

86
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EFICACIA CLINICA DE UN PREPARADO
INTRAMAMARIO A BASE DE UNA
CEFAQUINOLONA EXPERIMENTAL
(CQEPKA-600M), PARA EL TRATA-
MIENTO DE LA MASTITIS
BOVINA.

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

JOSE ANTONIO SANTAMARIA DEL ROSARIO

ASESORES: M.V.Z. HECTOR SUMANO LOPEZ
M.V.Z. SALVADOR AVILA TELLEZ
M.V.Z. PEDRO CANO CELADA



MEXICO D. F.

1997

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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

EFICACIA CLINICA DE UN PREPARADO INTRAMAMARIO
A BASE DE UNA CEFALOSPORINA EXPERIMENTAL
(CQEPKA-600M), PARA EL TRATAMIENTO DE LA
MASTITIS BOVINA.

Tesis presentada ante la
División de Estudios profesionales de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
de la
Universidad Nacional Autónoma de México
para obtener el título de
Médico Veterinario Zootecnista

por

JOSÉ ANTONIO SANTAMARIA DEL ROSARIO

Asesores: MVZ: Héctor Sumano López.
MVZ: Salvador Avila Téllez.
MVZ: Pedro Cano Celada.

MÉXICO, D.F. 1997.

DEDICATORIA.

A Dios y a mi Virgencita de Guadalupe:
Gracias les doy por ayudarme a lograr mi meta
y por sobresalir en aquellos momentos
buenos y malos de la vida.

A mis Padres:
Celia Del Rosario Sánchez y Juan Santamaria Galicia
por darme su amor, apoyo, paciencia y confianza
durante toda mi formación profesional,
pero sobre todo gracias a ti Madre.

GRACIAS.

A G R A D E C I M I E N T O S .

A mis asesores: MVZ. Salvador Avila Telléz, MVZ. Héctor Sumano López y MVZ. Pedro Cano Celada por su ayuda para la elaboración de este trabajo.

Al MVZ. Edgardo Canizal Jiménez por su colaboración en el estudio estadístico de este trabajo.

Al MVZ. Luis Fernando Trejo Reyes y a Habram Raúl Gonzalez Martinez por su apoyo incondicional y amistad.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM por darme todos sus conocimientos para mi formación profesional.

A mi apreciable jurado.

Gracias por todas sus atenciones.

Gracias

José Antonio Santamaria Del Rosario.

Este trabajo forma parte de la línea de investigación
clave 85.4 : "Mastitis en Rumiantes".

La realización de este trabajo fue posible gracias a la
colaboración de la familia Fernandez Sobrino,
quienes proporcionaron el material animal.

CONTENIDO.

Página.

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
HIPÓTESIS.....	12
OBJETIVO.....	12
MATERIAL Y MÉTODOS.....	13
RESULTADOS.....	18
DISCUSIÓN.....	20
LITERATURA CITADA.....	23
CUADROS.....	29
FIGURAS.....	32

R E S U M E N .

SANTAMARIA DEL ROSARIO JOSE ANTONIO. EFICACIA CLINICA DE UN PREPARADO INTRAMAMARIO A BASE DE UNA CEFAQUINOLONA EXPERIMENTAL (CQEPKA-600M), PARA EL TRATAMIENTO DE LA MASTITIS BOVINA. (Bajo la asesoría del MVZ. Héctor Sumano López, MVZ. Salvador Avila Téllez, MVZ. Pedro Cano Celada).

La cefaquinolona (CQEPKA-600M), es un antimicrobiano desarrollado mediante la sustitución de un anillo cefalosporánico (ácido 7-amino cefalosporánico) en la posición 3 de una molécula 7-etilpiperazenil 6-fluoro 1-ciclopropilo 4-quinolínico, mediante la formación de un grupo carboxamido con un pH tendiente a la neutralidad y no es irritante. Es un antimicrobiano diseñado para inhibir tanto a microorganismos Gram-positivos como a Gram-negativos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la eficacia clínica de la cefaquinolona en mastitis clínica bovina con diversos grados de severidad. El trabajo se desarrolló con 100 casos clínicos de mastitis que se presentaron en vacas de primer parto en su mayoría y de las cuales al azar, 50 casos se destinaron a un grupo tratado por vía apertura natural del pezón con la cefaquinolona a dosis de 1 g (2 tubos), cada 12 hrs, designándose a este grupo como (T1); los 50 casos restantes se trataron con un preparado comercial a base de penicilina (5 millones de U.I) combinada con dihidroestreptomicina (120 mg) y dexametasona (0.2 mg), cada 12 hrs, denominando a este grupo como (T2) y que fue considerado como grupo testigo comparativo, ambos

tratamientos fueron aplicados por vía apertura natural del pezón. De los casos clínicos T1, 28/50(56%) respondieron favorablemente; comparativamente contra 24/50(48%) del grupo testigo (T2). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas ($P>0.05$). Las diferencias se dieron en los cuadros severamente agudos donde si se apreció una ventaja de 19 puntos porcentuales de eficacia clínica, cuando fueron tratados con la cefaquinolona.

INTRODUCCIÓN.

La mastitis se define como la inflamación de la glándula mamaria, caracterizada por daño en el epitelio glandular, seguido por una inflamación subclínica o clínica, pudiendo presentarse con cambios patológicos localizados o generalizados dependiendo de la magnitud del daño (17).

A pesar de la gran cantidad de medicamentos utilizados para el control de la mastitis bovina (24,29,39,42,43), la producción de leche requiere de nuevas opciones encaminadas a lograr el antimicrobiano ideal que debe tener características evidentes como son: eficacia superior al 90 % en casos clínicos agudos (36), tratados por primera vez, elevada eficacia en casos de mastitis crónica, mayor al 50 % (36), mejor liposolubilidad hacia las porciones profundas de la glándula mamaria y rápida eliminación sin dejar residuos (11,16,43). Estos dos últimos puntos son difíciles de conciliar farmacológicamente.

Cuando se realizan pruebas clínicas para el tratamiento de la mastitis con un antimicrobiano se deben considerar ciertos criterios de inclusión congruentes, ya que no resulta posible comparar la eficacia clínica de un compuesto si se comparan vacas multitratadas o vacas con mastitis agudas de primera vez (36). De hecho, Sumano *et al.* (36), proponen una división de los casos clínicos conforme a su gravedad y número de tratamientos anteriores; de manera, que una vaca que ha recibido dos o más tratamientos sea comparada con una que tenga una historia similar. Es necesario evaluar la

eficacia clínica de un antimicrobiano en una sola explotación, de ésta manera se evitan variables como resistencias bacterianas, usos inadecuados de medicamentos, manejo del hato (por ejemplo, número de ordeños al día), etc.

En la última década, los grupos de antimicrobianos que más han evolucionado, que mayor espectro han cubierto y que mayor potencia han presentado son las cefalosporinas y las fluoroquinolonas (38).

Durante la década de 1970 a 1980, las cefalosporinas proliferaron en cuanto al número, el espectro de actividad, las prescripciones efectuadas por los médicos y el costo para el sistema de atención de la salud.

Actualmente existen tres generaciones de cefalosporinas.

Las cefalosporinas de primera generación que agrupa a la cefotina, cefaleridina, cefapirina, cefazolina, cefalexina, cefradina y cefadroxin. Son activas contra microorganismos Gram-positivos y no tan eficaces contra Gram-negativos. Son sensibles a β -lactamasas (cefalosporinasas).

Las cefalosporinas de segunda generación se integra por el cefamandol, cefoxitina, cefotiram, cefaclor, cefuroxina y ceforanida. Son activas contra Gram-positivos y Gram-negativos. Son resistentes a β -lactamasas, ineficaces contra *Enterococos*, *Pseudomona aeruginosa*, *Actinobacter spp.*, y anaerobios obligados.

Las cefalosporinas de tercera generación incluyen a la cefoperazona, cefotaxina, cefotatan, ceftacidima, cefidizoxima, ceftriaxona y moxalactama. Son moderadamente

activas contra Gram-positivos, sin embargo son activas contra gran variedad de Gram-negativos, incluso contra ciertas especies de *Pseudomonas spp.*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter spp.* y *Citrobacter spp.* Son resistentes a β -lactamasas y a menudo penetran barrera hematoencefálica (34).

La cefalosporina C, obtenida a partir de la cepa del *Cephalosporium acremonium*, tiene un anillo β -lactámico y un anillo de dihidrotiazina adyacente. El tratamiento ácido de la cefalosporina C, la hidroliza al ácido 7 aminocefalosporánico (7-ACA). En sí el compuesto 7-ACA no tiene actividad biológica y se utiliza como materia prima para aumentar radicales en sitios específicos (34). Este mismo grupo se utilizó en la reacción de la cefaquinolona mediante una reducción con el grupo carboxilo del radical 4-quinolónico en la posición 3, dando lugar a un enlace carboxamido y una fórmula general como la que se presenta en la figura 1.

Con respecto a las quinolonas, hasta ahora se han conceptualizado únicamente tres generaciones, más ya se están desarrollando otras. Algunas ya han sido evaluadas en estudios clínicos (22). Desafortunadamente en México éste no es el caso. A menudo se hacen extrapolaciones de especie a especie de manera precipitada, obedeciendo más a la presión comercial que a criterios clínico-farmacológicos, debido a que se han convertido en el grupo de medicamentos más utilizados en las épocas de los ochentas y noventas (38), ya que ofrecen

significativas ventajas en cuanto a la farmacocinética, el espectro de actividad y bajo costo (34).

Leshner (citado por Albrecht (1)), puso a disposición de la comunidad médica en 1960, la primera quinolona antibacteriana, el ác. nalidixico, fármaco que pronto encontró un lugar en la terapéutica de las infecciones de vías urinarias. Con el tiempo, se demostró que generaba rápidamente resistencias bacterianas, lo que limitó su uso.

El ác. oxolinico y la cinoxacina, también son de las primeras quinolonas y al igual que el ác. nalidixico no lograron concentraciones antibacterianas sistémicas y por lo tanto, sólo son útiles como antisépticos urinarios (7). Estas primeras quinolonas muestran actividad contra diversas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (7). De cualquier manera el ác. nalidixico 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.

Los derivados fluorinados más recientes (norfloxacin, ciprofloxacina, enoxacina y perfloxacin) tienen actividad antimicrobiana mucho mayor, logran concentraciones sanguíneas y tisulares adecuadas en clínica y su toxicidad es baja (7).

Las fluoroquinolonas norfloxacina, ciprofloxacina y otras, inhiben a bacilos Gram-negativos como Enterobacteriaceas, especies de *Pseudomonas*, *Neisserias* y otras.

Las quinolonas contienen un grupo ác. carboxílico en la posición 3 del anillo estructural básico (41). Las fluoroquinolonas más recientes también contienen un constituyente flúor en la posición 6 y muchos de estos compuestos contienen un grupo piperazina en la posición 7 (18).

El núcleo básico de las fluoroquinolonas, posee sitios en los que es posible añadir algún otro radical para buscar nuevas acciones antibacterianas. Abundan datos acerca de las manipulaciones de la molécula, de manera que aquí solo se presentan los resultados resumidos en dichos intentos (38).

Posición 1. En esta posición se encontró que el grupo ideal es el ciclopropilo en función de sus características estéricas, espaciales de interacción electrónica con su potencial receptor, la ADN girasa. Recientemente se encontró que un sustituto t-butilo aumenta la eficacia contra Gram-positivos sin mucha pérdida contra Gram-negativos (1,6,19).

Posición 2. Poco se ha logrado a este nivel. La cinoxacina ha introducido un N en esta posición logrando importantes ventajas farmacocinéticas, pero perdiendo potencia antibacteriana (9).

Posiciones 3 y 4. En estas posiciones no se han podido modificar los grupos carboxilo y cetona, y no se han logrado resultados importantes (1,19).

Posición 5. Se intentaron sustituciones en esta posición con grupos N, NH₂, halo y alquilo, y no se han logrado resultados importantes (19).

Posición 6. De las sustituciones a este nivel, indudablemente que el F representó el avance más importante de las quinolonas de primera generación, haciéndolas de segunda generación. Tal sustitución es verdaderamente marcada, 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 (12). Todas las fluoroquinolonas de mayor potencia y utilidad clínica tienen un F en la posición 6.

Posición 7. 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 (6,19). Las diferencias entre las de la segunda y tercera generación de quinolonas se han hecho evidentes con los pocos estudios disponibles en términos de distribución.

Nouws et al (25) comentan acerca de dos quinolonas muy parecidas estructuralmente (la ciprofloxacina de segunda generación y la enrofloxacin de tercera generación) que la segunda logra el doble de las concentraciones plasmáticas que la primera bajo iguales condiciones experimentales, a pesar de que la diferencia entre ambas quinolonas es de un etilo en la posición 4 del anillo, inserto en la posición 7 de la quinolona (25).

Es prudente aclarar que la actividad *in vitro* de las fluoroquinolonas de segunda generación es muy buena. En cuanto a la actividad de la ciprofloxacina, se ha dicho que es excelente, con notable acción contra los *Micoplasmas* más comunes en medicina veterinaria (8,20,30).

Desafortunadamente, no se cuenta con más datos acerca del destino de este fármaco en el organismo de las distintas especies y por ello aún no se pueden establecer indicaciones precisas de eficiencia para diversas enfermedades.

Posición 8. En este sitio la sustitución con un radical "N" (tosufloxacina) u "O" (ofloxacina), ha mejorado los rasgos farmacocinéticos, aunque no tanto los antimicrobianos, de tal manera que la pérdida de la actividad *in vitro* se sustituye con una mejor actividad *in vivo* (9,15,23).

Como puede apreciarse en esta descripción el desarrollo químico de quinolonas y fluoroquinolonas y la modificación del grupo carboxilo daba lugar a la inactivación de la molécula.

Dado lo prolífico de esta molécula es difícil establecer todas las posibles relaciones de estructura-actividad; por ello desde el punto de vista de la farmacología veterinaria, lo importante es que se le someta a pruebas farmacológicas antes de ubicar su valor para la clínica (38).

En este contexto México llevó a cabo una idea atrevida dentro del desarrollo de las fluoroquinolonas, esto es, la sustitución del carboxilo de la posición tres, considerada como posición estratégica, hasta ese momento y clave para la

unión de la fluoroquinolona con su objetivo (la topoisomerasa II) (9). Lejos de obtener una reducción en la actividad, se logró una notable mejoría marcando así, lo que se puede calificar como el inicio de las fluoroquinolonas de cuarta generación.

Es posible que la diferencia entre la falta de actividad detectada por otros investigadores al sustituir este radical y la enorme actividad lograda con esta nueva molécula se deba a que la sustitución se hizo con una cefalosporina, constituyendo una molécula que se ha denominado cefaquinolona (CQEPCA-600M).

En México, se ha desarrollado una nueva línea de antimicrobianos mediante la substitución de un anillo cefalosporánico (ácido 7-amino cefalosporánico) en la posición 3 de una 7-etilpiperazenil 6-fluoro 1-ciclopropilo 4-quinolínico, mediante la formación de un grupo carboxamido como se ilustra en la figura 1¹. Esta reacción dió lugar a una patente internacional² y se calcula que pueden generarse cerca de 100 moléculas con actividad antimicrobiana. Una de ellas, la denominada CQEPCA-600M, que se caracteriza por presentar un pH tendiente a la neutralidad y no es irritante.

Las pruebas iniciales de susceptibilidad antimicrobiana sugieren concentraciones mínimas inhibitorias alrededor de 0.2-0.8 µg/ml, tanto para Gram-positivos como para

¹ Premio Canifarma 1995

² Patente Europea: 94-325-A-Mx.

Gram-negativos. Estas se pueden lograr con relativa facilidad mediante la aplicación directa de tubos intramamarios.

Aún no se sabe con precisión a que se debe la mejor actividad antimicrobiana de la CQEP-600M con respecto a los componentes por separado. Es posible que la CQEP-600M tenga un mecanismo antibacteriano doble, esto es, tanto en el citoplasma bacteriano inhibiendo el desenrollamiento del ADN, como en la pared, a través de la inhibición de la polimerización de los nucleótidos de Park (10). Se han realizado estudios para determinar con exactitud la participación de estas vías del metabolismo bacteriano y quizá otras en el mecanismo de acción de esta novedosa molécula. Hasta la fecha las evidencias indican que la actividad antibacteriana de la CQEP-600M persiste en bacterias resistentes a cefalosporinas y lo mismo sucede cuando hay resistencia para fluoroquinolonas, pero en contadas cepas de *Pseudomonas spp* en las que se han detectado resistencia tanto a cefalosporinas como a fluoroquinolonas, se reduce la actividad de la CQEP-600M.

En función de la necesidad de generar nuevas opciones antimicrobianas para el control de la mastitis bovina y dado el potencial que existe de la molécula referida, se consideró de utilidad realizar un ensayo clínico tendiente a evaluar dicho potencial.

HIPÓTESIS.

Con el uso de la cefaquinolona (CQEPCA-600M), aplicada por la apertura natural del pezón en los casos clínicos de mastitis con diferentes grados de severidad, se obtienen resultados clínicos más eficaces que los habitualmente obtenidos con otros antimicrobianos utilizados en el tratamiento de la mastitis clínica durante la lactación en vacas en producción de leche comercial.

OBJETIVO.

Evaluar la eficacia clínica de la cefaquinolona (CQEPCA-600M) aplicada por vía apertura natural del pezón para el tratamiento de la mastitis clínica bovina con diversos grados de severidad inflamatoria.

MATERIAL Y MÉTODOS.

El ensayo clínico se llevó a cabo en un hato de ganado bovino especializado en producción de leche, en el Edo. de México, Municipio de Ixtapaluca, ubicado a 19° latitud norte, 99° latitud oeste, a 2200 msnm, temperatura media anual de 18°C, precipitación pluvial anual de 750 mm y clima templado semifrío C(wo)(wb(i'))(14).

El diagnóstico de la mastitis clínica se realizó mediante la exploración física de la ubre y de la glándula mamaria afectada según lo mencionado por Avila (3). El grado de severidad fue calificado según lo señalado por Runnells, et al (31), en mastitis clínica severamente aguda (SA), moderadamente aguda (MA) y crónica (CR).

El ensayo se realizó con 50 casos clínicos de mastitis de vacas de primer parto en su mayoría, utilizando jeringas (tubos) para aplicación intramamaria conteniendo 500 mg de la cefaquinolona (CQEPCA-600M) en una base de propilenglicol y glicerina. Se aplicaron dos tubos en cada glándula con mastitis clínica y se repitió la dosis cada 12 hrs hasta las 24 hrs de iniciado el tratamiento (T1). Cuando no se dió mejoría del caso a las 36 hrs se cambió el tratamiento y el resultado se registró como negativo.

Se tomarón muestras de leche a las 12, 24, 36, 48, 60 y 72 horas después del último tratamiento para la cuantificación de la presencia de sustancias inhibidoras mediante la técnica microbiológica adaptada por Bennet et al (5), en un 10% de las vacas tratadas, con el fin de

identificar posibles residuos del quimioterápico aplicado.

La concentración de la cefaquinolona (CQEPKA-600M) se determinó en leche de vacas mediante el método ideado por Bennet et al (5), que consiste en la determinación de las concentraciones en leche de la fracción activa del quimioterápico por difusión en placa y que ha sido considerada tan sensible como el High Performance Liquid Chromatography (HPLC) para moléculas similares (21), estandarizado en leche de vacas y una cepa ultrasensible de *Escherichia coli* como microorganismo prueba.

1) Obtención de la cepa para la prueba: Se obtuvo del laboratorio de Microbiología y Bacteriología de la FMVZ-UNAM. Con un isopo estéril se tomó la muestra y se sembró en una caja de Petri con medio selectivo y diferencial, agar verde brillante (V.B.), mediante la técnica de aislamiento en cultivo puro y se incubó 24 hrs. a 37° C, el cultivo obtenido se sembró con la técnica de estria continua en otra caja de petri con agar V.B. y se incubó 24 hrs. a 37°C. De esta manera, se utilizaron cultivos jóvenes de 24 hrs. de *Escherichia coli* para toda la prueba.

2) Preparación del material: Se utilizaron refractarios tipo Pyrex resistentes al calor de 22 cm. X 22 cm. y de 5 cm. de altura, cuyo borde superior es esmerilado, sometidos a un lavado con agua y jabón, desgrásandolos, una vez secos, con alcohol al 70%, posteriormente fueron sellados con dos capas de plástico de silicón (Ega-Pack) y envueltos en papel estraza para su esterilización con un autoclave a una

temperatura de 121°C y una presión de 15 lb., durante 15 minutos.

Los medios utilizados fueron agar Müller-Hinton (M-H) y caldo infusión cerebro corazón (CICC), preparados según especificaciones del producto y posteriormente esterilizados en el autoclave (121°C/15 lb/15 min.).

3) Estandarización de la prueba: Esta se llevó a cabo para determinar la concentración de bacterias, la concentración del fármaco, y el volumen de agar a utilizar a lo largo de toda la investigación y poder así comparar los resultados a obtener de las muestras.

a) Concentración de bacterias: Se utilizó un inóculo obtenido del cultivo joven de *E. coli* en agar V.B. que se sembró en tubo con 4 ml. de CICC, se homogenizó y se estandarizó en el espectrofotómetro Bausch & Lomb, hasta alcanzar una lectura de 0.6 de absorbancia al utilizar un filtro para medir una longitud de onda con luz visible de 530 nm. lo cual correspondió a 112.5×10^7 UFC/ml. De aquí se tomaron 1.6 ml (inóculo estándar) y se agregaron a 200 ml de agar M-H estéril y tibio, lo que determinó una concentración final bacteriana de 1.41×10^{11} UFC/ml.

b) Concentración del quimioterapéutico: El fármaco utilizado fue CQEPKA-600M. El límite inferior de sensibilidad de detección de este método fue establecido en el laboratorio de Farmacología del Departamento de Fisiología y Farmacología de la FMVZ de la UNAM a 0.001 µg de CQEPKA-600M/ml de leche de vaca a las 48 hrs de iniciado el

tratamiento. Lo cual se llevó a cabo por diluciones dobles seriadas.

c) Se utilizaron 200 ml de agar M-H / refractario para toda la prueba.

4) Preparación de las placas de agar: Una vez estériles los refractarios, se les quitó el papel y se colocaron entre dos mecheros de Bunsen lo más cercano posible con el cuarto cerrado evitando corrientes de aire, se destaparon y se les vació el agar M-H (200 ml/ refractario) inmediatamente después de habersele agregado el inóculo estandarizado y homogeneizado. En este momento con el mechero se quitaron las posibles burbujas de aire que habían quedado y se tapó herméticamente con el (Ega-Pack). Se dejó solidificar en una superficie plana durante 1 hora aproximadamente. Una vez solidificado, se realizaron 25 perforaciones equidistantes una de otra 4.4 cm, con un sacabocados de 0.05 cm de diámetro, para lo cual se utilizó un diagrama con las posiciones de las perforaciones debajo del refractario.

Una vez realizado esto, con micropipeta se tomaron 100 ml. de cada una de las diluciones y se fueron colocando en los pozos utilizando una puntilla diferente en cada ocasión .

Se identificaron los pozos en el refractario y se incubaron por 24 hrs. a 37°C.

5) Lectura de los halos de inhibición: Al día siguiente se midieron los diámetros de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano con un Vernier.

6) Análisis de las muestras: Para el análisis de las muestras se utilizaron los mismos pasos que para la preparación de las placas de agar, con la diferencia de que en lugar de utilizar diluciones del fármaco se aplicaron directamente 100 ml. de leche. Los resultados (halos de inhibición) se compararon contra la línea estándar para determinar la concentración del fármaco en cada muestra de leche.

El grupo testigo se conformó por 50 casos de mastitis clínica tratados con penicilina (5 millones de U.I) con sulfato de dihidroestreptomocina (120 mg) y dexametasona (0.2 mg) en solución acuosa (T2), siguiendo el mismo método de tratamiento establecido en el grupo (T1).

La eficacia clínica del antimicrobiano se evaluó mediante pruebas de Ji-cuadrada, (35).

RESULTADOS.

Del total de los 100 casos clínicos tratados, 52/100 respondieron favorablemente antes de las 72 hrs. de iniciada la aplicación del quimioterapéutico vía apertura natural del pezón, calificándose como positivos; y 48/100 no respondieron en el periodo antes indicado por lo que se calificaron como resultados negativos (Cuadro 1).

De los 50 casos clínicos tratados con la cefaquinolona (COEPCA-600M) (T1), aplicada por apertura natural del pezón en dosis de 1 gr. en una base de propilenglicol y glicerina por glándula mamaria afectada, cada 12 hrs; 26/50 (52%) correspondieron a casos clínicos severamente agudos; 16/50 (32%) a moderadamente agudos, y 8/50 (16%) a casos crónicos (Cuadro 2) (Fig. 2).

En este grupo de tratamientos, 28/50 (56%), respondieron satisfactoriamente desde el punto de vista clínico en un tiempo menor a 72 hrs, resultado que se calificó como positivo. De estos 28 casos, 14 (54%) correspondieron a cuadros severamente agudos, 11 (69%) a moderadamente agudos y 3 (37%) a crónicos (Cuadros 1 y 2) (Fig. 2) (31).

Comparativamente los 50 casos clínicos correspondientes al grupo testigo (T2) que recibieron como tratamiento por dosis una combinación de penicilina (5 millones) con sulfato de dihidroestreptomocina (120 mg) y dexametasona (0.2 mg) en sol. acuosa, cada 12 hrs, 23/50 (46%) correspondieron a cuadros con presentación calificada clínicamente como

severamente agudos; 19/50 (38%) como moderadamente agudos, y 8/50 (16%) como casos crónicos (Cuadro 3) (Fig. 3) (31).

De este grupo testigo, 24/50 (48%), respondieron satisfactoriamente desde el punto de vista clínico en un tiempo menor a 72 hrs, resultado que se calificó como positivo. De estos 24 casos, 8 (35%) correspondieron a cuadros severamente agudos, 13 (69%) a moderadamente agudos y 3 (37%) a crónicos (Cuadros 1 y 3) (Fig. 3).

DISCUSIÓN.

Comparando el total de casos clínicos resueltos entre grupos tratados con la cefaquinolona (T1) contra penicilina combinada con dihidroestreptomicina y dexametazona (T2) (testigo), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (28/50 vs 24/50) (J_i cuadrada=0.7163, $P>0.05$) respectivamente (Cuadro 1).

Quando los casos clínicos se presentaron con un grado de severidad inflamatoria calificada como moderadamente aguda (T1 y T2 = 69%) o crónica (T1 y T2 = 37%), la eficacia resultó igual para ambos tratamientos, considerando severidad del cuadro inflamatorio (Cuadros 2 y 3) (Fig. 2 y 3), la diferencia se apreció en los resultados de los cuadros severamente agudos, donde se obtuvo una eficacia del 54% para el grupo tratado con la cefaquinolona (T1) (Cuadro 2) (Fig. 2) y un 35% para el grupo testigo (T2) (Cuadro 3) (Fig. 3), resultando una diferencia estadísticamente significativa de 19 puntos porcentuales a favor del grupo T1 (Fig. 4).

Considerando que la cefaquinolona estudiada es un quimioterapéutico originado a partir de la combinación de una cefalosporina con una quinolona, es de interés tener presente la eficacia clínica en los tratamientos para mastitis tanto con cefalosporinas como con quinolonas.

Con respecto al empleo de cefalosporinas, Flores, (13), aplicando cefacetil sódico para el tratamiento de vacas finalizando lactación encuentra un 77% de eficacia clínica; Vega, (40), utiliza cefalexina y cefacetil con una eficacia

del 64% y 71%; Bansal, et al, (4), empleando cefaloridina, logran una eficacia del 81% para tratamientos de mastitis clínica, resultados que son mayores a los obtenidos con la cefaquinolona. Sin embargo se ha comentado que por el uso indiscriminado de antimicrobianos para el tratamiento de la mastitis, la variabilidad en los patrones de resistencia bacteriana y los distintos manejos de medidas de higiene, es de poco valor realizar estudios comparativos entre granjas y se requerirá preferentemente de un bioensayo dentro de cada explotación Sumano, et al, (34).

Sánchez, (32), evalúa enrofloxacin y Sánchez, (33) utiliza danofloxacin, ciprofloxacin y norfloxacin en casos severos y moderadamente agudos de mastitis. El primer autor obtiene 87%, de eficacia clínica y el segundo 75%, 65% y 76% de eficacia respectivamente para las quinolonas empleadas.

Alvarez, (2), estudia la eficacia de la enrofloxacin en el tratamiento de casos de mastitis severas y moderadamente agudas logrando un 84% de eficacia clínica.

Estos resultados son superiores a los logrados con la aplicación de la cefaquinolona donde la eficacia fue del 56%, quimioterapéutico que *in vitro* mostró inhibición del desarrollo microbiano pero administrado por apertura natural del pezón resultó con baja eficacia en la resolución de los casos de mastitis tratados.

El que la cefaquinolona haya resultado con una menor eficacia comparativamente a lo reportado para las cefalosporinas y quinolonas, se puede atribuir a la

concentración del producto aplicado, ya que cuando se doblo la dosis los resultados fueron superiores, situación que no se discute en este trabajo debido a que el número de casos tratados con dosis dobles fueron en poca cantidad.

Es bien sabido que la presencia de leche disminuye la eficacia de la mayoría de los antimicrobianos (26,27,37,44) y que un exceso de un antimicrobiano puede ocasionar una drástica disminución de la fagocitosis a nivel de la glándula mamaria (28,37). De ahí que, la eficacia obtenida suele ser producto de la dosis y que si un incremento en ella mejora la eficacia clínica, se puede contar con un elemento importante para la clínica dado que no es irritante y su eliminación es relativamente rápida como lo muestra: los resultados obtenidos.

Como sugerencia final en este trabajo, cabría proponer la realización de pruebas adicionales con 2 y 3 gramos de la cefaquinolona por cuarto, así como estudiar su efecto sobre la actividad fagocitaria en glándula mamaria.

LITERATURA CITADA.

1. Albercht, R.: Development of antibacterial agents of the nalidixic acid type. *Prog. Drog Res.* 21: 99-104 (1977).
2. Alvarez, E.I.: Comparación clínica del tratamiento de mastitis con enrofloxacin administrada por vía intramuscular y por conducto natural del pezón. Tesis de Licenciatura. Fac. Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. (1995).
3. Avila T.S.: Mastitis: Importancia y diagnóstico clínico. Memorias del "Curso internacional teórico-práctico de actualización en el diagnóstico de las enfermedades más frecuentes en bovinos"., *FMVZ-UNAM*: 119-124 (1996).
4. Bansal, B.K., Singh, K.B., Naurigal, D.C and Uppal, S.K.: Treatment of bovine clinical mastitis during lactation with a Cephalosporin product. *Indian Vet. J.*, 72: 999-1000. (1995).
5. Bennet, J.B.B., Brodie, J.L., Benner, E.J. and Kirby, W. M.: Simplified accurate method for antibiotic assay. Clinical specimens. *Amer. Soc of Microb.* 14.: 170-177(1966).
6. Bergan, T.: Quinolones In: Antimicrobial Annual 2. *Elsevier* Amsterdam, Holland, 1987.
7. Bertram, G.K, M.D, PhD.: Farmacología básica y clínica. 4ª Edición. *Ed. El Manual Moderno*. México. D.F. 1993.
8. Chin, N.X., New, H.C.: Ciprofloxacin, a quinolone carboxylic acid, compared with those of norfloxacin, new β lactams, aminoglycosides, and trimethoprim. *Antimic Agents Chem.* 25: 319-326 (1984).

9. Chu, D.T.W., Fernandes, P.B.: Structure activity relationships of the fluoroquinolones. *Antimic Agents Chem.* 33: 131-135 (1989).
10. Chu, D.T.W., Fernandes, P.B and Pernet, A.G.: Synthesis and biological activity of benzothiazolo (3, 2-9) quinolone antibacterial agent. *J. Med. Chem.* 29: 1531-1534 (1986).
11. Craven, N.: Efficacy and financial value of antibiotic treatment of bovine clinical mastitis during lactation. A review. *Br. Vet. J.*, 143: 410-422 (1987).
12. Dogmala, J.M., Hanna, L.D., Heifetz, C.L., Huff, M.P., Mich, T.F., Sánchez, M.: Antibacterials using the target enzyme. The development of a DNA gyrase assay. *J. Med. Chem.* 29: 394-404 (1986).
13. Flores, T.A.R.: Eficacia del cefacetril en el tratamiento intramamario para el secado en vacas. Tesis de Licenciatura. Fac. Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. (1991).
14. García M E.: Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. (Para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana). *Instituto de Geografía-UNAM.* 3^a edición, México, D.F. 1981.
15. Gargallo, D., Moros, M., Coll, R., Esteve, M., Pares, J., Xicota, M.A., Gumea, J.: Activity of E-3846, a new fluoroquinolone and in experimental cystitis and phielonephritis in rats. *Antimic agents Cham.* 39: 636-641 (1988).

16. Giesecke, W.D.: Bovine Mastitis. Technical Communication 51. Department of Agriculture Technical Services of the Republic of South Africa, Pretoria, South Africa, 1979.
17. Giesecke, W.H.: The definition of bovine mastitis and the diagnosis of its subclinical types during normal lactation. IDF Seminar on mastitis control. Reading University 1975. 62-69. College of Estate Management, Reading, England (1975).
18. Goodman, G.A., Rall, W.T., Niesl, Taylor, P.: The pharmacological basics of therapeutics. Ed. Médica Panamericana. México 1993.
19. Ito, A., Hirai, K., Inoue, M., Koga, H., Suzue, S., Irikure, T., Mishahushi, S.: *In vitro* antibacterial activity of AM-715 a new nalidixic acid analogue. *Antimic Agents Chem.* 17: 103-108 (1980).
20. King, A., Shanon, K., Phillips, I.: The *in vitro* activity of ciprofloxacin compared with that of norfloxacin and nalidixic acid. *J. Antimic. Chem.* 13: 325-331 (1984).
21. Kung, K.J., Rioud, L., Wolfram, S. and Wanner, M.: Comparison of an HPLC and bioassay method to determine antimicrobial concentrations after intravenous and oral administration of enrofloxacin in four dogs. *Res. in Vet. Sc.* 54: 247-248 (1983).
22. Leysen, D.C., Haemers, A.N and Pattyn, S.R.: Mycobacteria and the new quinolones. *Antimic Agent chem.* 33., 1-5 (1989).
23. Migamoto, T., Matsumoto, J., Chiba, K., Egawa, H., Shibamori, K., Minamida, A., Nishimura, Y., Okada, H.,

- Katoaka, M., Fujita, M., Hirotsu, T., Nakamo, J.: Synthesis and structure-activity relationships of 5 substituted 6, 8 potency. *J. Med. Chem.* 33: 1645-1656 (1990).
24. Moore, G.A. and Heider, L.E.: Treatment of Mastitis. *Vet. Clin. North Am. Large Anim. Pract.*, 6: 323-333 (1984).
25. Nows, J.F.M., Mevius, D.J., Uree, T.B., Baars, A.M., Laurensen.: Ciprofloxacin following intravenous and oral administration to calves and pigs. *Vet. Q.* 10: 156-163 (1988).
26. Owens, W.E. and Nickerson, S.C.: Treatment of *Staphylococcus aureus* mastitis with penicillin and novobiocin; Antibiotic concentrations and bacteriologic status in milk and milk mammary tissue. *J. Dairy Sci.*, 75: 115-124 (1990).
27. Owens, W.E., Ray, C.H. and Washburn, P.J.: Effect of selected antibiotics on *Staphylococcus aureus* present in milk from infected mammary glands. *J. Vet. Med.*, 40: 508-514 (1993).
28. Paape, M.J. and Miller, R.H.: Effects of florfenicol, chloramphenicol and thiamphenicol on phagocytosis, chemiluminescence and morphology of polymorpho-nuclear neutrophil leukocytes. *J. Dairy Sci.*, 73: 1734-1744 (1990).
29. Prescott, J.F. and Baggot, J.D.: Antimicrobial therapy in veterinary medicine. *Blackwell Scientific publications*, Boston, Massachusetts, 1993.
30. Prescott, J.F., Yielding, K.M.: *In vitro* susceptibility of selected veterinary (1990).

31. Runnells, R.A., Monlux, W.S. y Monlux, W.A.: Principios de patología veterinaria. Ed. Continental, S. A. 5ª impresión en Español, México, D.F. 1975.
32. Sánchez, M.J.M.: Prueba de Microquel (Producto natural, mezcla de sabila, sauco y alcanfor) en comparación con enrofloxacin en cuadros clínicos de mastitis. Tesis de Licenciatura. Fac. Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. (1994).
33. Sánchez, R.M.R.: Estudio comparativo de la eficacia de varios quimioterapéuticos en el tratamiento de casos clínicos de mastitis por coliformes. Tesis de Licenciatura. Fac. Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. (1994).
34. Smith, C.M., Reynard, A.M.: Farmacología. Ed. Médica Panamericana. España, 1993.
35. Steel, G.D.R and Torrie, H.J.: Bioestadística: Principios y Procedimientos. Ed. McGraw-Hill. 2ª Edición, México, D.F. 1988.
36. Sumano L.H., Brumbaugh, G.W., Mateos, T.G.: Bases farmacológicas del tratamiento de la mastitis bovina. *Vet. Mèx.*, 27: 63-81 (1996).
37. Sumano, L.H.: Farmacología clínica en bovinos. Ed. Trillas. 1ª Edición, México, D.F. 1996.
38. Sumano, L.H.: Quinolonas y fluoroquinolonas en medicina veterinaria. *Vet. Mèx.* 24: 83-92 (1993).

39. Sumano L.H. and Ocampo, C.L.: Pharmacological basis for the treatment of bovine mastitis. *Isr. J. Vet. Med.*, 47: 127-135 (1992).
40. Vega, A.J.L.: Tratamiento de mastitis clínica empleando cuatro diferentes medicamentos con y sin adición de sulfóxido de dimetilo (DOMOSO). Tesis de Licenciatura. Fac. Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. (1994).
41. Wolfson, J.S. and Hooper, D.C.: Norfloxacin: a new targeted fluoroquinolone antimicrobial agent. *Ann. Intern. Med.*, 10: 283-251 (1988).
42. Wright, C.L.: Pharmaceutical agents and the bovine udder. In: *Pharmacological Basis of Large Animal Medicine*. Edited by: Bogan, J.A., Less, P., Yoxall, A.T., 87-106. *Blackwell Scientific Publications*, London, 1983.
43. Ziv, G. .: Pharmacokinetic concepts for systemic and intramamary treatment in lactating and dry cows. *Proc. Int. Dairy Fed.*, 85: 314-340 (1975).
44. Ziv, G. and Sulman, F.G.: Distribution of aminoglycoside antibiotics in blood and milk. *Res. vet. Sci.*, 17: 66-71 (1974).

Cuadro 1.

Total de casos de mastitis clínica con diferentes grados de severidad que respondieron positiva o negativamente al tratamiento con la cefaquinolona (COEPCA-600M) y la combinación de penicilina-dihidroestreptomicina-dexametasona.

Antimicrobiano.	Casos resueltos (+)				Casos no resueltos (-)				Total
	SA	MA	CR	Subtotal	SA	MA	CR	Subtotal	
Cefaquinolona (COEPCA-600M).	14	11	3	28	12	5	5	22	50
Penicilina Dihidroestreptomicina Dexametasona	8	13	3	24	15	6	5	26	50
Total				52				48	100

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Proporción de la comparación de la eficacia clínica de la cefaquinolona (CQEPCA-600M) vs la combinación de penicilina-dihidroestreptomicina-dexametasona en el tratamiento de la mastitis clínica con diferentes grados de severidad que respondieron positiva o negativamente respectivamente (Cuadro 2 y 3).

Cuadro 2.

Proporción de casos de mastitis clínica tratados con la cefaquinolona (CQEPCA-600M).

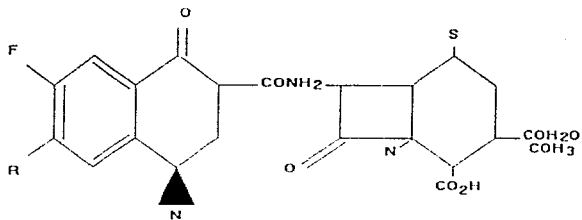
Grados de severidad de la mastitis clínica.	Proporciones totales de casos clínicos.	Proporciones de casos que respondieron positivamente.	Proporciones de casos que respondieron negativamente.
MA	16/50=32%	11/16=69%	5/16=31%
SA	26/50=52%	14/26=54%	12/26=46%
CR	8/50=16%	3/8=37%	5/8=63%
TOTAL	50/50=100%	28/50=56%	22/50=44%

Cuadro 3.

Proporción de casos de mastitis clínica tratados con la combinación de penicilina-dehidroestreptomocina-dexametasona.

Grados de severidad de la mastitis clínica	Proporciones totales de casos clínicos	Proporciones de casos que respondieron positivamente	Proporciones de casos que respondieron negativamente
MA	19/50=38%	13/19=69%	6/19=31%
SA	23/50=46%	8/23=35%	15/23=65%
CR	8/50=16%	3/8=37%	5/8=63%
TOTAL	50/50=100%	24/50=48%	26/50=52%

Figura 1.



Formula estructural de la cefaquinolona (CQEP).

Fig. 2. Porcentajes de la presentación y eficacia clínica de cefaquinolona (T1).

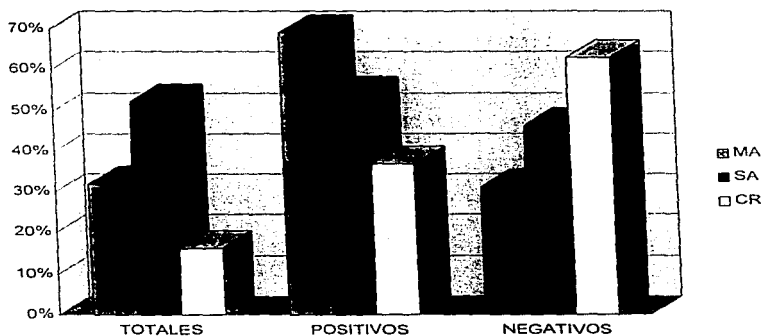


Fig. 3. Porcentajes de la presentación y eficacia clínica de la combinación de penicilina-dihidroestreptomicina y dexametasona (T2).

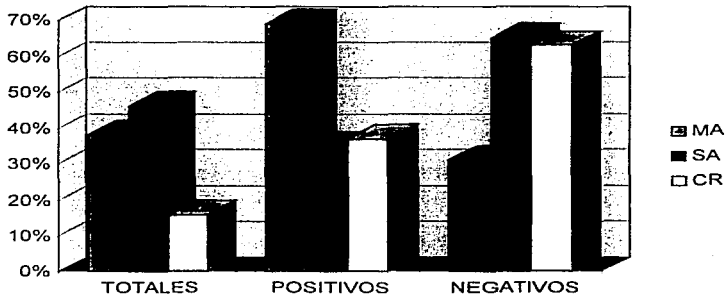
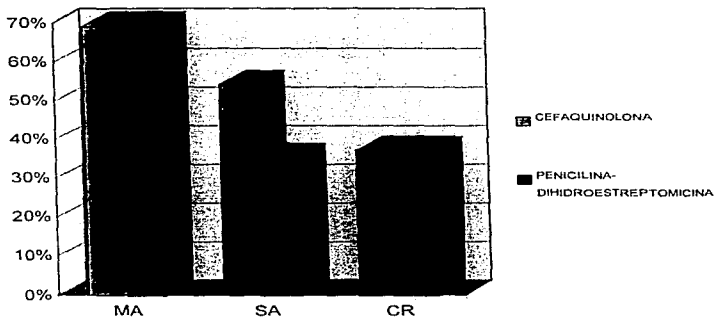


Fig. 4. Resultados positivos obtenidos con la cefaquinolona (T1) vs penicilina-dihidroestreptomicina y dexametasona(T2)



**Fig. 5. Resultados negativos obtenidos con la cefaquinolona (T1)
vs penicilina-dihidroestreptomicina y dexametasona (T2).**

