

197  
2ej



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES DE LA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

## EVALUACION IN VITRO DE DIEZ COMBINACIONES DE ANTIBIOTICOS, CONTRA CEPAS MULTIRRESISTENTES DE Staphylococcus aureus, AISLADAS DE GLANDULA MAMARIA DE BOVINOS.

### T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

P R E S E N T A :  
**SALVADOR RODRIGUEZ FRANCO**

Asesores: MVZ. Marcelo Pérez Dominguez  
QFB. Laura Hernández Andrade  
MVZ. Teodomiro Romero Andrade



México, D. F.

Octubre, 1989

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## CONTENIDO

	<u>Página</u>
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
MATERIAL Y METODOS.....	15
RESULTADOS.....	20
DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	25
LITERATURA CITADA.....	30
CUADROS.....	39

## RESUMEN

RODRIGUEZ FRANCO SALVADOR. EVALUACION IN VITRO DE DIEZ COMBINACIONES DE ANTIBIOTICOS, CONTRA CEPAS MULTIRRESISTENTES DE S. AUREUS, AISLADAS DE GLANDULA MAMARIA DE BOVINOS. (Bajo la dirección de Marcelo Pérez Domínguez, Laura Hernández Andrade y Teodomiro Romero Andrade).

Los objetivos de este trabajo fueron los siguientes: a) Verificar si combinaciones sinérgicas de antibióticos son efectivas contra cepas multirresistentes de S. aureus, aisladas de mastitis bovina y b) determinar la combinación y concentración de mayor eficacia in vitro. Se aislaron cuatro cepas multirresistentes de S. aureus de vacas que presentaban mastitis. Se les practicaron antibiogramas para verificar la multirresistencia. Se hicieron 10 combinaciones utilizándose los diluentes necesarios para cada antibiótico y se realizaron las combinaciones con tres concentraciones para cada una. Se expusieron las cepas y las combinaciones por medio de la técnica de cilindro en placa. Los resultados obtenidos fueron: la combinación Cefotaxima-Gentamicina eficaz para todas las cepas; dos cepas fueron susceptibles a la cefotaxima sola encontrándose un incremento en los halos obtenidos por la combinación, las otras dos cepas fueron intermedias a Cefotaxima sola y susceptibles a la combinación. Para Gentamicina sola, dos cepas fueron resistentes y dos susceptibles, y para la combinación todas susceptibles. La mejor concentración fue la máxima obteniéndose 25 mm de halo de inhibición en promedio para todas las cepas. Con la combinación Ampicilina-Gentamicina se

obtuvieron incrementos en los halos para las cuatro cepas, pero no hubo cambios en la sensibilidad. Para Penicilina-Estreptomicina, no se encontró el incremento suficiente en los halos de inhibición para rebasar el nivel de resistencia. Las combinaciones Penicilina-Kanamicina, Tetraciclina-Cloranfenicol, Tetraciclina-Eritromicina y Penicilina-Neomicina, provocaron un ligero aumento en el halo de inhibición, pero no lograron rebasar el nivel de resistencia. Las combinaciones Tetraciclina-Neomicina, Lincomicina-Neomicina y Eritromicina-Estreptomicina, no produjeron ningún cambio.

Según reportes de varios autores en México la mastitis varía de región a región: En el Estado de México en 1969, era de 62.7% (50); en Chipilo Estado de Puebla en 1971, de 43.8% (5); en la región lagunera en 1972, de 17.7% (54); en Cuautla, Mor. en 1973, de 30% (57); en el Valle de Tulancingo, Hgo. en 1984, de 34.8% (58) y en Puente de Ixtla, Mor. en 1988, del 45% (17).

La mastitis tiene dos tipos de presentación; una es la clínica, la cual a nivel individual causa las mayores pérdidas de producción de leche, y la otra presentación es la subclínica; ésta última causa considerables pérdidas de producción a nivel de hato, debido a la dificultad que presenta para su diagnóstico (21, 35, 43, 48, 49, 56, 59). Los costos que ocasiona la mastitis son elevados y las pérdidas son producidas por los costos de tratamientos en los casos clínicos, desecho de leche contaminada con antibióticos, pérdida de producción láctea, incremento de los costos por reemplazos y pérdida de material genético por desecho de animales enfermos (2, 18, 35, 51).

## I.2.MECANISMO DE ACCION DE LOS ANTIBIOTICOS

La penicilina G, la Ampicilina y la Cefotaxima, actúan sobre la pared bacteriana, inhibiendo la transpeptidación y produciendo la liberación de ácido lipoteicoico, quedando activada la hidrolasa mureína, enzima que degrada la pared bacteriana, permitiendo una muerte por estallamiento. La penicilina G es de espectro reducido, actúa contra gérmenes grampositivos. La ampicilina y cefotaxima son de amplio espectro, actúan sobre gérmenes grampositivos y gramnegativos (27, 30, 62).

La Estreptomocina, la Kanamicina, la Gentamicina y la Neomicina, son aminoglucósidos de amplio espectro, que actúan contra gérmenes grampositivos y gramnegativos, uniéndose a la unidad ribosómica 30s, en donde inhiben la síntesis de proteínas y disminuyen la fidelidad del código genético, evitando así el desarrollo bacteriano (27, 30, 62).

La Lincomicina, y La Eritromicina son macrólidos de mediano a amplio espectro, que actúan uniéndose a la unidad ribosómica 50s, inhibiendo la síntesis proteica y disminuyendo la capacidad de unión del RNAt-Fenilalanina con los complejos ribosomales (17, 30, 62).

La Tetraciclina es de amplio espectro, actúa uniéndose a la unidad ribosómica 30s, inhibiendo la síntesis proteica, además actúa inhibiendo sistemas enzimáticos activos y en la quelación activa de cationes (27, 30, 62).

El Cloranfenicol es de amplio espectro y actúa inhibiendo la síntesis proteica a nivel de la unidad ribosómica 50s, bloqueando la incorporación de aminoácidos en las cadenas peptídicas de las proteínas (27, 30, 62).

### 1.3. MECANISMOS DE RESISTENCIA DE LAS BACTERIAS

Las bacterias tienen diferentes mecanismos de resistencia, para los diferentes antibióticos utilizados en la terapia antimicrobiana, los mecanismos de resistencia bacteriana son los siguientes:

Para la Penicilina G y Ampicilina, que son antibióticos Beta-lactámicos, es por medio de la producción de Beta-lactamasa o

penicilinas estable en Ph neutro. Estas enzimas hidrolizan a la penicilinas, volviéndolas inactivas. Estas son producidas principalmente por: Bacillus subtilis, Aerobacter aerogenes, y Mycobacterium tuberculosis. Existen más de 50 Betalactamasas y la mayor parte de ellas son producidas por plásmidos bacterianos. Otro mecanismo de resistencia de las bacterias a estos antibióticos, es la ausencia de receptores en su pared celular a los cuales se tienen que unir los antibióticos para ejercer su acción bactericida. Esta falta de disponibilidad de receptores se puede deber a diferentes razones:

- a).- Algunas enzimas como las transpeptidasas, carboxidasas y endopeptidasas se acoplan y ocupan los receptores.
- b).- Las bacterias modifican las barreras de permeabilidad impidiendo el paso del fármaco hacia el receptor.
- c).- No existen receptores en la pared celular de la bacteria, ya sea por insuficiencia para sintetizar péptido glicano, por insuficiencia de actividad de enzimas autolíticas de la pared celular, o simplemente por mutaciones que modifican la estructura (27, 30, 62).

Las cefalosporinas son antibióticos Betalactámicos y normalmente son resistentes a las enzimas Betalactamasas, y las bacterias desarrollan resistencia a las cefalosporinas por medio de la producción de Cefalosporinasas, enzimas que son de efectos similares a las Betalactamasa (27, 30, 62).

La Estreptomycinina es un fármaco que suele inducir rápida resistencia bacteriana, sobre todo cuando se usa frecuentemente. Los gérmenes adquieren esta resistencia por mutación de genes y

plásmidos de resistencia (27, 30, 62).

Los mecanismos de resistencia para la Gentamicina pueden ser los siguientes: 1) Por mutación y selección de una cepa en presencia del fármaco. Los ribosomas de estas cepas no pueden fijar la Gentamicina. 2) Por incapacidad de las bacterias para transportar la Gentamicina al interior. 3) Por plásmidos de resistencia. Estos producen una enzima adenilante, la sintetasa del adenilato de gentamicina, que inhibe al antibiótico (27, 30, 62).

En el caso de la Kanamicina, las bacterias adquieren resistencia por medio de la conjugación. Esta resistencia se acompaña de enzimas que pueden fosforilar, acetilar o adenilar a la Kanamicina. Además existe resistencia cruzada con Neomicina, Paromicina y en menor grado con la Estreptomicina (27, 30, 62).

En cuanto a la resistencia a la Neomicina, las bacterias la obtienen a través de plásmidos, transmitiendo información genética como: a). Ausencia o alteración de un receptor protéico específico sobre la subunidad 30s del ribosoma, b). Producción de enzimas adenilantes, fosforilantes o acetilantes, que inactivan al fármaco. Por otro lado la neomicina también puede presentar resistencia cruzada con los demás aminoglucósidos, debido a la similitud de su estructura química (27, 30, 62).

Para la Eritromicina, las bacterias obtienen resistencia a través de plásmidos, produciendo una metilación del RNAr, evitando la inserción del fármaco al ribosoma. Las bacterias también pueden disminuir la concentración del fármaco alterando la permeabilidad de su pared. La Eritromicina presenta ligera

resistencia cruzada con Lincomicina, Oleandomicina y Espiramicina (27, 30, 62).

La resistencia a Lincomicina aparece lentamente, tal vez como resultado de la mutación de cromosomas bacterianos. Es común esta resistencia entre los estafilococos, neumococos y estreptococos (27, 30, 62).

En el caso de la Tetraciclina, la resistencia aparece lentamente, en forma gradual o por etapas. Las Tetraciclinas son acumuladas activamente por las bacterias y se da el fenómeno de resistencia transferible. Existe resistencia cruzada entre las diferentes tetraciclinas (27, 30, 62).

La resistencia para el cloranfenicol se debe a la mutación de las cepas, las cuales son generalmente de 2 a 4 veces más resistentes. Debido a esto la resistencia se da en forma gradual, dependiendo de la frecuencia del tratamiento. Generalmente las bacterias gramnegativas, por medio de conjugación adquieren el factor de resistencia, produciendo una acetil transferasa que acetila al Cloranfenicol (27, 30, 62).

#### I.4. MASTITIS POR Staphylococcus aureus Y EL PROBLEMA DE LA RESISTENCIA A LOS ANTIBIOTICOS

El Staphylococcus aureus, presenta reacción tintorial grampositiva, son cocos que se agrupan en racimos, son facultativos no móviles. Su habitat es en piel y mucosas incluyendo tracto genital respiratorio y gastrointestinal. Sus factores de virulencia son: la cápsula, polisacáridos, proteína A, tóxina epidemolítica, estafilokinasas, hialuronidasas,

hemolisinas (alfa, beta, delta y gama), coagulasas y enterotoxinas. Es causante de enfermedades como : Mastitis, osteomielitis, piodermas y abscesos. El medio de cultivo en el cual crece es el agar manitol sal (es específico), agar sangre, agar infusión cerebro corazón (BHI) y Muller Hinton. Es catalasa positivo y coagulasa positivo (32, 45).

El S. aureus como causante de mastitis, generalmente penetra a la ubre a través del canal la papila o teta, también puede penetrar por heridas o lesiones de la superficie de la misma. El tipo de mastitis que produce varía de subclínica a gangrenosa grave, aunque la mayoría de las infecciones tienen un curso crónico subclínico, el cual produce endurecimiento de la ubre, coagulos de leche y aumento de células somáticas en leche (32). Otros signos clínicos característicos son: tumor por hiperhemia y exudado, con aumento de volumen del tejido; calor debido a reacciones enzimáticas e hiperhemia local; rubor por hiperhemia; dolor por compresión de las fibras nerviosas sensitivas, este es el signo más perceptible; alteración funcional, donde hay una reducción de la producción de leche pudiendo llegar a agalactia. La leche puede aparecer con exudado (suero sanguíneo, fibrina, leucocitos o sangre total). También puede encontrarse inflamación de ganglios retromamarios (25).

Tipos de mastitis que puede llegar a producir S. aureus

- Serosa: En esta predomina el suero en la leche y tejido, normalmente es el inicio del proceso de la mastitis (25).
- Fibrinosa: se caracteriza por la presencia de exudado fibrinoso en el tejido glandular y la leche (25).

- Purulentas: En esta predominan los leucocitos en la leche, dando un aspecto de exudado caseoso (25).
- Hemorrágicas: Se aprecia salida de sangre completa junto con la leche (25).
- Gangrenosas: Normalmente se presenta en forma sobreaguda ocurriendo con mayor frecuencia en vacas primíparas que están en el inicio de la lactación. Esta origina pérdida de grandes cantidades de tejido mamario y la toxina alfa tiene un papel importante, ya que lesiona los vasos sanguíneos produciendo una necrosis coagulativa e isquémica del tejido adyacente a los vasos sanguíneos. Sobre el área afectada la piel se torna morada y finalmente sufre necrosis. Los animales presentan fiebre elevada y pueden morir por toxemia en uno o dos días (32).

La incidencia de mastitis por S. aureus es muy variada: Guzmán, A.A y col. (31) reportan porcentajes de aislamientos de S. aureus en vacas lecheras en el trópico, que van de 3.4 a 15%. Barajas, R.J.A. (3) reportó 6.6% de aislamientos de S. aureus a partir de vacas con mastitis. Madariaga y López (42) reportaron un 27% de aislamientos de S. aureus, en establos lecheros que abastecen a México, D.F. Campos (13) encontró una incidencia de mastitis por S. aureus de 6 a 29%, con una media de 16%. y Pérez (50) encontró 35.78% de leches provenientes de vacas con mastitis, positivas a S. aureus.

El uso de antibióticos por vía intramamaria es necesario en los programas de control de mastitis de un hato. Por otra parte la profilaxis y terapéutica en las infecciones de la glándula mamaria son complicadas debido a la gran variedad de

microorganismos y su resistencia a los antibióticos (14).

Debido a la alta incidencia de mastitis, la mayoría de los ganaderos se ven forzados a utilizar una gran cantidad de antibióticos de manera empírica, a través de los ordeñadores y encargados, favoreciendo de esta manera el desarrollo de resistencia bacteriana a esos antibióticos. Esto como consecuencia complica enormemente el control de la mastitis elevando las pérdidas económicas (64).

Para disminuir la resistencia de los diferentes microorganismos debe evitarse el uso inadecuado de los antibióticos. Procurando basar el tratamiento en un previo antibiograma del germen causante de la mastitis (47).

Frecuentemente se aísla Staphylococcus aureus de la glándula mamaria de vacas con mastitis y generalmente es resistente a los antibióticos (53), por esta razón es necesario buscar combinaciones sinérgicas con el fin de combatir infecciones por cepas multirresistentes, debido a que la resistencia que pueden presentar los microorganismos a un antibiótico, se reduce considerablemente cuando son expuestos a la combinación de antibióticos que sean sinérgicos (10, 27).

La resistencia del S. aureus a los antibióticos también es muy variada; en varios reportes se observó lo siguiente: Barajas (3) encontró que el 100% de las cepas de S. aureus aisladas de vacas con mastitis, fueron resistentes a sulfonamidas, penicilina y oxacilina, y algunas cepas presentaron resistencia a estreptomycinina y ampicilina. Madariaga y López (42) encontraron 47% de cepas de S. aureus resistentes a penicilina, 94%

resistentes a sulfas, 68% resistentes a estreptomycin. 27% a kanamicina, 26% a eritromicina, 23% a tetraciclina, 18% a cloranfenicol y 16% resistentes a neomicina; Pérez, M.J.A (50) encontró 72.22% de cepas de S. aureus resistentes a penicilina, 38.88% a tetraciclina y 6.66% resistentes a kanamicina. Klausstrup, O. (38) informó del porcentaje de resistencia a penicilina de cepas de S. aureus aisladas a partir de mastitis bovina, encontrado en diferentes países: En India 27.4%, en Polonia 14%, en Suiza 35%, en Dinamarca 3.1 a 4.5%, en Noruega 16.5%, en Holanda 63%, en Estados Unidos (New Jersey) 47%, y en Inglaterra 70%.

#### 1.5. SINERGISMO

El sinergismo se da cuando el efecto de dos fármacos aplicados conjuntamente es mayor a la suma algebraica de los efectos de los dos fármacos por separado. Dicho de otra manera, un antibiótico es activador potente de la acción del otro antibiótico, cuando se administran juntos. Dentro del sinergismo se dan los efectos de suma o adición y potencialización (10, 27, 62). Y existen tres formas en las que los fármacos pueden ejercer su efecto sinérgico: a) por bloqueo de etapas sucesivas en una secuencia metabólica, b) un medicamento inhibe una enzima que puede destruir al segundo medicamento y c) un medicamento promueve la entrada de un segundo medicamento a través de la pared celular microbiana (37). Un antibiótico se puede administrar junto con otro, con varios fines: para aumentar la acción quimioterapéutica, aumentar el espectro bacteriano,

disminuir la resistencia bacteriana y para disminuir los efectos bacterianos (62); sin embargo, la selección de la combinación apropiada requiere del conocimiento del potencial de interacción entre los agentes antimicrobianos (30). Las penicilinas pueden combinarse con aminoglucósidos y se puede obtener: a) una actividad aumentada (aditiva o sinérgica), b) disminuir la toxicidad, c) inhibición del desarrollo de resistencia al medicamento y d) conversión del medicamento de bacteriostático a bactericida (37).

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fué el de evaluar el efecto bactericida de combinaciones de antibióticos sobre cepas de *S. aureus* multirresistentes a antibióticos individuales.

### I.6. HIPOTESIS

Las combinaciones sinérgicas pueden ser efectivas en cepas de Staphylococcus aureus multirresistentes a antibióticos individuales.

Por lo menos una combinación a una concentración determinada podría ser eficaz contra las cepas multirresistentes de S. aureus.

### I.7. OBJETIVOS

Verificar si combinaciones de antibióticos son efectivas contra cepas de S. aureus, resistentes a antibióticos individuales

Desarrollar combinaciones de antibióticos efectivas contra cepas multirresistentes de S. aureus.

Determinar la combinación y concentración de mayor eficacia contra cepas multirresistentes de S. aureus.

## II. MATERIAL Y METODOS

Este trabajo se realizó en el laboratorio del Programa de Investigación sobre Ganado Lechero del CIFAP-MEX. de la SARH. Ubicado en el Km 33 de la carretera México-Texcoco.

### II.1. AISLAMIENTO DE Staphylococcus aureus.

Se obtuvieron cuatro cepas multirresistentes de S. aureus, a partir de muestras estériles de leche de cuartos de vacas con mastitis clínica sin tratamiento. Las muestras se mantuvieron a una temperatura de 4 a 5 ° C. hasta su procesamiento en el laboratorio. Se tomó aproximadamente 0.1 ml de leche, se sembró en Agar Sangre y se incubaron las cajas a 37 ° C durante 24 a 48 hrs. La morfología de las colonias hemolíticas se observó con la tinción de gram. A los cocos gram (+) se les realizó la prueba de catalasa y a los que dieron reacción positiva se les practicó las pruebas de manitol y coagulasa. Los que resultaron positivos a éstas últimas se identificaron como Staphylococcus aureus. (45).

### II.2. ELABORACION DE ANTIBIOGRAMAS

A las cepas de S. aureus se les practicaron antibiogramas siguiendo el método de Kirby Bauer (6, 29). Este consistió en usar cajas de petri conteniendo 15 ml. de agar Muller Hinton. Sobre la superficie del agar se aplicó un inóculo de bacterias, por medio de un hisopo estéril humedecido con una suspensión de bacterias estandarizada al tubo 0.5 de McFarland, (concentración aproximada de  $150 \times 10^6$  bacterias por mililitro) (41). Posteriormente se colocaron sensibilizadores comerciales para bacterias grampositivas y gramnegativas. Se incubaron a 37 ° C

durante 18 a 24 hrs., después de las cuales se realizó la medición de los halos de inhibición. La prueba de sensibilidad a neomicina se efectuó mediante la prueba de cilindro en placa (39), la cual consistió en colocar tres cilindros de acero inoxidable con una capacidad de 250 ul sobre la capa de agar Muller Hinton, previamente sembrada con el inóculo de bacterias, posteriormente los cilindros se llenaron con 250 ul de una solución de neomicina con una concentración de 30 mcg por cada 250 ul. Se incubaron a 37° C. durante 18 a 24 hrs., posteriormente se realizaron las lecturas de los halos de inhibición.

### II.3. ELABORACION Y EVALUACION DE LAS COMBINACIONES DE ANTIBIÓTICOS

Los diluentes, la potencia y constantes de secado y refrigeración para cada antibiótico fueron las siguientes: (23)

ANTIBIOTICO	POTENCIA	SOLVENTE: SOL. AMORTIGUADORA	TIEMPO DE REFRIGERACION EN DIAS	SECADO POR 3 Hrs
Penicilina G pot.	1590 UI/mg	pH 6	2	NO
Cefotaxima	924 mcg/mg	pH 8	7	NO
Ampicilina	855 mcg/mg	pH 8	7	NO
Estreptomicina	778 mcg/mg	pH 8	30	60° C
Kanamicina	708 mcg/mg	pH 8	30	NO
Gentamicina	591 mcg/mg	pH 8	30	110° C
Neomicina	626 mcg/mg	pH 8	14	60° C
Lincomicina	853 mcg/mg	pH 8	30	NO
Eritromicina	1035 mcg/mg	pH 8	14	60° C
Cloranfenicol	400 mcg/mg	pH 6	30	NO
Tetraciclina	550 mcg/mg	Sol. HCl 0.1 N	1	NO

Las cepas multiresistentes de S. aureus fueron expuestas a las combinaciones de antibióticos que se indican a continuación; para cada combinación se prepararon tres concentraciones de la

siguiente manera: se tomó como concentración media la concentración especificada para cada antibiótico en sensibilizadores comerciales (6,29). La concentración alta fué una y media veces la concentración media, y la concentración baja fué la mitad de la concentración media.

COMBINACION	CONCENTRACION EN ( $\mu\text{cg}$ ó UI)		
	BAJA	MEDIA	ALTA
Penicilina G pot : Estreptomicina	5 : 5	10 : 10	15 : 15
Penicilina G pot : Kanamicina	5 : 15	10 : 30	15 : 45
Penicilina G pot : Neomicina	5 : 15	10 : 30	15 : 45
Lincomicina : Neomicina	1 : 15	2 : 30	3 : 45
Ampicilina : Gentamicina	5 : 5	10 : 10	15 : 15
Eritromicina : Estreptomicina	7.5 : 5	15 : 10	22.5 : 15
Tetraciclina : Eritromicina	15 : 7.5	30 : 15	45 : 22.5
Tetraciclina : Neomicina	15 : 15	30 : 30	45 : 45
Tetraciclina : Cloranfenicol	15 : 15	30 : 30	45 : 45
Cefotaxima : Gentamicina	15 : 5	30 : 10	45 : 15

La evaluación de las combinaciones se efectuó por el método de cilindro en placa, con tres repeticiones para cada concentración de cada combinación y con cada una de las cuatro cepas desafiadas.

Las pruebas se corrieron en agar Muller Hinton y sobre la superficie del agar se aplicó un inóculo de las cepas expuestas, usando para cada caja un hisopo estéril humedecido con una suspensión de bacterias estandarizada al tubo 0.5 de McFarland. Con una pinza estéril se colocaron en cada caja 5 cilindros de acero inoxidable, con una capacidad de 250 ul. En tres de ellos se vertió 250 ul de una mezcla de antibióticos, de tal manera que quedara una concentración diferente por cilindro. En otro cilindro se puso como patrón negativo 250 ul de agua destilada

estéril y en el último cilindro se puso como patrón positivo 250 mcl de una solución de cloruro de benzalconio al 0.5%. Se incubaron las cajas a 37° C durante 18 a 24 hrs. Se realizaron las lecturas midiendo los halos de inhibición en mm, con un lector de zona.

Los resultados se analizaron con un diseño estadístico al azar con arreglo factorial (61).

$$Y_{ijkl} = \mu + \sum_i \epsilon_i + K_j + \gamma_k + \sum_{Kij} \epsilon_{Kij} + \sum_{Yik} \epsilon_{Yik} + \sum_{KYjk} \epsilon_{KYjk} + \sum_{EKYijk} \epsilon_{EKYijk} + \epsilon_{ijkl}$$

donde:

$Y_{ijkl}$  = Es la l-ésima repetición de la respuesta de i-ésima cepa, con la j-ésima concentración y la k-ésima combinación.

$\mu$  = Efecto de la media general.

$\sum_i \epsilon_i$  = Efecto de la cepa.

$K_j$  = Efecto de la concentración.

$\gamma_k$  = Efecto de la combinación.

$\sum_{Kij} \epsilon_{Kij}$  = Interacción entre cepas y concentraciones.

$\sum_{Yik} \epsilon_{Yik}$  = Interacción entre cepas y combinaciones.

$\sum_{KYjk} \epsilon_{KYjk}$  = Interacción entre concentraciones y combinaciones.

$\sum_{EKYijk} \epsilon_{EKYijk}$  = Interacción entre cepas, concentraciones y combinaciones.

$\epsilon_{ijkl}$  = Error experimental.

Se realizó la prueba de Tukey para determinar la mejor combinación y concentración (61).

$$DMSH = q_{\alpha} \cdot t \cdot g_{le} \sqrt{CME / r}$$

Donde:

DMSH = Diferencia mínima significativa honesta.

$q_{\alpha}$  = Valor de tablas.

- t = Tratamientos (combinaciones y concentraciones).
- gle = Grados de libertad del error.
- CME = Cuadrado de la media del error.
- r = Número de repeticiones.

## RESULTADOS

La sensibilidad de las cepas obtenidas en la prueba de Kirby Bauer se expresa en el cuadro 1.

Adicional a ésta prueba se realizó una prueba de sensibilidad por medio de la técnica de cilindro en placa (35), con los antibióticos utilizados en forma individual y con las tres concentraciones probadas, obteniéndose los siguientes resultados (cuadro 2).

Los resultados del análisis de varianza, nos indican que hay efectos estadísticamente significativos en lo siguiente: a) las combinaciones; b) las cepas; c) las concentraciones; d) interacción entre las combinaciones y las cepas; e) las combinaciones y las concentraciones; f) no se encontró interacción entre la cepas y las concentraciones, ni entre las combinaciones, cepas y concentraciones (cuadro 3).

En el cuadro 4 se muestra la interacción entre las combinaciones y las cepas por medio de la Prueba de la Diferencia Significativa más Honesta de Tukey. Datos utilizados: CME = 1.67267; GL = 240;  $S_x = 0.4311$ ; Observaciones utilizadas para calcular un promedio = 9 alfa = 0.5. Estos datos fueron tomados del Análisis de Varianza.

Durante las lecturas de las pruebas, se observó que los patrones negativo y positivo se comportaron en forma normal. En el positivo se encontró halo de inhibición y en el negativo solo hubo crecimiento alrededor del cilindro.

Se realizó una comparación de los cuadros 1, 2 y 4 obteniéndose los siguientes resultados:

La combinación Cefotaxima-Gentamicina fue efectiva contra 3 cepas, siendo sensibles con un promedio de 26, 24 y 23 mm de halo de inhibición respectivamente y una cepa con sensibilidad intermedia con 20 mm de halo de inhibición. Comparando esta combinación con el resultado de la prueba de sensibilidad usando solamente Cefotaxima se observa que para una cepa (promedio de 22 mm), pasó de sensibilidad intermedia con Cefotaxima sola, a ser sensible con la combinación. Para el caso de la Gentamicina sola, dos cepas se encontraron resistentes y dos susceptibles y con la combinación las 4 cepas fueron susceptibles.

La combinación Ampicilina-Gentamicina fue la que obtuvo el segundo lugar en halo de inhibición, pero esta combinación no rebasó los límites de resistencia establecidos para la Ampicilina en forma individual, aunque sí se observó un aumento en el halo de inhibición de 4 mm para una cepa, teniendo con Ampicilina sola un halo de 17 mm y 21 mm para la combinación. Para las otras tres cepas el incremento del halo fue mínimo. Para la Gentamicina sola se obtuvo un aumento hasta de 12 mm para una cepa, y un incremento menor en las otras tres, encontrándose un cambio de sensibilidad en 2 cepas las cuales fueron resistentes a la gentamicina sola y susceptibles a la combinación. Dos cepas fueron sensibles en ambos casos.

La combinación Penicilina-Estreptomicina, no alcanzó a rebasar el nivel de resistencia para la Penicilina, pero para la Estreptomicina se llegó a la susceptibilidad. Para el patrón de resistencia de Penicilina, las 4 cepas se mantuvieron resistentes

a pesar del incremento en el halo de inhibición, y para el patrón de Estreptomina, tres cepas pasaron de resistentes con Estreptomina sola a susceptibles con la combinación. Una cepa pasó de resistente a intermedia.

En la combinación Penicilina-Kanamicina, se obtuvieron 3 cepas que no rebasaron el límite de resistencia de ambos antibióticos y la otra cepa tuvo un incremento en el halo para Kanamicina, obteniéndose una sensibilidad intermedia para este antibiótico, y para Penicilina también fue resistente.

En la combinación Tetraciclina-Cloranfenicol, las 4 cepas se encontraban resistentes para Tetraciclina y Cloranfenicol, y con la combinación solo una cepa tuvo un cambio en la sensibilidad de resistente a intermedia para el patrón del Cloranfenicol.

En la combinación Tetraciclina-Eritromicina, aunque se obtuvo un ligero incremento en el halo de inhibición de la combinación con respecto al halo de los antibióticos en forma individual, no sobrepasó el límite de resistencia con ninguna cepa.

En la combinación Penicilina-Neomicina, también se encontró un ligero aumento del halo de inhibición de la combinación sobre el de los antibióticos en forma individual, pero no alcanzó a pasar el nivel de resistencia establecido para sensidiscos comerciales.

En las combinaciones Tetraciclina-Neomicina, Lincomicina-Neomicina y Eritromicina-Estreptomina, no se encontró

incremento de los halos de inhibición, sobre los obtenidos en la prueba con los antibióticos en forma individual.

En el cuadro 5 se muestran las mejores combinaciones y concentraciones ordenadas de forma decreciente según su efectividad. Esta clasificación se realizó con la prueba de la diferencia significativa más honesta de Tukey.  $CME = 1.672667$   
 $GLE = 240$   $Sx = 0.3733482$   $\alpha = 0.05$  No. de obs. usadas para sacar un promedio = 12

Se hizo una comparación de los cuadros 1,2 y 5 observándose lo siguiente:

En la combinación Cefotaxima-Gentamicina, las concentraciones alta y media resultaron efectivas dando un resultado de susceptible para las cuatro cepas. La concentración baja resultó intermedia para las cuatro cepas.

En la combinación Ampicilina-Gentamicina fue más efectiva la concentración alta, seguida de la media y la baja, encontrándose las tres resistentes para el patrón de Ampicilina y sensible para el patrón de Gentamicina.

En la combinación Penicilina-Estreptomicina la eficacia fue mejor de la concentración alta a la baja, obteniéndose en las tres concentraciones para las cuatro cepas, resistencia para Penicilina y susceptibilidad para Estreptomicina.

En la combinación Penicilina-Kanamicina la eficacia de las concentraciones fue mejor de la alta a la baja, encontrándose las 3 resistente para ambos antibióticos.

Para Tetraciclina-Cloranfenicol la concentración alta fue la

mejor en este caso el halo de inhibición para las cuatro cepas fue de un grado intermedio, mientras que la concentración media y baja fueron resistentes para las cuatro cepas.

Para la combinación Tetraciclina-Eritromicina, ninguna de las tres concentraciones sobrepasó el nivel de resistencia a pesar del incremento en el diametro del halo obtenido con la combinación.

Para la Penicilina-Neomicina, aunque hubo un ligero aumento del halo de inhibición sobre los obtenidos con los antibióticos en forma individual, ninguna de las concentraciones sobrepasó el nivel de resistencia.

Para las combinaciones Tetraciclina-Neomicina, Lincomicina-Neomicina y Eritromicina Estreptomina, no se encontró ningún cambio en el halo de inhibición, con ninguna de las concentraciones.

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

Evidentemente la resistencia de S. aureus a los antibióticos de uso común es un grave problema para el control de mastitis en el ganado lechero (3, 42, 50), en el presente trabajo podemos concluir que la resistencia de estos microorganismos se conservó para la mayoría de las combinaciones probadas.

La combinación Cefotaxima-Gentamicina, fue la más efectiva observándose un cambio en la sensibilidad de una cepa. Para las otras tres cepas el incremento fue mínimo, y no alcanzó a producir un cambio en la sensibilidad. Se encontró que esta combinación con la concentración alta y media fue efectiva contra todas las cepas, encontrándose un halo mayor para la combinación. Esto nos puede sugerir que el incremento observado se debe a la acción sinérgica o aditiva de esta combinación. En un estudio in vitro, Winstanley y Spencer (67) encontraron interacción en la combinación Cefotaxima-Desacetilcefotaxima; en el 34% de los aislamientos demostró sinérgismo, en el 10% sinérgismo parcial o adición, y el 24% antagonismo. Selwyn y Bakhtior (60), en otro estudio, encontraron que ésta misma combinación, fue efectiva en diferentes bacterias aisladas de casos clínicos en humanos y demostraron su estabilidad a las beta-lactamasas. Hamilton-Miller y col. (33), encontraron que el cefonacid (una cefalosporina de larga acción), en combinación con gentamicina tuvo un 94% de eficacia en diferentes cepas, debido a sinérgismo o adición; y Just y col. (36), encontraron que las cepas de

S. aureus se comportaron de diferente manera al ser expuestas a la combinación de cefotetan-gentamicina, obteniendo en el 30% de las cepas un efecto indiferente y en el 70% un efecto aditivo. Esta combinación demostró mejor efecto sobre bacterias gramnegativas, donde en el 40% de las cepas el efecto fue indiferente, en el 50% aditivo y en el 10% sinérgico.

La combinación Ampicilina-Gentamicina se ha usado en el tratamiento de endocarditis en humanos, obteniendo excelentes resultados (40).

En esta combinación se encontró un incremento de 4 mm en una cepa comparado con el halo obtenido con Ampicilina sola y para las otras tres el incremento fue menor. Si comparamos los resultados de la combinación con los obtenidos con Gentamicina sola, la diferencia llega a ser hasta de 12 mm. El efecto observado en esta combinación es medianamente efectivo, debiéndose posiblemente a un efecto sinérgico parcial o aditivo. Esto se observó aún con la concentración alta.

Si tomamos en cuenta que la Ampicilina es un antibiótico sensible a la penicilinas (27, 30, 62), y que el S. aureus es muy factible que sea productor de beta-lactamasa (32), la resistencia será más difícil de romper aún usando combinaciones sinérgicas. A este respecto se puede pensar en la necesidad de buscar otra posible solución como sería usar un inhibidor de la beta-lactamasa, como es el Sublactam.Chin y col.(16), demostraron el efecto sinérgico en la combinación de Sublactam y Ampicilina, contra cepas de Staphylococcus resistentes a Meticilina.

La combinación Penicilina-Estreptomicina es una combinación

muy usada y el efecto sinérgico es debido al diferente sitio de acción de los antibióticos. Primero actúa la penicilina rompiendo las barreras de permeabilidad bacteriana, dejando el paso libre al segundo antibiótico (27, 30, 37, 62). En los resultados del presente trabajo se observó este efecto, pero sin llegar a los resultados esperados, dado que el incremento de los halos de inhibición solo fueron satisfactorios comparándolos con el patrón de sensibilidad de Estreptomicina. En las tres concentraciones usadas se observaron resultados similares.

La combinación Penicilina-Kanamicina es una combinación que se sugiere como sinérgica con un efecto similar al de Penicilina-Estreptomicina (27, 30, 37, 62). En los resultados obtenidos el efecto sinérgico solo se observó para una cepa, comparando el halo obtenido con la combinación y el obtenido con Kanamicina sola. En los promedios obtenidos para todas las cepas, ni siquiera con la concentración alta se logró obtener un cambio en la sensibilidad. Esta falta de efecto posiblemente se deba a la alta resistencia de S. aureus a estos antibióticos en forma individual.

La Tetraciclina-Cloranfenicol es una combinación compatible de dos antibióticos bacteriostáticos de amplio espectro y es recomendada para ampliar el espectro bacteriano (27, 30, 37, 62). Los resultados obtenidos fueron medianamente efectivos para todas las cepas con la concentración alta, encontrándose intermedias para el patrón de sensibilidad de ambos antibióticos.

La combinación Tetraciclina-Eritromicina puede emplearse para ampliar el espectro (27, 30, 37, 62). El efecto de esta

combinación sobre las cepas expuestas no fue satisfactorio. El aumento obtenido no fue suficiente para que las cepas fueran susceptibles; esto se observó con las tres concentraciones. Estos resultados sugieren que el efecto sinérgico es parcial entre estos antibióticos o que se comportan en forma indiferente, como lo demuestran Traub y col. (63); quienes utilizaron cepas de S. aureus resistente a Gentamicina y Meticilina, y en sus pruebas también resultaron resistentes a Ampicilina, Cefotaxima, Cloranfenicol, Eritromicina, Gentamicina, Penicilina G, Tetracilina, Meticilina, Piperacilina y Tobramicina. Estas cepas también fueron expuestas a la combinación de Rifampicina-Eritromicina, Rifampicina-Cefotaxima y Acido Fusidico-Eritromicina, observando un efecto indiferente entre los antibióticos solos y las combinaciones.

Para la combinación Penicilina-Neomicina, se esperaba un efecto similar al de Penicilina-Estreptomina, (27, 30, 37, 62). Esta combinación produjo un aumento tan ligero en el halo de inhibición que no hubo ningún cambio en la sensibilidad de las cepas; esto se observó con las tres concentraciones.

Si bien es conocido que estos dos antibióticos pueden ejercer un efecto sinérgico, los resultados obtenidos nos llevan a pensar que las cepas mantienen la resistencia comportándose como si fueran expuestas a los antibióticos en forma individual.

En las combinaciones Tetraciclina-Neomicina, Lincomicina-Neomicina y Eritromicina-Estreptomina, los resultados obtenidos fueron nulos. Dado que las bacterias son resistentes a cada uno de estos antibióticos aplicados separadamente, es posible que al

utilizar la combinación hayan actuado individualmente de forma que las cepas mantuvieron su resistencia. Se puede pensar que este efecto indiferente de los antibióticos es similar al reportado por Traub y col. (63).

Podemos observar que diferentes cepas de la misma especie (en este caso *S. aureus*) manifiestan diferentes grados de sensibilidad ante una misma combinación. Además la resistencia bacteriana llega a ser tan fuerte, que ni las combinaciones sinérgicas a diferentes concentraciones logran romperla, por lo cual es necesario hacer énfasis en la lucha contra el uso inadecuado de antibióticos, y, para los casos severos de resistencia, buscar nuevas drogas o combinaciones poco usadas a las que sean susceptibles las cepas bacterianas resistentes.

En este trabajo observamos que la combinación más eficaz contiene un antibiótico que no ha sido usado en el tratamiento de mastitis bovina, lo cual nos sugiere que este antibiótico (Cefotaxima), puede ser un potencial terapéutico para los casos de mastitis donde haya severa resistencia.

Esperamos que este sea el inicio de una investigación más profunda y que esta alternativa de llevar nuevos productos a la terapéutica de la mastitis bovina sea para mejorar la producción láctea.

## LITERATURA CITADA

1. Alcántara, P.T.: Principales agentes etiológicos que causan la mastitis en la comarca Lagunera y su sensibilidad a los antibióticos. Tesis de Licenciatura, FMVZ-UNAM, México, 1970.
2. Avila, T.S.: Producción intensiva de ganado lechero. C.E.C.S.A. México, D.F. 1984.
3. Barajas, R.J.A.: Diagnóstico bacteriológico y sensibilidad a quimioterapéuticos de casos de mastitis bovina en el CNEEIZ de la FMVZ de la UNAM. Memorias del primer curso de actualización sobre mastitis bovina. México, D.F. 1978. 41-57 FMVZ-UNAM, México, (1978).
4. Barlandas, R.N.R. y Figueroa, R. M. E.: Aislamiento e identificación de los agentes etiológicos de mastitis subclínica y determinación de su sensibilidad a los antibióticos in vitro, en la región de Tierra Caliente, Gro. Memorias del X Congreso Nacional de Buiatría. Acapulco, Gro. 1984. 314 - 319 Asoc. Méx. de Med. Vet. Esp. en Bov. y Pq. Ruminantes. A.C. México, (1984).
5. Barreda, Q.R. de la.: Encuesta sobre la incidencia de mastitis y ensayo de tratamiento en vacas del municipio de Atlixco, Puebla Sn. Francisco Javier Mina (Chipilo) y Ejido Sn. Agustín, Edo. de Pue. Tesis de Licenciatura, FMVZ-UNAM. México. 1971.
6. Barry, A. y Thornsberry, C.: Pruebas de susceptibilidad: Procedimientos para pruebas de difusión. Manual de Microbiología Clínica, 3a. ed. Médica Panamericana, México. 1982.
7. Bath, D.L., Dickinson, F.N. y Roley, R.C.: Ganado Lechero: Principios prácticos, problemas y beneficios. 2a. ed. Intramericana. México. 1982.

8. Blood, C.D. y Henderson, A.J.: Medicina Veterinaria. 6a. ed. Interamericana, México, D.F. 1986.
9. Bruhl, H.G.: Bovine mastitis caused by Nocardia asteroides. Aust. Vet. J., 39 305 (1963).
10. Bryant, M.C.: Antibióticos y su control mediante el laboratorio. El Manual Moderno. México, D.F. 1976.
11. Burgos, F.D.A.: Estudio bacteriológico de leche procedente de cuartos no mamíferos de bovinos de 7 establos del Municipio de Ciudad Victoria, Tamaulipas. Memorias del XII Congreso Nacional de Buiatría. Tampico, Tamps. 1986. . Asoc. Mex. de Med. Vet. Exp. en Eqv. y Pq. Ruminantes, A.C. México. (1986).
12. Cabello, F.E.: Las causas de la mastitis y cuánto cuesta su control. Boviverna, 12 : 6-9. México. (1975).
13. Campos, R.V.M.: Incidencia de infecciones de la glándula mamaria en ganado lechero durante el periodo seco. Tesis de Licenciatura. FMVZ-UNAM, México, D.F. 1981.
14. Cantor, A. and Palochak, M.: The in vitro sensitivity of antibiotic resistant bacterial to intramamary antibiotic preparation. Vet. Small Animal Clinician, 70 : 800 - 808 (1975).
15. Cervantes, C.R.A.: Principales agentes micóticos aislados en México como posibles causantes de mastitis. Memorias del primer curso de Actualización Sobre Mastitis Bovina. México, D.F. 1978. 98 - 105. FMVZ-UNAM. México. (1978).
16. Chin, N.X., Neu, N.M. and Neu, H.C.: Synergy of sublactam and ampicillin against methicillin-resistant Staphylococci. Drug. Exp. Clin. Res., 12 (12) : 939 - 942. (1986).
17. Cortéz, J.F.: Prevalencia de mastitis subclínica bovina e

- identificación de microorganismos presentes en la leche positiva, en la región de Puente de Ixtla, Mor. Tesis de Licenciatura. FMVZ-UNAM, México. 1988.
18. Dobbins, Ch. N.: Mastitis losses. J. Am. Vet. Med. Ass., 179: 1128 - 1132 (1977).
19. Eberhart, R.J. and Buckalew, J.M.: Evaluation of a hygiene and dry period therapy, program for mastitis control. J. Dairy Sci., 55 (12): 1683 - 1691. (1972).
20. El-Magandi, K., Tereloiu, I. y Tariakov, I.: Consideración a cerca de la mastitis bovina, pruebas de sensibilidad y tratamiento, en la Republica Arabe de Libia. X Congreso Mundial de Buiatría. Resumen. México. 1978. 540 Asoc. Mex. de Med. Vet. Esp. en Bov. y Req. Ruminantes, México. (1978).
21. Ensminger, M.E.: Dairy cattle science. 2a. ed. Interstate Printers and Publishers, Danville, Ill. USA. 1980.
22. Faribank, W.C., Einde, R.N. and Smith, F.F.: Milking machine systems, milking management and its relationship to milk quality. Pub. Axt-94. Revised University of California Agricultural Extension Service, Bekely Cal. USA. 1967.
23. Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos. Dirección General de Control de Alimentos, Bebidas y Medicamentos. 4a. ed. Secretaría de Salubridad y Asistencia, México, 1974.
24. Frank, N.A. and Pouden, W.D.: Prevalence of bovine mastitis, during various stages of lactation. Jour. Am. Vet. Med. Assoc., 138 (1) : 179 - 184. (1961).
25. Frappe, M.R.C.: Manual de infectología veterinaria,

- enfermedades bacterianas y micóticas. 3a. ed. Francisco Méndez Oteo. México, D.F. 1986.
26. Fuente de la, E.G.H. y Villalobos, M.A.: Establecimiento de un programa de control de mastitis en Tulancingo Hidalgo. Memorias del primer curso de actualización sobre mastitis bovina. México, D.F. 1978. 188-223. FMVZ-UNAM. México, (1978).
27. Fuentes, H.V.: Farmacología y terapéutica veterinaria. Interamericana. México, D.F. 1987.
28. Gibbs, E.P.J., Jhonson, R.H. and Osborne, A.D.: Field observation on the epidemiology of bovine herpes mamitis. Vet. Rec., 91. (17) : 395 - 401. (1972).
29. Giono, C.S.: Prueba de Kirby-Bauer para sensibilidad a los antimicrobianos. Infectología III (7) : 325 (1983).
30. Goodman, G.A., Louis, S.G. y Alfred, G.: Las bases farmacológicas de la terapéutica. 6a. ed. Panamericana. México, D.F. 1982.
31. Guzmán, A.A., Alvarez, M.A., Baqueiro, M.M., Urrutia, R.M. y Reinoso, O.: Cuantificación de células somáticas en leche y principales gérmenes presentes en la misma en un hato lechero en el trópico. Reunion de Investigación Pecuaria en México. Memorias México. 1983. 449-453. P.A.D.E.P. México, D.F. (1983).
32. Hagan, W.A. y Bruner, D.W.: Enfermedades infecciosas de los animales domesticos. 4a. ed. Prensa Médica. México, 1983.
33. Hamilton-Miller, J.M.T., Patel, R. and Brumfitt, W.: Cefonicid a long actin cephalosporin in vitro activity compared with three cephalosporin and gentamicin. Drug. Exp. Clin. Res., 12 (11) : 861 - 869. (1986).

34. Jaartsveld, F.H.J.: Mastitis control program in the Netherlands. Memorias del primer curso de actualización sobre mastitis bovina. México, D.F. 1978. 154-176. FMVZ-UNAM. México, (1978).
35. Janzen, J.J.: Economic losses resulting from mastitis. Jour. Dairy Sci., 53 (9) : 1151 - 1161 (1970).
36. Just, H.M., Becker, M. and Daschner, F. D.: In vitro combination effects of cefotetan with four aminoglycosides, piperacillin and mezlocillin on gram-positive and gram-negative nosocomial bacteria. Chemotherapy., 30 : 387 - 391. (1984).
37. Katzung, B.G.: Farmacología básica y clínica. 2a. ed. Manual Moderno. México, D.F. 1986.
38. Kjastrup, O.: Therapy - Subclinical Mastitis. Pros and cons of treatment during lactation. International Mastitis Symposium Macdonald College Ste. Anne de Bellevue. Quebec, Canada. 1987.
39. Kramer, J., Carter, G.G., Arret, B., Wilner, J., Wright, W.W. and Kirshbaum, A.: Antibiotic residues in milk, dairy products, and animal tissues: Methods, reports, and protocols. Part I. Assay methods for antibiotics in milk, dairy products, and animal tissues. National Center for Antibiotics and Insulin Analysis Food and Drug Administration Department of health, Education, and Welfare. Washintong, D.C. USA. 1968.
40. Kronzman, C.O., Brodsky, S.M., MacKenzie, J. and Hauser, A.: Endocarditis after lithotripsy. Ann. Intern. Med., 106 : 777. (1987).
41. McFarland, J.: The Nefelometer: An instrument for stimating the number of bacterian in suspension, use for calculating the

opsonic index and vacciones. Jour. Am. Med. Assoc., 49 : 1176 (1957).

42. Madariaga, A.O.E. y López, A.J.: Bacterias asociadas con la mastitis bovina en los establos lecheros que abastecen a México, D.F. y su susceptibilidad a agentes quimioterapéuticos. Memorias del primer curso de actualización sobre mastitis bovina. México, D.F. 1978. 70-87. FMVZ-UNAM. México, (1981).

43. Martínez, P.L.: Prevalencia de mastitis subclínica en ganado Holstein Freisan y su relación con la eficiencia al ordeño y prácticas realizadas durante éste. Tesis de Licenciatura. FMVZ-UNAM. México, 1986.

44. Moreyra, B.H., Martínez, A.P.P. y Villamar, S.V.M.: Mastitis bovina por Nocardia asteroides. X Congreso Mundial de Buiatría. Resumen. México. 1978. 560-567. Asoc. Méx. de Med. Vet. Esp. en Bov y Pq. Rumiantes. México, (1978).

45. Murillo, S.E., Pérez, D.M. y Campos, R.V.: Manual sobre la glándula mamaria vol. 6 Análisis de la leche. Fasc. 2 Identificación de patógenos de la glándula mamaria. Técnica y Productos Agropecuarios Texcoco. México, 1983.

46. Neruda, S., Sharma, V.K. and Rajandi, H.B.: Incidences economy and test efficacy of subclinical mastitis in dairy animal. Indian Vet. Jour., 59 : 692-696. (1982).

47. Ochoa, U.G., Pérez, G.R., Juárez, C.R. y Cazáres, A.: Substancias bactericidas a partir de extractos de algas. Reunion de Investigación Pecuaria en México. Memorias. México. 1982. 150-151. P.A.D.E.P. México, D.F. (1982).

48. Pérez, D.C.: Evaluación de la oxitetraciclina lentamente

soluble administrada por vía subcutánea para el tratamiento de mastitis subclínica. Tesis de Licenciatura. FMVZ-UNAM. México, 1982.

49. Pérez, D.M., Castillo, R.F., Campos, R.V. y Murillo, S.D.: Manual sobre la glándula mamaria. vol. 6 Análisis de la leche. Fasc. 1: Métodos fisicoquímicos para el diagnóstico de mastitis subclínica. Técnica y Productos Agropecuarios. Texcoco, México, D.F. 1983.

50. Pérez, M.J.A.: Principales gérmenes aislados en México como causantes de mastitis. Memorias del primer curso de actualización sobre mastitis bovina. México, D.F. 1978. 88-96. FMVZ-UNAM, México, (1978).

51. Rivera, L.E. y Pérez, F.L.F.: Diferentes pérdidas económicas por mastitis en un estable lechero. X Congreso Mundial de Buiatría. Memorias. México, 1978. 582-584 Asoc. Mex. de Med. Vet. Esp. en Bov. y Peq. Ruminantes. México, D.F. (1978).

52. Rivera, S.A.: Incidencia de mastitis subclínica en explotaciones del D.F. Tesis de Licenciatura. FMVZ-UNAM, México, 1974.

53. Rojano, F.U.: Evaluación de un año sobre la resistencia a antibióticos de microorganismos patógenos causantes de mastitis, aislados de hatos lecheros. Tesis de Licenciatura. Fac. de Ciencias - UNAM. México, D.F. 1988.

54. Ruelas, R.V.M.: Incidencia de mastitis en ganado lechero en la Región Lagunera de Durango y aislamiento e identificación de gérmenes causantes. Tesis de Licenciatura. FMVZ-UNAM. México, 1971.

55. Ruiz, R.C.: Eficiencia de mano de obra e incidencia de mastitis en diferentes sistemas de ordeño. Tesis de licenciatura. FMVZ-UNAM, México, 1969.
56. Ruiz, S.H.: Pruebas utilizadas en el diagnóstico de mastitis subclínica. Mastitis bovina. FMVZ-UNAM, México, 1982.
57. Sánchez, R.: Incidencia y etiología de la mastitis en la cuenca lechera de Cuautla, Mor. Tesis de Licenciatura. FMVZ-UNAM, México, 1973.
58. Saracco, L.G.: Estudio epizootológico de la mastitis bovina en la cuenca del Valle de Tulancingo, Hgo. Tesis de Licenciatura. FMVZ-UNAM, México, 1984.
59. Schalm, C.W. and James, H.T.: Bovine mastitis. Lee and Febringer, Philadelphia, USA. 1971.
60. Belwyn, S. and Bakhtior, M.: Comparative in vitro studies of cefotaxime and desacetylcefotaxime. Drug. Exp. Cli. Res., 12 (12) : 953 - 965. (1986).
61. Steel, G.D.R. and Torry, H.J.: Principles and procedures of statistics a biometrical approach. 2a. ed. Mc. Graw Hill. Nogakusha. Ltd. Tokio, Japan, 1988.
62. Sumano, L.H. y Ocampo, C.L.: Farmacología veterinaria. Mc. Graw Hill, México, 1988.
63. Traub, W.H., Spohr, M. and Bauer, D.: Gentamicin and methicillin-resistant, clinical isolated of Staphylococcus aureus : Comparative in vitro and in vivo efficacy of alternative antimicrobial drugs. Chemotherapy., 30 : 102 - 112. (1984).
64. Trejo, J.R.: Consideraciones económicas de los efectos de la matitis sobre la producción de leche. Memorias del primer curso

de actualización sobre mastitis bovina. México, D.F. 1978. 27-40.

FMVZ-UNAM. México, (1978).

65. Valdéz, O.O. y de la Fuente, G.H.: Políticas oficiales para el control de mastitis bovina en la Republica Mexicana. Memorias del primer curso de actualización sobre mastitis bovina. México, D.F. 1978. 1-12. FMVZ-UNAM. México, (1978).

66. Weith, V.: Aspecto etiológico para mastitis leudauriforme. X Congreso Mundial de Buiatría. Resúmen. México, 1978. 559. Asoc. Méx. de Med. Vet. Exp. en Bov. y Poo. Ruminantes. México, (1978).

67. Winstanley, T.G. and Spencer, R.C.: In vitro study of the interaction between cefotaxime and desacetylcefotaxime. Drug. Exp. Clin. Res. 12 (12) : 967 - 971. (1986).

CUADRO 1. PARAMETROS DE SENSIBILIDAD PARA SENSIDISCOS COMERCIALES (6,29). Y RESULTADOS DE LA LECTURA, DE LAS 4 CEPAS DE Staphylococcus aureus.

ANTIBIOTICO	CONCENT.	RESIST	INTERM	SENS	RESULTADOS			
		< (mm) =	(mm)	> (mm) =	CEPA			
					A	B	C	D
Penicilina G	10 UI	28	-	29	R	R	R	R
Ampicilina	10 mcg	28	-	29	R	R	R	R
Cefotaxima	30 mcg	14	15 - 22	23	I	S	S	I
Estreptomocina	10 mcg	11	12 - 14	15	R	R	R	R
Kanamicina	30 mcg	13	14 - 17	18	R	R	R	R
Gentamicina	10 mcg	12	13 - 14	15	R	R	S	R
Neomicina	30 mcg	12	13 - 16	17	R	R	R	R
Lincomicina	2 mcg	14	15 - 16	17	R	R	R	R
Eritromicina	15 mcg	13	14 - 17	18	R	R	R	R
Tetraciclina	30 mcg	14	15 - 18	19	R	R	R	R
Cloranfenicol	30 mcg	12	13 - 17	18	S	I	S	S

R= Resistente I= Intermedio S= Susceptible

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

CUADRO 2. SENSIBILIDAD DE LAS CEPAS DE *S. aureus* POR EL METODO DE CILINDRO EN PLACA.

ANTIBIOTICO	CONCENT	INHIBICION EN (mm)				INTERPRETACION			
		A	B	C	D	A	B	C	D
Penicilina G	5 UI	8.0	10.0	8.0	13.0				
	10 UI	8.0	10.6	8.0	13.5	R	R	R	R
	15 UI	9.0	11.6	9.0	16.0				
Ampicilina	5 mcg	13.8	17.0	16.0	20.0				
	10 mcg	16.6	18.0	16.4	19.4	R	R	R	R
	15 mcg	16.8	18.6	17.6	21.4				
Cefotaxima	15 mcg	28.0	22.0	21.5	19.0				
	30 mcg	22.0	23.0	23.8	19.0	I	S	S	I
	45 mcg	24.0	24.2	23.9	20.0				
Estreptomocina	5 mcg	8.0	8.0	8.0	8.0				
	10 mcg	8.0	8.0	8.0	8.0	R	R	R	R
	15 mcg	8.0	8.0	8.0	8.0				
Kanamicina	15 mcg	8.0	8.0	8.0	8.0				
	30 mcg	8.0	8.0	8.0	8.0	R	R	R	R
	45 mcg	8.0	8.0	8.0	8.0				
Gentamicina	5 mcg	15.0	8.0	16.0	8.0				
	10 mcg	16.0	8.0	16.0	8.0	S	R	S	R
	15 mcg	17.4	8.0	17.0	8.0				
Neomicina	15 mcg	8.0	8.0	8.0	8.0				
	30 mcg	8.0	8.0	8.0	8.0	R	R	R	R
	45 mcg	8.0	8.0	8.0	8.0				
Lincomicina	1 mcg	8.0	8.0	8.0	8.0				
	2 mcg	8.0	8.0	8.0	8.0	R	R	R	R
	3 mcg	8.0	8.0	8.0	8.0				
Eritromicina	7.5 mcg	8.0	8.0	8.0	8.0				
	15.0 mcg	8.0	8.0	8.0	8.0	R	R	R	R
	22.5 mcg	8.0	8.0	8.0	8.0				
Tetraciclina	15 mcg	8.0	8.0	8.0	8.0				
	30 mcg	8.0	8.0	8.0	8.0	R	R	R	R
	45 mcg	8.0	8.0	10.0	11.0				
Cloranfenicol	15 mcg	8.0	8.0	9.4	13.0				
	30 mcg	10.0	8.0	10.0	14.0	R	R	R	I
	45 mcg	11.0	8.0	11.0	14.8				

R= Resistente I=Intermedio S= Susceptible

CUADRO 3. RESULTADOS DEL ANALISIS DE VARIANZA:

	G.L	S.C	C.M	F.C	Pr>F †
Modelo	119	8909.8012222	74.8722792	44.76	0.0001
Error	119	401.44	1.672667		
total	240	9311.2412222			
Comb	9	7680.979	854.331	510.76	0.0001
Cepa	3	65.173	21.724333	12.99	0.0001
Conc	2	232.708722	116.354361	69.56	0.0001
Comb - Cepa	27	726.911444	26.925387	16.10	0.0001
Comb - Conc	18	95.685167	52.82509	3.16	0.0001
Cepa - Conc	6	19.718167	2.619694	1.57	0.1577
Comb-Cepa-Conc	54	85.205722	1.577084	0.94	0.5896

† Si  $Pr > F \leq \alpha = 0.0001$  existe efecto o interacción.

CUADRO 4. DIAMETROS DE INHIBICION PRODUCIDOS POR LOS ANTIBIOTICOS COMBINADOS, SOBRE LAS DIFERENTES CEPAS.\*

COMBINACION	DIAMETRO DE INHIBICION EN (mm)	CEPA	DIFERENCIA ** SIGNIFICATIVA
Cefotaxima : Gentamicina	25.94	C	A
Cefotaxima : Gentamicina	23.83	B	AB
Cefotaxima : Gentamicina	23.16	A	B
Ampicilina : Gentamicina	20.64	C	C
Cefotaxima : Gentamicina	20.23	D	CD
Ampicilina : Gentamicina	19.86	D	CD
Ampicilina : Gentamicina	19.02	B	DE
Penicilina : Estreptomycin	17.81	B	DE
Ampicilina : Gentamicina	16.86	A	EF
Penicilina : Kanamicina	15.96	D	EG
Penicilina : Estreptomycin	15.73	A	EGH
Penicilina : Estreptomycin	14.58	D	EGHI
Tetraciclina : Cloranfenicol	13.62	D	GHI
Penicilina : Estreptomycin	13.32	C	HID
Tetraciclina : Cloranfenicol	13.08	A	IJL
Penicilina : Kanamicina	12.99	A	IJL
Penicilina : Neomicina	12.80	A	IJKL
Tetraciclina : Eritromicina	12.46	A	IJKL
Eritromicina : Estreptomycin	12.33	D	IJKLM
Tetraciclina : Cloranfenicol	11.70	C	JKLM
Penicilina : Neomicina	11.41	C	JKLMN
Penicilina : Kanamicina	11.32	C	JKLMN
Tetraciclina : Eritromicina	11.31	C	JKLMN
Penicilina : Neomicina	11.30	D	JKLMN
Tetraciclina : Eritromicina	11.27	D	JKLMN
Penicilina : Kanamicina	11.03	B	JKLMN
Tetraciclina : Eritromicina	10.73	B	JKLMN
Penicilina : Neomicina	10.43	B	MNOP
Tetraciclina : Neomicina	9.09	D	NOP
Tetraciclina : Neomicina	8.51	C	OP
Tetraciclina : Cloranfenicol	8.33	B	OP
Eritromicina : Estreptomycin	8.00	A	P
Eritromicina : Estreptomycin	8.00	C	P
Lincomicina : Neomicina	8.00	B	P
Lincomicina : Neomicina	8.00	C	P
Lincomicina : Neomicina	8.00	D	P
Eritromicina : Estreptomycin	8.00	B	P
Lincomicina : Neomicina	8.00	A	P
Tetraciclina : Neomicina	8.00	A	P
Tetraciclina : Neomicina	8.00	B	P

\* Promedio de las tres concentraciones estudiadas. con tres repeticiones para cada cepa.

\*\* Para las combinaciones que compartan la misma letra, no existe diferencia significativa, estadisticamente son iguales.

CUADRO 5. DIAMETROS DE INHIBICION PRODUCIDOS POR LOS ANTIBIOTICOS COMBINADOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES. \*

COMBINACION Y CONCENTRACION (mcg o UI)	DIAMETRO DE INHIBICION EN (mm)	DIFERENCIA ** SIGNIFICATIVA
Cefotaxima 45 : Gentamicina 15	25.08	A
Cefotaxima 30 : Gentamicina 10	23.06	AB
Cefotaxima 15 : Gentamicina 5	21.73	B
Ampicilina 15 : Gentamicina 15	19.52	C
Ampicilina 10 : Gentamicina 10	19.32	C
Ampicilina 5 : Gentamicina 5	17.69	CD
Penicilina 15 : Estreptomocina 15	16.58	DE
Penicilina 10 : Estreptomocina 10	15.33	EF
Penicilina 5 : Estreptomocina 5	14.17	FG
Tetraciclina 45 : Cloranfenicol 45	13.83	FGH
Penicilina 15 : Kanamicina 45	13.65	FGHI
Penicilina 10 : Kanamicina 30	12.89	GHIJ
Tetraciclina 45 : Eritromicina 22.5	12.67	GHIJ
Penicilina 15 : Neomicina 45	12.66	GHIJ
Penicilina 5 : Kanamicina 15	11.93	HIJK
tetraciclina 30 : Eritromicina 15	11.72	IJKL
Tetraciclina 30 : Cloranfenicol 30	11.42	JKL
Penicilina 10 : Neomicina 30	11.34	JKLM
Penicilina 5 : Neomicina 15	10.46	KLMN
Tetraciclina 15 : Eritromicina 7.5	9.97	KLMNO
Tetraciclina 15 : Cloranfenicol 15	9.79	LMNO
Eritromicina 22.5 : Estreptomocina 15	9.29	MNO
Tetraciclina 45 : Neomicina 45	9.08	NO
Eritromicina 15 : Estreptomocina 10	9.04	NO
Eritromicina 7.5 : Estreptomocina 5	8.92	NO
Tetraciclina 30 : Neomicina 30	8.13	0
Tetraciclina 15 : Neomicina 15	8.00	0
Lincomicina 3 : Neomicina 45	8.00	0
Lincomicina 2 : Neomicina 30	8.00	0
Lincomicina 1 : Neomicina 15	8.00	0

\* Promedio de las cuatro copas, con tres repeticiones cada una

\*\* Para las combinaciones que comparten la misma letra, no existe diferencia significativa, estadísticamente son iguales.