



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE CEPAS DE
Mycoplasma spp. AISLADAS DE BOVINOS CON PROBLEMAS
RESPIRATORIOS Y MASTITIS

TESIS

Que para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

GERARDO TONATIHU LÓPEZ PELÁEZ

ASESORAS:

DRA. ROSA ELENA MIRANDA MORALES

M en C. VERÓNICA ROJAS TREJO

Ciudad Universitaria, CD. MX., 2017



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.

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a toda mi familia, gracias por su apoyo incondicional.

Mis padres **Silvia** y **Gerardo**, que desde pequeño me han ayudado en todo momento desde niño, para poder llegar a ser la persona que soy el día de hoy, por siempre darme esas palabras de aliento para no rendirme y ayudarme a encontrar la solución para todo problema, la verdad jamás poder pagarles por todo su amor.

A mis hermanos **Sergio**, **Lorena** y **Diego**, por apoyarme siempre que lo he necesitado, sus palabras de aliento y consejos que día a día me sirvieron para el trabajo y la vida diaria, recordando especialmente aquellos momentos en los que vivíamos juntos y cuidaron de mí.

A mis sobrinos **Fernanda**, **Jaen**, **Mónica**, **Luís** y **Ángel**, siempre me han brindado su cariño, el cuidarlos ha sido una gran dicha y experiencia, siempre contarán con mi apoyo y espero estén orgullosos de su tío Tona.

A mis tíos **Salvador**, **Abraham** y a mí prima **Denis**, que se adelantaron de este mundo, pero sé que siempre estarán cuidándome desde dónde estén, espero estén orgullosos de este logro.

Muchas gracias a **Tessy**, **Marifer** y **Yolanda**, por cuidarme, alimentarme, preocuparse de mí día a día, pero especialmente por todo el cariño y amor que me han brindado desde que llegaron, haciéndome sentir como parte de la familia.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Rosa Elena Miranda Morales, por haberme confiado este proyecto, por sus horas de ayuda y comprensión antes los problemas que surgieron y especialmente por ser una gran guía para mí en cuanto a lo académico así como en el aspecto personal.

A la Dra. Verónica Rojas Trejo, que siempre estuvo pendiente de mis dudas y trabajo experimental, ayudándome desde mi primer día en el laboratorio, por la paciencia y sobre todo la confianza,

A los miembros de mi comité tutor:

Dr. Luís Ocampo Camberos

Dr. Francisco Suárez Güemes

Dr. Miguel Ángel Blanco Ochoa

Dr. Jaime Campuzano Granados

Por sus consejos que ayudaron a mejorar este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio Marlenne, Maricela, Enrique, Monse, Joss, Jaramar y Gaby, que estuvieron dispuestos a ayudarme y pasar un momento agradable en todo momento.

A mis amigos y amigas José Mora, José Luis Rangel, Karen Hernández, Mariela Juárez, Ángel Moyado y todas las demás personas que me acompañaron durante toda la carrera, estudiando, conviviendo, platicando, hasta viviendo por algunos días, saben lo importante que han sido para terminar con esta parte de mi vida.

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
Antecedentes	3
Taxonomía y Requerimientos Nutricionales	4
Pérdidas económicas.....	5
Quimioterapéuticos	6
Concentración Mínima Inhibitoria (MIC).....	7
JUSTIFICACIÓN	9
OBJETIVO GENERAL.....	10
Objetivos Particulares	10
HIPÓTESIS	11
MATERIAL Y MÉTODOS.....	12
Elaboración del Medio Hayflick	12
Cepas de <i>Mycoplasma</i>	12
Preparación del material biológico.	13
Preparación de los Quimioterapéuticos.....	13
Inhibición de Metabolismo para determinar las Unidades Cambio de Color (UCC).	14
Prueba de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC).....	16
Determinación de la MIC 50 Y MIC 90	17
Efecto micoplasmicida	17
RESULTADOS.....	18
Inhibición del metabolismo para determinar las unidades Cambio de Color	18
Concentración Mínima Inhibitoria	23
Determinación del MIC 50 y MIC 90.....	27
Efecto Micoplasmicida	30
DISCUSIÓN	32
CONCLUSIONES.....	37
BIBLIOGRAFÍA.....	39

RESUMEN

LÓPEZ PELÁEZ GERARDO TONATIHU. Susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* de cepas de *mycoplasma spp.* aisladas de bovinos con problemas respiratorios y mastitis (bajo la dirección de la Dra. Rosa Elena Miranda Morales y la M. en C. Verónica Rojas Trejo).

Debido a las características morfológicas y metabólicas de los micoplasmas, aunado a la falta de estudios que comprueben el efecto o la capacidad de los diferentes quimioterapéuticos hacia estos microorganismos, es importante realizar la técnica de Concentración Mínima Inhibitoria en cepas de *Mycoplasma bovirhinis*, *dispar* y *bovis*, con el objetivo de conocer la cantidad de antimicrobiano capaz de inhibir a estas cepas de manera *In vitro*. Se utilizó el método de microdilución en caldo de Tanner y Wu, modificado por Hannan en el 2000, con los resultados obtenidos pudimos determinar los valores de MIC90 y MIC50 (definido como la dilución capaz de inhibir al 90% y 50% de las cepas) de los antimicrobianos usados (Enrofloxacin, Eritromicina, Florfenicol, Oxitetracilina, Tilosina y Tilmicosina). Después de analizar los datos, tenemos que enrofloxacin fue el antimicrobiano que inhibió a las cepas de micoplasma con una concentración menor de MIC90 (<0.25 µg/mL).

INTRODUCCIÓN

Los problemas más frecuentes que se presentan en el ganado bovino productores de leche son la mastitis y el complejo respiratorio bovino (CRB). Existen diferentes estudios (1,2 ,3 ,4) donde se demuestra que es posible aislar diferentes especies de micoplasmas que están asociados a las diferentes etiologías en los bovinos. La micoplasmosis predispone a que otros microorganismos bacterianos y virales se asocien, esto provoca serias complicaciones que ocasionan altos costos por las bajas en la producción a la industria láctea y de ganado de carne.

En la mastitis bovina, de acuerdo con la *Nacional Mastitis Council* (NMC), *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y *Mycoplasma* spp están considerados como agentes patógenos primarios (1).

En los bovinos con mastitis, se pueden aislar en cultivo puro al *M. bovis*, además pueden asociarse a problemas del CRB, otitis media, artritis y queratoconjuntivitis (14). Sin embargo, es más común que *M. dispar* y *M. bovirhinis* sean aislados de casos de neumonía en bovinos, en asociación con otros microorganismos. (10, 11, 15)

En el complejo respiratorio bovino (CRB), se observa la asociación de virus (IBR, Parainfluenza 3, Virus respiratorio sincitial, Adenovirus) y bacterias (*Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Histophilus somni*, *Mycoplasma bovis*). (4) Esto nos indica que se necesita de una asociación de virus-bacteria para que se desarrolle esta enfermedad.

En la forma aguda del CRB se pueden presentar algunos signos como fiebre, flujo nasal, tos, respiración rápida y superficial, piel áspera, ojos hundidos y mal estado en general (5).

Para que un animal presente neumonía, no se requiere únicamente que entre en contacto con los agentes infecciosos específicos, sino que se necesita de la presencia de ciertas condiciones ambientales que faciliten el desarrollo de la infección. Estas condiciones incluyen: hacinamiento o mezcla de animales de diferentes edades y/o niveles inmunológicos, calor o frío excesivo, elevada humedad relativa, transportes prolongados, instalaciones con ventilación deficiente, presencia de concentraciones elevadas de partículas en el aire, etc. (5)

Antecedentes

Mycoplasma bovis se encuentra en casi todo el mundo, aunque en algunos países como Australia y Sudáfrica pudieron erradicar dicho agente. El control y erradicación es difícil debido al largo periodo de latencia que presentan los micoplasmas. Presentan una morbilidad del 90% y una mortalidad del 50% (6).

En la mastitis bovina las principales especies de micoplasmas involucradas son *M. bovis*, *M. dispar*, *M. mycoides*, *M. californicum* y *M. canadense*, de estas especies la especie más frecuente es *M. bovis* (13) la cual provoca una agalactia crónica (1).

En un trabajo realizado por Higuchi *et al* (2011) informaron de la prevalencia de diferentes especies de micoplasmas en leche de tanque de granjas comerciales en Japón, siendo aislado *M. bovis*, *M. californicum*, *M. canadense*, *M. arginini*, *M.*

bovigenitalium, *M. alkalescens* y *M. bovirhinis* (2), esto nos indica que en las granjas lecheras puede presentarse problemas por diversos tipos de micoplasmas a la vez.

Por su parte Kawai *et al* (2014) aislaron cepas de *M. bovis* a partir de 87 vacas con mastitis de diferentes establos y de 42 granjas comerciales de leche. (3) Demostrando la presencia de este agente en el ganado vacuno.

La asociación de diferentes especies de micoplasmas se menciona en estudios como el realizado en el Reino Unido 1992, que a partir de aislados de cavidad nasal en bovinos se identificaron *M. bovirhinis* (88%), *M. bovis* (20%), *M. bovigenitalium* (4%), *M. arginini* (16%) y *M. canis* (12%) (7). En otro estudio realizado en Europa, *M. bovirhinis* fue el mayormente aislado de la cavidad nasal en bovinos (8) y en menor frecuencia de neumonías, sin embargo, algunos autores lo consideran como microbiota normal en cavidad nasal de bovinos (9).

En el caso de México, hay diversos estudios que demuestran la presencia de micoplasmas en el ganado bovino, como es el estudio realizado por Rojas (10), en el cual pudo aislar e identificar a *M. bovis* (39.7%), *M. dispar* (24.8%) y *M. mycoides subsp capri* (15.6%). En el trabajo realizado por Maya (11), de igual manera aisló e identifico a *M. bovis* 37.3%, *M. bovirhinis* 30.4% y a *M. dispar* en un 20% en bovinos con y sin antecedentes respiratorios.

Taxonomía y Requerimientos Nutricionales

Los micoplasmas están clasificados dentro de la clase Mollicutes (*mollis*, suave; *cutis*, piel), Orden *Mycoplasmatales* de la familia *Mycoplasmataceae*. La subdivisión

de las familias se realizó con base en el hábitat, a la utilización de esteroides para su crecimiento, tamaño del genoma y la tolerancia al oxígeno. (12)

Los micoplasmas, debido a la ausencia de la pared celular, requiere de factores de crecimiento para el cultivo *in vitro*. el medio de cultivo usado debe tener niveles adecuados de proteínas para proveer la osmolaridad necesaria, para esto se agrega extracto de levadura, además requieren fuentes de esteroides y de ácidos grasos, para suplementar estas necesidades se utiliza suero de animales. En cuanto a la energía que requiere, se le provee glucosa o arginina. Debido a estas exigencias para su crecimiento *In vitro* se le considera un microorganismo difícil para su aislamiento y tipificación. Son varios los medios de cultivo que se utilizan para el desarrollo de los micoplasmas como Friis, Hayflick, Frey, etc. Todos ellos tienen como medio base el Caldo infusión Cerebro-Corazón y/o PPLO (*pleuropneumonia-like organisms*). (12)

Pérdidas económicas

Se ha reportado que *M. bovis* es causante de un tercio de las pérdidas económicas en la industria ganadera europea. (16)

Otro informe estima pérdidas por \$108 millones de dólares por año como resultado de problemas por mastitis, mientras que en la industria de engorda bovina se estimaron pérdidas de \$32 millones de dólares a causa de la pérdida de peso en los animales y por muerte. Los costos por enfermedades asociadas a micoplasmas pueden incrementarse por la baja de producción, la compra de fármacos, el pago a

los trabajadores por administrar los tratamientos además de la muerte de los animales. (14)

Quimioterapéuticos

Debido a la ausencia de pared celular de los micoplasmas, los antimicrobianos β – lactámicos no son efectivos; son susceptibles a fármacos que interfieren en la síntesis de proteína y ADN. Los que actúan en la síntesis de proteínas como las tetraciclinas que actúan en la fracción 30s ribosomal y los macrólidos, lincosamidas y florfenicol que actúan en la fracción 50s ribosomal. Los antimicrobianos que actúan a nivel de la síntesis de ADN como las fluoroquinolonas que inhiben la actividad de la ADN girasa. (14)

En un estudio del 2014, se determinó una resistencia por parte de *M. bovis* aislada de animales enfermos hacia quimioterapéuticos como macrólidos, oxitetraciclina, espectinomicina y florfenicol. (15)

Un trabajo realizado en Europa, durante el año 2000, reveló una disminución en la efectividad de algunos antimicrobianos, como la espectinomicina, oxitetraciclina y tilmicosina que comúnmente eran usados para el tratamiento contra *M. bovis*. (14)

Los antimicrobianos más utilizados en México para el control de la mastitis en la clínica bovina son las tetraciclinas, macrólidos y las fluoroquinolonas. Mientras que, para el tratamiento del CRB, se utiliza florfenicol, enrofloxacin, tulatromicina, tilmicosina, ceftiofur y oxitetraciclina.(3) Diferentes estudios de antimicrobianos realizados por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) muestran

diversa actividad sobre los micoplasmas, por lo que es fundamental conocer la concentración mínima inhibitoria (MIC) de algunos antimicrobianos utilizados en el tratamiento de la mastitis y del complejo respiratorio bovino, algunos de estos pertenecientes al grupo de los macrólidos, tetraciclinas, florfenicol y quinolonas, con el fin de demostrar la sensibilidad o resistencia de cepas de micoplasmas aisladas de campo. (16).

Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)

La MIC se define como la concentración más baja de un antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento visible o el metabolismo de un microorganismo de forma *in vitro* después de proporcionarle las condiciones adecuadas para su crecimiento. (17)

Para la realización de MIC, es necesario realizar la prueba de inhibición del metabolismo, la cual nos permite estandarizar el cultivo y así tener una constante en todas las muestras trabajadas.

La importancia de esta técnica es para establecer la sensibilidad o la resistencia de los microorganismos a los antimicrobianos.

Con la ayuda de un microscopio estereoscópico se pueden revisar las colonias y si es que los antimicrobianos afectan a la viabilidad de la morfología típica de los micoplasmas (morfología de huevo frito), esto es conocido como efecto micoplasmicida. (18)

La MIC se realiza con antimicrobianos de sales puras al 100%, cuando las sales no cubren este requisito se debe determinar su pureza con el fin de utilizar la cantidad indicada y restar la sustancia con la que se mezcla. Para conocer la sensibilidad y resistencia de los micoplasmas a los antimicrobianos se realiza la prueba inhibición del metabolismo para verificar la viabilidad bacteriana. Esta prueba requiere de medio de cultivo enriquecido que permite que los micoplasmas viables obtengan los nutrientes esenciales y así poder sobrecrecer.

JUSTIFICACIÓN

Debido a las características morfológicas y metabólicas de los micoplasmas, aunado a la falta de estudios que comprueben el efecto o la capacidad de los diferentes quimioterapéuticos hacia estos microorganismos, es importante realizar la técnica de Concentración Mínima Inhibitoria en cepas de *Mycoplasma spp.* obtenidas de diferentes estados de México, para así tener un panorama acerca de la sensibilidad o resistencia hacia los quimioterapéuticos más utilizados en la industria ganadera en problemas del CRB y/o de mastitis, esto con el fin de establecer tratamientos efectivos que ayuden a los productores y a su vez se eviten que los microorganismos generen resistencia a los quimioterapéuticos por el uso inadecuado.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la concentración mínima inhibitoria de Tilosina, Tilmicosina, Oxitetraciclina, Florfenicol, Enrofloxacin y Eritromicina, con el método de microdilución para establecer la sensibilidad de las cepas de *Mycoplasma bovis*, *M. dispar* y *M bovirhinis* aislados de bovinos con CRB y mastitis.

Objetivos Particulares

- Estandarizar el antígeno en unidades cambió de color con la prueba inhibición del metabolismo.
- Realizar la prueba de micrométodo en caldo para determinar la concentración mínima inhibitoria para cada cepa de micoplasma.
- Determinar MIC 50 y MIC 90 de las cepas en estudio.

HIPÓTESIS

- Las cepas de *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma dispar* y *Mycoplasma bovirhinis* presentan una sensibilidad ($\leq 8 \mu\text{g/mL}$) a fármacos del grupo de los Macrólidos, tetraciclinas, fenicoles y fluoroquinolonas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Elaboración del Medio Hayflick

Para preparar 100 ml del medio de cultivo, este se realizó en medio base con 2.1 gramos de medio PPLO¹ diluido en 70 ml de agua destilada, posteriormente se esterilizó en autoclave a 121°C 15 Lbs. por 15 minutos. Una vez que se esterilizó se le agregó 10 ml de levadura fresca estéril, 20 ml de suero de caballo estéril, 1 ml de Dextrosa al 10%, 1 ml de penicilina a 100 000 UI y 0.3 ml de rojo de fenol al 1% como indicador de pH. Posteriormente, se le realizó al medio de cultivo la prueba de esterilidad incubando a 37°C por 24 horas.

Cepas de *Mycoplasma*

Las cepas de campo utilizadas se obtuvieron de trabajos previos de Rojas 2013 y López 2015, las muestras fueron de hisopos nasales y leche, obtenidas en Aguascalientes, Torreón e Hidalgo. Las cepas fueron molecularmente tipificadas con la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) usando primers que codifican para los genes *rpoB* para *M. bovirhinis* y *M. dispar*, *oppD* en *M. bovis*. Se trabajaron un total de 60 cepas de campo, siendo 35 cepas de *M. bovis* de las cuales 20 provienen de casos aislados en animales con CRB y 15 con mastitis, 5 cepas de *M. bovirhinis* de animales con CRB y 20 aislados de *M. dispar* de animales con CRB. Para este estudio se utilizaron como control las cepas de *Mycoplasma*

¹ Difco TM PPLO/BD

bovis cepa Donetta PG 45², *Mycoplasma bovirhinis* PG 43³ y *Mycoplasma dispar* 462/2⁴.

Preparación del material biológico.

El material biológico se preparó siguiendo la metodología de Tully *et al*, 1983 para cada una de las cepas de campo y para las cepas control.

Se depositaron 0.2 ml de la cepa en 1.8 ml de medio líquido Hayflick, incubando a 37°C, hasta observar un ligero cambio de pH y turbidez, *M. bovis* y *M. bovirhinis*, requieren de 24 horas para desarrollar, mientras que *M. dispar* necesita 48 horas. El medio líquido se conservó en alícuotas con volúmenes de 1 ml en tubos eppendorf y se congelaron a -70°C.

Para determinar viabilidad bacteriana, las cepas se sembraron en medio semisólido de Hayflick para observar la morfología típica de micoplasma conocida como de “huevo frito”. Se incubaron a 37°C en un ambiente de microaerobiosis por 72 horas.

Preparación de los Quimioterapéuticos

Se utilizaron 6 diferentes fármacos: eritromicina, florfenicol, clorhidrato de oxitetraciclina, tilmicosina, tartrato de tilosina y enrofloxacina (Sigma - Aldrich©)

^{2, 3 y 4} Cepas donadas por la Universidad de Arhus, Dinamarca

Los cinco primeros actúan sobre la síntesis de proteínas y la última en la síntesis de ADN. Cada una de estas sales presenta características diversas, por lo que se diluyeron en soluciones diferentes como: agua destilada y etanol al 95%.

La MIC se realiza con sales puras al 100%, cuando las sales no cubren este requisito se debe determinar su pureza con el fin de utilizar la cantidad indicada y restar la sustancia con la que se mezcla. En este estudio, las sales del Clorhidrato de Oxitetraciclina y del Tartrato de Tilosina no cubrieron ese requisito y se les aplicó la siguiente fórmula.

$$\frac{\text{peso molecular del quimioterapéutico en base pura}}{\text{peso molecular del quimioterapéutico a utilizar}} \times \frac{\text{pureza del quimioterapéutico}}{100}$$

Las diluciones del antimicrobiano que se utilizaron en la concentración mínima inhibitoria se establecieron en µg/ml.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25
µg/mL									

Inhibición de Metabolismo para determinar las Unidades Cambio de Color (UCC).

Con esta prueba se permite que el micoplasma metabólicamente utilice todos los nutrientes presentes en el medio de cultivo para permitir su viabilidad.

Procedimiento.

- Descongelar cada una de las cepas e incubar a 37°C durante dos horas.
- Depositar 1 ml de antígeno en 9 ml de medio de Hayflick
- Realizar diluciones decimales hasta obtener 1×10^{-12} .
- De cada dilución se transfirió 0.1 ml en pozos consecutivos en una microplaca de 96 pozos estéril, empezando por la dilución más alta (10^{-12}) y terminando en la dilución más baja (10^{-1}).
- Agregar 0.1 ml de medio líquido Hayflick en cada uno de los pozos. Este procedimiento se realizó por duplicado.
- Utilizar un pozo como control negativo (0.2 ml de medio líquido estéril)
- Utilizar un pozo como control positivo (0.1 ml de medio líquido estéril y 0.1 ml de antígeno).
- La microplaca se selló usando cinta adhesiva y una tapa, la microplaca se incubó a 37° C por lo menos 78 horas en aerobiosis.

De cada dilución, se tomó 20 µl y se sembró en medio semisólido de Hayflick, como control para verificar la viabilidad del microorganismo. Las placas de agar se incubaron de 24 a 48 horas a 37° C en aerobiosis.

La microplaca y las placas de agar se revisaron todos los días hasta observar un cambio de color visible, mientras que las cajas se revisaban con un microscopio

estereoscópico⁵ para observar la morfología típica de “huevo frito” de *Mycoplasma* spp.

Se determinó las unidades cambio de color (UCC). Cada una de las cepas se estandarizó a 4 UCC. 1 UCC es donde la más alta dilución de antígeno de micoplasma presentó un cambio de color (pH), a partir de ahí se cuentan las diluciones hasta llegar a la cuarta dilución y se consideró 4 UCC.

Prueba de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC).

Se utilizó la metodología de microdilución en placa modificado de Tanner y Wu 1992.

- Se utilizó una placa de 96 pozos estéril. A cada pozo se le depositó (del pozo 1 al 11) 0.1 ml de medio de cultivo líquido de Hayflick estéril.
- Se agregó 0.1 ml del quimioterapéutico a la concentración de 256 µg/mL en la fila 1 (Enrofloxacin, Eritromicina, Florfenicol, Oxitetraciclina, Tilosina y Tilmicosina). Con la ayuda de una pipeta multicanal⁶,
- Se realizaron diluciones dobles seriadas hacia la derecha, mezclando 7 veces por fila y transfiriendo 0.1 ml al siguiente pozo.
- Una vez que se efectuaron las diluciones se colocó 0.1 ml del antígeno estandarizado a 4 UCC en cada pozo de la fila 1 a la 10.

⁵ Microscopio estereoscópico “Carl Zeiss KL1500 LCD”

⁶ Thermo Scientific/ FINNPIPETTE

- A los pozos de la fila número 12 se le agregaron 0.2 ml de medio líquido de Hayflick estéril, esto como control negativo, mientras que la fila 11 sirvió como control positivo (0.1 ml de medio líquido estéril y 0.1 ml del antígeno).
- Las microplacas se sellaron con cinta adhesiva y con su respectiva tapa, se metieron a incubar a 36°C +/- 1°C durante tres días, a partir de este tiempo se revisaban cada 24 horas para revisar si presentaban cambio de color.

Determinación de la MIC 50 Y MIC 90

Una vez obtenidas las lecturas de la prueba de la MIC, se analizaron los datos para calcular la dilución de cada antimicrobiano que inhibió al 50% (MIC 50) y al 90% (MIC 90) de las cepas probadas.

Efecto micoplasmicida

El efecto micoplasmicida se realizó para comprobar la efectividad de los diferentes antimicrobianos sobre la viabilidad de los micoplasmas. La metodología que se siguió fue la descrita por Hannan (2000). Esta prueba se realizó sembrando en medio semisólido de Hayflick, con el propósito de evidenciar colonias de micoplasmas, lo que nos indica viabilidad. Las placas de agar se inocularon con 10 µl a partir de cada pozo de la microplaca utilizada para el MIC, que contiene a la bacteria y el antimicrobiano en las diferentes diluciones, posteriormente se incubaron a 37°C en una atmósfera de velobiosis con humedad del 70 - 80%. Las lecturas se realizaron a partir de las 72 horas. Con ayuda de un microscopio estereoscópico.

RESULTADOS

Inhibición del metabolismo para determinar las unidades Cambio de Color

Se realizó la prueba de UCC para las 63 muestras. Las diluciones fueron dobles seriadas empezando con una dilución 10^{-1} hasta la dilución 10^{-12} . Se considera como primer UCC a la última dilución que presente un cambio de color visible (cambio de pH). Como se observa en la Ilustración 1, donde el sexto pozo fue la última dilución en presentar cambio de color, por lo que la dilución 10^{-3} es la cuarta UCC.

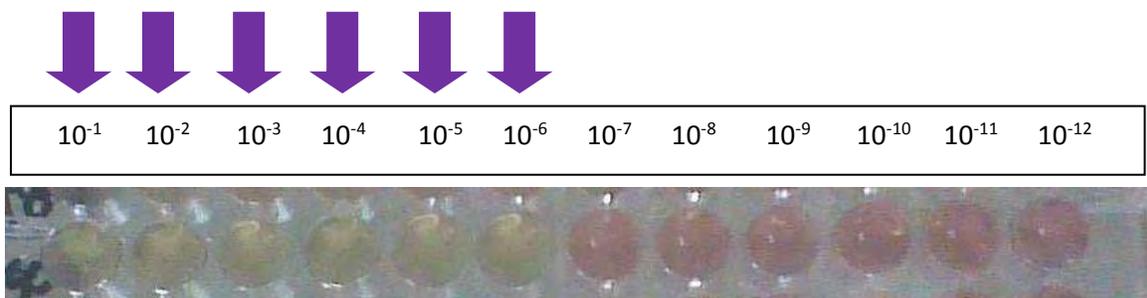


Ilustración 1 Demostración de las Unidades Cambio de Color

Las 60 cepas de campo y las tres cepas de ATTC analizadas para la determinación de las UCC mostraron diferentes resultados, desde 4 UCC hasta 12 UCC, resultados que se muestran en los cuadros 1, 2, 3 y 4 y en las ilustraciones 2, 3, 4 y 5.

Cuadro 1. Resultados de Unidades Cambio de Color para *M. bovirhinis* de CRB

No.	Identificación cepa	Resultado UCC
1	Cepa ATCC	10^{-6}
2	414	10^{-4}
3	418	10^{-12}
4	430	10^{-4}
5	1884	10^{-4}
6	8942	10^{-5}

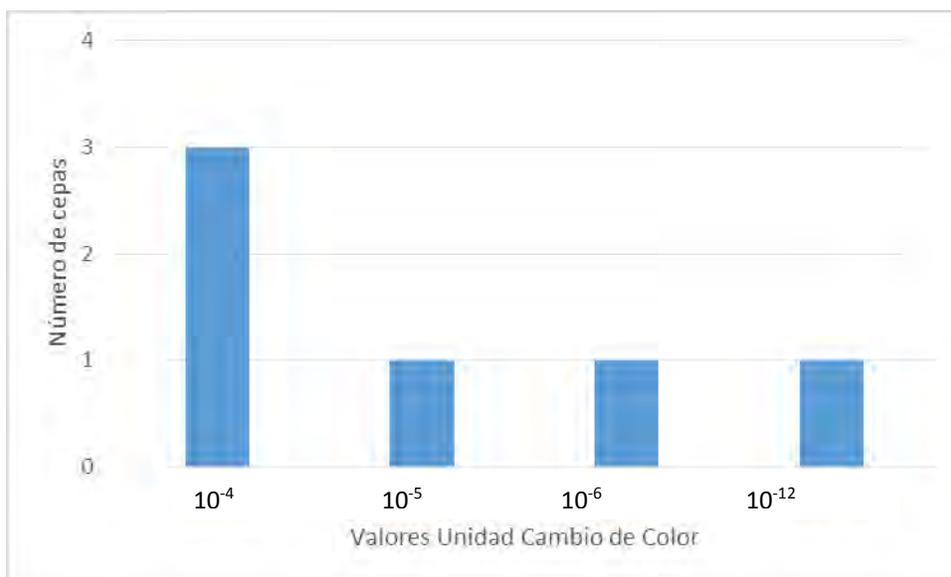


Ilustración 2. Gráfica de Resultados para Unidades Cambio de Color *M. bovirhinis*

Cuadro 2. Resultados Unidades Cambio de Color para *M. dispar* de CRB

No.	Identificación cepa	Resultado UCC
1	ATCC	10^{-5}
2	809	10^{-10}
3	3014	10^{-12}
4	5235 A	10^{-12}
5	1055	10^{-12}
6	T8A	10^{-4}
7	395	10^{-4}
8	182	10^{-9}
9	T6	10^{-5}

10	T2A	10^{-4}
11	395 A	10^{-7}
12	110B	10^{-6}
13	5252	10^{-5}
14	T3A	10^{-4}
15	1927	10^{-4}
16	189	10^{-4}
17	662	10^{-5}
18	5021A	10^{-6}
19	48	10^{-9}
20	2707	10^{-11}
21	9977	10^{-12}

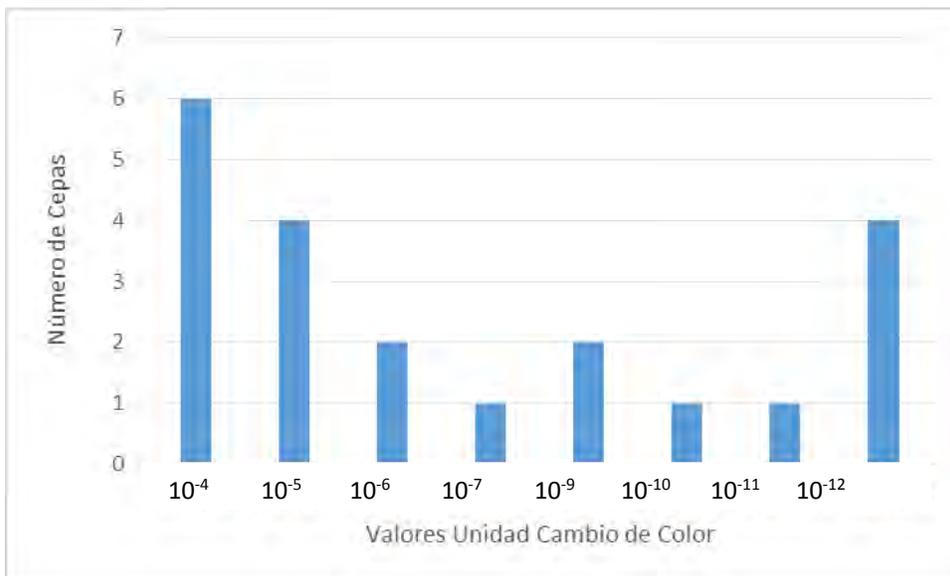


Ilustración 3. Gráfica de Resultados para Unidades Cambio de Color en *M. dispar*

Cuadro 3. Resultados de Unidades Cambio de Color para *M. bovis* de CRB

No.	Identificación cepa	Resultado UCC
1	ATCC	10^{-5}
2	183	10^{-6}
3	206	10^{-5}
4	390	10^{-4}
5	405	10^{-5}

6	202	10^{-4}
7	120	10^{-4}
8	500	10^{-4}
9	426	10^{-4}
10	895	10^{-4}
11	094 B	10^{-4}
12	404	10^{-6}
13	5021 B	10^{-7}
14	655	10^{-10}
15	18	10^{-12}
16	T7A	10^{-12}
17	T8B	10^{-12}
18	711	10^{-4}
19	422	10^{-4}
20	154	10^{-8}
21	5010 B	10^{-11}

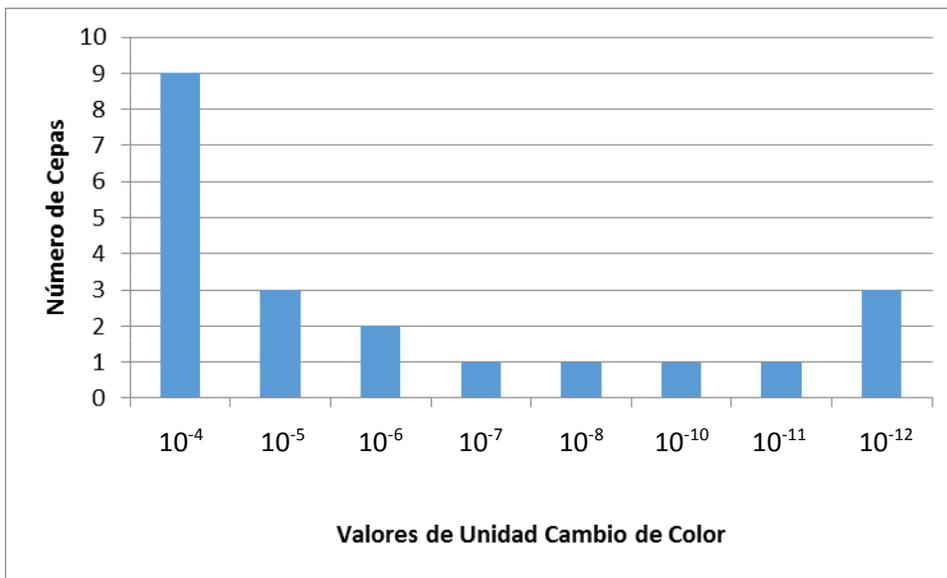


Ilustración 4. Gráfica de resultados para Unidades cambio de Color en *M. bovis* (CRB)

Cuadro 4. Resultados de Unidades Cambio de Color para *M. bovis* de Leche

No.	Identificación cepa	Resultado UCC
1	176	10^{-4}
2	142	10^{-4}
3	152	10^{-6}
4	136	10^{-4}
5	147	10^{-8}
6	186	10^{-7}
7	134	10^{-4}
8	144	10^{-4}
9	194	10^{-4}
10	108	10^{-4}
11	109	10^{-4}
12	113	10^{-4}
13	139	10^{-4}
14	108T2	10^{-4}
15	606	10^{-4}

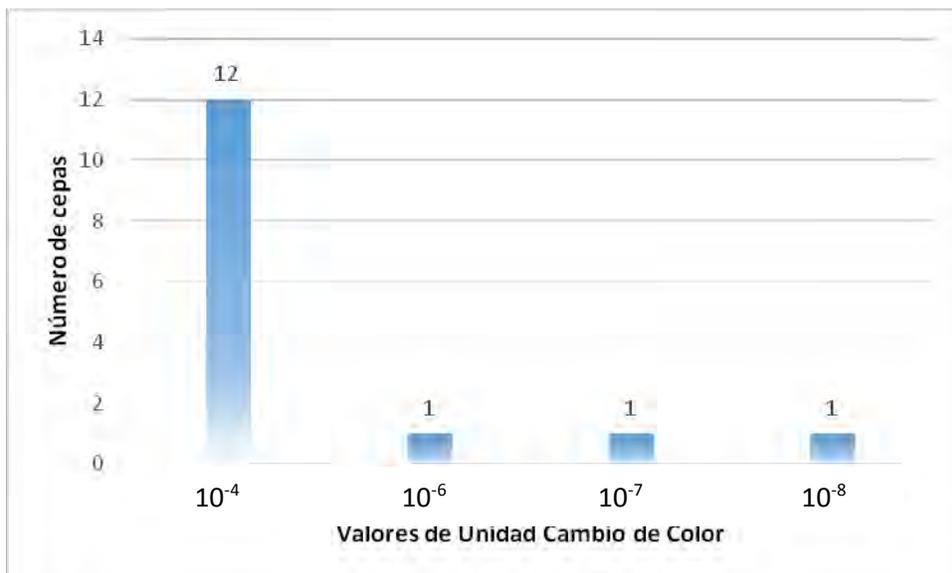


Ilustración 4. Gráfica de resultados para Unidades Cambio en Color *M. bovis* (Mastitis)

Con base en estos resultados, se puede observar que el valor más repetido para las cepas de CRB fue 4 UCC que corresponde a 18 (40%) del total de las cepas (45).

Para el caso de las muestras de *M. bovis* provenientes de leche, el valor que se repitió más veces fue el de 10^{-4} (12 veces) equivalente al 80% del total de las cepas (15 muestras).

Concentración Mínima Inhibitoria

Las 63 cepas a partir de cultivos de 24 horas se prepararon cada una de ella a la concentración de 4 UCC. La prueba de MIC se realizó por duplicado para cada cepa y para cada antibiótico. Los resultados se expresaron en $\mu\text{g/mL}$.

Cuadro 5 Resultados de la MIC para *M. bovirhinis*

Id. Muestra	Enrofloxacina	Eritromicina	Florfenicol	Oxitetraciclina	Tilosina	Tilmicosina
ATCC	<0.25	16	0.5	4	<0.25	<0.25
414	<0.25	32	0.5	1	<0.25	2
418	<0.25	4	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25
430	<0.25	0.5	<0.25	0.5	<0.25	0.5
1884	<0.25	<0.25	0.5	2	<0.25	<0.25
8942	<0.25	64	1	8	<0.25	128<

Cuadro 6. Resultados de la MIC para *M. dispar*

Id. Muestra	Enrofloxacina	Eritromicina	Florfenicol	Oxitetraciclina	Tilosina	Tilmicosina
ATCC	<0.25	16	<0.25	8	2	2
5252	<0.25	16	<0.25	32	4	128
2707	<0.25	1	<0.25	16	<0.25	<0.25
5235 a	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25
3014	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25
809	<0.25	16	16	32	16	128
T6	<0.25	16	1	64	8	128
662	<0.25	16	1	64	2	128<
1055	<0.25	32	1	128	8	128<
189	<0.25	128<	1	128	64	128<
182	<0.25	8	0.5	32	8	<0.25
395 A	<0.25	16	0.5	64	8	128<
110 B	<0.25	16	1	32	8	128<
5021 A	<0.25	8	0.5	64	8	128<

48	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25
1927	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25
9977	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	0.5
5252	<0.25	16	0.5	64	8	128
T3A	<0.25	32	<0.25	32	8	64
T2A	<0.25	64	<0.25	8	<0.25	4
T8A	<0.25	16	<0.25	8	2	64

Cuadro 7. Resultados de la MIC para *M. bovis*

Id. Muestra	Enrofloxacina	Eritromicina	Florfenicol	Oxitetraciclina	Tilosina	Tilmicosina
ATCC	<0.25	32	<0.25	32	2	2
183	<0.25	32	2	32	8	32
206	<0.25	1	1	4	0.5	8
390	<0.25	1	0.5	16	2	4
405	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25
202	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25
120	<0.25	16	0.5	0.5	16	8
500	<0.25	1	2	0.5	128<	128<
426	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25
895	<0.25	64	2	64	4	64
094 B	<0.25	<0.25	16	<0.25	<0.25	<0.25
404	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25
5021 B	<0.25	16	<0.25	16	4	8
655	<0.25	8	16	<0.25	<0.25	0.5

18	<0.25	2	<0.25	4	2	<0.25
T7A	<0.25	16	0.5	128	8	64
T8B	<0.25	8	<0.25	4	<0.25	0.5
711	<0.25	<0.25	<0.25	1	<0.25	<0.25
422	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25
154	<0.25	1	0.5	2	8	1
5010B	<0.25	<0.25	2	2	2	2

Cuadro 8. Resultados de la MIC para *M. bovis* de mastitis

Id. Muestra	Enrofloxacina	Eritromicina	Florfenicol	Oxitetraciclina	Tilosina	Tilmicosina
176	<0.25	2	0.5	16	2	128
142	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25
152	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25
136	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25
147	<0.25	0.5	0.5	<0.25	<0.25	<0.25
186	<0.25	<0.25	2	<0.25	0.5	1
134	<0.25	<0.25	1	2	0.5	1
144	<0.25	0.5	<0.25	<0.25	1	2
194	<0.25	<0.25	1	2	0.5	1
108	<0.25	1	<0.25	2	2	1
109	<0.25	<0.25	1	0.5	1	2
113	<0.25	0.5	1	2	1	2
139	<0.25	1	2	2	2	2
108T2	<0.25	<0.25	8	4	16	16
606	8	128<	4	32	8	128<

En relación con las tablas 5, 6, 7 y 8, se enlistan los resultados para la concentración mínima inhibitoria, cabe resaltar que en este trabajo se hizo la prueba por duplicado, en la cual, sólo para las muestras de la tabla 5 (*M. bovirhinis*) se obtuvieron los mismos resultados en ambos experimentos. En cuanto a las tablas 6, 7 y 8 hubo una variación en los resultados por antimicrobiano para cada cepa de hasta 4 veces la dilución en algunos casos, por lo que se decidió poner la dilución más baja de entre las dos con efecto de MIC, aunque la acción más recomendable es la de realizar una vez más el experimento para corroborar el resultado.

Determinación del MIC 50 y MIC 90.

El MIC50 y MIC90 se obtuvo de la dilución capaz de inhibir el 50% y el 90% de las cepas estudiadas para cada antimicrobiano. Estos datos también se compararon con las cepas de referencia de ATCC para conocer si el MIC de las cepas estudiadas está por arriba o por debajo de la cepa tipo.

Cuadro 9 MIC50 y MIC90 *M. bovirhinis*

	Enrofloxacina	Eritromicina	Florfenicol	Oxitetraciclina	Tilosina	Tilmicosina
Rango del MIC	<0.25	<0.25 - 64	<0.25 - 1	0.25 - 8	<0.25	<0.25 - 128<
MIC50	<0.25	4	0.5	1	<0.25	<0.25
MIC90	<0.25	32	0.5	2	<0.25	2
ATCC	<0.25	16	0.5	4	<0.25	<0.25

Cuadro 10 MIC50 y MIC90 *M. dispar*

	Enrofloxacina	Eritromicina	Florfenicol	Oxitetraciclina	Tilosina	Tilmicosina
Rango del MIC	<0.25	<0.25 - >128	<0.25 - 16	<0.25 - 128 (18)	<0.25 - 64	<0.25 - 128<
MIC50	<0.25	16	<0.25	32	4	64
MIC90	<0.25	32	1	64	16	128<
ATCC	<0.25	16	<0.25	8	2	2

Cuadro 11 MIC50 y MIC90 *M. bovis* de CRB

	Enrofloxacina	Eritromicina	Florfenicol	Oxitetraciclina	Tilosina	Tilmicosina
Rango del MIC	<0.25	<0.25 - 64	<0.25 - 16	<0.25 128	<0.25 - 128<	<0.25 - 128<
MIC50	<0.25	1	0.5	1	0.5	0.5
MIC90	<0.25	16	2	32	8	64
ATCC	<0.25	32	<0.25	32	2	2

Cuadro 12 MIC50 y MIC90 *M. bovis* de Mastitis

	Enrofloxacina	Eritromicina	Florfenicol	Oxitetraciclina	Tilosina	Tilmicosina
Rango del MIC	<0.25 - 8	<0.25 - >128	<0.25 - 8	<0.25 - 32	<0.25 - 16	<0.25 - >128
MIC50	<0.25	<0.25	11	2	1	1
MIC90	<0.25	2	4	16	8	128
ATCC	<0.25	32	<0.25	32	2	2

Con estos resultados podemos evaluar el comportamiento que tienen los antimicrobianos en relación con la cepa de referencia contra las cepas aisladas de campo.

Para *M. bovirhinis* (cuadro 9) se observa que el MIC50 de eritromicina fue de (4 µg/mL) es menor al valor obtenido para la cepa ATCC (16 µg/mL). En los demás antimicrobianos se obtienen los mismos resultados. En cuanto al MIC90, sólo hay igualdad en el caso de enrofloxacina, florfenicol y para tilosina (<0.25, 0.5 y <0.25 respectivamente), para Oxitetraciclina el valor de la MIC90 fue menor (2 µg/mL) al de la cepa de referencia (4 µg/mL), eritromicina y tilmicosina presentaron valores más altos (32 µg/mL/16 µg/mL y 2 µg/mL/ <0.25 µg/mL respectivamente).

Los resultados de *M. dispar* (cuadro 10) tenemos que en MIC50 se obtuvieron los mismos valores para enrofloxacina (<0.25 µg/mL), eritromicina (16 µg/mL) y florfenicol (<0.25 µg/mL). Mientras que para oxitetraciclina (32 µg/mL), tilosina (4 µg/mL) y tilmicosina (64 µg/mL) los valores que presentaron fueron más altos en comparación de la cepa tipo (8 µg/mL, 2 µg/mL y 2 µg/mL). Hablando del MIC90, tenemos que sólo para la enrofloxacina (<0.25 µg/mL) tuvo el mismo valor a la cepa de referencia. En los demás quimioterapéuticos, se presentaron valores más altos.

En el caso de *M. bovis* se realizó el estudio en muestras provenientes de casos con CRB (20 cepas) y de problemas de mastitis (15 cepas).

Las provenientes de CRB (Cuadro 11) tuvieron valores menores en MIC50, excepto para florfenicol, que presento un valor de 0.5 µg/mL en comparación del <0.25 que presento la muestra de referencia.

Ya en MIC90 se puede observar que la enrofloxacina y oxitetraciclina tuvieron el mismo valor a la cepa ATCC, mientras que para la eritromicina fue menor (MIC90: 2 µg/mL ATCC: 32 µg/mL). Los antimicrobianos restantes (florfenicol, tilosina y tilmicosina) fueron los que presentaron valores más altos a diferencia de la cepa ATCC.

Las muestras de *M. bovis* que se obtuvieron de animales con mastitis (cuadro 12) tuvieron valores de MIC50 por debajo a lo obtenido en la cepa tipo a excepción del florfenicol (1 µg/mL).

En comparación del MIC90, de nuevo sólo enrofloxacin ($<0.25 \mu\text{g/mL}$) fue el antimicrobiano que presento el mismo valor, para eritromicina ($2 \mu\text{g/mL}$) y oxitetraciclina ($16 \mu\text{g/mL}$) fueron valores menores a la cepa de referencia. Los que presentaron valores por encima a los presentados por la cepa tipo fueron florfenicol ($4 \mu\text{g/mL}$), tilosina ($8 \mu\text{g/mL}$) y tilmicosina ($128 \mu\text{g/mL}$)

Efecto Micoplasmicida

Una vez que se tuvieron las diluciones hechas en la microplaca y antes de sellarla con la cinta adhesiva, se sembraron las cajas de medio semisólido de Hayflick. Con la ayuda de una cuadrícula por debajo de las cajas, se inoculó lo equivalente a 20 pozos por caja de medio semisólido. Se metió a incubar en una atmosfera de microaerobiosis a 37°C durante 4 días, después de este tiempo, se revisaban las cajas cada 24 horas.

La lectura de las cajas se hizo con la ayuda de un microscopio estereoscópico. Se revisaron todos los cuadrantes, empezando por la dilución más baja y terminando con la más alta.

La importancia de realizar la prueba del efecto micoplasmicida es la de conocer si el antimicrobiano usado realmente elimina a la bacteria o si sólo inhibe su crecimiento por lo que no se vería un cambio de pH en las diluciones.

Al momento de revisar las cajas observamos que no se presentaba crecimiento de micoplasma, esto pasaba en las diluciones dónde en la prueba de MIC no se veía crecimiento de la bacteria.

Comparando los resultados del efecto micoplasmicida con los de la concentración mínima inhibitoria, se observa que se obtienen los mismos resultados, por lo que se concluye que el valor de MIC afecta directamente en la inhibición de la morfología típica para micoplasmas.

DISCUSIÓN

La enrofloxacin, que actúa en la ADN polimerasa de las células procariotas, demostró ser efectiva contra todas las cepas de *Mycoplasma* spp aisladas de las muestras de campo, leche e hisopos nasales, ya que inhibió el crecimiento bacteriano hasta la dilución más alta (<0.25 µg/mL), con valores de MIC50 y MIC90 de <0.25 µg/mL, así como tener efecto micoplasmicida en la misma dilución, valores comparables con los obtenidos con las cepa control ATCC utilizadas en el estudio. La enrofloxacin, a pesar de ser uno de los antimicrobianos más utilizados en la medicina veterinaria en México fue efectiva contra las cepas de micoplasmas.

Sin embargo, tilmicosina y tilosina presentaron resistencia para las cepas de *M. bovis* de CRB y de mastitis (64 µg/mL y 8 µg/mL en ambos casos) y *M. dispar* (128 µg/mL y 16 µg/mL), para *M. bovirhinis* la tilmicosina tuvo un valor de 2 µg/mL, esto en comparación con la cepa de referencia (<0.25 µg/mL para *bovirhinis* y de 2 µg/mL para *dispar* y *bovis*).

Por su parte eritromicina, florfenicol y oxitetraciclina variaron mucho para cada una de las cepas, siendo solamente sensible eritromicina para las cepas de *M. bovis* de mastitis (2 µg/mL), mientras que para bovis de CRB (16 µg/mL), *M. dispar* y *M. bovirhinis* (32 µg/mL para ambos). Para el florfenicol se presentaron los siguientes valores: *M. bovirhinis* 0.5 µg/mL, *M. dispar* 1 µg/mL, *M. bovis* de CRB 2 µg/mL y *M. bovis* de mastitis 4 µg/mL. La oxitetraciclina presentó los siguientes valores de MIC90: 2 µg/mL en *M. bovirhinis*, 64 µg/mL *M. dispar*, 32 µg/mL y 16 µg/mL para *M. bovis* de CRB y mastitis respectivamente.

En comparación a otros estudios, como el realizado por Kawai *et al.*, 2014 donde trabajaron cepas de *M. bovis*, obtuvieron datos muy similares a los obtenidos en este trabajo, en los cuales demuestran sensibilidad por parte de enrofloxacin (rango= 0.25 – 1, MIC50= 0.5, MIC90= 0.5), mientras que también demuestran la resistencia de estos microorganismos en contra de Tilosina (rango= 16 – 128<, MIC50= 64, MIC90= 128) y Tilmicosina (rango= 32 – 128<, MIC50= 128<, MIC90= 128 o mayor a este valor).

Así mismo, en otro estudio realizado por Anne V. Gautier-Bouchardon *et al.*, 2014 donde se trabajaron con 27 cepas de *M. bovis* aisladas en un periodo de tiempo comprendido de 1978 a 1979 y que después se compararon con 143 cepas aisladas entre 2010 y 2012. De igual manera, hay similitud en los resultados que tienen con los demostrados en este trabajo, mostrando la sensibilidad por parte de enrofloxacin (MIC50: 0.5 µg/ml) y resistencia para tilosina (>64 µg/ml), tilmicosina (>128 µg/ml), oxitetraciclina (>32 µg/ml) y florfenicol (8 µg/ml), aunque sus valores de MIC50 fueron mayores para tilosina (1 µg/mL) y tilmicosina (1 µg/mL) en comparación a los nuestros.

Rosenbusch *et al.*, 2005 trabajaron con cepas de *M. bovis* aisladas en Estados Unidos, utilizaron algunos quimioterapéuticos iguales a los de este trabajo, como fue la enrofloxacin (MIC50: 0.25, MIC90: 0.5, rango: 0.03 – 4), florfenicol (MIC50: 1, MIC90: 4, rango: 0.06 – 8), Oxitetraciclina (MIC50: 2, MIC90: 16, rango: 0.125 - >32) y tilmicosina (MIC50: 64, MIC90: >128, rango: 0.5 – 128<). En comparación con nuestro estudio, tenemos resultados similares para los antimicrobianos usados

en común, observamos que la enrofloxacina es el antimicrobiano con valores más bajos, teniendo los mismos resultados para MIC50 (0.25 µg/mL) y para tilmicosina se obtienen valores iguales de hasta 128 µg/mL.

Otro estudio realizado en Israel por Gerchman *et al.*, 2009, donde se utilizaron cepas de *M. bovis*, 17 aislados “locales” y 18 cepas “importadas” de Hungría (11 cepas), Lituania (3 cepas), Australia (4 cepas) y de USA (1 que fue la cepa ATCC) de *M. bovis*. Los resultados que se obtuvieron fueron los siguientes: enrofloxacina: MIC50= 0.16, MIC90= 63, rango= 0.08 – 2.5, oxitetraciclina: MIC50= 4, MIC90=8, rango=0.5 – 16, tilmicosina: MIC50=128, MIC= >128, rango= 0.5 - >128 y tilosina: MIC50:8, MIC90:128 y rango de 0.5 a 128, estos datos son para las cepas señaladas como “locales”, mientras que para las “importadas se obtuvieron resultados para enrofloxacina de MIC50: 0.32, MIC90: 1.25, rango: 0.16 – 5, oxitetraciclina MIC50: 2, MIC90: 4, rango: 0.5 – 8, tilmicosina MIC50: 2, MIC90: 128, rango: 0.5 – 128 y tilosina MIC50: 1, MIC90: 8 y rango de 0.5 – 128. Al igual que los estudios anteriormente descritos y a nuestro trabajo, observamos que la enrofloxacina es la que presenta la MIC con valores más bajos (de 0.8 hasta 2.5 µg/mL) siendo este antimicrobiano el de elección, mientras que la tilosina y la tilmicosina, que se indican como fármacos de elección para el tratamiento de la micoplasmosis, obtuvieron valores más concentrados (rangos de 0.5 – 128 µg/mL para ambos).

En México no se tienen estudios de MIC sobre alguno de los micoplasmas usados en este trabajo, sólo se tiene un trabajo de tesis realizado por Castro Méndez y Miranda Molares (1994), en el cual trabajaron cepas de *M. mycoides* aislados de un

brote de mastitis bovina. Utilizaron sales de gentamicina, norfloxacin y tiamulina. Sus resultados mostraron que en las 18 cepas analizadas la norfloxacin y tiamulina mostraron un valor 0.04 µg/mL para el 100% de los aislados, mientras que en gentamicina sus valores fueron de 0.04 a 5 µg/mL. Comparándolo con este estudio, las cepas analizadas son de micoplasmas causantes de mastitis, para las cepas de *M. bovis* se observó sensibilidad a enrofloxacin antimicrobiano del grupo de las quinolonas y a la eritromicina, después de dos décadas se nota resistencia a tilosina y tilmicosina en aislados de micoplasmas de la mastitis bovina en la misma zona geográfica.

En el caso de *Mycoplasma dispar* y *Mycoplasma bovirhinis* no se han descrito trabajos relacionados con la concentración mínima inhibitoria, por lo cual se utilizó una cepa ATCC para cada una de ellas y así poder comparar los resultados de estas cepas con las cepas aisladas del campo para poder determinar si hay un cambio en los valores tanto de MIC50 y en MIC90.

En *M. dispar* se puede decir que las muestras aisladas de campo tienen una gran diferencia en cuanto al MIC90 para los quimioterapéuticos como Oxitetraciclina (32 µg/mL), tilosina (16 µg/mL) y tilmicosina (128 < µg/mL) en comparación a la cepa de referencia (8 µg/mL, 2 µg/mL y 2 µg/mL respectivamente), por lo que se puede determinar que hay resistencia. Mientras que para la enrofloxacin se mantienen los mismos valores en MIC90 con la Cepa de referencia, siendo un valor de <0.25 µg/ml, por lo que se considera como sensible.

Usando el mismo fundamento para *M. bovirhinis*, se puede determinar que las 5 muestras evaluadas son sensibles a enrofloxacin ($<0.25 \mu\text{g/mL}$), florfenicol ($0.5 \mu\text{g/mL}$), oxitetraciclina ($2 \mu\text{g/mL}$) y tilosina ($<0.25 \mu\text{g/mL}$), mientras que para eritromicina ($32 \mu\text{g/mL}$) y tilmicosina ($2 \mu\text{g/mL}$) fue resistente en comparación con la cepa de referencia

CONCLUSIONES

Las cepas estudiadas mostraron una concentración bacteriana de 10^{-4} (40% en provenientes de CRB y 80% en las de Mastitis).

La MIC para *M. bovirhinis* fue de <0.25 $\mu\text{g/mL}$ enrofloxacin y tilosina, 32 $\mu\text{g/mL}$ eritromicina, 0.5 $\mu\text{g/mL}$ florfenicol, 2 $\mu\text{g/mL}$ oxitetraciclina y tilmicosina.

Para *M. dispar* la MIC fue de <0.25 $\mu\text{g/mL}$ enrofloxacin, 32 $\mu\text{g/mL}$ eritromicina, 1 $\mu\text{g/mL}$ $\mu\text{g/mL}$ florfenicol, 64 $\mu\text{g/mL}$ oxitetraciclina, 16 $\mu\text{g/mL}$ tilosina y 128 $<$ $\mu\text{g/mL}$ tilmicosina.

M. bovis, cepas aisladas del CRB y de la mastitis bovina, mostró una MIC de: <0.25 $\mu\text{g/mL}$ enrofloxacin, 16 $\mu\text{g/mL}$ eritromicina, 2 $\mu\text{g/mL}$ florfenicol, 32 $\mu\text{g/mL}$ oxitetraciclina, 8 $\mu\text{g/mL}$ tilosina y 64 $\mu\text{g/mL}$ de tilmicosina para las cepas de CRB y <0.25 $\mu\text{g/mL}$ enrofloxacin, 2 $\mu\text{g/mL}$ eritromicina, 4 $\mu\text{g/mL}$ florfenicol, 16 oxitetraciclina, 8 $\mu\text{g/mL}$ tilosina y 128 $\mu\text{g/mL}$ para tilmicosina para las cepas de mastitis.

La enrofloxacin con $<0.25\mu\text{g/ml}$ (MIC50: $<0.25\mu\text{g/ml}$ y MIC90: $<0.25\mu\text{g/ml}$) es el antimicrobiano con mejor acción contra los micoplasmas causantes de problemas respiratorios y de mastitis, y con la misma concentración del antimicrobiano mostró un efecto micoplasmicida.

M. dispar y *M. bovis* han desarrollado resistencia contra tilmicosina, tilosina y oxitetraciclina, así como para la eritromicina las cepas de *M. bovis* del CRB. Estas variaciones en la resistencia puede estar relacionada con el origen geográfico,

sistema producción, presentación clínica, el sitio en donde se realizó el aislamiento, y por el uso de antimicrobianos sin la práctica regulatoria.

Las cepas de *Mycoplasma bovirhinis* fueron sensibles a florfenicol (5 µg/ml), oxitetraciclina (2 µg/ml) y tilosina (<25 µg/ml), resistente a tilmicosina.

En el caso de *M. dispar* sólo la enrofloxacin tuvo valores similares entre las cepas de campo con la cepa de referencia (<25 µg/ml) por lo que se considera sensible, para los 5 antimicrobianos restantes los valores fueron de hasta 7 veces más en comparación con la cepa ATCC, denotando una resistencia bacteriana.

Florfenicol mostró una MIC con valores (1 µg/ml y 2 µg/ml) considerado como intermedio para *M. dispar* y *M. bovis*.

BIBLIOGRAFÍA

1. NMC Publication "Laboratory and Field Handbook on Bovine Mastitis" (1999) pg. 171.
2. Higuchi H, Iwano H, Gondaira S, Kawai K, Nagahata H. 2011. Prevalence of Mycoplasma species in bulk tank milk in Japan. Vet Rec. Oct 22;169(17):442.
3. Kawai K, Higuchi H, Iwano H, Iwakuma A, Onda K, Sato R, Hayashi T, Nagahata H, Oshida T. 2014. Antimicrobial susceptibilities of Mycoplasma isolated from bovine mastitis in Japan. Anim Sci J. Jan;85(1):96-9.
4. Griffin D, Chengappa MM, Kuszak J, McVey DS. 2010. Bacterial pathogens of the bovine respiratory disease complex. Vet Clin North Am Food Anim Pract. Jul;26(2):381-94.
5. Trigo Francisco J. El complejo respiratorio de los bovinos y ovinos. Ciencia veterinaria. 4-1987.
6. AMMVEB., 2016. Micoplasmosis. Cd. De México, México. Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, A.C.
<http://www.ammveb.net/clinica/micoplasmosis.pdf> (Consulta: 11 jun 2016).
7. Laak, Noordergraaf, Dieltjes, Prevalence of mycoplasmas in the respiratory tracts of pneumonic calves, Zentralbl Veterinarmed B, 39, 553-562, 1992.
8. Hirose, Kobayasji, Ito, Kawasaki, Zako, Kotani, Ogawa, Sato. Isolation of Mycoplasmas from Nasal Swabs of Calves affected with Respiratory

- Diseases and Antimicrobial Susceptibility of their Isolates. J. Vet. Med. B 50, 347-351, 2003.
9. Angen, Thomsen, Larsen, Larsen, Kokotovic, Heegaard, Enemark. Respiratory disease in calves: Microbiological investigations on trans-tracheally aspirated bronchoalveolar fluid and acute phase protein response. Vet. Microbiol, 137, 165-171, 2009.
 10. Rojas Trejo Verónica. Tipificación de micoplasmas aislados de bovinos con problemas respiratorios en México. Tesis que para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Producción de la Salud Animal, Cd. De México. Universidad Nacional Autónoma de México, 2013.
 11. Maya Rodriguez Linda Marlenne. Estandarización de la técnica pcr multiplex de las especies de mycoplasma asociadas al complejo respiratorio bovino (CRB). Tesis que para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Producción de la Salud Animal, Cd. De México. Universidad Nacional Autónoma de México. 2014
 12. Howard WW, Rosenbusch RF, Lloyd HL, Mycoplasmosis in animals: laboratory diagnosis. Ames: Iowa State University, 1994.
 13. Núñez D. Detección de mastitis bovina subclínica por micoplasmosis mediante diagnóstico serológico (prueba de ELISA indirecta) y aislamiento (Tesis de licenciatura) México (DF) México. Universidad Nacional Autónoma de México 2005; 2.

14. Maunsell FP, Woolums AR, Francoz D, Rosenbusch RF, Step DL, Wilson DJ, Janzen ED. 2011. *Mycoplasma bovis* infections in cattle. *J Vet Intern Med.* Jul-Aug;25 (4):772-83.
15. Miles K, McAuliffe L, Ayling RD, Nicholas RA. 2004. Rapid detection of *Mycoplasma dispar* and *M. bovirhinis* using allele specific polymerase chain reaction protocols. *FEMS Microbiol Lett.* Dec 1;241(1):103-7
16. Sulyok KM, Kreizinger Z, Fekete L, Hrivnák V, Magyar T, Jánosi S, Schweitzer N, Turcsányi I, Makrai L, Erdélyi K, Gyuranecz M. 2014. Antibiotic susceptibility profiles of *Mycoplasma bovis* strains isolated from cattle in Hungary, Central Europe. *BMC Vet Res.* Oct 25;10:256.
17. Pothmann H, Spersger J, Elmer J, Prunner I, Iwersen M, Klein-Jöbstl D, Drillich M. 2015. Severe *Mycoplasma bovis* outbreak in an Austrian dairy herd. *J Vet Diagn Invest.* Nov;27(6):777-83.
18. Hannan PC, Windsor GD, de Jong A, Schmeer N, Stegemann M. 1997. Comparative susceptibilities of various animal-pathogenic mycoplasmas to fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother.* 41(9):2037-40.
19. Hannan PC. 2000. Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary mycoplasma species. *International Research Programme on Comparative Mycoplasmology. Vet Res.* 31(4):373-395.

20. López Alvarado Cuauhtémoc. Estudio serológico y molecular, para determinar la presencia de *mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* sc, en unidades bovinas de producción láctea. tesis que para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Producción de la Salud Animal, Cd. De México. Universidad Nacional Autónoma de México, 2015.
21. Rosenbusch RF, Kinyon JM, Apley M, Funk ND, Smith S, Hoffman LJ. 2005. In vitro antimicrobial inhibition profiles of *Mycoplasma bovis* isolates recovered from various regions of the United States from 2002 to 2003. J Vet Diagn Invest. Sep; 17(5):436-41.
22. Gerchman I, Levisohn S, Mikula I, Lysnyansky I. 2009. In vitro antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma bovis* isolated in Israel from local and imported cattle. Vet Microbiol. 2009 Jun 12; 137 (3-4):268-75. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.01.028. Epub Jan 24.
23. Castro Méndez, María del Carmen Josefina. Concentración Mínima Inhibitoria en tres Antimicrobianos Probados con Cepas de *Mycoplasma* SPP. Proteolíticas Aisladas de Mastitis Bovina. (Tesis de licenciatura), México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México, 1994.