

## Perfil de susceptibilidad antimicrobiana en cepas de micoplasmas contaminantes en cultivos celulares



### Antimicrobial susceptibility pattern in strains of contaminating mycoplasmas in cell cultures

<https://eqrcode.co/a/9NOfbJ>

 Evelyn Lobo-Rivero <sup>1\*</sup>, Anisleidy Pérez Castillo <sup>1</sup>, Ania Ramón-Martínez <sup>1</sup>, Michel Báez Arias <sup>2</sup>, Ivette Espinosa-Castaño <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Diagnóstico de Micoplasmas (MYCOLAB), Dirección de Salud Animal, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, CP 32 700, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

<sup>2</sup>Laboratorio de Bacteriología Animal, Dirección de Salud Animal, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, CP 32 700, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

**RESUMEN:** En los cultivos celulares, los antibióticos se utilizan en el control de las contaminaciones por micoplasmas. La resistencia antimicrobiana de estos microorganismos aumentan considerablemente en los últimos años y los antibióticos de elección, como las quinolonas, los aminoglucósidos y las tetraciclinas, disminuyen su efectividad. El objetivo de este trabajo fue determinar los perfiles de susceptibilidad en cepas de micoplasmas contaminantes en cultivos celulares. Para esto se utilizaron 11 cepas de micoplasma, obtenidas del diagnóstico de contaminaciones en cultivos celulares y caracterizadas previamente por pruebas bioquímicas y genéticas. Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de las cepas frente a nueve agentes antimicrobianos que se utilizan en el trabajo rutinario con cultivos celulares y contra especies de micoplasma contaminantes. Los aislados mostraron susceptibilidad a tetraciclinas: minociclina (rango de CMI: 0,25-0,5 µg/mL) y oxitetraciclina (rango de CMI: 1-2 µg/mL) y al macrólido: tilosina (rango de CMI: 0,25-1 µg/mL); mientras que evidenciaron moderada resistencia a quinolonas: enrofloxacina (rango de CMI: 4-8 µg/mL) y ciprofloxacina (rango de CMI: 4-8 µg/mL). Un total de 10/11 cepas mostraron resistencia a los aminoglucósidos: neomicina (rango de CMI: 8-16 µg/mL), gentamicina (rango de CMI: 8-32 µg/mL), kanamicina (rango de CMI: 8-32 µg/mL) y estreptomycinina (rango de CMI: >64 µg/mL). La resistencia antimicrobiana de los micoplasmas debe ser continuamente monitoreada con vista a minimizar los cambios en la susceptibilidad y mantener eficacia antimicrobiana frente a la contaminación.

**Palabras clave:** antibiótico, cultivo celular, *Mycoplasma*, resistencia antimicrobiana.

**ABSTRACT:** Antibiotics are used in the control of mycoplasma contaminations in cell cultures. The antimicrobial resistance of these microorganisms has increased considerably in recent years and the antibiotics of choice, such as quinolones, aminoglycosides and tetracyclines, have become less effective. The aim of this work was to determine the susceptibility patterns in strains of mycoplasma contaminants in cell cultures. Eleven mycoplasma strains, derived from the diagnosis of contamination in cell cultures and previously characterized by biochemical and genetic tests, were used for this purpose. It was determined the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of strains against nine antimicrobial agents used in the routine work with cell cultures and against contaminating mycoplasma species. Isolates showed susceptibility to tetracyclines: minocycline (MIC range: 0.25-0.5 µg/mL) and oxytetracycline (MIC range: 1-2 µg/mL), and to macrolide: tylosine (MIC range: 0.25-1 µg/mL); while they showed moderate resistance to quinolones: enrofloxacin (MIC range: 4-8 µg/mL) and ciprofloxacin (MIC range: 4-8 µg/mL). A total of 10/11 strains showed resistance to aminoglycosides: neomycin (MIC range: 8-16 µg/mL), gentamicin (MIC range: 8-32 µg/mL), kanamycin (MIC range: 8-32 µg/mL), and streptomycin (MIC range: >64 µg/mL). The antimicrobial resistance of mycoplasmas should be continuously monitored with a view to minimizing changes in susceptibility and maintaining antimicrobial efficacy against contamination.

**Key words:** antibiotic, cell culture, *Mycoplasma*, antimicrobial resistance.

\*Autor para la correspondencia: Evelyn Lobo-Rivero. E-mail: [elobo@censa.edu.cu](mailto:elobo@censa.edu.cu)

Recibido: 03/11/2019

Aceptado: 10/02/2020

## INTRODUCCIÓN

El cultivo celular juega un papel importante en la biotecnología moderna y en el desarrollo de numerosos proyectos de investigación (1). La contaminación de estos cultivos por hongos y bacterias es frecuente y tratable; sin embargo, en ocasiones se produce una contaminación grave y persistente por micoplasmas (2).

Los micoplasmas, por ser microorganismos sin pared celular, no son susceptibles a las penicilinas y otros antibióticos que actúan en esta estructura (3). No son susceptibles a las sulfamidas ni al trimetropin-sulfametoxazol, ya que no sintetizan ácido fólico (4). Sin embargo, son sensibles a macrólidos, tetraciclinas que afectan la síntesis de proteínas y a quinolonas, que inhiben la replicación celular (5).

Las cepas de *Mycoplasmas* spp. incrementan la resistencia antimicrobiana considerablemente en los últimos años y los antibióticos de elección, como las quinolonas, aminoglucósidos y tetraciclinas comienzan a disminuir su efectividad (6). En la mayoría de las especies de micoplasma, la resistencia adquirida es debido a las alteraciones de las enzimas dianas o a la inducción de los sistemas activos de eflujo (7).

Una de las pruebas de mayor uso para estimar la susceptibilidad microbiana *in vitro* es la concentración mínima inhibitoria (CMI), es decir, la menor concentración de agente antimicrobiano necesario para inhibir el crecimiento de las bacterias (8). Existen varios métodos para la determinación de CMI: método de dilución en placa o en caldo que es la prueba de oro de los ensayos *in vitro* (9), test de dilución en agar (9), método de difusión en disco (10) y el E-test (11). Sin embargo, para *Mycoplasma* spp., debido a su naturaleza "fastidiosa", al pequeño tamaño de sus colonias y a los requerimientos nutricionales específicos para cada especie, en la práctica las pruebas de susceptibilidad se ejecutan esporádicamente y solo en laboratorios especializados; por este motivo existen pocos datos sobre los valores de CMI y escasos criterios armonizados (3,12).

Los micoplasmas son difíciles de erradicar en cultivos celulares debido a la resistencia a los antibióticos. Sin embargo, la terapia antibiótica es una de las principales herramientas para la

desinfección de cultivos celulares (12). Por tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar el perfil de susceptibilidad a diferentes antibióticos para cepas de micoplasmas contaminantes en cultivos celulares.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepas de micoplasmas utilizadas

Se estudiaron 11 cepas de micoplasmas, aisladas de cultivos celulares contaminados, las cuales forman parte de la colección del laboratorio MYCOLAB (CENSA, Cuba) y se encuentran conservadas con glicerol a -70°C (13). Estas cepas se identificaron por pruebas bioquímicas y ensayos de ácidos nucleicos, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) especie-específico (13) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Número y especies a las cuales corresponden las cepas de micoplasmas empleados para el estudio. / *Number and species to which the mycoplasma strains used for the study correspond.*

| No Cepas | Especies identificadas        |
|----------|-------------------------------|
| 1        | <i>Mycoplasma orale</i>       |
| 2        | <i>Mycoplasma orale</i>       |
| 3        | <i>Mycoplasma orale</i>       |
| 4        | <i>Mycoplasma hyorhinis</i>   |
| 5        | <i>Acholeplasma laidlawii</i> |
| 6        | <i>Mycoplasma hyorhinis</i>   |
| 7        | <i>Acholeplasma laidlawii</i> |
| 8        | <i>Mycoplasma arginini</i>    |
| 9        | <i>Mycoplasma fermentans</i>  |
| 10       | <i>Mycoplasma fermentans</i>  |
| 11       | <i>Mycoplasma orale</i>       |

### Antibióticos

Enrofloxacin (Fluka), tilosina (SIGMA), oxitetraciclina (SIGMA), ciprofloxacina (Fluka), minociclina (SIGMA), kanamicina (SIGMA), neomicina (SIGMA), gentamicina (SIGMA) y estreptomycin (HIMEDIA). Se prepararon soluciones *stock* equivalentes a 1000 µg/mL de cada compuesto siguiendo las instrucciones del Instituto de Estándares Clínicos (de sus siglas en inglés CLSI, *Clinical Laboratory Standards Institute*) (14).

### Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

La resistencia antimicrobiana de las 11 cepas de micoplasmas se determinó por el ensayo de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) (9), utilizando el método de microdilución en el medio Hayflick caldo (15). La concentración de los cultivos de cada aislado se ajustó a 10<sup>3</sup> UFC/mL y se corroboró mediante conteo de UFC/mL por diluciones seriadas sobre la base de 10 en medio Hayflick sólido (15). Se utilizaron placas de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano y tapa de baja evaporación (FALCON Becton Dickinson). Se realizaron diluciones sobre la base de dos (64 a 0,025 µg/mL) de los antibióticos antes mencionados en el medio Hayflick. A continuación, se añadieron a los pocillos 200 µL de cada dilución del antibiótico y 100 µL del cultivo de cada aislado a 10<sup>3</sup> UFC/mL. Las placas se sellaron e incubaron a 37°C por tres días. Se realizaron dos réplicas para cada aislado. Se utilizó como control positivo una línea de pocillos donde se encontraba la cepa en ausencia de antibiótico; se consideró crecimiento cuando se observó cambio de coloración (rojo a amarillo o rojo a fresa intenso). La CMI se definió como la menor concentración de antibiótico que inhibió el crecimiento del microorganismo y en la cual no ocurrió cambio de coloración de rojo a amarillo o rojo a fresa intenso, según Hannan (9).

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la [Tabla 2](#) se muestran los resultados del perfil de susceptibilidad *in vitro* de las 11 cepas de micoplasmas, procedentes de cultivos celulares frente a nueve agentes antimicrobianos.

Todas las cepas (100 %) resultaron sensibles a los antibióticos minociclina (rango de CMI: 0,25-0,5 µg/mL) y tilosina (rango de CMI: 0,25 a 1 µg/mL); ocho fueron sensibles a oxitetraciclina (rango de CMI: 1 a 2 µg/mL) y tres mostraron CMI equivalente a 2 µg/mL. Estos resultados coinciden con lo reportado por el Comité de Expertos sobre medicamentos para usos veterinarios (16), que recomienda el uso de macrólidos (tilosina); tetraciclinas (oxitetraciclinas y minociclina) como antimicrobianos para la eliminación de contaminaciones por micoplasmas.

Las quinolonas son de origen sintético y constituyen uno de los grupos de antimicrobianos que más se utilizan por su eficacia frente a micoplasmas (17). Su mecanismo de acción interfiere con la replicación del ADN por actuar sobre las topoisomerasas bacterianas, lo cual lleva a la muerte celular (18). Para los micoplasmas solamente se describen las mutaciones en las topoisomerasas y los sistemas de eflujo como los responsables de la disminución de la susceptibilidad a estos fármacos (19). En este caso, tanto para

**Tabla 2.** Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los antimicrobianos para cepas de micoplasmas aisladas de cultivos celulares. / *Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of antimicrobials for mycoplasma strains isolated from cell cultures.*

| Antimicrobiano  | Valor de corte de sensibilidad (µg/mL) | CMI (µg/mL) |      |     |   |   |   |   |    |    |     |     |     |     |  |
|-----------------|--|-------------|------|-----|---|---|---|---|----|----|-----|-----|-----|-----|--|
|                 |  | 0.125       | 0.25 | 0.5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64  | 128 | 256 | 512 |  |
| Ciprofloxacina  | ≤ 1                                    |             |      |     | 4 | 2 | 2 | 3 |    |    |     |     |     |     |  |
| Kanamicina      | ≤ 4                                    |             |      |     |   |   | 1 | 2 | 6  | 2  |     |     |     |     |  |
| Estreptomcina   | ≤ 4                                    |             |      |     |   |   |   |   |    |    | 11* |     |     |     |  |
| Gentamicina     | ≤ 4                                    |             |      |     |   |   |   | 2 | 5  | 4  |     |     |     |     |  |
| Tilosina        | ≤ 1                                    |             | 4    |     | 7 |   |   |   |    |    |     |     |     |     |  |
| Oxitetraciclina | ≤ 4-8                                  |             |      |     | 8 | 3 |   |   |    |    |     |     |     |     |  |
| Enrofloxacina   | ≤ 1                                    |             |      |     | 2 | 2 | 2 | 5 |    |    |     |     |     |     |  |
| Minociclina     | ≤ 1                                    |             | 4    | 7   |   |   |   |   |    |    |     |     |     |     |  |
| Neomicina       | ≤ 4                                    |             |      |     |   |   |   | 7 | 4  |    |     |     |     |     |  |

\*CMI mayor que 64 µg/mL

enrofloxacin como ciprofloxacina (quinolonas), se observó incremento en los valores de CMI hasta 8 µg/mL por encima del rango 0,125 a 4 µg/mL que refieren Prasad y Lim-Fong (20). La disminución de la susceptibilidad a las quinolonas puede estar dada por el uso frecuente que tienen estos fármacos en los últimos años; esto implica una presión selectiva sobre las poblaciones bacterianas lo cual origina cepas resistentes. Otro aspecto a tener en cuenta en este resultado, se corresponde con los sistemas de expulsión activa (19), los cuales son responsables de bajos niveles de resistencia y pueden actuar como un primer paso en el comportamiento de cepas altamente resistentes.

Por otra parte, las tetraciclinas son antibióticos de amplio espectro y se utilizan para ampliar la acción y en sinergia a otros micoplasmicidas de mayor especificidad; a nivel internacional, debido al gran uso de estos antimicrobianos se describe una alta resistencia surgida como consecuencia de la adquisición de genes *tet* (tetraciclina) y/o genes *otr* (oxitetraciclina) por parte de las bacterias, tanto comensales como patógenas (18). En tal sentido, los valores de la CMI para la oxitetraciclina (1-2 µg/mL) y la minociclina (0,25-0,5 µg/mL) demuestran que poseen efecto *in vitro* sobre las cepas en estudio. Estos resultados se relacionan con los que obtuvieron Ogawa *et al.* (21), quienes señalan valores de CMI entre 0,016-2 µg/mL.

Los agentes antimicrobianos, pertenecientes al grupo de los aminoglucósidos, exhibieron los siguientes valores de CMIs: neomicina (rango de 8 a 16 µg/mL), kanamicina (rango de 4 a 32 µg/mL), gentamicina (rango de 8 a 32 µg/mL),

estreptomocina (>64 µg/mL). Como se puede apreciar, ocurrió incremento en los valores de CMI, lo cual evidencia la presencia de cepas resistentes a estos fármacos. Estos resultados coinciden con los datos propiciados por Hannan (22) que encontraron resistencia múltiple a los aminoglicósidos en una cepa de *Mycoplasma fermentans*. Este resultado en los cultivos celulares puede ser debido a la exposición a estreptomocina y otros aminoglucósidos durante los intentos de eliminar las infecciones bacterianas de los cultivos de células.

Una de las dificultades en las pruebas de susceptibilidad microbiana, como la determinación de CMI para micoplasmas, es la ausencia de consenso en cuanto a los procedimientos, lo cual afecta notablemente la comparación de los resultados. Para una misma especie, como *M. gallisepticum*, es posible emplear diferentes medios de cultivo, FM4, Frey, Friis o Hayflick. Además, la carencia de cepas para el control de calidad también afecta la comparación entre los resultados de diferentes laboratorios (16,19,23).

La Tabla 3 agrupa a los diferentes antimicrobianos de acuerdo al comportamiento de las cepas y su clasificación como sensibles, medianamente resistentes y resistentes. Las cepas de micoplasmas fueron susceptibles a los fármacos de la familia de los macrólidos y las tetraciclinas; en cambio, mostraron una resistencia moderada a las quinolonas y resistencia a los aminoglucósidos.

El fenotipo de múltiple resistencia a antimicrobianos se puede definir como el resultado de una combinación de mecanismos y

**Tabla 3.** Concentración Mínima Inhibitoria (CMIs) de los antibióticos usados en este estudio. / *Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the antibiotics used in this study.*

| Susceptibilidad          | Familia de Fármacos | Fármacos        | Rango de valores de la CIM |
|--------------------------|---------------------|-----------------|----------------------------|
| Susceptible              | Tetraciclinas       | Minociclina     | 0,25-0,5 µg/mL             |
|                          |                     | Oxitetraciclina | 1-2 µg/mL                  |
| Moderadamente resistente | Macrólidos          | Tilosina        | 0,25-1 µg/mL               |
|                          | Quinolonas          | Enrofloxacin    | 4-8 µg/mL                  |
|                          |                     | Ciprofloxacina  | 4-8 µg/mL                  |
| Resistente               | Aminoglucósidos     | Neomicina       | 8-16 µg/mL                 |
|                          |                     | Gentamicina     | 8-32 µg/mL                 |
|                          |                     | Kanamicina      | 8-32 µg/mL                 |
|                          |                     | Estreptomocina  | > 64 µg/mL                 |

reacciones por parte de la célula bacteriana que tiene como consecuencia la disminución de susceptibilidad a múltiples antimicrobianos (9,23). Algunos *loci* cromosomales, tales como *marRAB*, *soxR* y *rob*, controlan la expresión de múltiples genes, de manera que son capaces de desatar en la célula bacteriana cambios que influyen en los niveles de resistencia a diferentes antimicrobianos (23).

Los micoplasmas no poseen pared celular y los sistemas de expulsión activa, responsables del desarrollo de resistencia a las quinolonas, poseen como sustrato a otros antimicrobianos como los aminoglucósidos, lo que puede explicar que desarrollen un fenotipo de múltiple resistencia a los antimicrobianos (21).

Los sistemas de expulsión activa no son por sí solos capaces de provocar una resistencia clínica, su importancia reside en el hecho de que se asocian con otros mecanismos de resistencia y se potencian entre sí (18). Los resultados en este trabajo coinciden con lo señalado por estos autores, pues se evidencia una resistencia marcada a los aminoglucósidos unido a niveles de resistencia moderados frente a las quinolonas.

La Tabla 4 relaciona el comportamiento de las cepas en cuanto a la susceptibilidad antimicrobiana. Los criterios de clasificación en susceptibles, moderada resistencia y resistencia se realizó según los criterios de Hannan (9), quien basó dicha clasificación en correspondencia con los valores obtenidos por CMIs.

Estos resultados evidencian que las cepas de micoplasmas, derivadas de cultivos celulares contaminados, pueden variar en cuanto a su susceptibilidad. Esto propicia que los fármacos disponibles no inhiban el crecimiento de todas las especies de micoplasmas y, por tanto, la selección y aplicación de antibióticos pueden convertirse en un problema como práctica para evitar posibles contaminaciones por micoplasmas.

La mejor opción para tratar cultivos celulares contaminados con *Mycoplasma* spp. es su eliminación y reemplazo por otros cultivos nuevos y frescos libres de *Mycoplasma* spp., pero esto no es siempre posible y una práctica común es el uso de antibióticos (13). En varios estudios (12,24,25) se reporta que la resistencia a antibióticos puede ser inducida con bastante facilidad para micoplasmas y se advierte sobre el uso indiscriminado y continuo de una variedad de antibióticos en los cultivos celulares como medida profiláctica. Tal práctica podría resultar en el desarrollo de cepas de micoplasmas resistentes a antibióticos y persistentes (26).

Las vías para adquirir la resistencia en las cepas de *Mycoplasma* spp. se relacionan con la fuente de su procedencia. Algunos de los componentes que se utilizan como suplementos en los medios de cultivos celulares, como es el caso del suero tiene como fuente un origen animal, donde se hace uso de antibióticos para el control de la salud. Estos antibióticos constituyen una fuerza para la selección de cepas que adquieren resistencia (27,28).

**Tabla 4.** Frecuencia de cepas sensibles a los antimicrobianos. / *Frequency of antimicrobial sensitive strains.*

| Antimicrobiano  | Puntos de cortes ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) |          |           | No. de cepas sensibles/ Total |
|-----------------|--|----------|-----------|-------------------------------|
|                 | criterios (9)                                |          |           |                               |
|                 | S  | I        | R         |                               |
| Tilosina        | $\leq 1$                                     |          | $> 1$     | 11/11                         |
| Oxitetraciclina | $\leq 4-8$                                   | $\leq 8$ | $> 8$     | 11/11                         |
| Gentamicina     | $\leq 4$                                     | 8        | $\geq 16$ | 0/11                          |
| Ciprofloxacina  | $\leq 1$                                     | $\leq 2$ | $\geq 16$ | 4/11                          |
| Enrofloxacin    | $\leq 1$                                     |          | $> 1$     | 2/11                          |
| Kanamicina      | $\leq 4$                                     | 8        | $\geq 16$ | 1/11                          |
| Estreptomycin   | $\leq 4$                                     | 8-16     | $\geq 32$ | 0/11                          |
| Minociclina     | $\leq 1$                                     | $\leq 4$ | $\geq 32$ | 11/11                         |
| Neomicina       | $\leq 4$                                     | 8        | $\geq 16$ | 0/11                          |

El presente estudio permitió determinar los valores de la CMI para los agentes antimicrobianos que se utilizan en el trabajo rutinario con cultivos celulares y contra especies de micoplasmas contaminantes de estos, los cuales están en correspondencia con los valores que se describen a nivel mundial (29,30). El conocimiento de los valores de CMI son de gran utilidad para su aplicación en el tratamiento de los cultivos celulares contaminados y para realizar ajustes a las dosis, acorde a estos datos. Las cepas de micoplasmas procedentes, de contaminaciones en cultivos celulares, presentan resistencia antimicrobiana a los aminoglucósidos y quinolonas. La susceptibilidad antimicrobiana de especies de micoplasmas debe ser continuamente monitoreada con el objetivo de minimizar los cambios en la susceptibilidad y mantener eficacia antimicrobiana frente a la contaminación.

## REFERENCIAS

1. Fader CM, Medero A, Furlán M, Colombo MI, editors. Observación de Mycoplasma spp. por microscopía electrónica, tratamiento, eliminación y confirmación por PCR anidada. 10th Inter-American Congress on Electron Microscopy (CIASEM 2009). 2009.
2. Razin S, Yogev D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Microbiol Mol Biol Rev. 1998;62(4):1094-1156.
3. Rivera-Tapia JA, Cedillo-Ramírez ML, Vega-Benítez M. Micoplasmas y su importancia médica. Rev Biomed. 2001;12(4):262-271.
4. Fagundo-Sierra R, Sánchez-Saínz A, Pérez-Jáuregui J. Resistencia in vitro de aislamientos clínicos de Mycoplasma hominis y Ureaplasma urealyticum en México. Bioquímica. 2006;31(4):124-131.
5. Waites KB, Katz B, Schelonka RL. Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens. Clin Microbiol Rev. 2005;18(4):757-789.
6. Hilliard NJ, Duffy LB, Crabb DM, Waites KB. In vitro comparison of agar and microbroth dilution methods for determination of MICs for Mycoplasma hominis. J Microbiol Meth. 2005;60:285-288.
7. Hirose K, Kawasaki Y, Kotani K, Abiko K, Sato H. Characterization of a point mutation in the parC gene of Mycoplasma bovirhinis associated with fluoroquinolone resistance. Journal of veterinary medicine B. InfectDis Vet Pub Health. 2004;51(4):169-175.
8. Taroco R, Seija V, Vignoli R. Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. Temas de Bacteriología y Virología médica. Mexico. 2006. p. 663-671.
9. Hannan PC. Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary mycoplasma species. Vet Res. 2000;31(4):373-395.
10. Ross JE, Scangarella-Oman NE, Flamm RK, Jones RN. Determination of disk diffusion and MIC quality control guidelines for GSK2140944, a novel bacterial type II topoisomerase inhibitor antimicrobial agent. Journal of clinical microbiology. 2014;52(7):2629-2632.
11. Sader HS, Pignatari AC. E test: a novel technique for antimicrobial susceptibility testing. Sao Paulo Med J. 1994;112(4):635-638.
12. Medvedeva ES, Baranova NB, Mouzykantov AA, Grigorieva TY, Davydova MN, Trushin MV, et al. Adaptation of Mycoplasmas to Antimicrobial Agents: Acholeplasma laidlawii Extracellular Vesicles Mediate the Export of Ciprofloxacin and a Mutant Gene Related to the Antibiotic Target. The Scientific World Journal. 2014:1-7.
13. Pérez A. Detección y caracterización de contaminaciones por micoplasmas en cultivos celulares y productos biotecnológicos. (Tesis en Opción al Grado de Master en Microbiología, Mención Bacteriología-parasitología). Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. 2017.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Analysis and Presentation of Cumulative Antimicrobial Susceptibility TestData; Approved Guideline. Fourth Edition. CLSI document M39-A4. CLSI, Wayne, Pennsylvania, USA, 2016.
15. Tully JG, Razin S. Methods in Mycoplasmaology. 2 ed. New York and London: Academic Press. 1983.

16. CVMP. Guidelines for environmental impact assessment for veterinary medicinal products. EMEA/CVMP/ERA/4182/2005-corr. EMEA, London. 2007.
17. Van Bambeke F, Michot JM, Van Eldere J, Tulkens PM. Quinolones in 2005: an update. *Clin Microbiol Infect.* 2005;11(4):256-280.
18. Duque A, Pérez A, Espinosa I, Lobo E. Resistencia antimicrobiana de aislados cubanos de *Mycoplasma gallisepticum*. *Rev Salud Anim.* 2017;39(1):28-34.
19. Antunes NT. Mecanismos de resistencia a las quinolonas en *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC. España: Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. 2007.
20. Prasad E, Lim-Fong R. *Mycoplasma* detection and elimination. Abstract Book of 14th International Congress of the International Organization of Mycoplasmology (IOM). 2002; Viena, Austria.
21. Ogawa M, Uchiyama T, Satoh M, Ando S. Decontamination of mycoplasma-contaminated *Orientia tsutsugamushi* strains by repeating passages through cell cultures with antibiotics. *BMC Microbiol.* 2013;13:32.
22. Hannan PC. Antibiotic susceptibility of *Mycoplasma fermentans* strains from various sources and the development of resistance to aminoglycosides in vitro. *J Med Microbiol.* 1995;42(6):421-428.
23. Meng DY, Sun CJ, Yu JB, Ma J, Xue WC. Molecular mechanism of fluoroquinolones resistance in *Mycoplasma hominis* clinical isolates. *Braz J Microbiol.* 2014;45(1):239-242.
24. Raheison S, Gonzalez P, Renaudin H, Charron A, Bébéar C, Bébéar CM. Evidence of active efflux in resistance to ciprofloxacin and to ethidium bromide by *Mycoplasma hominis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(3):672-679.
25. Perlman D, Rahman SB, Semar JB. Antibiotic control of *Mycoplasma* in tissue culture. *Appl Microbiol.* 1967;15(1):82-85.
26. Jin LY, Hyoung-Joon M, Bo-Kyu K, Man KJ, Wan-Kyu L. In vitro antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma hyorhinis* field isolates collected from swine lung specimens in Korea. *J Swine Health Prod.* 2014;22(4):193-196.
27. Gautier-Bouchardon AV. Antimicrobial Resistance in *Mycoplasma* spp., *Microbiol Spectrum* 6(4):ARBA-0030-2018. doi:10.1128/microbiolspec.ARBA-0030-2018.
28. Cord C, Uphoff, Sabine-A. Denkmann, Hans G. Drexler Treatment of *Mycoplasma* Contamination in Cell Cultures with Plasmocin *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012, 8 pages doi:10.1155/2012/26767.
29. Soehnlen MK, Kunze ME, Karunathilake KE, Henwood BM, Kariyawasam S, Wolfgang DR, et al. In vitro antimicrobial inhibition of *Mycoplasma bovis* isolates submitted to the Pennsylvania Animal Diagnostic Laboratory using flow cytometry and a broth microdilution method. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.* 2011;23(3):547-551.
30. Wu CC, Shryock TR, Lin TL, Faderan M, Veenhuizen MF. Antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma hyorhinis*. *Vet Microbiol.* 2000;76(1):25-30.

**Contribución de los autores:** Evelyn Lobo-Rivero: Diseño de la investigación, análisis, discusión y escritura de resultados. Anisleidy Pérez Castillo: Ejecución de ensayos, análisis y discusión de resultados. Ania Ramón-Martínez: Ejecución de ensayos; Michel Báez-Arias: Análisis de resultados; Ivette Espinosa-Castaño: Análisis, discusión y escritura de resultados.

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)