre otros. En la actualidad la mayoría de los medicamentos que ingresan al mercado veterinario tienen un origen sintético o por lo menos biosintético; estas consideraciones son relevantes en las quinolonas y fluoroquinolonas, en función de que en este momento, este grupo representa el rubro comercialmente mas productivo de la Industria Farmacéutica Veterinaria.

Para un nuevo antimicrobiano, se evalúa primero la susceptibilidad sobre algún patógeno en cuestión, posteriormente, si los resultados son favorables "in vitro", se procede a llevar a cabo pruebas "in vivo". La antibiosis fué observada por vez primera por Leeuwenhoek en 1676. Así Fleming en 1924 fué el primero en marcar una prueba de susceptibilidad antimicrobiana para Staphylococcus aureus con penicilina (Balows, 1974).

Estas técnicas fueron evolucionando por la necesidad de estandarización, las pruebas para evaluar la susceptibilidad antimicrobiana se estandarizaron de laboratorio a laboratorio. Y es en 1966 cuando Bauer y cols, describen un método estandar para llevar a cabo las pruebas de susceptibilidad por el método en disco y comparan los diámetros de la zona de inhibición con la concentración mínima inhibitoria (MIC). La continua necesidad de estandarizar estos procedimientos no solo es preocupación entre laboratorios sino también entre países, esto ha originado que varios grupos describan estos métodos estandar: WHO (Anon 1961); Ericsson & Sherris (1971); Stokes & Waterworth (1972); Swedish Reference Group (Anon 1981); National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (Anon 1985).

Este trabajo esta apoyado con reportes previos llevados a cabo por (Colmenares, 1988), donde de 20 aislamientos de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1, fueron 100% resistentes a un gran número de antibióticos como: penicilina, ampicilina, cefaloxina, estreptomycin, kanamicina, furadomicina, gentamicina, tilosina, tiamulina, ácido oxalínico, polimixina B y sulfametaxoltrimetoprim. Se podría presentar que el uso de antibióticos para uso humano utilizados en Medicina Veterinaria pudieran dar falsas expectativas.

Lamentablemente el uso de pruebas de sensibilidad a los antibióticos, esta basado en la utilización de sensidiscos para agentes bacterianos de tipo humano, por ello es necesario llamar la atención al uso de ellos con bacterias de origen animal, dado que su compartamiento puede ser diferente. Sería recomendable que los laboratorios de diagnóstico veterinario tuvieran sensidiscos con las concentraciones recomendadas para evitar fracasos en Campo. Solo se ha reportado la producción de sensidiscos por una compañía (Pfizer), por lo que estos sensidiscos podrían servir para implementar antibiogramas veterinarios.

Las Quinolonas de 3a generación como lo es el antimicrobiano A (Floxacin) empleado en este trabajo, tienen afinidad por la ADN-girasa aumentando de manera directamente proporcional con el tamaño del sustituyente. Así como el fluor (F) en la posición 6 del anillo 4-quinolinico distingue a las quinolonas de 2a generación como son el (antimicrobiano B y C empleados para este estudio) en la posición 7 de este anillo tienen un radical (4-metilo-piperazin-1-il) en las quinolonas de 3a generación. Por lo que moléculas lineales muestran menos potencia que radicales cíclicos como el de la Danofloxacin que es muy grande y liposoluble (Chu, 1986).

Los resultados del presente estudio, por medio de la prueba microbiológica difusión en agar mostraron diferencia a la susceptibilidad de A. pleuropneumoniae a las tres quinolonas fué de interés, para el serotipo 1, el antimicrobiano A (Floxacin), ofreció mejor actividad bactericida, siguiendole en orden de magnitud el antimicrobiano B y C.

Se menciona que en Medicina Veterinaria las más potentes son las Fluoroquinolonas de tercera generación, estas son activas contra una gran gama de bacterias como: Haemophilus spp, Pasteurella spp, Staphylococcus spp, Brucella spp, entre otras. (Pérez-Martínez, 1992). Los resultados individuales obtenidos para esta cepa, se promediarón, posteriormente se les realizó un estudio estadístico de análisis de varianza (ANOVA) y por último la prueba para detectar grupos homogéneos (prueba de Tukey), con esta última prueba se obtuvo diferencia entre grupos de concentraciones a si para estas tres Quinolonas en forma general presentaron semejantes rangos de concentraciones, se hizo con el promedio de los tres antimicrobianos. Para el serotipo 1 se tuvo una misma acción bactericida al utilizar el rango de 10-20 ug/ml y otra entre 30-80ug/ml.

Con respecto a A.pleuropneumoniae serotipo 3, se encontró que el antimicrobiano A y B (Quinolonas de 3a y 2a generación, respectivamente) ofrecieron una misma acción bactericida, que el antimicrobiano C. Se sabe que en el caso de las quinolonas de 2a generación la actividad "in vitro" es muy buena, como la Ciprofloxacina, se ha visto que es excelente con notable acción contra los Micoplasmas más comunes en Veterinaria (Prescott, J.F, 1990). Para este serotipo la concentración de 10 ug/ml mostró una actividad bactericida diferente, ya que concentraciones de 20-80 ug/ml o de 40-100 ug/ml tuvieron un mismo efecto antimicrobiano. Lo que resulta útil para poder elegir una concentración mínima y adecuada.

Sin embargo algunos reportes mencionan que el tratamiento con Norfloxacin para combatir la neumonia inducida por Mycoplasma hyopneumoniae ha resultado costoso.

Continuando con A. pleuropneumoniae serotipo 5 con estas tres quinolonas presentaron el mismo comportamiento con respecto al serotipo 1, en este serotipo los diametros de inhibición fueron mas grandes, indicando que el serotipo 5 fue más sensible a estos antimicrobianos. Debe recordarse que los antimicrobianos tienen diferente espectro de actividad y que el microorganismo control puede ser menos susceptible que el probado, lo que puede ser causa que algunos microorganismos sean erroneamente designados sensible, eg. Ampicilina vs Haemophilus influenzae.

Con lo que respecta al rango de concentraciones para este serotipo 5, fue de 10-20 ug/ml, que mostro una actividad bactericida semejante a la que daría una concentración entre 30-80 ug/ml. Finalmente por este método de difusión en agar, el A. pluropneumoniae serotipo 7, con los tres antimicrobianos ofrecieron actividad bactericida diferente, tal como ocurrió con el serotipo 1 y 5, en el que el antimicrobiano A (Floxacin) fue la que presento, mejor actividad bactericida, en donde a una concentración de 10 ug/ml se tuvo un efecto muy semejante al que se obtendría a mayores concentraciones.

Para interpretar el tamaño del diametro de inhibición, debe estar primero relacionado con el MIC. Cepas individuales de la misma especie pueden tener variación en el diametro de la zona y un rango amplio de MIC's.

Por otro lado la construcción de la regresión lineal para interpolar los datos puede enmascarar la variación y no indicar la probabilidad de falsos positivos y falsos negativos. Así un autor considera que el análisis de regresión lineal es un hecho que es un dogma matemático. (Krasemann, 1980). Frecuentemente los datos para microorganismos sensibles y resistentes de diferentes especies son esquematizados en una misma gráfica de dispersión. En suma la regresión lineal es construida a partir del promedio de los datos del MIC que son correctos (Pidcock, 1990). En algunas ocasiones se puede construir un diagrama de dispersión para determinar el punto de intercepto del tamaño de zona, sin embargo para este tipo de diagrama se necesita una serie de bastantes datos y con diferentes bacterias, así se obtendrá el punto de intercepto de la concentración que corresponda a susceptibilidad bajo condiciones muy especiales. El BSAC (Philips, 1988), llegaron a una fórmula que permite obtener el promedio de la variabilidad farmacocinética y microbiológica, con un listado amplio de recomendaciones para calcular el punto de intercepto de dos grupos de microorganismos para dosis estándar de agentes antimicrobianos comúnmente usados. Los dos grupos de microorganismos que se estudiaron en el trabajo anterior fueron. Grupo 1: Streptococcus spp, Staphylococcus spp, Branhamella catarrhalis y Haemophilus influenzae y Grupo 2: Ps.aeruginosa y Enterobacterias. Por lo tanto calcular este tipo de diagrama sería difícil, se trabajó con un solo microorganismo aunque diferentes serotipos. Por otro lado como una limitante es que las compañías guardan celosamente los

estandares, por lo tanto es un error considerable no comparar contra ellos, se presentan también diferentes condiciones para antibactericidas y antibacteriostáticos además de considerar que son diferentes familias de antimicrobianos, por lo tanto calcular un diagrama de dispersión tendría un margen de error. Mediante este método de difusión en agar entre las ventajas que ofrece permitió en forma general determinar sensibilidad o resistencia de cepas de A. pleuropneumoniae a estos antimicrobianos, se menciona bibliográficamente que zonas de inhibición  $> 25\text{mm}$  son sensibles, entre  $15-25\text{mm}$  medianamente sensibles y  $< 15\text{mm}$  se consideran resistentes.

Así en el caso de A. pleuropneumoniae serotipo 1, partiendo de la bibliografía podemos sugerir que fué sensible al antimicrobiano A, medianamente sensible al B y resistente al C. Para el serotipo 3 es sensible al antimicrobiano A y B, y resistente al antimicrobiano C. En el caso de A. pleuropneumoniae serotipo 5 es muy sensible al quimioterapéutico A, que es con el que se obtiene el mayor diametro de inhibición  $3.46\text{ cm}$ , con respecto a los otros, también es sensible al antimicrobiano B y medianamente sensible al C. En cuanto al A. pleuropneumoniae serotipo 7, se obtuvo mediana sensibilidad al antimicrobiano A y B, y resistente al C. Resultando que los serotipos 1, 3 y 7 fueron resistentes únicamente al antimicrobiano C.

La resistencia a las Quinolonas, se menciona que es muy rápida a las de 2a generación que a las de 3a generación (las fluoroquinolonas), (Pidcock, 1990). De hecho se sabe que de manera natural la resistencia a las fluoroquinolonas de 3a generación es notablemente baja (Inoue, 1982). Aunque experimentalmente se ha logrado seleccionar a bacterias resistentes, no se ha descrito la inactivación enzimática de la quinolonas y fluoroquinolonas por bacterias. Por otro lado se ha descrito la resistencia cruzada de las quinolonas con las fluoroquinolonas de 2a generación (Inoue, 1982). Como con cualquier antimicrobiano generado a la fecha, el uso indiscriminado de las nuevas fluoroquinolonas puede generar resistencia (Endtz, 1991).

Los resultados obtenidos mediante el estudio microbiológico (método turbidimétrico), mostraron ser diferentes al método anterior, considerando que cada uno tiene sus ventajas y desventajas. En turbidimetría se miden D.O., el medio de crecimiento es líquido, la densidad del inóculo es muy importante. El inóculo usual es de  $10^8$  ufc/ml, si el inóculo usado es mayor, durante el crecimiento de estas células se empiezan a multiplicar, por lo consiguiente aumenta el valor del MIC. (Barrand y Fay 1973). Las pruebas son afectadas por otras condiciones como son: la composición del medio, pH, temperatura y tiempo de incubación; un factor crítico en todas las pruebas es la densidad del inóculo. Factores que pudieron resultar importantes al comparar estos tres antimicrobianos mediante estos dos métodos.

A diferencia del método anterior de difusión en agar, en el que los tres antimicrobianos ofrecieron actividad microbiológica diferente; En turbidimetría los tres presentaron igual actividad bactericida sobre A. pleuropneumoniae serotipo 1 y de igual manera concentraciones de 10-20 ug/ml ofrecieron el mismo efecto antimicrobiológico que al utilizar concentraciones de 30-100 ug/ml. Para el A. pleuropneumoniae serotipo 3, el antimicrobiano B presentó el mismo comportamiento, o igual cinética de acción bactericida de A y C. Resultando que el antimicrobiano A y C son diferentes.

Finalmente para los serotipos 5 y 7 de A. pleuropneumoniae, los antimicrobianos A y B ofrecieron la misma acción bactericida, a diferencia del antimicrobiano C, en el que la inhibición del crecimiento se dio paulatinamente.

Las lecturas con ambos métodos turbidimetría y cilindro-placa fueron diferentes debido a varios factores entre ellos: con el método turbidimétrico, la relación es que a mayor concentración del antibiótico, la absorbancia es menor, en este caso la densidad óptica la ejerce la bacteria debido a que el antibiótico inhibe su crecimiento ya se ejerciendo un efecto bactericida o bacteriostático; Además los procedimientos que se basan en la medición de la densidad óptica o nefelometría para detectar actividad antibacteriana pueden dar resultados falsos resistentes para algunos antibióticos. Ya que las Beta-lactamasas y Quinolonas causan filamentación de las bacterias (así como también otros cambios morfológicos), por lo que la filamentación puede aumentar

la turbidez del medio, cuando de hecho, el número de células viables esta disminuyendo y por lo tanto la turbidez también.

En el método cilindro-placa, la relación es que el halo de inhibición es directamente proporcional a la concentración del antibiótico, es decir a menor concentración menor halo de inhibición. (Piddock, 1990). Este comportamiento es el que se observa en las diferentes gráficas de cada serotipo con cada uno de los antimicrobianos; en el método de difusión en agar con el serotipo 3 y 7, usando el quimioterapéutico C, ambas gráficas parten de cero debido a que una concentración de 10 ug/ml no ejerció ningún efecto, solo a mayores concentraciones. Por otro lado en las demás gráficas que no parten de cero sino que estan por arriba de este punto, es indicativo que el antimicrobiano actuo mejor sobre dicho serotipos y la concentración mínima inhibitoria (MIC) estuvo por abajo de 10 ug/ml.

Los valores del MIC 90 que se dan en la tabla 1, fueron obtenidos mediante el uso de la regresión lineal. Asi mismo, este análisis de la regresión lineal ha sido criticado por Krasseman y Hildenbran (1980). Primero cepas individuales de la misma especie pueden tener una amplia variedad de zonas de inhibición y un amplio rango de MICs. El uso de la regresión lineal puede enmascarar variaciones y que probablemente no nos dira datos de falsos-resistentes o falsos sensibles. A menudo datos de microorganismos resistentes o sensibles de diferentes especies son extrapolados en la misma gráfica. La linearidad de los datos puede no ocurrir y por lo tanto el error matemático estará introducido al construir la

regresión lineal.

De los tres antibióticos probados las concentraciones a las cuales empezó a inhibir el crecimiento bacteriano se encuentran por debajo de 10 ug/ml; para los tres antibióticos con los 4 serotipos de A. pleuropneumoniae debido a esto no se pudo determinar el MIC 50, sino sólo el MIC 90. Y solo se pudo determinar el MIC para el serotipo 7 con el antimicrobiano C (quinolona de 2a generación) en el que empezaba a formarse el halo en 30 ug/ml y dicha concentración correspondió al MIC, y para el serotipo 3 con este mismo antimicrobiano el MIC lo da en 20 ug/ml, esto fue mediante cilindro-placa.

En general, con los dos métodos, el fármaco que presentó una mejor actividad antimicrobiana para A. pleuropneumoniae fue el antibiótico A (quinolona de 3a generación), siguiéndole en orden de actividad el antibiótico B y por último el C. (ambas quinolonas de 2a generación).

En contraste a nuestro presente estudio, Davis (Vancutsem, 1990) han demostrado MIC's 90 de Enrofloxacin entre 0.032 ug/ml para Actinobacillus suis y (Berg, 1988), ha reportado MIC's para Enrofloxacin entre 0.016 y 8 ug/ml. En el presente una explicación entre los resultados reportados y los nuestros son especulativos. Una explicación posible es la especie, ellos trabajaron con A. suis y nosotros con A. pleuropneumoniae además el origen diferente de las cepas, ellos utilizaron patógenos aislados de casos clínicos y en este estudio se utilizaron cepas donadas por el National Veterinary de Iowa.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Considerando además: el medio utilizado, capa base, la medición, y aunque se siguen métodos estandares mencionados oficialmente, cada quien valida sus datos con repeticiones y su estudio estadístico.

Entre los diversos estudios que se han realizado con otras Quinolonas sobre A. pleuropneumoniae, son muy pocos los estudios reportados "in vitro" a nivel nacional, existiendo algunos reportes llevados "in vivo", como es el caso de la Ciprofloxacina para A. pleuropneumoniae y Mycoplasma hyopneumoniae. (Rincón, 1993).

En otro estudio reportan el uso "in vivo" de Norfloxacina y Enrofloxacin, comentan que el uso de enrofloxacin usado a altas dosis ayuda al control de la enfermedad, pero no evita la reinfección en estos animales, por lo que sugieren que es necesario desarrollar otros métodos para controlar la enfermedad. (Doporto, 1992).

Tomando en cuenta que los resultados obtenidos mediante este estudio "in vitro" resultarán ser favorables, se recomiendan en posteriores estudios trabajar con concentraciones menores, para la elaboración de sensibilizadores para uso comercial, evaluados en cepas aisladas de problemas respiratorios causados por la PCP, además de estudios "in vivo", utilizando estas 3 Quinolonas (Floxacin, Fx-Plus y Cronimex).

## CONCLUSIONES

1.- El antimicrobiano A (Floxacin) es el que mostró mejor actividad bactericida sobre las cuatro cepas de A.pleuropneumoniae, siguiéndole en orden de actividad el B (Fx-Plus) y C (Cronimex).

2.- El método cilindro placa fué el más rápido y fácil de llevar a cabo y por las ventajas que este ofrece.

3.- No se ha reportado el uso de estas fluoroquinolonas sobre Actinobacillus pleuropneumoniae, "in vitro", solo en otras especies de Haemophilus y en otros géneros bacterianos. Por lo que con este estudio se demuestra que la Quinolonas ofrecen una buena opción para el tratamiento de la PCP.

572.

4.- Con los resultados obtenidos, se obtiene que los valores del MIC 50 están por abajo de 10 ug/ml, de las concentraciones empleadas.

573.

574.

## BIBLIOGRAFIA

1. ALTMAN E, Brisson, Perry MB.: Structure of the capsular polysaccharide of Haemophilus pleuropneumoniae Serotype 5. Eur J. Biochem. 170:185-192, 1987.
2. ALBRECHT, R.: Development of antibacterial agents of the nalidixic acid type. Prog. Drug. Res; 21:99-104, 1977.
3. ANON.: Standarization of methods for conducting microbic sensitivity test. Second Report of the Expert Committee on Antibiotics (WHO Technical Report Series No 210), WHO, Geneva.1961.
4. ANON.: A revised system for antibiotic sensitivity testing. Swedish Reference Group for antibiotics. Scandinavian Journal of Infectious Diseases 13:148-152, 1981.
5. ANON.: Methods for dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria that grow aerobically. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Approved Standard M-A, Villanova, PA: NCCLS. 1985.
6. BALOWS, A.: Introduction to "in vitro" susceptibility testing in current techniques for susceptibility testing. Ed Balows, A. pp 3-5 Spring field Illinois. 1974
7. BAUER, A.W; Kirby, W. M.M, Sherris, J.C.: Antibiotic susceptibility testing by a standardised single disc method. American Journal of Clinical Pathology 45: 493-496. 1966.
8. BARRAND, A.L & FAY, G.D.: The amount of agar in antimicrobic disc susceptibility test plates. American Journal of Clinical Pathology 59: 196-198. 1973.
9. BENDIXEN, H; Shewen, P.E and Rosendal, S.: Toxicity of Haemophilus pleuropneumoniae for porcine lung macrophages peripteral blood monocytes and testicular cells. Infection and Immunity 33(3): 673-676, 1981.
10. BERG J. Clinical indications for enrofloxacin in domestic animals and poultry. In: Quinolones: A new class of antimicrobials agents for use in veterinary medicine. Proc West Vet Conf, Las Vegas, Nevada: Mobay Corporation Animal Health Division, Shawnee, Kansas, 1988:25-34.
11. BIBERSTEIN, E.L; Gunnarsson and Hurvell, B.: Cultural and biochemical criteria for the identification of Haemophilus spp from swine. Am. J. Vet. Res 38: 7-11, 1977.

12. BURKHANDT JE, Hill MA, Carlton WW.: Histologic and histochemical changes in articular cartilages of immature Beagle dogs dosed with difloxacin, a fluoroquinolone. *Vet. Pathol*, 27:162-170, 1990.
13. CHU, D.T.W; Fernández, P.B; and Pernet, A.G.: Synthesis and biological activity of benzothiazolo (3,2-a) quinolone antibacterial agent. *J. Med. Chem*, 29:1531-1534 (1986).
14. CHRIST W, Lehnert T, and Ulbrich B.: Specific toxicologic aspects of the quinolones. *Rev Infect. Dis*, 10 (suppl 1): 141s-146s, 1988.
15. COLMENARES, G.V; Torres, A.O; Lara, S.V.: Resistencia antimicrobiana no codificada por plásmidos en Actinobacillus pleuroneumoniae serotipo 1. *Vet. Mex. Vol. XIX, núm 4, p 315-320, 1988.*
16. CORNETT, J.B; Wagner, R.B; Dobson, R.A; Wentland, M.P and Bailey, D.M.: In vitro and in vivo antibacterial activities of the fluoroquinolone WIN 49375 (amifloxacin). *Antimicrob. Agents Chemother*; 27:4-10, 1985.
17. DOMAGALA JM, Hanna LD, Heifetz CL, Huff MP, Mich TF, Sanchez P, and Solomon M.: New structure activity relationship of the quinolone antibacterials using the target enzyme. The development and application of a DNA gyrase assay *J. Med. Chem*; 29:394-404 1986.
18. DOPORTO, D.J.M; Trujillo, O.M.E; Zuñiga, J.: Comparative efficiency of two quinolones against natural respiratory infection by Actinobacillus pleuroneumoniae. *International Pig Veterinary Society*, 1:232, 1992.
19. ERICSSON, H.M & Sherris, J.C.: Antibiotic sensitivity testing. Report of an International Collaborative Study. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica. Section B Suppl.* 217. 1-90, 1971.
20. FENWICH BW.: Immune responses to the lipopolysaccharide and capsular polysaccharides of Haemophilus pleuropneumoniae in convalescent and immunized pigs. *Infect. Immun* 54: 575-582 1986.
21. ENDTZ, H.P; Ruijs, G.J; Gingeren, V; Jansen, W.H.: Quinolone in *Campylobacter* isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine. *J. Antimicrob. Chemother*, 27:199-208, 1991.
22. FLEMING A.: On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae. *British Journal of Experimental Pathology* 10:226-236. 1929.

23. FREY J. Perrin, Nicolet J.: Cloning and expression of a cohemolysin, the CAMP factor of Actinobacillus pleuropneumoniae Infect Immun. 57: 2050-2056, 1989.
24. GEORGOPAPADAKU NH, Dix BA, Angerhn P, Wick A and Olson GL.: Monocyclic and tricyclic analogues of quinolones: Mechanism of action. Antimicrob. Agents Chemother; 31: 614-616, 1987.
25. GREENWAY J. A.: Haemophilus pleuroneumoniae en B.C swine. Can. Vet. J. 22: 20-21, 1981.
26. HOOPER D, Wolfson J.: The fluoroquinolones: Structures, mechanisms of action and resistance and spectra of activity in vitro. Antimicrob Agents Chemother, 28:581-586, 1985.
27. INOUE, A; Yamamoto, K; Hirano N.: Drug susceptibility of Haemophilus pleuropneumoniae strains isolated from pigs. Jpn J Vet Sci 46: 175-180. 1984.
28. INNOUE, S.J; Yamagishi, S; Nakamura, S.: Novel nalidixic acid-resistance mutations relating to DNA-gyrase activity. In: Drug resistance in bacteria. Edited by: Mitsuhashi S. 411-414. Thieme Stratton, New York, 1982.
29. INZANA, T.J; Serotype specificity and immunogenicity of capsular polymer of Haemophilus pleuropneumoniae serotype 5. Infect. Immun. 53: 1580-1587, 1987.
30. JACQUES, M; Foiry, B; Higgins, R; Mittal, KR.: Electron microscopic examination of capsular material from various serotypes of Actinobacillus pleuropneumoniae. J. Bacteriol. 170: 3314-3318, 1988.
31. KAMP, E.M; Pompa, J.K; Anakotta, J and Smits, M.A.: Identification of hemolytic and cytotoxic proteins of Actinobacillus pleuropneumoniae by use of monoclonal antibodies. Infect. Immun. 59:3079-3085, 1991.
32. KILIAN, M; Biberstein, EL.: Family 111. Pasteurellaceae. Genus 11. Haemophilus In Krieg, NR (ED). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol 1, Baltimore, William & Wilkins, pp 558-569, 1984.
33. KRASEMANN, C & Hildenbran, G.: Interpretation of agar diffusion test. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 6:181-187. 1980.

34. Leman, A. D; Clock, R.D; Mengeling, W.L; Ponny, RH; Ed 1981: Diseases of swine, p. 371, Iowa State University Press, Ames Iowa U.S.A.

35. LIBAL, M.C and Gates, C.E.: Antimicrobial susceptibility patterns of Haemophilus pleuropneumoniae isolates from pigs with pneumonia. J. Am Vet Med. Assoc 180:399. 1982.

36. MATTHEWS, P.R.J and Pattison, I. H.: The identification of Haemophilus like organism associated with pneumonia and pleuresy in the pig. J. Comp. Path. 71:44-52, 1961.

37. MAUDSLEY, JR; Kadis, S.: Growth and hemolysin production by Haemophilus pleuropneumoniae, cultivated in a chemically defined medium. Can. J. Microbiol. 32: 801-805, 1986.

38. MITSUHASHI, S.: Drug resistance in bacteria In: R factor, Drug resistance plasmid. 3-45 Univ Tokyo, press Tokyo, 1977.

39. NIELSEN R.: Haemophilus pleuropneumoniae serotypes cross protection experiments. Nord. Vet. Med 36: 221-234, 1984.

40. OLANDER, H.J.: A septicemic disease of swine and its causative agent Haemophilus parahaemolyticus PhD Tesis, University of California, Davis, USA.

41. PATISON, IH; Howell, D.G and Elliot J.: Haemophilus-like organism isolated from pig lung and the associated pneumonic lesions. J. Comp Pathol. 67: 320-329. 1957

42. PEREZ-MARTINEZ, J.A.: Las quinolonas: Estructura química, mecanismo de acción bactericida y perfil de farmacología clínica. Vet. Mex. 23:57-66, 1992.

43. PHILIPS, I; Andrews, J.M; Bint, A.J; Bridson, E; Brown, D.F.J.: Working Party for the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. Breakpoints in in-vitro antibiotic sensitivity testing. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 21. 701-710, 1988.

44. PIJOAN, C.: Neumonía del cerdo. Encuentro sobre Enfermedades Infecciosas del Cerdo. Editado por Correa, G.P Y Morrilla, G.A; Ediciones de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos (AMVEC). p. 85-99, 1985.

45. POHL, S; Bertschinger, H.U; Frederiksen, W; Mannheim W.: Transfer of Haemophilus pleuropneumoniae and the Pasteurella haemolytica-like organism causing porcine necrotic pleuropneumonia to the genus Actinobacillus pleuropneumoniae comb. nov. on basis of a phenotypic and deoxyribonucleic acid relatedness). Internatl. J. System. Bacterio 33: 510-514, 1983.

46. PIDDOCK, L.J.V; Wray, C; McClaren, I. and Wise, R: Quinolone resistance in Salmonella spp, Veterinary pointers. Lancet, 336:123-125, 1990.
47. PIDDOCK, L.J.V.: Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. Journal of Applied Bacteriology, 68:307-318, 1990.
48. PRESCOTT, J.F and Yielding, K.M.: In vitro susceptibility of selected veterinary bacterial pathogens to ciprofloxacin. Can. J. Vet. Res, 54:195-197, 1990.
49. RINCON R.F.J; Bañuelos P.C.: Eficacia de Ciprofloxacina en el tratamiento de afecciones respiratorias en cerdos en la fase de crecimiento. XXVIII Congreso Nacional AMVEC, 220-222, Cancún Qroo, Septiembre 1993.
50. RYCROFT, A.N; Williams, D; Cullen, J.M and Macdonald, J.: The cytotoxin of Actinobacillus pleuropneumoniae (pleurotoxin) is distinct from the haemolysin and is associated with a 120 Kda polypeptide. J. Gen Microbiol, 137,561-568, 1991.
51. SHOPE, R.E.: Porcine Contagius Pleuropneumoniae. I. Experimental transmission, etiology and pathology. J. Exp. Med. 119: 357-368. 1964.
52. STOKES, E.J & Waterworth, P.M.: Antibiotic sensitivity tests by diffusion methods. Association of Clinical Pathologists Broadsheet, 55, 1972
53. UDEZE, F.A; Latimer, K.S.: Role of Haemophilus pleuropneumoniae iopolysaccharide endotoxin in the pathogenesis of porcine Pleuropneumonia. Am. J. Vet. Res 48: 768-773, 1987.
54. VANCUTSEM, P.M; Babish, J.G and Schwark, W.S.: The fluoroquinolone antimicrobials: structure, antimicrobial activity, pharmacokinetics, clinical use in domestic animals and toxicity. Cornell Vet., 80:173-186, 1990.
55. WATANABE, T AND Fukasawa; T.: Episome mediated transfer of drug resistance of Enterobacteriaceae. J. Bacter. 81:619-683, 1961.
56. WOLFSON, S.J and Hooper, C.D.: The fluoroquinolones structures, mechanisms of action, resistance and spectra of activity in vitro. Antimicrob. Agents Chemother; 28:581-586, 1985.