



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Estudios de isobogramas con 8 premezclas de antibióticos y 5 bacterias del aparato respiratorio del cerdo.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO

DE LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:

GABRIELA DÍAZ RODRÍGUEZ

DIRECTORES DE TESIS:

DRA. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA

DR. ABEL CIPRIÁN CARRASCO

MC ARIANNA ROMERO FLORES

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE VIROLOGÍA DE LA
COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO DE LA FES-
CUAUTILÁN U.N.A.M.**

Índice General

1.0. Antecedentes e Introducción.....	1-3
1.1. Enfermedades del complejo respiratorio del cerdo y <i>E. coli</i>	4-5
1.2. Generalidades de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> Serotipo 1 (App ST1).....	5-6
1.3. Generalidades de <i>Streptococcus suis</i> Serotipo 2 (<i>S. suis</i> ST2).....	6-7
1.3. Generalidades de <i>Pasteurella multocida</i> tipo A (<i>P.m</i> tipo A).....	7-8
1.4. Generalidades de <i>Haemophilus parasuis</i> (<i>Hps</i>).....	8-9
1.5. Generalidades de <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>).....	10-11
2.0 Objetivos.....	12
3.0 Material y método	
3.1 Presentación de cada premezcla antibiótica: Clortetraciclina, Tiamulina fumarato, Colistina, Lincominicina, Espectinomycinina, Amoxicilina, Florfenicol y Tilmicosina.....	13
3.2 Material.....	14
3.3 Cepas.....	14
3.4 Premezclas antibióticas.....	15
3.5 Combinación de antibióticos.....	16-18
3.6 Esquema y descripción del método de tablero de ajedrez (“checkboard assay”).....	19-21
4.0 Cuadro de las combinaciones específicas de los antibióticos para elaboración de placas.....	21-24
5.0 Medios de cultivo.....	25
6.0 Soluciones Stock y Concentración mínima inhibitoria (MIC).....	26-27
6.1 Metodología de la preparación de las soluciones Stock [512 µg/mL] y [15,360 µg/mL].....	28-30

7.0	Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) para cada antibiótico frente a los cinco microorganismos <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> , <i>Streptococcus suis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pasteurella multocida</i> y <i>Haemophilus parasuis</i>	31
7.1	Criterios para definir un efecto antagónico, sinérgico o indiferente.....	32-33
8.0	Resultados de MIC para cada antibiótico frente a 5 bacterias.....	33-36
8.1	Resultados de FIC (Fracción de la concentración mínima inhibitoria).....	37-39
8.2	Resultados de Isobogramas de;	
	• <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> (App ST1).....	40-44
	• <i>Streptococcus suis</i> (S. suis ST2).....	45-49
	• <i>Escherichia coli</i> (E. coli).....	50-54
	• <i>Pasteurella multocida</i> . (P.m tipo A).....	55-59
	• <i>Haemophilus parasuis</i> (Hps).....	60-64
8.3	Resultados en gráficos de colores.....	65-67
9.0	Discusión de resultados.....	68-71
10.0	Conclusión.....	72
11.	Referencias.....	73-74

Resumen

El presente estudio realizado en el Laboratorio de Virología de la Coordinación General de Estudios de Posgrado, del estudio de isobogramas de 8 premezclas de antibióticos (Clortetraciclina, Tiamulina fumarato, Colistina, Lincomicina, Espectinomicina, Amoxicilina, Florfenicol y Tilmicosina) y 5 bacterias (*App ST1*, *S.suis ST2*, *E.coli*, *P.multocida tipo A* y *H. parasuis*) causantes de afecciones del tracto respiratorio del cerdo; tiene por objetivo determinar las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) de cada una de las premezclas antibióticas, empleando la técnica de sembrado masivo en agar, para conocer la cantidad mínima de premezcla que se necesita para inhibir a la bacteria. Además de determinar el efecto que generan al estar en combinación, mediante el método de ajedrez (checkboard assay). La finalidad de este trabajo de investigación fue obtener datos de referencia de estos antibióticos que dan cura a las infecciones del tracto respiratorio del cerdo y por consiguiente soluciones a la industria porcina evitando grandes pérdidas económicas.

1.0 Antecedentes

Los primeros isobogramas fueron publicados por Fraser a finales del siglo XIX y presentaban una interacción de tipo antagónico para el efecto letal de las combinaciones entre atropina y fisostigmina (Fraser,1872).No existen indicios acerca de la siguiente publicación de isobogramas hasta la aparición entre 1926-1927 de una serie de trabajos realizados por Loewe y sus colaboradores, la mayoría de los cuales presentaban interacciones antagónicas entre los efectos letales de las combinaciones de barbitúricos y analgésicos.

A pesar de un cierto incremento en el número de publicaciones utilizando isobogramas para establecer interacciones, tuvieron que transcurrir 20 años más para que el método se generalizase. Aunque el concepto teórico en los que estaban basados era el correcto, las consideraciones estadísticas implicadas en la interpretación de los resultados, permanecía sin especificar. Unos años más tarde, este aspecto se convirtió en el principal punto de interés de algunos investigadores (Tallarida *et. al.*2000).

Como resultado surgió uno de los métodos estadísticos más utilizado en el análisis de interacciones con isobogramas. A partir de entonces se han publicado muchos trabajos que utilizan los isobogramas como método de análisis de combinaciones de diversos fármacos y en particular de analgésicos.

Introducción

Los isobogramas son representaciones gráficas en un eje de coordenadas de dosis equiefectivas de dos o más fármacos. En cada uno de los ejes se representa la dosis equiefectiva de uno de los fármacos que se estudian (DA) y (DB) respectivamente. Estos dos puntos se unen mediante una línea (isobolo) que también se conoce como línea de aditividad o de no interacción. A continuación, se representa el valor de dosis de la combinación de ambos (da, db) que es equiefectiva con las dosis individuales de los fármacos (Fig.1).

Cuando los agentes no interactúan (interacción cero) los puntos que representan las dosis isoeffectivas de la combinación están situados sobre el isobolo formando una línea recta (Berembaum, 1997)

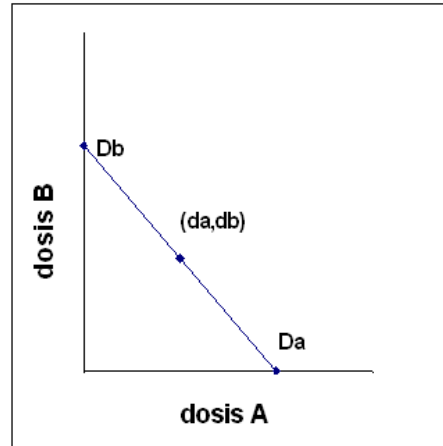


Figura 1.- Isobolograma de interacción cero de una combinación de dos sustancias A y B

Cada uno de los puntos de esta línea representa una combinación de A y B en la que las sustancias se comportan de modo aditivo, es decir, no se produce interacción. La ecuación que la define es la siguiente:

$$\text{Ecuación 1.- } \frac{d_a}{D_A} + \frac{d_b}{D_B} = 1$$

Interpretación:

D_A, D_B =dosis equieffectivas de cada uno de los fármacos a estudiar.

d_a, d_b =valor de dosis de la combinación de ambos fármacos.

Cuando la combinación es más efectiva de lo que se espera se requieren menos cantidades de d_a o d_b para producir el mismo efecto, mientras que D_A y D_B permanecen inalteradas, con lo que la ecuación se transforma en una desigualdad y define un isobolograma cóncavo (sinergia) (Fig. 2).

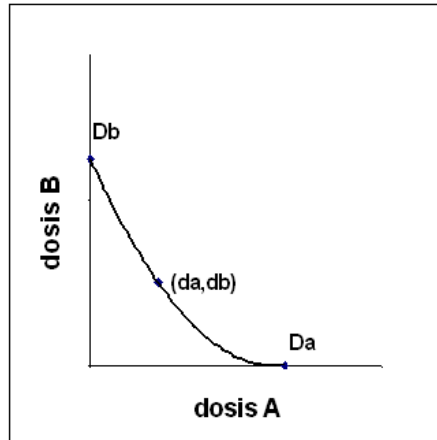


Figura 2.- Isoblograma de interacción sinérgica de una combinación de dos sustancias.

Ecuación 2.- $d_a/DA + d_b/DB < 1$

Por otra parte, cuando los agentes en combinación son menos efectivos que lo esperado d_a y/o d_b deberían ser incrementados con el fin de obtener el mismo efecto (antagonismo). La ecuación en este caso describe un isobolo convexo (Fig. 3).

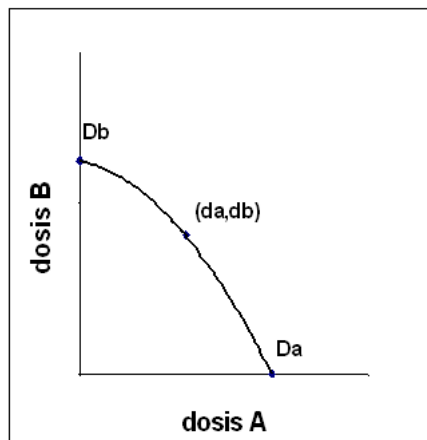


Figura 3.- Isoblograma de interacción antagónica de una combinación de dos sustancias.

Ecuación 3.- $d_a/DA + d_b/DB > 1$

1.1 Enfermedades del complejo respiratorio del cerdo y *E.coli*

La presencia de un brote de alguna enfermedad en las granjas, afecta a la productividad de distintas formas. Puede, por ejemplo, reducir la productividad por el aumento de la mortalidad y reducir el promedio de la ganancia diaria. Además, uno de los efectos más importantes con la presencia de una enfermedad es que afectaría la economía del negocio al aumentar el número de cerdos de bajo valor o de desecho, reduciendo así la eficiencia al incrementar el costo de la producción.

Las enfermedades respiratorias son causadas por una combinación de diversos agentes patológicos que dan como resultado la Enfermedad del Complejo Respiratorio Porcino o ECRP. Las enfermedades respiratorias en los cerdos son causadas muy rara vez por un determinado patógeno. Es decir, casi siempre hay dos o más agentes patógenos que afectan al cerdo al mismo tiempo.

Los patógenos más frecuentes en un brote de ECRP son los siguientes:

- *Streptococcus suis*
- *Pasteurella multocida*
- *Actinobacillus pleuropneumoniae*
- *Haemophilus parasuis*

En cuanto *E.coli* es muy común en las granjas porcinas, ya que es habitante normal en la flora intestinal y se elimina en grandes cantidades por las heces. Aunque no todas las cepas de la bacteria son patógenas, el riesgo de brotes de colibacilosis va en proporción directa con el nivel y dosis de desafío. Este problema se agrava en explotaciones con alta densidad, fallas en instalaciones, pocas jaulas de maternidad disponibles, falta de higiene y mal manejo (Hampson *et al.*, 2001).

Lo ideal para la porcicultura moderna radica en aumentar los índices de ganancia diaria de peso (GDP) y disminuir la conversión alimenticia (CA). Estos parámetros se ven seriamente afectados por las enfermedades

Hoy en día siguen teniendo una relevante importancia estos microorganismos ya que los problemas neumónicos siguen apareciendo tanto en las granjas convencionales como en las granjas de alta salud. Los estudios que se llevan a cabo se enfocan principalmente a identificar los mecanismos de patogenicidad, a su diagnóstico y a su profilaxis de cada una de las enfermedades estudiadas.

Uno de los puntos medulares en el tratamiento y control de las Enfermedades Respiratorias y colibacilosis radica principalmente en tener buenos sistemas de diagnóstico y de monitoreo, para tomar las medidas preventivas y así determinar las medidas de manejo adecuadas, de tratamientos estratégicos con antibiótico y con todo esto controlar lo mejor posible el problema neumónico y de colibacilosis en los cerdos.

1.2 Generalidades de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App ST1)

Actinobacillus pleuropneumoniae (App) es un cocobacilo Gram negativo, pleomórfico, anaerobio facultativo, que no forma esporas y es capsulado. Se le ha considerado inmóvil, aunque en un trabajo reciente han descrito flagelos y movilidad (Negrete ,2002). Bioquímicamente es ureasa positiva, capaz de fermentar manitol, xilosa, ribosa y fermentación variable de lactosa. En medio artificial ocurre la transformación morfológica de colonia rugosa a lisa. Las colonias en placas de agar sangre exhiben hemólisis y han sido identificadas fimbrias por tinción negativa (Fedorka-Cray, 1993). En función de sus requerimientos de NAD se clasifica en dos biotipos, el biotipo 1 agrupa las cepas dependientes de NAD, y dentro de él se han reconocido 12 serotipos. El biotipo 2 agrupa las cepas NAD independientes reconociéndose los serotipos 13 y 14. Recientes estudios muestran la identificación del serotipo 15 que se agrupa dentro del biotipo 1 ya que es dependiente de NAD (Blackall, 2002). El aislamiento inicial de App es con atmósfera de CO₂ del 5-7%. Esta bacteria es positiva a la reacción de CAMP (Prueba de Christie Atkins-Munch-Petersen), que consiste en una reacción de complementación entre una hemolisina de App con una esfingomielisina de *Staphylococcus aureus* (Fenwick, 1994).

La pleuroneumonía porcina es uno de los problemas de salud más importantes en las grandes empresas productoras de cerdos. Al igual que los estreptococos, *Actinobacillus pleuropneumoniae* se encuentra colonizando las tonsilas y tracto respiratorio superior de los cerdos, existen muchos serotipos, pero los más importantes por su patogenicidad son los números; 1, 5, 7, 9, 11, y 12 además de los serotipos 3 y 6 de virulencia intermedia.

En México los serotipos más frecuentes son; 1, 5 y 7. *Actinobacillus pleuropneumoniae* produce 4 diferentes exotoxinas que pueden ser hemolíticas o citotóxicas conocidas como ApxI, II, III y IV, en México se han encontrado Apx I y Apx II (Williams *et.al.*,2000)

La transmisión de la enfermedad ocurre por la diseminación de la bacteria por animales infectados asintomáticos o por la introducción de animales portadores que diseminan el *Actinobacillus pleuropneumoniae* a través del aire, ya sea por aerosoles o por el contacto directo entre los mismos animales (Muñoz *et.al.*, 2010).

1.3 Generalidades de *Streptococcus suis* (*S. suis* ST2)

Streptococcus suis, coco Gram positivo y anaeróbico facultativo. Existen 35 serotipos diferentes, aunque los más frecuentes son el tipo 1 y el tipo 2. El tipo 1 se relaciona con la meningitis en lechones menores de tres semanas. El tipo 2 es el principal agente de meningitis en animales de 3 a 12 semanas de vida. La identificación del agente causal es por aislamiento bacteriano a partir de tejidos afectados. El tratamiento de mejor elección es la amoxicilina (Higgins, 1999)

Streptococcus suis es una bacteria común en las granjas de cerdos de todo el mundo y se asocia a problemas respiratorios frecuentemente y a otras enfermedades como meningitis y artritis en cerdos jóvenes. Es adquirido por el lechón al nacimiento de las secreciones vaginales de la madre infectada a la boca del lechón, colonizando las tonsilas poco después del nacimiento (Pallarés *et. al.*, 2003)

La neumonía puede ser resultado de la inhalación o de la bacteremia, bien sea por infección directa de los alvéolos pulmonares al inhalar aire contaminado o por el transporte de la bacteria por monocitos a los alvéolos.

1.4 Generalidades de *Pasteurella multocida* (*P. multocida* tipo A)

Pasteurella multocida, es un cocobacilo pleomórfico Gram negativo. En la tinción de Gram puede observarse como formas cocoides, bacilos cortos o filamentosos, con una típica tinción bipolar, que pueden aparecer sueltos o agrupados en parejas o cadenas cortas. *Pasteurella multocida* es anaerobio facultativo, inmóvil, crece bien en medios de Agar sangre, Chocolate y Mueller-Hinton, pero no en Agar McConkey, Eosina Azul de Metileno (EMB), ni en otros medios selectivos o diferenciales empleados para el aislamiento de enterobacterias. Tras 24 h de incubación en Agar Sangre, *P. multocida* crece formando colonias lisas de 1–2 mm de diámetro, de un color gris azulado brillante, no hemolíticas y en ocasiones mucosas. El crecimiento en medio de agar sangre y la característica tinción bipolar ayudan a diferenciar *P. multocida* del género *Haemophilus*, con el que puede confundirse en la observación microscópica inicial. Como la mayoría de las especies del género, *P. multocida* da las reacciones de oxidasa y catalasa positivas, reduce los nitratos a nitritos y es típicamente sensible a la penicilina (Holmes, 1999).

La ausencia de hemólisis en medios con sangre, la producción de indol, la descarboxilación de la ornitina y una reacción de urea negativa permiten diferenciar *P. multocida* de las otras especies del género (Holmes, 1999).

La mayoría de las cepas de *Pasteurella multocida* procedentes de muestras clínicas son sensibles a la penicilina, tetraciclinas, cefalosporinas de segunda y tercera generación, quinolonas y cotrimoxazol. La cloxacilina y las cefalosporinas de primera generación son menos activas, sobre todo cuando se administran por vía oral, y no deben emplearse en el tratamiento de las infecciones producidas por este microorganismo. La sensibilidad a los aminoglucósidos es variable y, aunque

estos antibióticos podrían utilizarse tras la realización de pruebas de sensibilidad, no existe experiencia clínica que avale su empleo.

Pasteurella multocida suele ser resistente o mostrar sensibilidad intermedia a la eritromicina y el 50% de las cepas son resistentes a la claritromicina. Aunque *P. multocida* resulta sensible a la azitromicina, la experiencia clínica con este agente es muy limitada por lo que, en general, no se aconseja este tratamiento. Algunas cepas son resistentes al cloranfenicol y todas lo son a la clindamicina (Goldstein, 1988).

Es un microorganismo muy importante en el CRP, *Pasteurella multocida* es el agente que con mayor frecuencia es aislado e identificado en pulmones de cerdos neumónicos en los últimos 100 años y frecuentemente combinado con agentes virales y continúa actualmente sin evidencias de disminución (Ross, 2007).

1.5 Generalidades de *Haemophilus parasuis* (Hps)

Haemophilus parasuis pertenece a la familia *Pasteurellaceae* y un importante patógeno del tracto respiratorio porcino. Su transmisión es directa por contacto entre los animales infectados o indirecta por vía aérea, pudiendo transmitirse a cierta distancia. Esta enfermedad, conocida como la enfermedad de *Glässer*, fue descrita por este investigador en 1910 como una inflamación fibrinosa de las articulaciones de cerdos jóvenes durante sus tres primeros meses de vida. La enfermedad se manifiesta esporádicamente y se ha asociado a situaciones de estrés (transporte y manipulación) de los animales, produciendo una elevada mortalidad.

El agente etiológico fue identificado por primera vez como *Haemophilus suis* (Hjarre, 1943) y más tarde como *Haemophilus influenza suis* (Lecce, 1960). Finalmente, se le denominó *H. parasuis* al demostrarse que para su crecimiento solo necesitaba el factor V [Dinucleótido de Nicotinamida y Adenina (NAD)] y que

no dependía del factor X de coagulación de la sangre (hemina u otras porfirinas) como *Haemophilus suis*. A partir de ese momento se aceptó que las especies de *Haemophilus* que no requerían el factor X para su crecimiento se denominarían con el prefijo “para” (Biberstein *et. al.*, 1976).

Las células de *H. parasuis* son bacilos Gram negativo no hemolítico, pleomórficos muy cortos, inmóviles, de longitud variable y algunos presentan capsula (Morozumi *et. al.* 1986). En estudios metabólicos se determinó que la mayoría de las cepas tienen actividad catalasa y oxidasa y que reducen nitratos a nitritos. No presentan actividad ureasa, no producen indol y no descarboxilan la ornitina, la lisina ni la arginina. Además, presentan un metabolismo fermentativo, produciendo ácido desde glucosa, manosa, maltosa y sacarosa, pero no desde xilosa, lactosa, manitol, ramnosa ni arabinosa.

Asociada al incremento del Síndrome Respiratorio y Reproductor Porcino (PRRS), la prevalencia de la enfermedad de *Glässer* ha aumentado en los últimos años de manera espectacular. Esta enfermedad ha sido diagnosticada prácticamente en todo el mundo y representa en la actualidad uno de los principales problemas emergentes del sector porcino, generando elevadas pérdidas económicas (Takahashi; *et al.*, 2001).

Los lechones son colonizados inmediatamente al nacimiento, sin embargo, no se desarrolla la enfermedad por la protección de los anticuerpos maternos recibidos en el calostro (Smart *et. al.*, 1989).

1.6 Generalidades de *Escherichia coli* (*E. coli*)

Las bacterias del género *E. coli* son bacilos Gram-negativas, es una Enterobacteria. Esta bacteria es un habitante común de los intestinos de todos los animales, incluyendo el de los humanos. *Escherichia coli* (*E. coli*) es quizás el organismo procarionte más estudiado por el ser humano, se trata de una bacteria unicelular que se encuentra generalmente en los intestinos animales y por ende en

las aguas negras. Ésta y otras bacterias son necesarias para el funcionamiento correcto del proceso digestivo. Además *E. coli* es bacteria que produce vitaminas B y K. Los serotipos se asocian con virulencia. Una tipificación incluye la determinación de los antígenos somáticos (O), capsulares (K), flagelares (H) y de fimbria (F). Es un bacilo que reacciona negativamente a la tinción de Gram (Gram negativo), es anaeróbico facultativo, móvil por flagelos peritricos (que rodean su cuerpo), no forma esporas, es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa (Barman, 1967).

La colibacilosis debida a *Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC)* en lechones lactantes a menudo se produce en una edad temprana, dentro de la primera semana de vida. Normalmente está asociada a camadas de cerdas primerizas, que se infectan rápidamente después del nacimiento debido a la contaminación ambiental y a los niveles inadecuados de anticuerpos maternos. Por lo tanto, este tipo de enfermedad causada por *E. coli* es más frecuente en el parto y la lactancia, cuando se realizan en lugares con un bajo nivel de atención a la limpieza e higiene de los suelos, áreas de pisos y corrales (Sojka, 1971).

El cultivo de bacterias del intestino puede confirmar la presencia de grandes poblaciones de *E. coli*, que deben analizarse para hemólisis, toxinas y sensibilidad a antibióticos. El tratamiento de los lechones afectados clínicamente con colibacilosis posdestete y/o enfermedad de los edemas puede asistirse con el antibiótico Colistina, que a menudo se considera el fármaco de elección, con sólo un bajo nivel de resistencia entre *E. coli* y *Salmonella*. La Colistina se puede administrar a través de la alimentación o el agua. Por ejemplo, se pueden añadir un 10 % en formulaciones premezcla de peso para 100 g/tonelada de peso completo (Barnum, 1967).

Es importante conocer la historia de la enfermedad en la explotación y la sensibilidad a los antibióticos de la *E. coli* presente. Los cerdos enfermos deben tratarse individualmente y la terapia de grupo se aplicará mediante la medicación en agua. Si los cerdos aparecen deshidratados, entonces debe proporcionarse

electrolitos en un suministro de agua separado. Además de Colistina, otros antibióticos utilizados para el tratamiento de *E. coli* son Apramicina, Neomicina, Tiamulina o Sulfonamidas (Sojka, 1971).

2.0 OBJETIVOS

Objetivo General: Evaluar a través de isobogramas la mezcla de ocho antibióticos en premezcla con diferentes bacterias para conocer el efecto que generan en combinación.

Objetivos particulares:

- Determinar las MIC (Concentración mínima inhibitoria) de cada una de las premezclas antibióticas frente a cada una de las bacterias de interés porcino, empleando la técnica de sembrado masivo en agar para conocer la concentración más pequeña de premezcla antibiótica que se necesita para inhibir a la bacteria.
- Demostrar la sinergia, antagonismo o indiferencia de los antibióticos que componen cada mezcla.
- Demostrar si la Colistina muestra alguno de los efectos anteriores en combinación con los demás antibióticos.
- Obtener los isobogramas para los siguientes antibióticos; Clortetraciclina, Tiamulina fumarato, Colistina, Lincomicina, Espectinomicina, Amoxicilina, Florfenicol y Tilmicosina, frente a *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotipo 1 (App ST1), *Streptococcus suis* Serotipo 2 (*S.suis* ST2), *Escherichia coli* (*E.coli*), *Pasteurella multocida* tipo A (*P.m* tipo A) y *Haemophilus parasuis* (*Hps*) mediante el método de ajedrez (Checkboard-assay).

3.0 Material y método.

3.1 Presentación de cada premezcla antibiótica: Clortetraciclina, Tiamulina fumarato, Colistina, Lincominicina, Espectinomicina, Amoxicilina, Florfenicol y Tilmicosina.

- a. Clortetraciclina en presentación de sal pura.
- b. Tiamulina Fumarato en presentación de sal pura.
- c. Colistina en presentación de sal pura.
- d. Lincominicina (COLLINCLOR 110) en presentación de premezcla antibiótica.
- e. Espectinomicina (LINCOSPECTIN 880) en presentación de sal pura de Lincominicina y Espectinomicina.
- f. Amoxicilina (SURAMOX 50%) en presentación de premezcla antibiótica.
- g. Florfenicol (FLORFENI-FEDD 4%) en presentación de premezcla antibiótica.
- h. Tilmicosina (TILMICOPREM) en presentación de premezcla antibiótica.

3.2 Material: cajas petri desechable chicas, autoclave, agua destilada estéril, HCl, balanza digital, espátula, charolas de plástico, vasos de precipitado, matraz aforado, pipetas, tubos Eppendorf, gradilla, tubos estériles de vidrio, puntas amarillas ara micropipeta multicanal, puntas azules , pipetas , incubadora, refrigerador, pinzas de metal, tinción Gram, portaobjetos, asas, microscopio óptico, matraz Erlenmeyer, probeta , Nefelómetro al 0.5 Mc Farland, placas desechable, gasas y contador de colonias.

3.3 Cepas: *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotipo 1 (App ST1), *Streptococcus suis* Serotipo2 (*S. suis* ST2), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Pasteurella multocida* tipo A (*Pm*) y *Haemophilus parasuis* (*Hps*).

3.4 Premezclas antibióticas

Presentación de las ocho premezclas antibióticas diferentes y tres sales puras

Imagen 1.



Imagen 1. Premezclas recibidas en esta presentación.

De acuerdo a las hojas de seguridad de cada producto se presenta un cuadro de los 8 antibióticos donde aparecen las condiciones de solubilidad dadas por el proveedor (**Cuadro 1**).

Cuadro 1. Solubilidad reportada de cada antibiótico.

Compuesto	Solubilidad reportada
Clortetraciclina	No se reporta la solubilidad, HCl 0.04 N, agua y baño ultrasónico.
Tiamulina Fumarato	Se reporta Solubilidad agua, metanol y etanol
Colistina	Se reporta solubilidad en agua en temperatura ambiente y ligeramente soluble en etanol.
Lincomicina (COLLINCLOR 110)	No se reporta solubilidad.
Espectinomicina (LINCOSPECTIN 880)	No se reporta solubilidad.
Amoxicilina (SURAMOX 50%)	Se reporta solubilidad en agua en temperatura ambiente, metanol y etanol absoluto.
Florfenicol (FLORFENIFEDD 4%)	Se reporta solubilidad en agua en temperatura ambiente.
Tilmicosina (TILMICOPREM)	No se reporta solubilidad.

3.5 Combinación de antibióticos

El estudio requirió conocer las combinaciones de dichas premezclas, tomando en cuenta la dosis de inclusión, el grupo al que pertenece cada antibiótico, así como su clasificación terapéutica, sitio de acción y enfoque terapéutico (**Cuadro 2**).

Cuadro 2. Combinación de las 8 premezclas de antibióticos su enfoque terapéutico.

Activo	Dosis de inclusión ppm	Grupo	Clasificación terapéutica	Sitio de acción	Enfoque terapéutico
Combinación 1					
Clortetracilcina	400 g/T	Tetraciclinas	Bacteriostático	Ribosoma 30 S	Respiratorio
Tiamulina	133 g/T	Macrólido	Bacteriostático	Ribosoma 50 S	Respiratorio
Colistina	1000 UI/T	Polimixina	Bactericida	Membrana	Digestivo
Combinación 2					
Lincomicina	100 g/T	Lincosamida	Bacteriostático	Ribosoma 50 S	Respiratorio
LINCOESPECTIN 880	88g/T	Aminociclitol	Bacteriostático	Ribosoma 30 S	Digestivo/Respiratorio.

Colistina	1000 U.I./T	M	Polimixina	Bactericida	Membrana	Digestivo
Combinación 3						
Amoxicilina	400g/T		Beta-lactámico	Bactericida	Pared	Sistémica
Colistina	1000 U.I./T	M	Polimixina	Bactericida	Membrana	Digestivo
Combinación 4						
Florfenicol	200 g/T		Amfenicol	Bacteriostático	Ribosoma 50S	Sistémico
Colistina	1000 U.I./T	M	Polimixina	Bactericida	Membrana	Digestivo
Combinación 5						
Amoxicilina	400g/T		Beta-lactámico	Bactericida	Pared	Sistémico
Tiamulina	133 g/T		Macrólido	Bacteriostático	Ribosoma 50 S	Respiratorio

Colistina	1000 U.I./T	M	Polimixina	Bactericida	Membrana	Digestivo
Combinación 6						
Tilmicosina	400g/T		Macrólido	Bacteriostático	Ribosoma 50 S	Respiratorio
Florfenicol	200 g/T		Amfenicol	Bacteriostático	Ribosoma 50 S	Sistémico
Paracetamol	200 g/T		Amfenicol			
Colistina	1000 U.I./T	M	Polimixina	Bactericida	Membrana	Digestivo
Combinación 7						
Tilmicosina	400g/T		Macrólido	Bacteriostático	Ribosoma 50 S	Respiratorio
Amoxicilina	400g/T		Beta-lactámico	Bactericida	Pared	Sistémico
	200 g/T		Amfenicol			
Paracetamol						
Colistina	1000 U.I./T	M	Polimixina	Bactericida	Membrana	Digestivo

3.6 Esquema del método de tablero de ajedrez (“Checkboard assay”).

El método del tablero de ajedrez (“checkboard assay”), es una de las técnicas más frecuentes utilizadas para probar combinaciones de agentes antimicrobianos “*in vitro*” (Blaser, J. 1991).

Placa de poliestireno de fondo plano y 96 pozos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	●

● Control de suspensión bacteriana

○ Control de medio de cultivo

1. Se realizaron las pruebas sinérgicas, con material estéril: Placas de poliestireno de fondo plano y 96 pozos, puntas de plástico.
2. Se etiquetó la placa.
3. Se colocó 100 µl a todos los pozos de Caldo (medio específico para el crecimiento de cada bacteria).

4. Se realizó una serie de diluciones del Antibiótico A de izquierda a derecha, para ello se utilizó 100 µl en la columna 11 de la placa y se realizaron diluciones dobles hacia la izquierda hasta la columna 2.

La columna 1, así como el pozo H12 (Control de Medio de Cultivo), no deberían contener Antibiótico A.

5. Se colocó 100 µl de las diluciones seriadas (las cuales se prepararon previamente al experimento) del Antibiótico B de arriba hacia abajo, comenzando por la hilera B, y terminando con la hilera H, La hilera A no debe contener antibiótico A, así como el pozo H12.

6. El pozo H12 se empleó como un control de Medio de Cultivo y la columna 1 como un control de suspensión bacteriana.

7. Se colocó 50 µl de la suspensión bacteriana fresca a todos los pozos de la placa, excepto al pozo H12.

8. Se agito la placa con suavidad, sin permitir que se derramara el líquido.

9. Se cubrió perfectamente la placa.

10. Se incubo a 37 °C durante 24 horas aprox.

11. Se realizó la lectura de placa.

Lectura de prueba.

1. Colocar la placa sobre una fuente de luz.

2. Examinar cada uno de los pozos e la placa.

3. El pozo A1 es control de turbidez abundante (crecimiento bacteriano), mientras que el H12 es un control de medio de cultivo estéril, por tanto, deberá observarse completamente claro (sin crecimiento bacteriano). En caso de que los controles no se observen como se indica, desechar la placa.

4. Registrar los pozos que presenten turbidez y los que estén claros, para ello es conveniente contar con una cuadrícula limpia que simule el tablero de 96 pozos.

5. Leer la mínima concentración inhibitoria (MIC) del antibiótico A (hilera A), esto es, el pozo que presente la concentración más baja del antibiótico y que cause la inhibición completa del crecimiento bacteriano.
6. Leer la MIC del antibiótico B (fila 1), de igual manera que el inciso anterior.
7. Examinar perfectamente todo el tablero y registrar turbidez o pozos claros.
8. Calcular la fracción de la mínima concentración inhibitoria (FIC) de cada uno de los antibióticos ensayados.

4.- Combinaciones de antibióticos para placas

Para la elaboración de placas mediante el método de tablero de ajedrez, se diseñó un cuadro que especifica todas las combinaciones posibles que se podían realizar para los antibióticos (**Cuadro 3**) así como las bacterias a las que se enfrentaron.

Cuadro 3. Combinaciones específicas de las mezclas de antibióticos para elaboración de placas.

Combinación 1		- <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
		- <i>Streptococcus suis</i>
	• Clortetraciclina-Tiamulina	
	• Tiamulina-Colistina	
	• Clortetraciclina-Colistina	- <i>Escherichia coli</i>
	• Clortetraciclina/Tiamulina-Colistina	
	• Clortetraciclina/Colistina-Tiamulina	
	• Tiamulina/Colistina-Clortetraciclina	- <i>Pasteurella multocida</i>
		- <i>Haemophilus parasuis</i>

Combinación 2		<i>-Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
		<i>-Streptococcus suis</i>
	• LINCOSPECTIN 880	
	• Lincomicina-Colistina	<i>-Escherichia coli</i>
	• LINCOSPECTIN 880-Colistina	
	• Lincomicina/LINCOSPECTIN 880-Colistina	
	• Colistina-LINCOSPECTIN 880	<i>-Pasteurella multocida</i>
	• LINCOSPECTIN 880/Colistina-Lincomicina	
		<i>-Haemophilus parasuis</i>

Combinación 3		<i>-Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
		<i>-Streptococcus suis</i>
	• Amoxicilina-Colistina	
		<i>-Escherichia coli</i>
		<i>-Pasteurella multocida</i>
		<i>-Haemophilus parasuis</i>

Combinación 4

- **Florfenicol-Colistina**

***-Actinobacillus
pleuropneumoniae***

-Streptococcus suis

-Escherichia coli

-Pasteurella multocida

***-Haemophilus
parasuis***

Combinación 5

- **Amoxicilina-Tiamulina**
- **Amoxicilina/Tiamulina-Colistina**
- **Amoxicilina/Colistina-Tiamulina**

***-Actinobacillus
pleuropneumoniae***

-Streptococcus suis

-Escherichia coli

-Pasteurella multocida

***-Haemophilus
parasuis***

Combinación 6		<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
		- <i>Streptococcus suis</i>
	• Tilmicosina-Florfenicol	- <i>Escherichia coli</i>
	• Tilmicosina-Colistina	
	• Tilmicosina/Florfenicol-Colistina	- <i>Pasteurella multocida</i>
• Tilmicosina/Colistina-Florfenicol		
• Florfenicol/Colistina-Tilmicosina		- <i>Haemophilus parasuis</i>

Combinación 7		<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
		- <i>Streptococcus suis</i>
	• Tilmicosina-Amoxicilina	- <i>Escherichia coli</i>
	• Tilmicosina/Amoxicilina-Colistina	
	• Tilmicosina/Colistina-Amoxicilina	- <i>Pasteurella multocida</i>
• Amoxicilina/Colistina-Tilmicosina		- <i>Haemophilus parasuis</i>

5.0 Medios de cultivo

Preparación del Medio de cultivo para:

a) *Streptococcus suis* Serotipo2 (*S. suis* ST2), *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Pasteurella multocida* tipo A (*Pm*).

Para el crecimiento de *E. coli*, *S. suis* (ST2) y *P. multocida* tipo A es el de Infusión cerebro corazón (BHI), en la determinación se emplearon dos tipos de medios el agar y el caldo BHI.

b) *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotipo1 (*App* ST1).

Para el crecimiento de *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotipo1 (*App* ST1) es el de microorganismo correspondiente a las Pleuroneumonías (PPLO) enriquecido con Nicotinamida Adenina Dinucleótido de Hidrógeno (NADH) en la determinación se utilizaron dos tipos de medios Agar y Caldo PPLO.

c) *Haemophilus parasuis* (*Hps*)

Para el crecimiento de *Haemophilus parasuis* (*Hps*) es el PPLO enriquecido con la Nicotinamida Adenina Dinucleótido de Hidrogeno (NADH) y se empleó tanto en Agar como en Caldo.

6.0 Soluciones Stock y Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)

- Datos de solubilidad experimental

Se evaluaron las solubilidades de los productos reportadas por el proveedor de las premezclas. Por tanto, realizaron pruebas de solubilidad para los antibióticos Tiamulina, Clortetraciclina, Lincomicina, LINCOESPECTIN 880, Colistina, Amoxicilina, Florfenicol y Tilmicosina (**Cuadro 4**).

Cuadro 4. Prueba de solubilidad experimental de antibióticos

Compuesto/disolvente
Clortetraciclina / HCl (36.5 % -38%) caliente y agua destilada estéril a temperatura ambiente
Tiamulina fumarato/ H2O destilada estéril
Colistina /agua destilada estéril
Lincomicina (COLLINCLOR 110) / agua destilada estéril
Espectinomicina (LINCOSPECTIN 880) / agua destilada estéril
Amoxicilina (SURAMOX 50%)/ agua destilada estéril
Florfenicol (FLORFEENIFEDD 4%)/ agua destilada estéril
Tilmicosina (TILMICOPREM)/ metanol/etanol 70% / agua destilada estéril

Después de realizadas las pruebas de solubilidad experimental se obtuvieron los siguientes resultados (**Cuadro 5**):

Cuadro 5. Resultados de solubilidad para compuestos:

Compuesto	Solubilidad experimental
Clortetraciclina	HCl concentrado caliente y agua a temperatura ambiente
Tiamulina Fumarato	Soluble en agua a temperatura ambiente.
Colistina	Soluble en agua en temperatura ambiente.
Lincomicina (COLLINCLOR 110)	No se solubiliza completamente en agua
Espectinomicina (LINCOSPECTIN 880)	Soluble en agua en temperatura ambiente.
Amoxicilina	No se solubiliza completamente en agua
Florfenicol (FLORFENIFEDD 4%)	No se solubiliza completamente en agua
Tilmicosina (TILMICOPREM)	No se solubiliza completamente en agua

Colistina, LINCOSPECTIN 880 y Tiamulina son los únicos compuestos en forma de sal; el resto de los compuestos fueron entregados en premezcla.

6.1 Metodología de la preparación de las soluciones Stock [512 µg/mL] y [15,360 µg/mL]

Para la elaboración de soluciones stock se realizaron los cálculos analíticos correspondientes de cada premezcla antibiótica referida en las hojas de registro, para conocer su concentración, con esto se buscó ajustar las cantidades del soluto (Cuadro 6).

Cuadro 6. - Preparación de soluciones stock [512 µg/mL] y [15,360 µg/mL].

Antibiótico	[512 µg/mL]	[15,360 µg/mL].
Clortetraciclina	0.06 gr	-
Tiamulina	-	0.15 gr
Colistina	0.74 gr	2.22 gr
Lincomicina (COLLLINCLOR 110)	0.46 gr	1.38 gr
Espectinomicina (LINCOSPESTIN 880)	0.17 gr	0.52 gr
Amoxicilina (SURAMOX 50%)	0.10 gr	0.30 gr
Florfenicol (FLORFENIFEDD 4%)	0.12 gr	0.38 gr
Tilmicosina (TILMICOPREM)	0.26 gr	0.78 gr

Preparación de sensidiscos:

1.- Se calculó la concentración de las premezclas antibióticas y en base a ello se obtuvo la cantidad de antibiótico a pesar.

2.-Pesar la cantidad adecuada de la premezcla (en balanza digital), necesaria para preparar una solución del antibiótico con concentración 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y de 15,360 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

3.-Se disolvió la premezcla previamente pesada, en un vaso de precipitados de 10 ml que contenía previamente 5 ml de agua estéril. Enseguida se vertió en matraz volumétrico aforando a 100 ml, perfectamente limpio y seco. A excepción de la Colistina que se aforo a 25 ml.

4.-Se realizaron diluciones seriadas para cada antibiótico obteniéndose las siguientes concentraciones en cada tubo Eppendorf.

Se agregaron 700 μl de agua destilada estéril en cada tubo Eppendorf, y se realizó una serie de 8 diluciones, empleando 300 μl de la solución stock [512 $\mu\text{g}/\text{mL}$].

Se agregaron 500 μl de agua destilada estéril en cada tubo Eppendorf, y se realizó una serie de 8 diluciones, empleando 500 μl de la solución stock [15,360 $\mu\text{g}/\text{mL}$].

5.-Ya impregnados los sensidiscos, se colocaron en cajas Petri (etiquetadas) con ayuda de pinzas, ambas previamente estériles y en zona de esterilidad, y se dejaron secar.

6.-En una caja petri con agar del medio correspondiente o apto para el crecimiento de la bacteria se inoculo tomando 200 μl de la solución bacteriana igualada al 0.5 del Nefelómetro de McFarland previamente preparada.

7.-Se empleó la técnica de sembrado masivo sobre el agar empleando un asa en forma de "L".

8.-Se colocaron los sensidiscos de manera ascendente es decir del menos al más concentrado con ayuda de unas pinzas estériles, todo se trabajó bajo condiciones de esterilidad (**Cuadro 7**).

9.-Se colocó un sensidisco impregnado con agua destilada estéril como control negativo.

Cuadro 7. Concentración de antibiótico por sensidisco

CONCENTRACIONES DE CADA SISTEMA (sensidiscos):	
C0: [512 µg/mL]	C0: [15,360 µg/mL]
C1: [153.60 µg/mL]	C1: [7,680µg/mL]
C2: [46.08µg/mL]	C2: [3,840 µg/mL]
C3: [13.82 µg/mL]	C3: [1,920 µg/mL]
C4: [4.14 µg/mL]	C4: [960 µg/mL]
C5:1.24 µg/mL]	C5: [480 µg/mL]
C6: [0.37 µg/mL]	C6: [240 µg/mL]
C7: [0.11 µg/mL]	C7: [120 µg/mL]
C8: [0.03 µg/mL]	C8: [120 µg/mL]
C (-): Disolvente utilizado para cada antibiótico	C (-): Disolvente utilizado para cada antibiótico

10.-Las cajas se incubaron a 37°C durante 24 hrs.

11.- Se tomó lectura de los halos de inhibición.

7.0 Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)

La Concentración mínima inhibitoria (MIC), es la concentración del antibiótico requerida para impedir el crecimiento bacteriano a partir de la incubación de 10^{5-6} bacterias en fase de crecimiento rápido, en un medio libre de proteínas con pH 7.2, aerobio.

La MIC es importante porque se utiliza para determinar la sensibilidad bacteriana a un agente antibiótico específico.

El microorganismo a investigar se inocula en una o varias placas de agar y sobre su superficie se disponen los discos correspondientes a varios antibióticos. Se incuban las placas durante 16-24 horas y se estudia el crecimiento en ellas.

Se valora el diámetro de la zona de inhibición que se forma alrededor de cada disco y se compara con las referencias oportunas publicadas por la NCCLS (**Cuadro 8**). De esta manera se sabe si el microorganismo es Sensible o Resistente a cada uno de los antibióticos.

Cuadro 8. Criterios de interpretación de la MIC de acuerdo a la NCCLS

	CIM($\mu\text{g/ml}$)	Halos de inhibición(mm)
Sensible	≤ 4	≥ 20
Intermedio	8-16	15-19
Resistente	≥ 32	≤ 14

*Puntos de corte de sensibilidad” es 4 $\mu\text{g/ml}$ o 20 mm

*Puntos de resistencia” es 32 $\mu\text{g/ml}$ o 14 mm

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). M2

Los criterios de evaluación de una MIC son:

- **SENSIBLE:** Esta categoría implica que una infección dada por la cepa en estudio puede ser tratada apropiadamente con la dosis de antibiótico recomendada para el tipo de infección y la especie infectante.
- **RESISTENTE:** Las cepas resistentes no son inhibidas por las concentraciones séricas normalmente alcanzadas a dosis habituales y/o caen en el rango donde son comunes mecanismos específicos de resistencia microbiana.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos.

7.1 Criterios para definir un efecto antagónico, sinérgico o indiferente en placas

Calculo de la FIC para cada antibiótico utilizando la siguiente formula.

$$\text{FIC del Antibiótico A} = \frac{\text{MIC del Antibiótico A en combinación}}{\text{MIC del Antibiótico A solo}}$$

$$\text{FIC del Antibiótico B} = \frac{\text{MIC del Antibiótico B en combinación}}{\text{MIC del Antibiótico B solo}}$$

Interpretación;

Sumar las dos fracciones calculadas, y obtener el FIC index.

FIC index=FIC de A+FIC de B

SINERGISMO, si x es menor o igual a 0.5

INDIFERENTE, si x está entre 0.5 y 4.0

ANTAGONICO, si x es mayor a 4.0

(Blaser, J. 1991)

Ejemplo: COMB.1 (Clortetraciclina-Tiamulina) para *S. suis* ST2

$$\text{FIC del Antibiótico A} = \frac{102.3 \mu/\text{ml}}{102.3 \mu/\text{ml}} = 1$$

$$\text{FIC dl Antibiótico B} = \frac{62.9 \mu/\text{ml}}{62.9 \mu/\text{ml}} = 1$$

FIC index=FIC de A+FIC de B

- FIC index=1+1=2 está entre 0.5 y 4.0 por lo tanto el efecto es **INDIFERENTE**.

8.0 RESULTADOS

El siguiente cuadro muestra el antibiótico, la bacteria a la cual se enfrentó, así como el criterio de evaluación de la MIC obtenida (**Cuadro 9**).

Cuadro 9. Resultados de MIC para cada antibiótico frente a 5 bacterias

Antibiótico	Bacteria	S(sensible)/ R (resistente)	MIC μ /ml
Clortetraciclina	<i>App ST1</i>	R	-
	<i>S. suis</i>	R	-
	<i>P. multocida</i>	S	124.416
	<i>H. parasuis</i>	R	-
	<i>App ST1</i>	S	480

Tiamulina	<i>S. suis</i>	R	-
	<i>P. multocida</i>	S	414.72
	<i>H. parasuis</i>	S	2,457.6
Colistina	<i>App ST1</i>	S	3.75
	<i>S. suis</i>	R	-
	<i>P. multocida</i>	S	30
	<i>E. coli</i>	S	1.24
	<i>H. parasuis</i>	S	4,388.5
Lincomicina (COLLINCLOR 110)	<i>App ST1</i>	S	1920
	<i>S. suis</i>	R	-
	<i>P. multocida</i>	R	-
	<i>H. parasuis</i>	S	983.0

Espectinomicina (LINCOSPECTIN 880)	<i>App ST1</i>	S	120
	<i>S. suis</i>	R	-
	<i>P. multocida</i>	S	1920
	<i>E. coli</i>	S	480
	<i>H. parasuis</i>	S	157.28
Amoxicilina (SURAMOX 50%)	<i>App ST1</i>	S	512
	<i>S. suis</i>	S	512
	<i>P. multocida</i>	R	-
	<i>E. coli</i>	S	3840
	<i>H. parasuis</i>	S	196.60
	<i>App ST1</i>	S	0.11
	<i>S. suis</i>	S	1920

Florfenicol (FLORFENIFEDD 4%)	<i>P. multocida</i>	R	-
	<i>E. coli</i>	S	1920
	<i>H. parasuis</i>	S	102.3
Tilmicosina (TILMICOPREM)	<i>App ST1</i>	S	120
	<i>S. suis</i>	R	-
	<i>P. multocida</i>	S	480
	<i>H. parasuis</i>	S	102.3

8.1 Resultados de FIC (Fracción de la concentración mínima inhibitoria)

La FIC se describe como la concentración mínima inhibitoria del antibiótico solo, entre la concentración inhibitoria del antibiótico en combinación. El siguiente cuadro muestra la combinación de antibióticos por placa, así como los resultados que arrojó el estudio al enfrentarlos a las 5 bacterias de interés (**Cuadro10**).

Cuadro 10. Resultados de la Fracción de la concentración mínima inhibitoria.

	<i>AppS</i> <i>T1</i>	<i>P.</i> <i>multocida</i> <i>tipo A</i>	<i>E. coli</i>	<i>S.</i> <i>suis</i> <i>ST2</i>	<i>H.</i> <i>parasuis</i>
Combinación de Antibióticos	FIC	FIC	FIC	FIC	FIC
CLORT-TIAM	18.51	45	0.5	2.0	4.5
TIAM-COLIST	1.00	1.00	0.5	1.28	1.01
CLORT-COLIST	2.00	55.35	0.5	0.39	2.0
CLORT/TIAM-COLIST	20.893	1.2	0.5	2.0	2.0
CLORT/COLIST-TIAM	13.25	0.08	0.5	3.49	4.5
TIAM/COLIST-CLORT	2.0	1.00	0.5	2.0	2.0

LINC-ESPECT	13.32	1.006	0.5	1.02	0.016
LINC-COLIST	13.00	1.023	0.5	1.39	0.031
ESPECT-COLIST	0.2	1.28	0.5	2.0	0.01
LINC/ESPECT-COLIST	1.001	1.08	0.5	1.28	0.026
LINC/COLIST-ESPECT	0.2	0.20	0.5	2.0	0.15
ESPECT/COLIST-LINCO	0.2	0.28	0.5	1.28	0.026
AMOX-COLIST	14.6	1.02	0.5	0.39	7.25
FLOR-COLIST	0.662	1.28	0.5	0.39	0.15
AMOX-TIAM	12.2	14.6	0.5	0.39	0.010
AMOX/TIAM-COLIST	88.7	1.02	0.5	0.39	0.01
AMOX/COLIST-TIAM	1.2	0.3	0.5	0.39	6
TILM-FLOR	1.0	0.3	0.5	2.0	0.34
TILM-COLIST	2.0	0.30	0.5	2.0	7.25

TILM/FLOR-COLIST	2.0	0.28	0.5	2.0	0.06
TILM/COLIST-FLOR	1.0	0.28	0.5	2.0	43.8
FLOR/COLIST-TILM	2.0	0.30	0.5	1.02	43.8
TILM-AMOX	43.15	0.28	0.5	1.00	0.06
TILM/AMOX-COLIST	19.19	2.0	0.5	0.39	0.02
TILM/COLIST-AMOX	52.9	0.28	0.5	1.06	43.8
AMOX/COLIST-TILM	1.2	0.30	0.5	0.39	13.25

8.2 Resultados de Isobogramas

Los estudios que se realizaron para obtener los isobogramas de las combinaciones con diferentes bacterias mediante el método de Ajedrez, se observan en los cuadros 11-14.

Cuadro 11. Siete combinaciones de antibióticos frente a *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App ST1).

ISOBOGRAMAS DE LAS COMBINACIONES DE ANTIBIÓTICOS CONTRA App ST1

Combinación 1

Activo	Dosis de inclusión ppm	Grupo	Clasificación terapéutica	Sitio de acción	Enfoque terapéutico
Clortetraciclina	400 g/T	Tetraciclinas	Bacteriostático	Ribosoma 30 S	Respiratorio
Tiamulina	133 g/T	Macrólido	Bacteriostático	Ribosoma 50 S	Respiratorio
Colistina	1000 UI/T	Polimixina	Bactericida	Membrana	Digestivo

Bacteria	COMBINACIÓN COMPUESTO	RESULTADO
<i>-Actinobacillus pleuropneumoniae</i> ST1	• Clortetraciclina-Tiamulina	ANTAGÓNICO
	• Tiamulina-Colistina	INDIFERENTE
	• Clortetraciclina-Colistina	INDIFERENTE
	• Clortetraciclina/Tiamulina-Colistina	ANTAGÓNICO
	• Clortetraciclina/Colistina-Tiamulina	ANTAGÓNICO
	• Tiamulina/Colistina-Clortetraciclina	INDIFERENTE
	• Tiamulina/Colistina/Clortetraciclina	INDIFERENTE

Combinación 2

Activo	Dosis de Inclusión ppm	Grupo	Clasificación Terapéutica	Sitio de Acción	Enfoque Terapéutico
Lincomicina	100g/T	Lincosamida	Bacteriostático	Ribosoma 50S	Respiratorio
Espectinomicona	88 g/T	Aminociclitol	Bacteriostático	Ribosoma 30 S	Digestivo/Respiratorio
Colistina	1000 UI/T	Polimixina	Bactericida	Membrana	Digestivo

Bacteria	COMBINACIÓN COMPUESTO	RESULTADO
<i>-Actinobacillus pleuropneumoniae ST1</i>	• Lincomicina-Espectinomicona	ANTAGÓNICO
	• Lincomicina-Colistina	ANTAGÓNICO
	• Espectinomicona-Colistina	SINÉRGICO
	• Lincomicina/Espectinomicona-Colistina	INDIFERENTE
	• Lincomicina/Colistina-Espectinomicona	SINÉRGICO
	• Espectinomicona/Colistina-Lincomicina	SINÉRGICO
	• Lincomicina/Espectinomicona/Colistina	INDIFERENTE

Combinación 3

Activo	Dosis de Inclusión ppm	Grupo	Clasificación Terapéutica	Sitio de Acción	Enfoque Terapéutico
Amoxicilina	400g/T	Beta-lactámico	Bactericida	Pared	Sistémico
Colistina	1000 UI/T	Polimixina	Bactericida	Membrana	Digestivo

Bacteria	COMBINACIÓN COMPUESTO	RESULTADO
<i>-Actinobacillus pleuropneumoniae ST1</i>	<ul style="list-style-type: none"> Amoxicilina-Colistina 	ANTAGÓNICO

Combinación 4

Activo	Dosis de inclusión ppm	Grupo	Clasificación terapéutica	Sitio de acción	Enfoque terapéutico
Florfenicol	200g/T	Amfenicol	Bacteriostático	Ribosoma50S	Sistémico
Colistina	1000 UI/T	Polimixina	Bactericida	Membrana	Digestivo

Bacteria	COMBINACIÓN COMPUESTO	RESULTADO
<i>-Actinobacillus pleuropneumoniae ST1</i>	<ul style="list-style-type: none"> Florfenicol-Colistina 	INDIFERENTE

Combinación 5

Activo	Dosis de inclusión ppm	Grupo	Clasificación terapéutica	Sitio de acción	Enfoque terapéutico
Amoxicilina	400g/T	Beta-lactámico	Bactericida	Pared	Sistémico
Tiamulina	100g/T	Macrólido	Bacteriostático	Ribosoma 50S	Respiratorio
Colistina	1000 UI/T	Polimixina	Bactericida	Membrana	Digestivo

Bacteria	COMBINACIÓN COMPUESTO	RESULTADO
-Actinobacillus pleuropneumoniae ST1	• Amoxicilina-Tiamulina	ANTAGÓNICO
	• Amoxicilina/Tiamulina-Colistina	ANTAGÓNICO
	• Amoxicilina/Colistina-Tiamulina	INDIFERENTE
	• Amoxicilina/Colistina/Tima	INDIFERENTE

Combinación 6

Activo	Dosis de inclusión ppm	Grupo	Clasificación Terapéutica	Sitio De Acción	Enfoque Terapéutico
Tilmicosina	400g/T	Macrólido	Bacteriostático	Ribosoma 50S	Respiratorio
Florfenicol	200g/T	Amfenicol	Bacteriostático	Ribosoma 50S	Sistémico
Paracetamol	200g /T	Aminofenol			
Colistina	1000 UI/T	Polimixina	Bactericida	Membrana	Digestivo

Bacteria	COMBINACIÓN COMPUESTO	RESULTADO
-Actinobacillus pleuropneumoniae ST1	• Tilmicosina-Florfenicol	INDIFERENTE
	• Tilmicosina-Colistina	INDIFERENTE
	• Tilmicosina-Florfenicol	INDIFERENTE
	• Tilmicosina/Colistina-Florfenicol	INDIFERENTE
	• Florfenicol/Colistina-Tilmicosina	INDIFERENTE
	• Tilmicosina/Florfenicol/Colistina	INDIFERENTE

Combinación 7

Activo	Dosis de inclusión ppm	Grupo	Clasificación terapéutica	Sitio de acción	Enfoque terapéutico
Tilmicosina	400g/T	Macrólido	Bacteriostático	Ribosoma 50S	Respiratorio
Amoxicilina	400g/T	Beta-lactámico	Bactericida	Pared	Sistémico
Paracetamol	200g /T	Aminofenol			
Colistina	1000 UI/T	Polimixina	Bactericida	Membrana	Digestivo

Bacteria	COMBINACIÓN COMPUESTO	RESULTADO
<i>-Actinobacillus pleuropneumoniae ST1</i>	• Tilmicosina-Amoxicilina	ANTAGÓNICO
	• Tilmicosina/Amoxicilina-Colistina	ANTAGÓNICO
	• Tilmicosina/Colistina-Amoxicilina	ANTAGÓNICO
	• Amoxicilina/Colistina-Tilmicosina	INDIFERENTE
	• Tilmicosina/Amoxicilina/Colistina	INDIFERENTE

Cuadro 12. Siete combinaciones de antibióticos frente a *Streptococcus suis*, (*S. suis* ST2).

**ISOBOLOGRAMAS DE LAS COMBINACIONES DE ANTIBIÓTICOS CONTRA
Streptococcus suis Serotipo 2**

Combinación 1

Activo	Dosis de inclusión ppm	Grupo	Clasificación terapéutica	Sitio de acción	Enfoque terapéutico
Clortetraciclina	400 g/T	Tetraciclinas	Bacteriostático	Ribosoma 30 S	Respiratorio
Tiamulina	133 g/T	Macrólido	Bacteriostático	Ribosoma 50 S	Respiratorio
Colistina	1000 UI/T	Polimixina	Bactericida	Membrana	Digestivo

Bacteria	COMBINACIÓN COMPUESTO	RESULTADO
<i>Streptococcus suis</i> Serotipo 2	• Clortetraciclina-Tiamulina	INDIFERENTE
	• Tiamulina-Colistina	INDIFERENTE
	• Clortetraciclina-Colistina	SINÉRGICO
	• Clortetraciclina/Tiamulina-Colistina	INDIFERENTE
	• Clortetraciclina/Colistina-Tiamulina	INDIFERENTE
	• Tiamulina/Colistina-Clortetraciclina	INDIFERENTE
	• Tiamulina/Colistina/Clortetraciclina	INDIFERENTE

Combinación 2

ACTIVO	DOSIS DE INCLUSION ppm	GRUPO	CLASIFICACIÓN TERAPÉUTICA	SITIO DE ACCION	ENFOQUE TERAPEUTICO
Lincomicina	100g/T	Lincosamida	Bacteriostático	Ribosoma 50S	Respiratorio
Espectinomicona	88 g/T	Aminociclitol	Bacteriostático	Ribosoma 30 S	Digestivo/Respiratorio
Colistina	1000 UI/T	Polimixina	Bactericida	Membrana	Digestivo

Bacteria	COMBINACIÓN COMPUESTO	RESULTADO
<i>Streptococcus suis</i> Serotipo 2	• Lincomicina-Espectinomicona	INDIFERENTE
	• Lincomicina-Colistina	INDIFERENTE
	• Espectinomicona-Colistina	INDIFERENTE
	• Lincomicina/Espectinomicona-Colistina	INDIFERENTE
	• Lincomicina/Colistina-Espectinomicona	INDIFERENTE
	• Espectinomicona/Colistina-Lincomicina	INDIFERENTE
	• Lincomicina/Espectinomicona/Colistina	INDIFERENTE

Combinación 3

Activo	Dosis de inclusión ppm	Grupo	Clasificación terapéutica	Sitio de acción	Enfoque terapéutico
Amoxicilina	400g/T	Beta-lactámico	Bactericida	Pared	Sistémico
Colistina	1000 UI/T	Polimixina	Bactericida	Membrana	Digestivo

Bacteria	COMBINACIÓN COMPUESTO	RESULTADO
<i>Streptococcus suis</i>	Amoxicilina-Colistina	SINÉRGICO
	Amoxicilina/Colistina	SINÉRGICO

Combinación 4

ACTIVO	DOSIS DE INCLUSION ppm	GRUPO	CLASIFICACIÓN TERAPÉUTICA	SITIO DE ACCION	ENFOQUE TERAPEUTICO
Florfenicol	200g/T	Amfenicol	Bacteriostático	Ribosoma50S	Sistémico
Colistina	1000 UI/T	Polimixina	Bactericida	Membrana	Digestivo

Bacteria	COMBINACIÓN COMPUESTO	RESULTADO
<i>Streptococcus suis</i>	Florfenicol-Colistina	SINÉRGICO
	Florfenicol/Colistina	SINÉRGICO

Combinación 5

Activo	Dosis de inclusión ppm	Grupo	Clasificación terapéutica	Sitio de acción	Enfoque terapéutico
Amoxicilina	400g/T	Beta-lactámico	Bactericida	Pared	Sistémico
Tiamulina	100g/T	Macrólido	Bacteriostático	Ribosoma 50S	Respiratorio
Colistina	1000 UI/T	Polimixina	Bactericida	Membrana	Digestivo

Bacteria	COMBINACIÓN COMPUESTO	RESULTADO
<i>Streptococcus suis</i> Serotipo 2	• Amoxicilina-Tiamulina	SINÉRGICO
	• Amoxicilina/Tiamulina-Colistina	SINÉRGICO
	• Amoxicilina/Colistina-Tiamulina	SINÉRGICO
	• Amoxicilina/Colistina/Tiamulina	SINÉRGICO

Combinación 6

Activo	Dosis de inclusión ppm	Grupo	Clasificación terapéutica	Sitio de acción	Enfoque terapéutico
Tilmicosina	400g/T	Macrólido	Bacteriostático	Ribosoma 50S	Respiratorio
Florfenicol	200g/T	Amfenicol	Bacteriostático	Ribosoma 50S	Sistémico
Paracetamol	200g /T	Aminofenol			
Colistina	1000 UI/T	Polimixina	Bactericida	Membrana	Digestivo

Bacteria	COMBINACIÓN COMPUESTO	RESULTADO
<i>Streptococcus suis</i> Serotipo 2	• Tilmicosina-Florfenicol	INDIFERENTE
	• Tilmicosina-Colistina	INDIFERENTE
	• Tilmicosina/Florfenicol-Colistina	INDIFERENTE
	• Tilmicosina/Colistina-Florfenicol	INDIFERENTE
	• Florfenicol/Colistina-Tilmicosina	INDIFERENTE
	• Tilmicosina/Florfenicol/Colistina	ANTAGÓNICO

Combinación 7

Activo	Dosis de inclusión ppm	Grupo	Clasificación terapéutica	Sitio de acción	Enfoque terapéutico
Tilmicosina	400g/T	Macrólido	Bacteriostático	Ribosoma 50S	Respiratorio
Amoxicilina	400g/T	Beta-lactámico	Bactericida	Pared	Sistémico
Paracetamol	200g /T	Aminofenol			
Colistina	1000 UI/T	Polimixina	Bactericida	Membrana	Digestivo

Bacteria	COMBINACIÓN COMPUESTO	RESULTADO
<i>Streptococcus suis</i> Serotipo 2	• Tilmicosina-Amoxicilina	INDIFERENTE
	• Tilmicosina/Amoxicilina-Colistina	SINÉRGICO
	• Tilmicosina/Colistina-Amoxicilina	INDIFERENTE
	• Amoxicilina/Colistina-Tilmicosina	SINÉRGICO
	• Tilmicosina/Amoxicilina/Colistina	SINÉRGICO

Cuadro 13. Siete combinaciones de antibióticos frente a *Escherichia coli* (*E. coli*).

**ISOBOLOGRAMAS DE LAS COMBINACIONES DE ANTIBIÓTICOS CONTRA
*Escherichia coli***

Combinación 1

Activo	Dosis de inclusión ppm	Grupo	Clasificación terapéutica	Sitio de acción	Enfoque terapéutico
Clortetraciclina	400 g/T	Tetraciclinas	Bacteriostático	Ribosoma 30 S	Respiratorio
Tiamulina	133 g/T	Macrólido	Bacteriostático	Ribosoma 50 S	Respiratorio
Colistina	1000 UI/T	Polimixina	Bactericida	Membrana	Digestivo

Bacteria	COMBINACIÓN COMPUESTO	RESULTADO
<i>Escherichia coli</i>	• Clortetraciclina-Tiamulina	SINÉRGICO
	• Tiamulina-Colistina	SINÉRGICO
	• Clortetraciclina-Colistina	SINÉRGICO
	• Clortetraciclina/Tiamulina-Colistina	SINÉRGICO
	• Clortetraciclina/Colistina-Tiamulina	SINÉRGICO
	• Tiamulina/Colistina-Clortetraciclina	SINÉRGICO
	• Tiamulina/Colistina/Clortetraciclina	SINÉRGICO

Combinación 2

Activo	Dosis de inclusión ppm	Grupo	Clasificación terapéutica	Sitio de acción	Enfoque terapéutico
Lincomicina	100g/T	Lincosamida	Bacteriostático	Ribosoma 50S	Respiratorio
Espectinomicina	88 g/T	Aminociclitol	Bacteriostático	Ribosoma 30 S	Digestivo/Respiratorio
Colistina	1000 UI/T	Polimixina	Bactericida	Membrana	Digestivo

MO	COMBINACIÓN COMPUESTO	RESULTADO
<i>Escherichia coli</i>	• Lincomicina-Espectinomicina	SINÉRGICO
	• Lincomicina-Colistina	SINÉRGICO
	• Espectinomicina-Colistina	SINÉRGICO
	• Lincomicina/Espectinomicina-Colistina	SINÉRGICO
	• Lincomicina/Colistina-Espectinomicina	SINÉRGICO
	• Espectinomicina/Colistina-Lincomicina	SINÉRGICO
	• Lincomicina/Espectinomicina/Colistina	SINÉRGICO

Combinación 3

Activo	Dosis de inclusión ppm	Grupo	Clasificación terapéutica	Sitio de acción	Enfoque terapéutico
Amoxicilina	400g/T	Beta-lactámico	Bactericida	Pared	Sistémico
Colistina	1000 UI/T	Polimixina	Bactericida	Membrana	Digestivo

MO	COMBINACIÓN COMPUESTO	RESULTADO
<i>Escherichia coli</i>	• Amoxicilina-Colistina	SINÈRGICO
	• Amoxicilina/Colistina	SINERGICO

Combinación 4

Activo	Dosis de inclusión ppm	Grupo	Clasificación terapéutica	Sitio de acción	Enfoque terapéutico
Florfenicol	200g/T	Amfenicol	Bacteriostático	Ribosoma50S	Sistémico
Colistina	1000 UI/T	Polimixina	Bactericida	Membrana	Digestivo

MO	COMBINACIÓN COMPUESTO	RESULTADO
<i>Escherichia coli</i>	• Florfenicol-Colistina	SINÈRGICO
	• Florfenicol/Colistina	SINÈRGICO

Combinación 5

Activo	Dosis de inclusión ppm	Grupo	Clasificación terapéutica	Sitio de acción	Enfoque terapéutico
Amoxicilina	400g/T	Beta-lactámico	Bactericida	Pared	Sistémico
Tiamulina	100g/T	Macrólido	Bacteriostático	Ribosoma 50S	Respiratorio
Colistina	1000 UI/T	Polimixina	Bactericida	Membrana	Digestivo

Bacteria	COMBINACIÓN COMPUESTO	RESULTADO
<i>Escherichia coli</i>	• Amoxicilina-Tiamulina	SINÉRGICO
	• Amoxicilina/Tiamulina-Colistina	SINÉRGICO
	• Amoxicilina/Colistina-Tiamulina	SINÉRGICO
	• Amoxicilina/Colistina/Tiamulina	SINÉRGICO

Combinación 6

Activo	Dosis de inclusión ppm	Grupo	Clasificación terapéutica	Sitio de acción	Enfoque terapéutico
Tilmicosina	400g/T	Macrólido	Bacteriostático	Ribosoma 50S	Respiratorio
Florfenicol	200g/T	Amfenicol	Bacteriostático	Ribosoma 50S	Sistémico
Paracetamol	200g /T	Aminofenol			
Colistina	1000 UI/T	Polimixina	Bactericida	Membrana	Digestivo

Bacteria	COMBINACIÓN COMPUESTO	RESULTADO
<i>Escherichia coli</i>	• Tilmicosina-Florfenicol	SINÉRGICO
	• Tilmicosina-Colistina	SINÉRGICO
	• Tilmicosina/Florfenicol-Colistina	SINÉRGICO
	• Tilmicosina/Colistina-Florfenicol	SINÉRGICO
	• Florfenicol/Colistina-Tilmicosina	SINÉRGICO
	• Tilmicosina/Florfenicol/Colistina	SINÉRGICO

Combinación 7

Activo	Dosis de inclusión ppm	Grupo	Clasificación terapéutica	Sitio de acción	Enfoque terapéutico
Tilmicosina	400g/T	Macrólido	Bacteriostático	Ribosoma 50S	Respiratorio
Amoxicilina	400g/T	Beta-lactámico	Bactericida	Pared	Sistémico
Paracetamol	200g /T	Aminofenol			
Colistina	1000 UI/T	Polimixina	Bactericida	Membrana	Digestivo

Bacteria	COMBINACIÓN COMPUESTO	RESULTADO
<i>Escherichia coli</i>	• Tilmicosina-Amoxicilina	SINÉRGICO
	• Tilmicosina/Amoxicilina-Colistina	SINÉRGICO
	• Tilmicosina/Colistina-Amoxicilina	SINÉRGICO
	• Amoxicilina/Colistina-Tilmicosina	SINÉRGICO
	• Tilmicosina/Amoxicilina/Colistina	SINÉRGICO

Cuadro 14. Siete combinaciones de antibióticos frente a *Pasteurella multocida*. (P.m tipo A)

ISOBOLOGRAMAS DE LAS COMBINACIONES DE ANTIBIÓTICOS CONTRA *Pasteurella multocida* tipo A

Combinación 1

Activo	Dosis de inclusión ppm	Grupo	Clasificación terapéutica	Sitio de acción	Enfoque terapéutico
Clortetracilina	400 g/T	Tetraciclinas	Bacteriostático	Ribosoma 30 S	Respiratorio
Tiamulina	133 g/T	Macrólido	Bacteriostático	Ribosoma 50 S	Respiratorio
Colistina	1000 UI/T	Polimixina	Bactericida	Membrana	Digestivo

Bacteria	COMBINACIÓN COMPUESTO	RESULTADO
<i>Pasteurella multocida</i> tipo A	• Clortetracilina-Tiamulina	ANTAGÓNICO
	• Tiamulina-Colistina	INDIFERENTE
	• Clortetracilina-Colistina	ANTAGÓNICO
	• Clortetracilina/Tiamulina-Colistina	INDIFERENTE
	• Clortetracilina/Colistina-Tiamulina	INDIFERENTE
	• Tiamulina/Colistina-Clortetracilina	INDIFERENTE
	• Tiamulina/Colistina/Clortetracilina	INDIFERENTE

Combinación 2

Activo	Dosis de inclusión ppm	Grupo	Clasificación terapéutica	Sitio de acción	Enfoque terapéutico
Lincomicina	100g/T	Lincosamida	Bacteriostático	Ribosoma 50S	Respiratorio
Espectinomicina	88 g/T	Aminociclitol	Bacteriostático	Ribosoma 30 S	Digestivo/Respiratorio
Colistina	1000 UI/T	Polimixina	Bactericida	Membrana	Digestivo

Bacteria	COMBINACIÓN COMPUESTO	RESULTADO
<i>Pasteurella multocida tipo A</i>	• Lincomicina-Espectinomicina	INDIFERENTE
	• Lincomicina-Colistina	INDIFERENTE
	• Espectinomicina-Colistina	INDIFERENTE
	• Lincomicina/Espectinomicina-Colistina	INDIFERENTE
	• Lincomicina/Colistina-Espectinomicina	SINÉRGICO
	• Espectinomicina/Colistina-Lincomicina	SINÉRGICO
	• Lincomicina/Espectinomicina/Colistina	INDIFERENTE

Combinación 3

Activo	Dosis de inclusión ppm	Grupo	Clasificación terapéutica	Sitio de acción	Enfoque terapéutico
Amoxicilina	400g/T	Beta-lactámico	Bactericida	Pared	Sistémico
Colistina	1000 UI/T	Polimixina	Bactericida	Membrana	Digestivo

Bacteria	COMBINACIÓN COMPUESTO	RESULTADO
<i>Pasteurella multocida tipo A</i>	• Amoxicilina-Colistina	INDIFERENTE
	• Amoxicilina/Colistina	INDIFERENTE

Combinación 4

Activo	Dosis de inclusión ppm	Grupo	Clasificación terapéutica	Sitio de acción	Enfoque terapéutico
Florfenicol	200g/T	Amfenicol	Bacteriostático	Ribosoma50S	Sistémico
Colistina	1000 UI/T	Polimixina	Bactericida	Membrana	Digestivo

Bacteria	COMBINACIÓN COMPUESTO	RESULTADO
<i>Pasteurella multocida tipo A</i>	• Florfenicol-Colistina	INDIFERENTE
	• Florfenicol/Colistina	INDIFERENTE

Combinación 5

Activo	Dosis de inclusión ppm	Grupo	Clasificación terapéutica	Sitio de acción	Enfoque terapéutico
Amoxicilina	400g/T	Beta-lactámico	Bactericida	Pared	Sistémico
Tiamulina	100g/T	Macrólido	Bacteriostático	Ribosoma 50S	Respiratorio
Colistina	1000 UI/T	Polimixina	Bactericida	Membrana	Digestivo

Bacteria	COMBINACIÓN COMPUESTO	RESULTADO
<i>Pasteurella multocida tipo A</i>	• Amoxicilina-Tiamulina	ANTAGÓNICO
	• Amoxicilina/Tiamulina-Colistina	INDIFERENTE
	• Amoxicilina/Colistina-Tiamulina	SINÉRGICO
	• Amoxicilina/Colistina/Tiamulina	INDIFERENTE

Combinación 6

Activo	dosis de inclusión ppm	Grupo	clasificación terapéutica	sitio de acción	enfoque terapéutico
Tilmicosina	400g/T	Macrólido	Bacteriostático	Ribosoma 50S	Respiratorio
Florfenicol	200g/T	Amfenicol	Bacteriostático	Ribosoma 50S	Sistémico
Paracetamol	200g /T	Aminofenol			
Colistina	1000 UI/T	Polimixina	Bactericida	Membrana	Digestivo

MO	COMBINACIÓN COMPUESTO	RESULTADO
<i>Pasteurella multocida tipo A</i>	• Tilmicosina-Florfenicol	SINÉRGICO
	• Tilmicosina-Colistina	SINÉRGICO
	• Tilmicosina/Florfenicol-Colistina	SINÉRGICO
	• Tilmicosina/Colistina-Florfenicol	SINÉRGICO
	• Florfenicol/Colistina-Tilmicosina	SINÉRGICO
	• Tilmicosina/Florfenicol/Colistina	SINÉRGICO

Combinación 7

Activo	Dosis de inclusión ppm	Grupo	Clasificación terapéutica	Sitio de acción	Enfoque terapéutico
Tilmicosina	400g/T	Macrólido	Bacteriostático	Ribosoma 50S	Respiratorio
Amoxicilina	400g/T	Beta-lactámico	Bactericida	Pared	Sistémico
Paracetamol	200g /T	Aminofenol			
Colistina	1000 UI/T	Polimixina	Bactericida	Membrana	Digestivo

MO	COMBINACIÓN COMPUESTO	RESULTADO
<i>Pasteurella multocida tipo A</i>	• Tilmicosina-Amoxicilina	SINÉRGICO
	• Tilmicosina/Amoxicilina-Colistina	INDIFERENTE
	• Tilmicosina/Colistina-Amoxicilina	SINÉRGICO
	• Amoxicilina/Colistina-Tilmicosina	SINÉRGICO
	• Tilmicosina/Amoxicilina/Colistina	INDIFERENTE

Cuadro 14. Siete combinaciones de antibióticos frente a *Haemophilus parasuis*

ISOBOLOGRAMAS DE LAS COMBINACIONES DE ANTIBIÓTICOS CONTRA *Haemophilus parasuis*

Combinación 1

Activo	Dosis de inclusión ppm	Grupo	Clasificación terapéutica	Sitio de acción	Enfoque terapéutico
Clortetracilina	400 g/T	Tetraciclinas	Bacteriostático	Ribosoma 30 S	Respiratorio
Tiamulina	133 g/T	Macrólido	Bacteriostático	Ribosoma 50 S	Respiratorio
Colistina	1000 UI/T	Polimixina	Bactericida	Membrana	Digestivo

Bacteria	No. Placa -COMBINACIÓN COMPUESTO	RESULTADO
<i>Haemophilus parasuis</i>	• Clortetracilina-Tiamulina	ANTAGÓNICO
	• Tiamulina-Colistina	INDIFERENTE
	• Clortetracilina-Colistina	INDIFERENTE
	• Clortetracilina/Tiamulina-Colistina	INDIFERENTE
	• Clortetracilina/Colistina-Tiamulina	ANTAGÓNICO
	• Tiamulina/Colistina-Clortetracilina	INDIFERENTE
	• Tiamulina/Colistina/Clortetracilina	INDIFERENTE

Combinación 2

Activo	Dosis de Inclusión ppm	Grupo	Clasificación Terapéutica	Sitio de Acción	Enfoque Terapéutico
Lincomicina	100g/T	Lincosamida	Bacteriostático	Ribosoma 50S	Respiratorio
Espectinomicina	88 g/T	Aminociclitol	Bacteriostático	Ribosoma 30 S	Digestivo/Respiratorio
Colistina	1000 UI/T	Polimixina	Bactericida	Membrana	Digestivo

Bacteria	No. Placa- COMBINACIÓN COMPUESTO	RESULTADO
<i>Haemophilus parasuis</i>	• Lincomicina-Espectinomicina	SINÉRGICO
	• Lincomicina-Colistina	SINÉRGICO
	• Espectinomicina-Colistina	SINÉRGICO
	• Lincomicina/Espectinomicina-Colistina	SINÉRGICO
	• Lincomicina/Colistina-Espectinomicina	SINÉRGICO
	• Espectinomicina/Colistina-Lincomicina	SINÉRGICO
	• Lincomicina/Espectinomicina/Colistina	SINÉRGICO

Combinación 3

Activo	Dosis de inclusión ppm	Grupo	Clasificación terapéutica	Sitio de acción	Enfoque terapéutico
Amoxicilina	400g/T	Beta-lactámico	Bactericida	Pared	Sistémico
Colistina	1000 UI/T	Polimixina	Bactericida	Membrana	Digestivo

Bacteria	No. Placa -COMBINACIÓN COMPUESTO	RESULTADO
<i>Haemophilus parasuis</i>	Amoxicilina-Colistina	ANTAGÓNICO
	Amoxicilina/Colistina	INDIFERENTE

Combinación 4

ACTIVO	DOSIS DE INCLUSION ppm	GRUPO	CLASIFICACIÓN TERAPÉUTICA	SITIO DE ACCION	ENFOQUE TERAPEUTICO
Florfenicol	200g/T	Amfenicol	Bacteriostático	Ribosoma50S	Sistémico
Colistina	1000 UI/T	Polimixina	Bactericida	Membrana	Digestivo

Bacteria	No. Placa -COMBINACIÓN COMPUESTO	RESULTADO
<i>Haemophilus parasuis</i>	Florfenicol-Colistina	SINÉRGICO
	Florfenicol/Colistina	SINÉRGICO

Combinación 5

Activo	Dosis de inclusión ppm	Grupo	Clasificación terapéutica	Sitio de acción	Enfoque terapéutico
Amoxicilina	400g/T	Beta-lactámico	Bactericida	Pared	Sistémico
Tiamulina	100g/T	Macrólido	Bacteriostático	Ribosoma 50S	Respiratorio
Colistina	1000 UI/T	Polimixina	Bactericida	Membrana	Digestivo

Bacteria	No. Placa -COMBINACIÓN COMPUESTO	RESULTADO
<i>Haemophilus parasuis</i>	• Amoxicilina-Tiamulina	SINÉRGICO
	• Amoxicilina/Tiamulina-Colistina	SINÉRGICO
	• Amoxicilina/Colistina-Tiamulina	ANTAGÓNICO
	• Amoxicilina/Colistina/Tiamulina	INDIFERENTE

Combinación 6

Activo	Dosis de inclusión ppm	Grupo	Clasificación terapéutica	Sitio de acción	Enfoque terapéutico
Tilmicosina	400g/T	Macrólido	Bacteriostático	Ribosoma 50S	Respiratorio
Florfenicol	200g/T	Amfenicol	Bacteriostático	Ribosoma 50S	Sistémico
Paracetamol	200g /T	Aminofenol			
Colistina	1000 UI/T	Polimixina	Bactericida	Membrana	Digestivo

Bacteria	No. Placa -COMBINACIÓN COMPUESTO	RESULTADO
<i>Haemophilus parasuis</i>	• Tilmicosina-Florfenicol	SINÉRGICO
	• Tilmicosina-Colistina	ANTAGÓNICO
	• Tilmicosina/Florfenicol-Colistina	SINÉRGICO
	• Tilmicosina/Colistina-Florfenicol	ANTAGÓNICO
	• Florfenicol/Colistina-Tilmicosina	ANTAGÓNICO
	• Tilmicosina/Florfenicol/Colistina	INDIFERENTE

Combinación 7

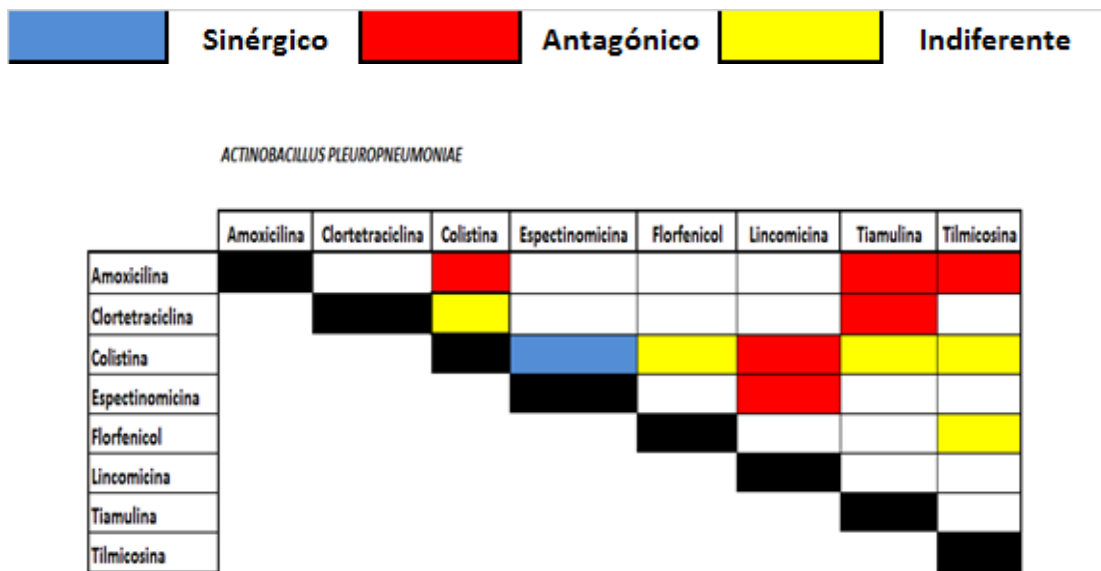
Activo	Dosis de inclusión ppm	Grupo	Clasificación terapéutica	Sitio de acción	Enfoque terapéutico
Tilmicosina	400g/T	Macrólido	Bacteriostático	Ribosoma 50S	Respiratorio
Amoxicilina	400g/T	Beta-lactámico	Bactericida	Pared	Sistémico
Paracetamol	200g /T	Aminofenol			
Colistina	1000 UI/T	Polimixina	Bactericida	Membrana	Digestivo

Bacteria	No. Placa -COMBINACIÓN COMPUESTO	RESULTADO
<i>Haemophilus parasuis</i>	• Tilmicosina-Amoxicilina	<i>SINÉRGICO</i>
	• Tilmicosina/Amoxicilina-Colistina	<i>SINÉRGICO</i>
	• Tilmicosina/Colistina-Amoxicilina	<i>ANTAGÓNICO</i>
	• Amoxicilina/Colistina-Tilmicosina	<i>ANTAGÓNICO</i>
	• Tilmicosina/Amoxicilina/Colistina	<i>INDIFERENTE</i>

8.3 Resultados en grafico de colores

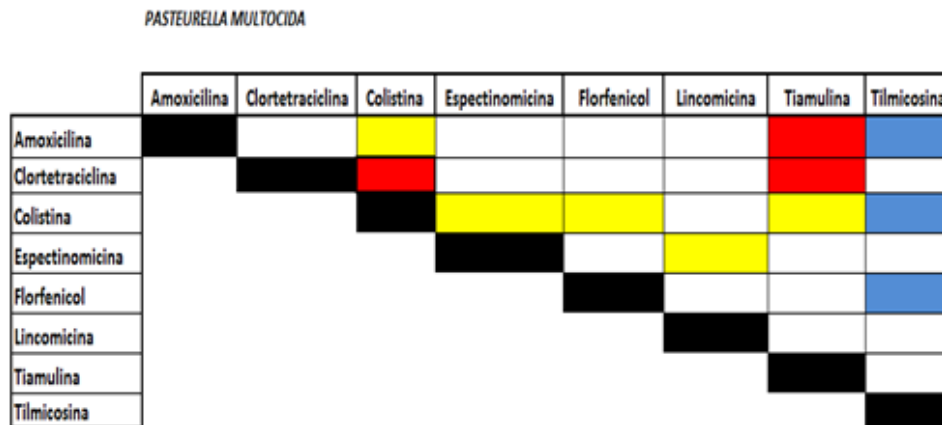
La figura 1, Se observa que en la mayoría de las premezclas antibióticas frente a *Actinobacillus pleuropneumoniae* ST1 generan efecto antagónico.

Figura 1. - Combinación de 2 antibióticos contra *Actinobacillus pleuropneumoniae* ST1.



En la figura 2, se puede observar que en la mayoría de las premezclas antibióticas frente a *Pasteurella multocida* tipo A presentan un efecto indiferente.

Figura 2.- Combinación de 2 antibióticos contra *Pasteurella multocida* tipo A



La siguiente figura muestra que en la mayoría de las premezclas antibióticas frente a *Streptococcus suis* ST2 presentan un efecto indiferente. Sin embargo, también presenta un efecto sinérgico.

Figura 3.- Combinación de 2 antibióticos contra *Streptococcus suis* ST2

STREPTOCOCCUS SUIS

	Amoxicilina	Clortetraciclina	Colistina	Espectinomicona	Florfenicol	Lincomicina	Tiamulina	Tilmicosina
Amoxicilina	Indiferente	Indiferente	Sinérgico	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Sinérgico	Sinérgico
Clortetraciclina	Indiferente	Indiferente	Sinérgico	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Sinérgico	Indiferente
Colistina	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Sinérgico	Sinérgico	Sinérgico	Sinérgico	Sinérgico
Espectinomicona	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Sinérgico	Indiferente	Indiferente
Florfenicol	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Sinérgico
Lincomicina	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Indiferente
Tiamulina	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Indiferente
Tilmicosina	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Indiferente

En la figura 4 se observa que las premezclas antibióticas frente a *Escherichia coli* presentan un efecto sinérgico.

Figura 4.- Combinación de 2 antibióticos contra *Escherichia coli*

ESCHERICHIA COLI

	Amoxicilina	Clortetraciclina	Colistina	Espectinomicona	Florfenicol	Lincomicina	Tiamulina	Tilmicosina
Amoxicilina	Indiferente	Indiferente	Sinérgico	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Sinérgico	Sinérgico
Clortetraciclina	Indiferente	Indiferente	Sinérgico	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Sinérgico	Indiferente
Colistina	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Sinérgico	Sinérgico	Sinérgico	Sinérgico	Sinérgico
Espectinomicona	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Sinérgico	Indiferente	Indiferente
Florfenicol	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Sinérgico
Lincomicina	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Indiferente
Tiamulina	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Indiferente
Tilmicosina	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Indiferente

En la figura siguiente se observa que en la mayoría de las premezclas antibióticas frente *Haemophilus parasuis* presentan un efecto sinérgico.

Figura 5.- Combinación de 2 antibióticos contra *Haemophilus parasuis*

HAEMOPHILUS PARASUIS

	Amoxicilina	Clortetraciclina	Colistina	Espectinomicina	Florfenicol	Lincomicina	Tiamulina	Tilmicosina
Amoxicilina	Black		Red				Blue	Blue
Clortetraciclina		Black	Yellow				Red	
Colistina			Black	Blue	Blue	Blue	Yellow	Red
Espectinomicina				Black		Blue		
Florfenicol					Black			Blue
Lincomicina						Black		
Tiamulina							Black	
Tilmicosina								Black

A continuación, se presenta la figura 5 donde se puede observar las combinaciones que se emplearon de 2 a 3 antibióticos donde se tiene en común el antibiótico Colistina por mezcla. Se muestra una comparación entre las 5 bacterias donde *E. coli*, es aquella bacteria que sigue presentando un efecto sinérgico, mientras que *App ST1* y *Haemophilus parasuis* por ser considerados bacterias tardías, en su mayoría presentan un efecto antagónico.

Figura 5. – Combinación de 2 y 3 antibióticos contra las 5 diferentes bacterias.

MEZCLA	ANTIBIÓTICOS			<i>App ST1</i>	<i>P. multocida</i> tipo A	<i>S. suis</i> ST2	<i>E. coli</i>	<i>H. parasuis</i>
1	Clortetraciclina	Tiamulina	Colistina	Red	Yellow	Yellow	Blue	Yellow
2	Lincomicina	Espectinomicina	Colistina	Yellow	Yellow	Yellow	Blue	Blue
3	Amoxicilina		Colistina	Red	Yellow	Blue	Blue	Red
4	Forfenicol		Colistina	Yellow	Yellow	Blue	Blue	Blue
5	Amoxicilina	Tiamulina	Colistina	Red	Yellow	Blue	Blue	Red
6	Tilmicosina	Florfenicol	Colistina	Yellow	Blue	Yellow	Blue	Red
7	Tilmicosina	Amoxicilina	Colistina	Red	Yellow	Blue	Blue	Red



9.0 Discusión

La realización de isobogramas empleando el método de ajedrez (“Checkboard assay”), es una de las técnicas más frecuentes utilizadas para probar combinaciones de agentes antimicrobianos “*in vitro*” (Blaser, J. 1991).

Es indispensable mencionar que la actividad *in vitro* de un antibiótico frente a un microorganismo determinado refleja su capacidad para inhibir el crecimiento de una bacteria o población bacteriana.

Las bacterias empleadas se enfocaron a tres sistemas; digestivo, sistémico y respiratorio que afectan a lechones en el intervalo del destete a las 10 semanas de edad.

Aunque también cabe mencionar que el suplemento antibiótico en el agua o en el alimento es frecuentemente utilizado para la prevención de brotes agudos de enfermedades infecciosas en cerdos, con resultados muy variables dependiendo del tiempo de administración y del producto utilizado. Sin embargo la presencia de alimento provoca una disminución significativa de los niveles sanguíneos, por lo que se recomienda el uso de antibióticos en agua.

Las combinaciones de antibióticos practicadas han sido de tipo empírico, basado ocasionalmente en principios generales derivados de la práctica diaria, ya sea por el manejo bien definido de bacterias o la predicción de las actividades de los antibióticos a utilizar (Blaser, 1991).

El objetivo principal del uso de combinaciones de antibióticos es la de clasificar a la combinación como sinergia, indiferente o antagónica. Sin embargo, esta clasificación no siempre es completa, ya que existen combinaciones, las cuales ambas son antagónicas e indiferente o indiferente y sinérgica, dependiendo de las concentraciones de los antibióticos o inóculo bacteriano considerado (Blaser, 1991).

Sabemos que los antibióticos comúnmente utilizados en el tratamiento de las enfermedades infecciosas de los porcinos, cada vez tienen menor efecto antibacteriano, debido posiblemente a que las cepas día a día van adquiriendo

mayor resistencia a los antibióticos, esto ha conducido al uso rutinario de combinaciones antibióticas, la mayoría de ellas elaboradas de manera empírica. En base a esto por medio del diseño experimental se efectuó la realización de las combinaciones de antibióticos.

Berembaum (1978) dice que sinergismo y antagonismo son interacciones difíciles de predecir, ya que el resultado varía en función al microorganismo y especie bacteriana, además de que puede ocurrir únicamente en un rango estrecho de concentraciones de antibiótico.

En este trabajo de investigación se probaron diferentes combinaciones de antibióticos como premezclas antibióticas tales como Clortetraciclina, Tiamulina fumarato, Colistina, Lincominicina, Espectinomicina, Amoxicilina, Florfenicol y Tilmicosina, antibióticos utilizados en los últimos años en el tratamiento para el trato y control de enfermedades infecciosas en cerdos como las pleuroneumonías y de tipo entérico como la colibacilosis porcina.

Esto se logro por la existencia de técnicas de ensayo de antibióticos como fueron las pruebas sinérgicas mediante el tablero de ajedrez en microdilución.

La Colistina es un antibiótico del grupo de las polimixina, con clasificación terapéutica bactericida; es decir que produce la muerte de la bacteria, su sitio de acción es la membrana y su enfoque terapéutico es el digestivo. Este antibiótico se combino con siete diferentes premezclas antibióticas entre ellas la Clortetraciclina perteneciente al grupo de las tetraciclinas; es considerado un antibiótico bacteriostático, es decir impide la reproducción de la bacteria, su enfoque terapéutico es el respiratorio; al estar en combinación con las demás premezclas genera un efecto antagónico e indiferente frente a *AppST1*, *P. multocida* y *H. parasuis* a excepción de *E. coli* y *S. suis* donde se obtuvo un efecto sinérgico.

La Colistina es sinérgica con gran variedad de antimicrobianos, entre ellos: -lactámicos, Eritromicina, Tetraciclinas, Sulfamidas, Trimetroprim y Bacitracina. No se han descrito antagonismos con otros antibióticos cuando se administra por vía oral (Hampson *et al.*, 2001).

La Colistina es un antibiótico que en “*in vivo*” no se absorbe y está destinado a infecciones de tipo digestivo. Es importante recordar que las condiciones “*in vivo*” son distintas a las utilizadas para esta prueba que se realiza “*in vitro*”.

En el caso de Amoxicilina es un antibiótico que generó mejores resultados para *Pasteurella multocida tipo A*. Sin embargo en combinación con la Colistina su efecto fue indiferente. Cabe mencionar que la Tilmicosina es un antimicrobiano efectivo para esta bacteria, y en combinación con la Amoxicilina potencian el efecto generando un efecto sinérgico.

De acuerdo a la guía rápida en salud animal de Laboratorio Lapisa y Bayer el Florfenicol es un antibiótico de amplio espectro que se desarrolló como alternativa como prohibición del Cloranfenicol en animales para abasto. También tiene buena actividad contra algunas bacterias que son resistentes al Cloranfenicol, aunque se concibe cierto grado de resistencia cruzada. Dentro de su espectro destaca el efecto sobre *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida* y *Hemophilus sp.* Es un antibiótico que inhibe la síntesis de proteínas a nivel ribosomal, es decir, bloqueando la incorporación de aminoácidos en las cadenas peptídicas de las proteínas en proceso de transformación. Inhibe la síntesis proteínica en las bacterias y, en menor grado, en las células eucarióticas. (VS01-Feb.13)

El laboratorio Zoetis en sus hojas de seguridad del antibiótico Linco-Spectin 880 menciona que está indicado para el tratamiento y prevención de infecciones, causadas por gérmenes susceptibles a los antibióticos de la fórmula. Previniendo y controlando la disentería porcina y enteritis por *E. coli*. Lo cual apoya los resultados obtenidos en las determinaciones al obtener un efecto sinérgico. Sin embargo también menciona que está compuesto por dos antibióticos los cuales son Lincomicina y Espectinomicina que por separado actúa inhibiendo la síntesis proteica bacteriana, al fijarse sobre la subunidad 30S del ribosoma. Perturba la ordenación del RNA mensajero y provoca una lectura incorrecta del código genético por el RNA de transferencia; esto para el caso de la Espectinomicina frente a *E.coli* y *P. multocida*. Mientras que la Lincomicina

presenta un mecanismo de acción y un espectro bacteriano muy semejante al de los macrólidos. Actúa inhibiendo la síntesis de las proteínas bacterianas al unirse a las subunidad 50S del ribosoma, impidiendo el acoplamiento de las moléculas del RNA de transferencia. Es primariamente bacteriostático, pero a altas concentraciones puede ser bactericida y es activo frente a *Streptococcus* spp.

La importancia de la asociación de ambos antibióticos es que existe un efecto sinérgico en la proporción de 1:1 y 1:2, traduciéndose en una mayor eficacia frente a distintos procesos patológicos (disentería porcina) que la que tiene por separado (Zoetis Spain, S.L).

Tomando en cuenta lo anterior el uso prolongado de antibióticos como promotores de crecimiento puede haber ejercido una selección para la supervivencia de bacterias y estirpes resistentes; resistencias que pueden ser transferidas a otras bacterias (Aarestrup, 1999). Con el tiempo, la presión de selección constante que ejerce el uso de antibióticos como promotores de crecimiento inhibe el crecimiento de bacterias susceptibles y altera la composición de la microbiota del intestino, en el caso de *E.coli*.

Un número creciente de bacterias patógenas en cerdos muestra resistencia a una gran variedad de antimicrobianos (Barton, 1999). Esto no sólo está reduciendo el número de antimicrobianos disponibles en la industria para el control de infecciones bacterianas, sino que además dicha resistencia incrementa el riesgo para la salud humana.

Finalmente, mucho se tendrá que seguir investigando acerca de las combinaciones de antimicrobianos y sus probables efectos sobre microorganismos patógenos de interés veterinario, Sin embargo en función a los resultados obtenidos en este trabajo, es evidente que el uso rutinario de los antibióticos en la clínica veterinaria ha provocado el desarrollo de multiresistencia antibiótica, lo cual explica la aparición de antagonismo y por lo tanto ha limitado los tratamientos para las enfermedades. Es importante mencionar que este estudio abre un nuevo panorama de combinaciones antibióticas conocidas y estudiadas para obtener un mejor camino hacia el mejor tratamiento.

10.0 Conclusiones

- 4 La Colistina es un antibiótico que “*in vitro*” se disuelve por completo en agua, sin embargo, “*in vivo*” no se absorbe.
- 5 Las mezclas de antibióticos muestran diversos patrones de efectividad en combinación, en general los efectos son mejores para *Escherichia coli*.
- 6 Los antibióticos Lincomicina y Espectinomicina en combinación (LINCO-ESPECTIN) potencializan su efecto generando una sinergia frente a *E.coli*.
- 7 En el caso de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (*App ST1*) las mezclas presentan ventajas limitadas y presentan un mayor efecto antagónico. Aunque estas mezclas están indicadas en las fases de inicio dentro del cual la presencia de *App* no es común.
- 8 Las mezclas para el caso de infecciones por *Streptococcus suis* (*ST2*) y *Escherichia coli* muestran resultados adecuados sin efectos antagónicos para ningún microorganismo.
- 9 El uso indiscriminado de antibióticos para diferentes enfermedades a nivel veterinario, ha generado una resistencia en las bacterias, lo cual se observó en este estudio donde se obtuvo un resultado antagónico en la mayoría de las combinaciones.

11.0 Referencias

- Aarestrup, F.M. (1999) International Journal of Antimicrobial Agents 12: 279-285.
- Barnum, D.A., Glantz, P.J. y Moon, H.W. Colibacillosis Ciba Veterinary Monograph Series/two. Summit, N.J., 1967.
- Barton, M.D. (1999) En: Manipulating Pig Production VII (Ed. P.D. Cranwell), pp. 194-199. Australasian Pig Science Association, Werribee, Australia.
- Blaser, J. Interactions of antimicrobial combinations in vitro: The relativity of synergism. (1991) Scan. J.Infect.Dis. Suppl. Vol. 74 pág. 71-79.
- Berenbaum M. Synergy, additivism and antagonism in immunosuppression - critical review. Clin Exp Immunol. 1977; 28:1-18.
- Blackall, P.J., Klaasen, H.L.B.M., Van Den Bosch, H., Kuhnert, P., and Frey, J.: Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15. Vet. Microbiol. 84: 47-52, 2002.
- Ciprián-Carrasco, A., Mendoza-Elvira, S.: Importancia de identificar el serotipo de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en la pleuroneumonía contagiosa porcina por la clase de citolisina excretada. Porcira 5: 6-20, 1995. 6. Cho, W.S. and Chae, c.: Expression of *apxIV* gene in pigs naturally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. J. Comp. Pathol. 125: 34-40, 2001.
- Fedorka-Cray, P.J., Hoffman, L., Cray, W.C., Gray, J.T., Breisoli, S.A., Anderson, G.A.: *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Part I. History, Epidemiology, Serotyping, and Treatment. Food Animal 1447-1455, 1993.
- Fenwick, B. and Henry, S.: Clinical Update: Porcine Pleuropneumonia. JAVMA. 20 (4): 1334-1340, 1994.
- Fraser H.M, Chapman V, Dickenson A.H, Spinal local anesthetic actions on afferent evoked responses and windup of nociceptive neurons in the rat's spinal cord: combination with morphine produces marked potentiation. Pain, 1872; 49 33-41.
- Goldstein E.J.C, Citron D.M, Richwald G.A. Lack of in vitro efficacy of oral forms of certain cephalosporins, erithromycin, and oxacillin against *Pasteurella multocida*. Antimicrob Agents Chemother 1988; 32: 213-215.
- Hampson D.J., Pluske, J.R. y Pethick D.W. (2001) En: Proceedings of the VIIIth International Symposium on Digestive Physiology in Pigs (Eds. A. Piva, K.E. Bach Knudsen y J.-E. Lindberg), pp. 247-261. CAB International, Wallingford, UK.

