



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

**Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS**

**CONTROL DE LA ANTIBIOTICORRESISTENCIA EN *Escherichia coli*
ENFOQUE FARMACOLÓGICO EN EL SISTEMA
ANIMAL-AMBIENTE-HOMBRE**

Autor: Méd. Vet. María Laura Marchetti

Directores: Prof. Dra. Nora Mestorino

Co-director: Prof. Dr. Jorge O. Errecalde

Lugar de Trabajo: Curso de Farmacología Especial y Toxicología, Facultad de
Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata

Miembros del Jurado: Dr. Gabriel Gutkind; Dr. Néstor Stanchi; Dra. Susana Levalle

2013

En memoria de mi padre
Miguel Leonardo Marchetti

A mi familia,

Jorge, Matías y Micaela

Por quienes todo el esfuerzo en este camino recorrido valió la pena

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a la Universidad Nacional de La Plata por darme la posibilidad de realizar mi Tesis Doctoral, a la Facultad de Ciencias Veterinarias, lugar donde llevé adelante este proyecto y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por el apoyo durante los cinco años como becaria doctoral.

A mis directores Nora Mestorino y Jorge Errecalde por guiarme pacientemente en estos años de trabajo, y ayudarme a crecer profesionalmente.

A mi directora Nora Mestorino especialmente, por permitirme trabajar con libertad, por su constante estímulo diario y por enseñarme que cualquier obstáculo puede ser vencido por más grande que este sea para alcanzar una meta.

A todos mis compañeros de trabajo de la Cátedra de Farmacología Especial y Toxicología, los que están y los que estuvieron, que pusieron su granito de arena para que este proyecto se hiciera realidad. Especialmente a Martín Quintero, Griselda Haag, Carlos Valle, Nadia Remezovsky, Alejandro Moncada, Martín Daniele, Martín Dadé, Andrea Buchamer.

A Bárbara Huber, Mariana Lucas y Andrea Lambertini quienes me ayudaron en absolutamente todo y que son un gran legado que me dejó este trabajo, mis amigas incondicionales.

A Roberto Vaca, Mariana Cebrián y Sergio Eyherabide por facilitarme la realización de los muestreos, por su paciencia, su colaboración y compromiso.

A los propietarios y al personal de los establecimientos tamberos donde realizamos las tomas de muestras, por su gran predisposición y amabilidad.

A la Cátedra de Tecnología de los Alimentos por abrirme las puertas y ayudarme a dar los primeros pasos en el aprendizaje de la microbiología.

Al Prof. Dr. Hiroshi Nikaido de la Universidad de California, Berkeley; y a la Dra. Laura McMurry de Tufts University School of Medicine, Boston quienes gentil y desinteresadamente nos donaron las cepas de *E. coli* isogénicas, que resultaron fundamentales para el desarrollo de la experimentación.

A María Laura Láttaro mi gran amiga de toda la vida, por su gran apoyo y sostén en momentos de flaqueza.

A mis padres, por ser el ejemplo más importante de mi vida y creer incondicionalmente en mí, por su eterno apoyo moral, su presencia y su contención.

A mi madre, que a pesar de la adversidad y las ausencias, me dio fuerzas para seguir adelante con su gran energía y su fortaleza.

A mis hermanos, mis sobrinos y a mis segundas madres, mis tías Juani e Isabel, por estar siempre presentes.

A Rosi y Juanjo por cuidarme, quererme y contenerme como mis verdaderos padres.

A todos aquellos que dentro y fuera del ámbito académico me han acompañado, ayudado, contenido, y soportado para concluir esta Tesis Doctoral.

Y por último, el mayor de los agradecimientos es a mis grandes amores, Jorge y mis hijos Matías y Micaela, mis pilares, mi motor, por quienes todo el camino recorrido y por recorrer, tuvo y tiene sentido.

TÍTULOS Y RESÚMENES

Título: Control de la antibioticorresistencia en *Escherichia coli*. Enfoque farmacológico en el sistema animal-ambiente-hombre

Palabras claves: *E. coli* – multirresistencia antibacteriana – bombas de eflujo – 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine -

Resumen

El objetivo central del presente trabajo de Tesis Doctoral fue restablecer *in vitro* la susceptibilidad antimicrobiana de cepas comensales de *Escherichia coli* (con fenotipo multirresistente-MDR-) aisladas de explotaciones pecuarias, mediante la asociación de diferentes antimicrobianos con el inhibidor de bombas de eflujo 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine (NMP).

De esta manera, se pretende contribuir al desarrollo de planes de dosificación de máxima eficacia antimicrobiana minimizando el riesgo de emergencia y diseminación de resistencia bacteriana; permitiendo así la obtención de productos de origen animal de excelencia sanitaria, en función de la correcta interpretación de los parámetros farmacocinéticos/farmacodinámicos (modelización PK/PD) para una correcta dosificación, del mecanismo de resistencia y del eventual bloqueo de éste último.

Se obtuvieron muestras de materia fecal mediante hisopado rectal de vacas en ordeño, terneros y animales de compañía, pertenecientes a tambos de la provincia de Buenos Aires; así como también de pozos sépticos, agua de consumo y bombas estercoleras.

Se determinaron los perfiles de sensibilidad, mediante el método estandarizado de Kirby-Bauer de difusión en agar, frente a ocho antimicrobianos a todas las cepas de *E.coli* aisladas. Se hallaron diez cepas de *E. coli multirresistentes* a partir de los animales muestreados en el estudio de tipo transversal. Se emplearon cepas isogénicas de *E. coli* con diferentes grados de expresión de bombas de eflujo como control de calidad (AG100A con delección total de bombas de eflujo, AG100 como cepa "normal" y AG112 con sobreexpresión de bombas). Se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM) de florfenicol, ciprofloxacina, tetraciclina y ampicilina por el método de microdilución seriada en caldo Luria-Bertani (LB) con y sin NMP.

Para la determinación de las interacciones entre los tres antimicrobianos seleccionados (florfenicol, ciprofloxacina y tetraciclina) y el inhibidor de bombas se calculó el Índice de Concentración Inhibitoria Fraccionaria (CIF) a fin de evaluar la manifestación o no de efecto sinérgico.

Para evaluar la cinética de muerte bacteriana se realizaron curvas de muerte bacteriana de las cepas de referencia y las cepas de campo MDR con y sin NMP. Con los datos obtenidos se realizó el análisis estadístico correspondiente.

Por último, a partir de la información farmacodinámica obtenida se realizó una modelización farmacocinética/farmacodinámica (PK/PD), para lo cual se utilizaron datos obtenidos de estudios farmacocinéticos de florfenicol, danofloxacina y oxitetraciclina realizados previamente por el grupo de investigación de la Cátedra de Farmacología.

Se aislaron cepas resistentes y multirresistentes con altos niveles de resistencia frente a tetraciclina y ampicilina. Todas las combinaciones de resistencia múltiple siempre incluyeron en su perfil a la tetraciclina. El NMP asociado a ampicilina tuvo un efecto nulo tanto en las cepas isogénicas como en las de campo. Sin embargo, ciprofloxacina, florfenicol y tetraciclina, demostraron ser claros sustratos de las bombas.

Se evidenció la ocurrencia de sinergismo de potenciación ya que con una concentración de antimicrobiano varias veces inferior a la de su CIM, se logró un efecto antibacteriano mejorado con la incorporación de NMP.

Se comprobó que es posible disminuir la concentración de los antimicrobianos -florfenicol, ciprofloxacina y tetraciclina- con la incorporación de NMP, sin modificar de manera importante la "cinética de muerte bacteriana", tanto en las curvas de muerte de las cepas de referencia como en las cepas problema.

En cuanto a la relación PK/PD, en la cepa AG112 se mejoraron notablemente los parámetros predictores de eficacia con la adición del inhibidor, con la consecuente disminución de la concentración de los antimicrobianos.

Resulta prometedor el efecto de la combinación de un fármaco inhibidor de bombas de eflujo como coadyuvante de aquellos antimicrobianos sustratos de las bombas de eflujo sobreexpresadas como mecanismo inespecífico de resistencia bacteriana.

Title: Control of antibiotic-resistance in *Escherichia coli*. Pharmacological approach in the animal-environment-man system

Key Words: *E. coli* – multidrug resistance – efflux pump – 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine -

Summary

The main objective of this work was to restore *in vitro* antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* commensal strains (MDR-multidrug resistance phenotype-) isolated from livestock farms, by associating different antimicrobials with the efflux pump inhibitor 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine (NMP).

By this way, we pretend to contribute to the development of dosage schedules which maximizes antimicrobial efficacy, minimizing the risk of emergence and spread of bacterial resistance; allowing the generation of animal products of excellence, based on the correct interpretation of the pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters (PK/PD modeling) to dose correctly, the knowledge of the resistance mechanisms and the eventual inhibition of them.

Faeces samples were collected by rectal swabs from dairy cattle, calves and pets, from commercial farms located in Buenos Aires province; as well as septic tanks, drinking water and effluents.

Susceptibility profiles were determined by standardized Kirby-Bauer agar diffusion test, eight antimicrobials were used against all strains of *E. coli* isolated.

Ten *E. coli* multiresistant strains were found from animals sampled in the cross-sectional study. *E. coli* isogenic strains with different efflux pump expression level, were used as a quality control (AG100A with total deletion of efflux pumps; AG100 as "wild type strain" and AG112 with overexpressing of efflux pumps). We determined the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of florfenicol, ciprofloxacin, tetracycline and ampicillin by serial microdilution method in Luria-Bertani (LB) with and without NMP.

Fractional Inhibitory Concentration Index (FIC) was calculated to measure the interaction between the three selected antimicrobials (florfenicol, tetracycline and ciprofloxacin) and the pump inhibitor due to study the occurrence of synergistic effect or not.

To evaluate the kinetics of bacterial death, we performed bacterial killing curves with reference and MDR-field strains, with and without NMP. Statistical analysis was performed.

Finally, pharmacodynamic information obtained was used to make a pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) modeling, to which end we used pharmacokinetic data from studies of florfenicol, oxytetracycline and danofloxacin previously made by the research group of the Department of Pharmacology.

Resistant and multiresistant strains were isolated from different kinds of samples. There were high levels of tetracycline and ampicillin resistance. In every multiresistance profile, resistance to tetracycline was expressed. The association between NMP and ampicillin had no effect both against isogenic strains nor in field ones. However, it was demonstrated that ciprofloxacin, tetracycline and florfenicol were good substrates for efflux pumps.

It was evident that there was potentiating synergism with the addition of the efflux pump inhibitor to the antimicrobial, since a lower antimicrobial concentration than the CIM without NMP, achieved a better antibacterial effect when combining with the inhibitor.

It was proved that it is possible to decrease the antimicrobial concentrations -florfenicol, tetracycline, ciprofloxacin-, when they were combined with NMP, without modifying the "bacterial killing kinetics" significantly, against reference and field MDR strains.

PK/PD efficacy predictor parameters improved significantly with the addition of the efflux pump inhibitor against AG112 strain, with the consequent reduction of the antimicrobials concentrations.

The effect of the combination of an efflux pump inhibitor as a co-adjuvant to antimicrobials substrates of overexpressed efflux pumps such as nonspecific bacterial mechanism is promising.

INDICE

TÍTULOS Y RESÚMENES	I
INDICE.....	V
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	VIII
I. INTRODUCCIÓN.....	14
I.1. Fundamentos de la elección del tema	14
I.2. Revisión bibliográfica	17
<i>I.2.1. Resistencia bacteriana a los antimicrobianos.....</i>	<i>17</i>
<i>I.2.2. Formas de resistencia bacteriana</i>	<i>19</i>
<i>I.2.3. Mecanismos bioquímicos implicados en la resistencia.....</i>	<i>21</i>
I.3. Microbiota bacteriana habitual	30
<i>I.3.1. Microbiota intestinal.....</i>	<i>31</i>
<i>I.3.2. Microbiota intestinal como reservorio de genes de resistencia.....</i>	<i>32</i>
I.4. Importancia de la resistencia y la multiresistencia bacteriana en el.....	38
I.5. Uso racional de los antibióticos	40
<i>I.5.1. Parámetros farmacocinéticos que más se vinculan con la eficacia antibacteriana</i>	<i>43</i>
<i>I.5.2. Parámetros farmacodinámicos.....</i>	<i>45</i>
<i>I.5.3. Parámetros farmacocinéticos-farmacodinámicos (PK/PD).....</i>	<i>46</i>
<i>I.5.4. Importancia de la relación PK/PD en la prevención de la selección de</i>	<i>50</i>
<i>resistencia bacteriana a los antimicrobianos</i>	<i>50</i>
I.6. Antibióticos afectados por sistemas de eflujo bacteriano como mecanismo.....	53
causal de multiresistencia en bacterias Gram-negativas.....	53
I.7. Estrategias para modificar la resistencia bacteriana por eflujo	63
I.8. La multiresistencia y la actualidad	65
I.9. Hipótesis	66
I.10. Objetivos.....	67
II. MATERIALES Y METODOS	70
II.1. MATERIALES.....	70
<i>II.1.1. Productos biológicos y medios para microbiología.....</i>	<i>70</i>
<i>II.1.2. Reactivos, solventes y diluyentes para microbiología.....</i>	<i>70</i>

II.1.3. Productos farmacológicos.....	71
II.1.4. Material descartable y de laboratorio.....	71
II.1.5. Instrumental y equipamiento.....	73
II.1.6. Equipamiento informático.....	73
II.2. METODOS	74
II.2.1. Diseño experimental.....	74
II.2.2. Selección de explotaciones agropecuarias	74
II.2.3. Aislamiento, identificación y selección de cepas de <i>Escherichia coli</i>	74
II.2.4. Estudio de susceptibilidad por antibiograma.....	84
II.2.5. Prueba cuantitativa para evaluar la disminución de la susceptibilidad	89
II.2.6. Concentración bactericida mínima (CBM).....	103
II.2.7. Curva de muerte o letalidad bacteriana (CLB).....	104
II.2.8. Modelización PK/PD.....	109
II.2.9. Realización de un análisis de riesgo de transferencia de resistencias entre.....	115
III. RESULTADOS	117
III.1. Selección de explotaciones agropecuarias	117
III.2. Muestras obtenidas para aislamiento de cepas de <i>E. coli</i> multirresistentes.....	117
III.3. Estudio de susceptibilidad por antibiograma	118
III.3.1. Selección de cepas de <i>Escherichia coli</i> multirresistentes.....	123
III.4. Prueba cuantitativa para evaluar la disminución de la susceptibilidad bacteriana	127
III.4.1. Efectos de la combinación de los antimicrobianos con el inhibidor de bombas NMP en las cepas mutagénicas.....	127
III.4.2. Efectos de la combinación de los antimicrobianos con el inhibidor de bombas NMP en las cepas de campo de <i>E. coli</i> MDR.....	136
III.4.3. Índice de Concentración Inhibitoria Fraccionada (CIF).....	162
III.5. Evaluación de variables farmacodinámicas de primera exposición	168
III.5.1. Concentración bactericida mínima (CBM).....	168
III.5.2. Curva de letalidad bacteriana (CLB).....	175
III.6.1. Estudios farmacocinéticos.....	213
III.6.2. Integración PK/PD.....	215
III.7. Realización de un análisis de riesgo de transferencia de resistencias entre animales-medio y el hombre	218
III.7.1. Detección de puntos críticos dentro del tambo.....	219
III.7.2. Detección de puntos críticos fuera del tambo.....	222

IV. DISCUSIÓN.....	226
IV.1. Selección de explotaciones agropecuarias.....	226
IV.2. Aislamiento, identificación y selección de cepas de <i>Escherichia coli</i>.....	226
IV.3. Estudio de susceptibilidad por antibiograma	227
IV.4. Prueba cuantitativa para evaluar la susceptibilidad	237
<i>IV.4.1. Concentración inhibitoria mínima.....</i>	<i>237</i>
<i>IV.4.2. Concentración efectiva mínima de NMP (MEC).....</i>	<i>244</i>
<i>IV.4.3. Interacciones entre los antimicrobianos y el NMP.....</i>	<i>244</i>
IV.5. Concentración bactericida mínima	246
IV.6. Curvas de letalidad bacteriana	248
<i>IV.6.1. Florfenicol.....</i>	<i>249</i>
<i>IV.6.2. Ciprofloxacina.....</i>	<i>251</i>
<i>IV.6.3. Tetraciclina.....</i>	<i>252</i>
<i>IV.6.4. Análisis estadístico de las curvas de letalidad bacteriana.....</i>	<i>254</i>
IV.7. Estudios farmacocinéticos.....	258
IV.7.1. Integración PK/PD.....	258
<i>IV.7.1.1. Fenicoles.....</i>	<i>258</i>
<i>IV.7.1.2. Fluoroquinolonas.....</i>	<i>259</i>
<i>IV.7.1.3. Tetraciclinas.....</i>	<i>261</i>
IV.8. Análisis de riesgo de transferencia de resistencias entre animales-medio y el hombre	262
<i>IV.8.1. Recomendaciones.....</i>	<i>263</i>
V. CONCLUSIONES.....	276
VI. ANEXO	280
VI.1. ANEXO A	280
VI.2. ANEXO B.....	294
VI.3. ANEXO C.....	298
VI.4. ANEXO D	307
VI.5. ANEXO E	310
VII. REFERENCIAS.....	359

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ABCC ₀₋₂₄	Área bajo la curva control de crecimiento bacteriano, sin antimicrobiano en función del tiempo de t ₀ a t ₂₄
ABCC ₀₋₄₈	Área bajo la curva control de crecimiento bacteriano, sin antimicrobiano en función del tiempo de t ₀ a t ₄₈
ABC/CIM	Área bajo la curva concentración tiempo dividida por la concentración inhibitoria mínima
ABC _{0-∞}	Área bajo la curva concentración en función del tiempo extrapolada al infinito
ABC ₀₋₂₄	Área bajo la curva de concentración en función del tiempo desde el tiempo 0 a 24 hs
ABC ₀₋₄₈	Área bajo la curva de concentración en función del tiempo desde el tiempo 0 a 48 hs
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMC	Amoxicilina con ácido clavulánico
AMP	Ampicilina
ANOVA	Análisis de la varianza
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
ATB	Antimicrobiano
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosín trifosfato
BLEES	Beta-lactamasas de espectro extendido
CBM	Concentración bactericida mínima
CEF	Ceftiofur
CIF	Acrónimo del inglés concentración inhibitoria fraccionaria
CIM	Concentración inhibitoria mínima
CIM ₅₀	Concentración inhibitoria mínima capaz de inhibir al 50% de los aislamientos evaluados
CIM ₉₀	Concentración inhibitoria mínima capaz de inhibir al 90% de los aislamientos evaluados
CIM ₉₉	Concentración inhibitoria mínima capaz de inhibir al 99% de los aislamientos evaluados
CIP	Ciprofloxacina
CLB	Clearance

CLB	Curva de letalidad bacteriana
CBM	Concentración bactericida mínima
CLSI	Acrónimo del Instituto de Estandarización de Procedimientos de Laboratorios Clínicos de E.E.U.U. (ex NCCLS)
CMP	Acrónimo inglés de proteína de membrana citoplasmática
$C_{m\acute{a}x}$	Concentración máxima
$C_{m\acute{a}x}/CIM$	Concentración máxima dividida por la CIM
CNS	Acrónimo inglés de <i>Staphylococcus coagulasa negativo</i>
CPM	Concentración preventiva de mutantes
Ctrl+	Control positivo de crecimiento bacteriano
Ctrl-	Control negativo
CV	Coefficiente de variación
DAN	Danofloxacina
DE	Desviación estándar
DMSO	Dimetilsulfóxido
ds	Días
EMB	Medio de cultivo agar eosina azul de metileno
EPA	Efecto post-antibiótico
EPI	Acrónimo inglés de Inhibidor de bombas
ETA	Eficacia total del antibiótico
ER	Error relativo
F	Biodisponibilidad
FLR	Florfenicol
FQ	Fluoroquinolonas
g	Gramo
GEN	Gentamicina
h	Hora/s
HACCP	Análisis de riesgos y control de puntos críticos
HLC	Hidroclorado
HPLC	Acrónimo inglés de cromatografía líquida de alta resolución
I	Sensibilidad intermedia
IMViC	Pruebas bioquímicas para identificar formación de indol, prueba del rojo de metilo, reacción de Voges-Proskauer y utilización del citrato
k	Constante de pasaje

Kg	Kilogramo
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
LMR	Límite máximo de residuos
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
Log ₁₀	Logaritmo en base 10
M	Molaridad
MATE	Acrónimo inglés de familia de extrusión de multifármacos y tóxicos
MEC	Mínima concentración efectiva
MFS	Acrónimo inglés de superfamilia del facilitador mayor
MFP	Acrónimo inglés de proteína de fusión de membrana
MDR	Acrónimo inglés de resistencia a múltiples drogas
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitro
MLS _B	Fenotipo de resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas
mm	Milímetro
MS _B	Fenotipo de resistencia a macrólidos y estreptograminas
n	Número de mediciones
nm	Nanómetro
N	Normalidad
NP	Valores no publicados
NMP	Número más probable
NMP	1-(1-naphthylmethyl)piperazine
°C	Grados centígrados
OMP	Acrónimo inglés de proteína de membrana externa
OTC	Oxitetraciclina
<i>P</i>	Probabilidad
p/p	Relación peso/peso
p/v	Relación peso/volumen
PBP	Proteína de unión a las penicilinas
PD	Acrónimo del inglés de farmacodinamia
pH	Logaritmo de la inversa de la concentración de hidrogeniones
PK	Acrónimo del inglés de farmacocinética

PK/PD	Relación farmacocinética -farmacodinámica
PM	Peso molecular
POEs	Procedimientos Operativos Estándares
QC	Control de calidad
QRDRs	Acrónimo del inglés regiones determinantes de resistencia a las quinolonas
r	Coefficiente de correlación
r ²	Coefficiente de determinación
R	Resistente
RND	Acrónimo inglés de familia de resistencia a división por nodulación
RM	Rojo de metilo
SIM	Medio de cultivo sólido para medir formación de sulfuro, indol y motilidad
SMR	Acrónimo inglés de familia de resistencia pequeña a multifármacos
s	Segundos
S	Sensible
T _{1/2ab}	Semivida de absorción
T _{1/2β}	Semivida de eliminación
T>CIM	Tiempo durante el cual la concentración sérica excede la CIM del patógeno
T _{máx}	Tiempo al que se produce la concentración máxima
TET	Tetracilina
TMS	Trimetoprima/sulfametoxazol
TSI	Medio de cultivo agar tripe azúcar hierro
UDP	Uridin difosfato
UFC	Unidades formadoras de colonias
UFC/mL	Unidades formadoras de colonias por mililitro
UI	Unidad internacional
v/v	Relación volumen/volumen
Vdβ	Volumen de distribución corporal
VSM	Ventana de selección de mutantes
VP	Voges-Proskauer
\bar{X}	Media aritmética
μg	Microgramo
μL	Microlitro
μm	Micrometro

∞	Infinito
α	Nivel de significación
$>$	Mayor que
$<$	Menor que
\pm	Más o menos
\leq	Menor o igual que
\geq	Mayor o igual que
$\%$	Porcentaje

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Fundamentos de la elección del tema

La resistencia bacteriana a los antimicrobianos representa un problema extremadamente severo para salud pública. Existen determinados tipos de infecciones en seres humanos, generadas por microorganismos multirresistentes, para las que ya no hay terapia eficaz (1, 2, 3, 4).

Las causas de esta pérdida de eficacia provienen, entre otras, de la mala utilización de los antimicrobianos en todos los ámbitos de la salud (uso innecesario, dosis bajas, tratamientos cortos, intervalos incorrectos, diagnóstico erróneo), a lo que se le debe sumar en medicina veterinaria el uso de los antimicrobianos como promotores del crecimiento, fundamentalmente en explotaciones intensivas (5, 6, 7, 8).

La producción bovina es una de las primeras actividades industriales de la Argentina. Varios autores destacaban no sólo la contribución de la actividad al desarrollo del país (y su inserción internacional) sino la calidad del producto y los elevados estándares técnicos de la industria frigorífica. Estos atributos de calidad del ganado y de la carne se han mantenido hasta nuestros días, a pesar de los cambios políticos y económicos (9).

El mercado de alimentos de origen animal exige calidad higiénico-sanitaria. Esto implica control de riesgos biológicos, químicos y físicos. Entre los primeros se encuentra principalmente el control de microorganismos que constituyen un riesgo en sí mismos cuando son patógenos para el hombre y son transmitidos desde el producto alimenticio directa o indirectamente (zoonosis). Por otro lado, existe un riesgo oculto al que se le da cada vez más trascendencia, ya que afecta a todos sin excepción; y sus consecuencias son graves y pueden serlo aún más en el futuro: **la multirresistencia bacteriana**.

Si nos referimos a la producción de productos de origen animal, existe una diferencia notable en cuanto al tipo de explotación y su relación con la resistencia antimicrobiana.

En explotaciones intensivas, el uso indiscriminado e irracional de antibacterianos contribuye de manera más importante a la permanencia de cepas multirresistentes en el entorno y a la emergencia de las mismas, comparado con explotaciones extensivas. Sin embargo, no existe evidencia debidamente documentada o ésta es completamente insuficiente, de que el uso de antibióticos exclusivamente en animales de producción sea el origen de la emergencia de cepas resistentes o multirresistentes que afecten a los seres humanos. La resistencia a los antimicrobianos puede ser adquirida por mutación o transferida, intercambiando material genético entre microorganismos

comensales y resistentes. Este intercambio ocurre a lo largo de una cadena más o menos complicada, que implica la adquisición de resistencia por una primera bacteria y su transferencia vertical a su descendencia; paralelamente con la transferencia horizontal de determinantes de resistencia que pueden ir de hospedador en hospedador, de animal en animal y llegar, eventualmente, al hombre (10).

Es importante destacar que una de las bacterias comensales con mayores posibilidades de generar resistencias en el campo veterinario es *Escherichia coli*. Por ello, esta bacteria fue seleccionada como indicador de resistencia debido a que es uno de los grupos más extendidos de la microbiota animal y del hombre. Su monitoreo, permite conocer qué antimicrobianos están generando resistencia, evitar riesgos en salud pública, disminuir el fracaso terapéutico y evitar pérdidas económicas al productor (11).

Incluso, la emergencia de resistencia en la microbiota normal constituye un riesgo inminente para la eficacia antimicrobiana en animales de consumo (12).

La multiresistencia es la más grave expresión de resistencia desde el punto de vista clínico. Uno de los mecanismos de multiresistencia en *E. coli* a antibióticos lipofílicos/ anfifílicos está representado por la sobreexpresión de bombas de eflujo. Estas bombas expulsan el antimicrobiano hacia el exterior de la bacteria, impidiéndole así ejercer su efecto (10, 13, 14, 15).

Por ello es de suma importancia remarcar el riesgo que implica que cepas bacterianas comensales de animales y del hombre puedan convertirse en verdaderos nichos de resistencia en latencia y sobreexpresar bombas de eflujo potencialmente transferibles (10, 16).

Existen sospechas muy fundadas de que la excreción de antibióticos y/o sus metabolitos activos ejercen presión de selección sobre la flora bacteriana ambiental, generando un "reservorio" de genes codificadores de resistencia, que pasan de bacteria en bacteria y pueden alcanzar, eventualmente a la población humana (10, 16, 17).

Según algunos autores, cepas bacterianas saprófitas del mismo género y especie, sometidas a diferentes grados de presión antibiótica, comparten resistencia a los mismos antibióticos (16, 18, 19, 20, 21).

Además existe evidencia documentada que estas cepas saprófitas de igual género y especie, aisladas desde un mismo establecimiento/zona, tanto de animales, hombres o del entorno, pueden compartir resistencia a los mismos antimicrobianos (22, 23, 24).

Está demostrado que la asociación de dos o más antibióticos puede seleccionar resistencia cruzada entre ellos por mecanismos de bombas de eflujo (25, 26, 27).

De esta forma, una vez instalada la resistencia, es probable que ésta persista aún retirado el antimicrobiano responsable de la selección (10, 16, 28).

Existe una “ventana” de concentraciones de antimicrobianos, dentro de la que se produce selección de cepas resistentes. Esa ventana tiene un límite superior, que es la concentración bactericida máxima, que elimina a todas las bacterias presentes; y tiene un límite inferior, más difícil de definir, que es la mínima concentración capaz de ejercer presión de selección.

Se ha instalado una interesante discusión vinculada a este límite inferior, ya que posiblemente, las concentraciones residuales que persisten en tejidos, por debajo de los Límites Máximos de Residuos Permitidos (LMR), no tengan ninguna significación en la selección de cepas resistentes (29).

A pesar que en los últimos quince años se adquirió gran conocimiento sobre el uso racional de antimicrobianos siguiendo pautas farmacocinéticas/farmacodinámicas (PK/PD), como herramienta para reducir y controlar la aparición y persistencia de flora antibiótico resistente, es primordial seguir trabajando estrictamente en la vigilancia del cumplimiento y la difusión de esta temática (5, 30, 31).

Más allá de las directivas de organizaciones nacionales e internacionales, el sentido común indica que la carencia de medidas higiénico-sanitarias en el manejo de productos de origen animal juega un rol fundamental en la transmisión y diseminación de cepas multirresistentes. Toda la educación y entrenamiento en éste área serán necesarios a efectos de incidir favorablemente en este complejo fenómeno.

Existe un conocimiento limitado, pero certero, de que bacterias comensales multirresistentes recuperan su susceptibilidad a los antibióticos *in vitro*, mediante bloqueo competitivo de las bombas de eflujo. Los bloqueadores de bombas pasan a tener, entonces, un interesante rol potencial (32, 33, 34, 35, 36).

La inactivación de dichos sistemas puede producir un aumento en la concentración de determinados sustratos marcadores en el interior de los microorganismos (37, 38, 39, 40). Esta característica puede transformarse en una prometedora estrategia para restaurar la actividad de los antimicrobianos que resulten sustrato del mismo. Existen diversas maneras de modificar la resistencia por eflujo, entre las que se encuentra el uso de inhibidores de bombas (EPI del *inglés efflux pump inhibitor*) (39).

No obstante, estos conocimientos están en un plano muy básico, no han pasado de limitados ensayos *in vitro* y, en algunos casos, requieren aún confirmación. Pero, no podemos dejar de remarcar

que en caso de confirmar sus efectos representarían una poderosa herramienta a ser utilizada en la terapéutica antimicrobiana (35, 41, 42, 43, 44).

De esta manera la aplicación de pautas PK/PD, conjuntamente con la profundización del estudio de los mecanismos de resistencia bacteriana, puede proveer información relevante en cuanto al diseño e implementación de nuevos planes terapéuticos; y de este modo ser de utilidad fundamental para reducir la selección de microorganismos multirresistentes y su posterior diseminación horizontal.

I.2. Revisión bibliográfica

I.2.1. Resistencia bacteriana a los antimicrobianos

La resistencia bacteriana puede ser definida desde dos puntos de vista, por un lado como resistencia microbiológica y por el otro como resistencia clínica. Los microorganismos resistentes desde un punto de vista microbiológico, son aquellos que poseen cualquier tipo de mecanismo de resistencia o genes de resistencia. Término que puede ser calificado de modo cualitativo como "nivel de resistencia bajo; moderado o elevado". La concentración inhibitoria mínima (CIM) de un antimicrobiano otorga información cuantitativa acerca de la susceptibilidad bacteriana. Un microorganismo es clasificado como susceptible cuando su CIM es menor que la concentración establecida como punto de corte (17, 45).

Desde el punto de vista clínico, la clasificación de bacterias como susceptibles o resistentes, depende de cómo responde una infección bacteriana al tratamiento. Para muchas bacterias el conocimiento de su susceptibilidad *in vitro* (CIM) es considerado indispensable para llevar a cabo una terapia racional. Sin embargo, a veces dicha evaluación no refleja en forma completa la verdadera eficacia de los mismos *in vivo*. La sensibilidad en un caso clínico depende no solamente del régimen de dosificación y del agente patógeno, sino también de la farmacocinética del antibiótico en las diferentes especies animales (17).

Se denominan microorganismos multirresistentes a aquellos que presentan resistencia simultánea a tres o más antimicrobianos (MDR, de las siglas en inglés Multiple Drug Resistance). La multirresistencia generalmente se atribuye a la adquisición de transposones, integrones y/o plásmidos, que serán los determinantes de los distintos mecanismos de resistencia (26). Pero también ocurre que los genes pueden localizarse en el cromosoma bacteriano (41). En este caso, la localización en el ADN cromosómico confiere a las bacterias un mecanismo intrínseco que les permite sobrevivir en medios hostiles (en presencia de antibiótico) (26).

La multirresistencia, no solo es producto de la expresión conjunta de una serie de genes que codifiquen para mecanismos distintos; sino que es factible por la expresión de determinadas porciones de ADN con capacidad de codificar mecanismos únicos de resistencia de elevada inespecificidad de sustrato, generando por si solos fenotipos de resistencia a múltiples fármacos. Estos últimos, se consideran genes excepcionales por el hecho de tener la capacidad de generar microorganismos multirresistentes con su sola expresión, como por ejemplo la sobreexpresión de algunos tipos de sistemas de bombas de eflujo (17).

La resistencia cruzada se manifiesta como un fenómeno por el cual un microorganismo que se ha vuelto resistente a un antimicrobiano empleado para combatirlo, desarrolla simultáneamente modificaciones en la sensibilidad frente a otro u otros agentes antimicrobianos a los que nunca estuvo expuesto (46). La resistencia cruzada es común entre los macrólidos y las fluoroquinolonas (47).

La co-resistencia involucra la transferencia de varios genes ubicados en cercanía o unidos entre sí; y/o la adquisición de mutaciones en diferentes locus genéticos. Esto produce, como consecuencia, ineficacia terapéutica de diferentes antimicrobianos, aún cuando uno de ellos deje de utilizarse por periodos prolongados. Una razón para que esto suceda, sería que el gen que codifica para la resistencia de dicho antibiótico, podría continuar presente como resultado del uso de otros antimicrobianos a los cuales dicho determinante se encuentra genéticamente unido (48). Este fenómeno de co-resistencia es por lo tanto consecuencia de una co-selección genética que incrementa la oportunidad de persistencia de la bacteria y los genes de resistencia (17, 48).

Las bacterias pueden ser intrínseca o naturalmente resistentes a los antibióticos debido a la ausencia de los mecanismos celulares requeridos para la acción antibiótica. Esta resistencia innata puede ser a más de una clase de antimicrobianos al mismo tiempo, y en este caso, todas las cepas pertenecientes a la misma especie bacteriana, resultarán resistentes a todos los miembros de aquella familia de antimicrobianos (49).

Este fenómeno es característico de especies bacterianas que resisten homogéneamente a un antibiótico en particular, ya sea porque carecen o perdieron el mecanismo celular sobre el cual actúa el antimicrobiano, por ejemplo en el caso de las bacterias Gram-negativas, la membrana externa actúa como una barrera que limita la entrada de varios tipos de agentes antibacterianos, sin relación química entre ellos. A estos microorganismos se los denomina insensibles (17, 47).

Por otro lado se encuentran las llamadas bacterias resistentes que son aquellas que parten de un fenotipo silvestre originalmente sensible y que logran ser resistentes gracias a cambios genéticos. Dicha resistencia puede tener su origen en una mutación cromosómica o bien por adquisición de

material genético exógeno transferible entre microorganismos relacionados o no, tanto en bacterias patógenas como en aquellas pertenecientes a la microbiota comensal de hombres y animales (17).

I.2.2. Formas de resistencia bacteriana

La mutación genética fue la primera forma de respuesta bacteriana descrita ante el uso de antimicrobianos (resistencia cromosómica). Aunque esta forma de resistencia es de bajo nivel y bastante inespecífica, es suficiente para proveer a los microorganismos de un medio de protección contra una amplia variedad de antimicrobianos. Sin embargo, las mutaciones son “más una excepción que una regla”, ya que la base genética de la antibióticorresistencia en bacterias de significancia clínica o pertenecientes a la microbiota, es debida al proceso dual de la adquisición de genes exógenos (resistencia adquirida) y la transferencia horizontal. A pesar de ello no debe desestimarse el rol de las mutaciones en el desarrollo de la resistencia bacteriana (16, 28).

Resistencia cromosómica

Las mutaciones cromosómicas que conducen a la resistencia a menudo producen cambios estructurales en la célula bacteriana, mientras que la resistencia transferible tiende a codificar las enzimas que metabolizan a los antibióticos. Las mutaciones que provocan antibióticorresistencia son eventos espontáneos, consistentes en cambios de la secuencia de nucleótidos cromosómicos no influidos por la presencia del antibiótico, que resultan en la síntesis de proteínas y otras macromoléculas que difieren suficientemente de las originales interfiriendo con la actividad antimicrobiana. La resistencia cromosómica en general es un proceso escalonado –gradual-, mientras que la transferible a menudo es un proceso del todo o nada –abrupto- (10).

Las mutaciones pueden ocurrir continuamente e independientemente de la presencia de los antibióticos, la mayoría de ellas generalmente son “reparadas” por mecanismos celulares (17). Pero cuando los cambios mutacionales permanecen, se caracterizan por ser estables, es decir, un carácter adquirido no puede ser perdido salvo en caso de mutación reversible, cuya frecuencia no es siempre idéntica a la de las mutaciones primitivas (10).

En ocasiones, las mutaciones se asocian con otros cambios celulares, de manera que tales células pueden estar en desventaja comparadas con la madre y por lo tanto no logran sobrevivir. Algunas mutantes sin embargo, son tan viables como las madres y por lo tanto inevitablemente son seleccionadas con el uso de los antibióticos. Las mutaciones que llevan a la resistencia pueden ser intensas, como en el caso de la estreptomycin, cuya CIM puede incrementarse 1000 veces con una

sola mutación, o puede ser gradual como en el desarrollo de la resistencia multiescalonada en las fluoroquinolonas (10).

Las mutaciones con incremento de antibióticorresistencia son ventajosas para la bacteria únicamente cuando el antibiótico se encuentra presente. En todos los casos, las cepas bacterianas resistentes por mutación son seleccionadas, sobreviven y crecen por el uso de antimicrobianos (49).

Solamente la subpoblación de bacterias susceptibles será eliminada en tanto el antimicrobiano permanezca a concentraciones por encima de la CIM. El desarrollo de resistencia mutacional resultará usualmente específico para el antibiótico seleccionado o para los que están muy relacionados entre sí (17).

Las mutaciones espontáneas pueden producir resistencia por: a) alteración de la proteína diana, ocasionada por modificación o eliminación del sitio de unión al antimicrobiano; b) activando la regulación de la producción enzimática, que inactiva al agente antimicrobiano; c) alterando o disminuyendo el número de porinas de membrana, que el antimicrobiano utiliza para ingresar a la bacteria y d) activando la síntesis de bombas de eflujo, permitiendo su sobreexpresión (49).

La probabilidad de emergencia de resistencia a los antimicrobianos por mutación es un fenómeno complejo, donde juega un rol de importancia un conjunto de factores - fisiología, genética, dinámica antibacteriana y comportamiento histórico de la población bacteriana entre otros- (50).

Las mutaciones antibióticorresistentes aparecen con menor frecuencia *in vivo* que *in vitro*, porque las defensas del hospedador destruyen a muchas de ellas. El desarrollo de la resistencia por mutación estaría favorecido por la subdosificación (baja dosis, intervalos de dosificación demasiado prolongados, insuficiente tiempo de tratamiento) (47, 50).

La transferencia de la mutación ocurre durante la multiplicación, solo de modo vertical (evolución vertical) (49). La frecuencia es baja, usualmente se encuentra en el rango de 10^{-6} hasta 10^{-10} por generación bacteriana. En general el número de mutantes resistentes suele decrecer luego de cesar la exposición (17).

Resistencia transferible

Las bacterias tienen sistemas extremadamente eficientes de transferencia, capaces de intercambiar y acumular genes de resistencia. Los genes bacterianos, incluyendo los de resistencia pueden moverse entre ADN cromosómico y extracromosómico, incluso entre bacterias pertenecientes a la misma o a distinta especie o bacterias de diferente género (evolución horizontal) (16).

La transferencia de material genético produce resistencia a menudo a varios antibióticos al mismo tiempo e incluso, en ausencia de antibióticos que seleccionan microorganismos resistentes. El ADN extracromosómico responsable de la resistencia puede autorreproducirse dentro de la célula y luego diseminarse a otras células mediante diversos mecanismos. La adquisición de genes de resistencia transferibles por una bacteria susceptible por lo general se asocia con marcado incremento ("salto") de la resistencia (10).

Los vehículos más importantes para la transferencia de genes de resistencia son los plásmidos, transposones, integrones y bacteriófagos. Gracias a su movilidad, los elementos transferibles tienen más posibilidades de permanecer (a bajo nivel) en un ecosistema aún en ausencia de presión antibiótica selectiva comparado con la resistencia cromosomal (17).

Los mecanismos de intercambio genético incluyen conjugación (transferencia directa de ADN de célula a célula), transducción (transferencia por virus bacterianos) y transformación (adquisición de ADN desde el medio ambiente). Para cada uno de estos eventos, los transposones pueden facilitar la transferencia e incorporación de los genes adquiridos de resistencia dentro del genoma huésped o dentro de plásmidos (49).

Los genes de resistencia pueden incorporarse dentro del cromosoma por recombinación. Estos genes pueden contener mutaciones simples o bien cambios severos en su secuencia (51).

I.2.3. Mecanismos bioquímicos implicados en la resistencia

Los microorganismos viven íntimamente en contacto con el medio ambiente. Tanto los comensales como los patógenos deben protegerse frente a los agentes agresores específicos e inespecíficos del hospedador. Por ello, no resulta sorprendente que las especies unicelulares hayan desarrollado una amplia y elaborada gama de defensas frente a los mismos a fin de reducir o prevenir la acumulación de sustancias nocivas no deseadas (52).

Los principales mecanismos de resistencia que presentan las bacterias pueden clasificarse en 4 grupos: ***inactivación enzimática del antimicrobiano; modificación química de la diana sobre la que actúa el antimicrobiano; desarrollo de vías metabólicas alternativas y modificación de la permeabilidad de su membrana.*** Siendo la inactivación antibiótica el mecanismo más importante (17).

Inactivación enzimática del antimicrobiano

Este mecanismo incluye una serie de estrategias bioquímicas dentro de las cuales se encuentran: la producción de enzimas capaces de inactivar directamente al antimicrobiano por hidrólisis; la transferencia de grupos químicos por acción de enzimas transferasas -las que mediante sustituciones en la molécula logran dejar inactivo al antimicrobiano- y la inactivación por mecanismos redox (51).

Suelen ser muy específicos, y afectan a una sola familia de antibióticos e incluso a un único compuesto, ya que es necesario un reconocimiento del sustrato por parte de la enzima, lo que conduce a una acción hidrolítica o modificación de la estructura química del antimicrobiano.

Las enzimas implicadas en este mecanismo de resistencia pueden ser hidrolasas, fosfotransferasas, adeniltransferasas y acetilasas. Las enzimas que inactivan de forma específica a estos agentes se presentan en una serie de bacterias que transportan factores R y otros plásmidos (53).

Inactivación del antimicrobiano por hidrólisis enzimática: muchos antimicrobianos son susceptibles de padecer hidrólisis debido a que contienen en su molécula enlaces lábiles -uniones éster o amida-. El clásico ejemplo para este tipo de mecanismos de resistencia es el de las beta-lactamasas, amidasas hidrolíticas que son frecuentemente excretadas por las bacterias, inactivando a los antimicrobianos antes de que alcancen su blanco de acción. Se han identificado más de 300 tipos de beta-lactamasas producidas tanto por microorganismos Gram-positivos como Gram-negativos (49, 51)

El rol principal de las beta-lactamasas no consiste en proteger a las bacterias de los antibióticos beta-lactámicos, sino en romper uniones en los intermediarios transitorios de estructura beta-lactámica durante la biosíntesis del peptidoglicano. Las beta-lactamasas de los microorganismos Gram-positivos habitualmente son codificadas por plásmidos. La compleja envoltura celular de los microorganismos Gram-negativos los hace intrínsecamente menos sensibles a los agentes beta-lactámicos que los Gram-positivos; además existen diferencias significativas entre las propiedades de las lactamasas de ambos grupos. En los Gram-negativos, estas enzimas pueden estar codificadas por plásmidos o bien por genes cromosómicos. Estas últimas, son producidas por casi todos los bacilos Gram-negativos y son responsables en gran parte de la resistencia a los beta-lactámicos de última generación (53).

Otros ejemplos de hidrolasas, son las estererasas vinculadas a la resistencia frente a los antimicrobianos macrólidos y las epoxidasas que hidrolizan el anillo de fosfomicina (54).

En las bacterias Gram-positivas este tipo de enzimas hidrolíticas suelen estar localizadas extracelularmente. Algunas, pueden permanecer adheridas a la membrana citoplasmática dependiendo de las condiciones de crecimiento. En cambio, en las Gram-negativas, las beta-lactamasas son en su mayor parte de localización periplasmática, actuando a nivel de la superficie bacteriana. En algunas ocasiones puede ocurrir que sean liberadas al espacio extracelular por efecto de fuga pero no por secreción activa (55, 56).

Inactivación del antimicrobiano por transferasas: el grupo de las *transferasas* es el grupo más diverso entre las enzimas de resistencia. Inactivan antimicrobianos del grupo de los aminoglucósidos, de los macrólidos, estreptograminas, rifampicina o cloranfenicol. En general el antimicrobiano es afectado en el sitio donde se une a su blanco. Este proceso se lleva a cabo a nivel del citoplasma, pues se requiere en todos los casos de un co-sustrato para su actividad (ATP, acetyl-CoA, NAD⁺, UDP-glucosa o glutatión (49, 57, 58).

Los genes son transportados por plásmidos R y varios de ellos han sido encontrados en transposones (53).

Inactivación por procesos redox: este mecanismo de oxidación/reducción del antimicrobiano ha sido, por el momento, pobremente explotado por los microorganismos patógenos (51, 59).

Modificación química de la diana del antibiótico

Es el segundo mecanismo de resistencia bacteriana en orden de importancia. La bacteria modifica la estructura de la molécula diana del antibiótico, que usualmente suele ser una enzima metabólica esencial, o expresa una molécula diana alternativa capaz de evadir el efecto tóxico del mismo (17).

La mayoría de los antibióticos ejercen su acción al unirse específicamente a diferentes proteínas que forman parte de procesos esenciales para la supervivencia bacteriana. En los mutantes resistentes, la modificación de estas proteínas puede afectar la afinidad por el antibiótico, sin interferir con su funcionalidad. En algunas ocasiones, las modificaciones en la estructura de la diana requieren de otros cambios en la célula bacteriana que permitan compensar la funcionalidad normal del microorganismo (51).

En la mayoría de los mutantes es suficiente el solo cambio de un aminoácido en la proteína para que se produzca este efecto.

Las proteínas diana que se suelen ser modificadas son las ribosómicas, los precursores de la pared celular y las enzimas esenciales (55, 60).

Modificación de las proteínas de la pared: Las enzimas involucradas en la síntesis y ensamblaje de los componentes del peptidoglicano de la pared celular bacteriana constituyen excelentes blancos para la acción antimicrobiana. La presencia de mutaciones en las proteínas de unión a penicilina o PBPs resulta en una disminución de la afinidad de los beta-lactámicos.

En cuanto a los glicopéptidos -vancomicina y teicoplanina-, su mecanismo de acción es inhibir la síntesis de la pared de las bacterias Gram-positivas mediante su unión al carbono terminal de acyl-D-alanyl-D-alanina (acyl-D-Ala-D-Ala) contenido en el precursor peptidoglicano. La resistencia bacteriana en los enterococos por ejemplo, se desarrolla mediante una alteración en el sitio diana cambiando alanina por serina o lactato, lo que produce una destacada disminución de la afinidad del antimicrobiano, en el orden de las 1000 veces (51, 59).

Modificación de las proteínas ribosómicas: muchos antimicrobianos interfieren con la transcripción de ARN polimerasa, tal es el caso de aminoglucósidos, tetraciclinas, cloranfenicol, macrólidos, lincosamidas y rifampicina (51).

Los macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B por ejemplo, bloquean la síntesis proteica actuando a nivel de la subunidad ribosomal 50s. La resistencia frente a dichos antimicrobianos se produce por una modificación post transcripcional del componente 23s ARNr de la subunidad ribosomal 50s, dando por resultado un fenotipo de resistencia conocido como MLS(B), correspondiente con las primeras letras de los antimicrobianos afectados (M: macrólidos, L: lincosamidas y S: estreptograminas B) en bacterias Gram-positivas (61).

Interferencia en la síntesis de ADN: Las fluoroquinolonas interactúan con las enzimas ADN girasa y la topoisomerasa IV previniendo la replicación y transcripción del ADN. Mutaciones en regiones específicas de genes estructurales que alteran suficientemente dichas enzimas, confieren resistencia a este grupo de antimicrobianos (59).

Desarrollo de vías metabólicas alternativas

Este mecanismo de resistencia se produce en mutantes auxótrofos que dependen del aporte de sustratos para la síntesis de productos normalmente obtenidos a través de vías metabólicas en las que

participan las enzimas que son inhibidas por esos antibióticos. Por ello, el microorganismo es capaz de crecer a pesar de la inhibición enzimática ejercida por el antibiótico en cuestión. Un ejemplo clásico es la resistencia a trimetoprima en bacterias dependientes de timina. Los microorganismos son capaces de sintetizar timidilato por el aporte externo de timina, en vez de acudir a la vía habitual, que se encuentra bloqueada por la acción de trimetoprima (62).

Modificación de la permeabilidad

Las bacterias modifican su permeabilidad ya sea por tornarse impermeables al antimicrobiano o bien por excreción activa del antibiótico acumulado en la célula.

Como ya se conoce, un ejemplo son las bacterias Gram-negativas, naturalmente resistentes o insensibles a antibióticos como la vancomicina y la bacitracina, debido a la presencia de su membrana externa. Pero, por otro lado, puede aparecer resistencia por mecanismos de extrusión activa del antibiótico o **bombas de eflujo**, mecanismo alternativo descrito por primera vez en 1980. Desde mediados del noventa se viene caracterizando un número cada vez mayor de sistemas de eflujo (13).

Las bombas de eflujo son transportadores de membrana involucrados generalmente en la extrusión de sustancias tóxicas desde el interior de las células hacia el medio externo. Estas proteínas se encuentran presentes en microorganismos Gram-positivos, Gram-negativos y eucariotas. Las células bacterianas y las eucariotas tienen variados sistemas transportadores de membrana con múltiples funciones vitales como ingreso de nutrientes, excreción de sustancias tóxicas y mantenimiento de la homeostasis (63, 64).

En las bacterias productoras de antibióticos, los sistemas de eflujo les confieren autoinmunidad, así como también les otorga protección contra las sustancias agresoras con capacidad antimicrobiana presentes en su medio ambiente natural. Sin embargo, la mayoría de los sistemas bacterianos de eflujo parecen tener roles en otros procesos como la comunicación intercelular y la exportación de sustancias tóxicas, como se mencionó previamente (65).

Todos los genomas bacterianos estudiados contienen diversidad de bombas de eflujo, claro indicio de su origen ancestral. Se ha estimado que entre el 5-10% de todos los genes están involucrados en el transporte y una gran proporción de los mismos codifica para bombas de eflujo (26).

Las bombas de eflujo pueden ser específicas para un sustrato, o bien pueden transportar una amplia variedad de compuestos químicamente diferentes, incluyendo antimicrobianos de múltiples

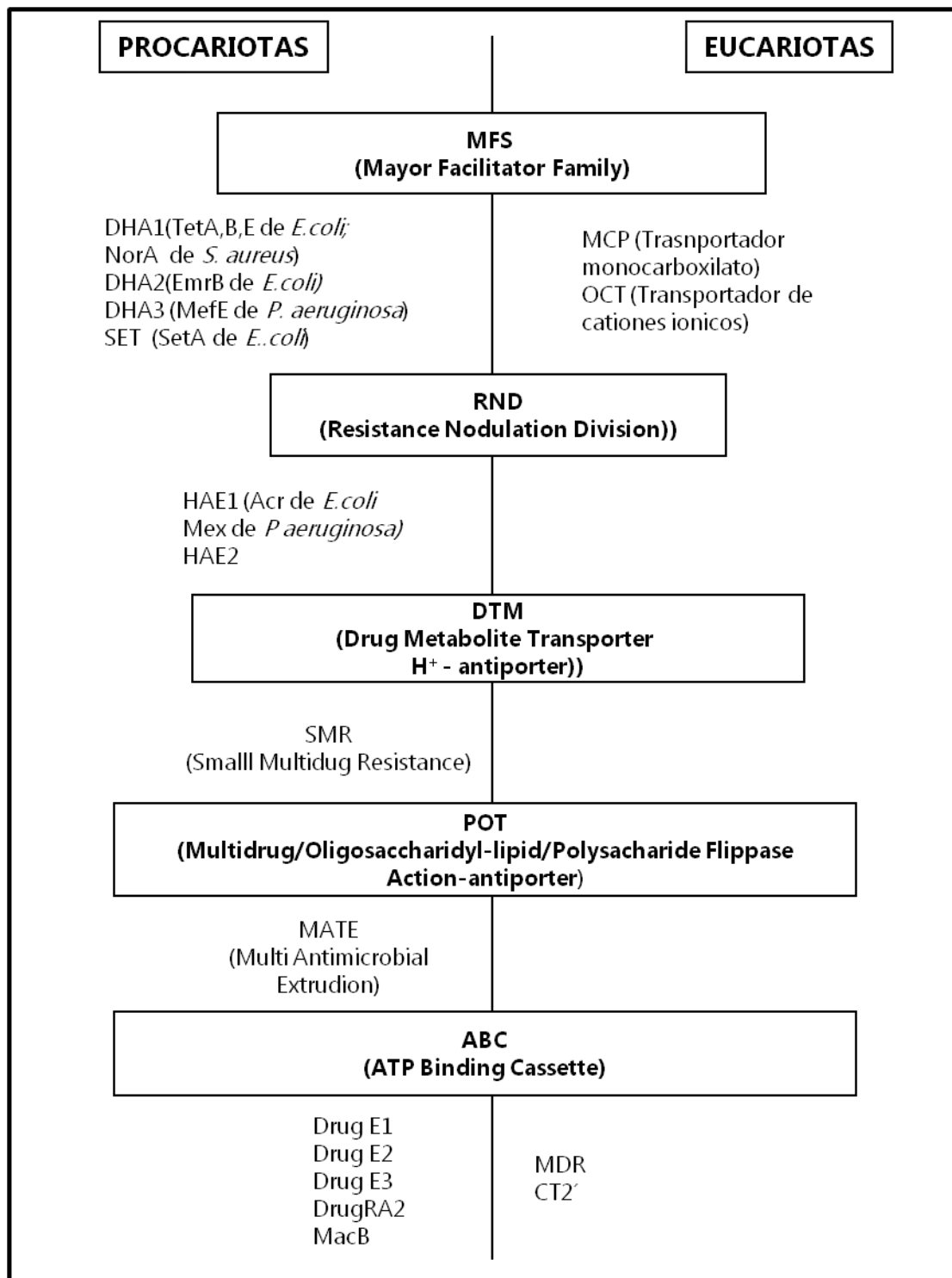
clases. En este último caso las bombas pueden estar asociadas con múltiple resistencia antimicrobiana. Estas han resultado ser un grave problema en la antibiòticoterapia, ya que la presencia de bombas tipo MDR en una célula bacteriana puede implicar disminución de la susceptibilidad a un amplio rango de quimioterápicos químicamente disímiles al mismo tiempo (26).

Los sistemas de eflujo están agrupados en familias de proteínas transportadoras basadas en la homología de las secuencias de aminoácidos, las similitudes en el tamaño y las estructuras secundarias (63, 66).

Filogenéticamente las bombas de eflujo pertenecen a cinco superfamilias denominadas: (1) familia de casete de unión al ATP (ABC, por sus siglas en inglés, *ATP binding cassette*); (2) superfamilia del facilitador mayor (MFS, *major facilitator superfamily*); (3) familia de extrusión de multifármacos y tóxicos (MATE, *multidrug and toxic-compound extrusion*); (4) familia de resistencia pequeña a multifármacos (SMR, *small multidrug resistance*); y (5) familia de resistencia a división por nodulación (RND, *resistance nodulation division*). ABC y MFS son las familias mayores y se piensa que pueden tener un origen común. La primera está conformada por transportadores activos primarios cuya actividad depende de la captación e hidrólisis del ATP, mientras que las superfamilias SMR, MATE, MFS y RND son transportadores secundarios, pues su actividad se lleva a cabo por gradiente de protones, ver tabla I.1 (25, 26).

MFS y RND son las bombas que se encuentran en mayor número. MFS, puede observarse en bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y células eucariotas de algunos mamíferos. Se caracteriza por tener un espectro de acción más reducido, reconociendo usualmente unos pocos antimicrobianos (67).

Tabla I.1. Clasificación y distribución de los sistemas de eflujo en los organismos procariontes y eucariotas. *Adaptado de Van Bambeke et al, 2003.*



El sistema descrito en las bacterias Gram-positivas consta de una única proteína (CMP: Cytoplasmic Membran Protein), situada en la membrana. Esta proteína expulsa los fármacos del interior celular, ya sea acoplada al potencial de membrana, o bien mediante la energía obtenida por hidrólisis del ATP. Este sistema de bombeo tiene como limitación la especificidad de sustrato, pues para garantizar su eficiencia es indispensable que la velocidad de ingreso del fármaco no supere en ningún momento a la de la expulsión, ver figura I.1 (13, 67, 68).

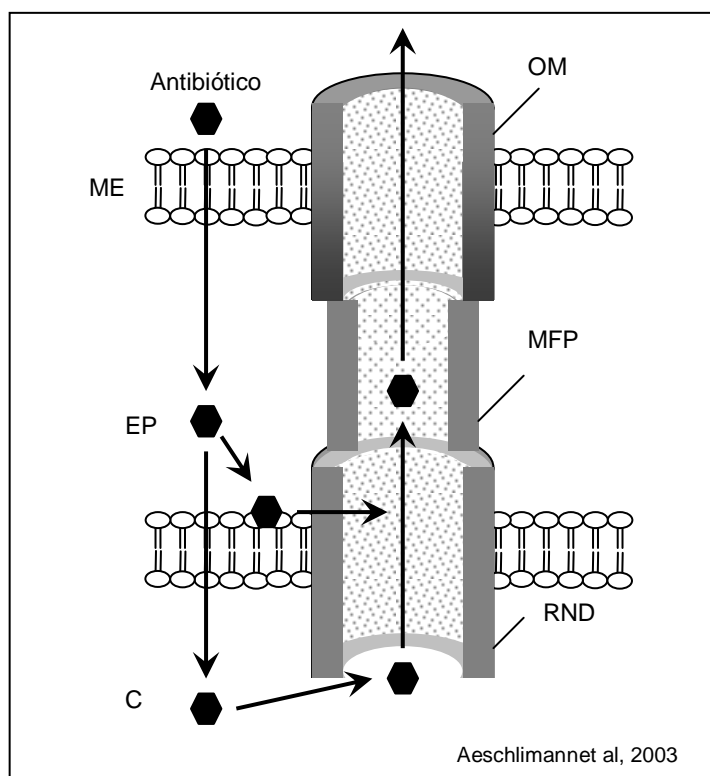


Figura I.1. Representación esquemática de la estructura y función de los sistemas de eflujo RND en bacterias Gram-negativas. Los antimicrobianos pueden ser capturados desde el espacio periplásmico (EP), la membrana citoplasmática (MC) y/o el espacio citoplasmático (EC) por este tipo de transportadores. ME: membrana externa. OM: proteína de membrana externa tipo porina. MFP: proteína periplásmica de fusión. RND: proteína transportadora.

Adaptado de Aeschlimann JR (69) et al, 2003.

Resistance nodulation division (RND)

RND es exclusiva de microorganismos Gram-negativos, presenta un amplio espectro de acción, ya que puede reconocer desde dos hasta siete antibióticos, así como también otros agentes farmacológicos como detergentes y antisépticos (42).

Los sistemas de bombeo que con mayor frecuencia se caracterizan en Gram-negativas están acoplados al potencial de membrana. Están compuestos por tres unidades proteicas: una proteína transportadora CMP situada en la membrana interna y responsable del eflujo propiamente dicho; una porina (OMP: Outer Membrane Protein) situada como su nombre lo dice en la membrana externa y una que actúa como nexo de unión entre las dos primeras, denominada proteína de fusión de membrana (MFP o Membran Fusion Protein). En este caso, la presencia de la membrana externa evita la limitación funcional antes descrita, permitiendo en consecuencia la expulsión de muy diversos sustratos por el mismo sistema (13, 27, 67).

En el caso particular de los microorganismos Gram-negativos, existen transportadores de eflujo de membrana situados en un sistema de membrana simple o un sistema de doble membrana.

En el caso de *membrana simple*, las bombas mueven agentes desde el citoplasma hacia el espacio periplásmico. Esta es una operación ineficiente porque las moléculas inhibidoras lipofílicas difundirán espontáneamente de regreso al citoplasma a través de la bicapa lipídica. Sin embargo, se ha demostrado que la bomba *Tet* bombea tetraciclina al espacio periplásmico de la *E. coli*. Podría crear altos niveles de resistencia solamente por tener una velocidad de eflujo que supere altamente al retorno de la droga hacia el citoplasma. Este tipo de bomba tiene un espectro reducido en general a un único antimicrobiano (65).

En el caso de eflujo en *sistema de doble membrana*, la droga es conducida desde el citoplasma hacia el exterior de la célula por el sistema de tres proteínas que forman el canal de salida. En *E. coli* se encuentra el sistema AcrAB, perteneciente a la superfamilia RND, con capacidad de bombear al exterior una extraordinaria variedad de antibióticos, detergentes, secantes, agentes quimioterápicos (13, 70).

Una característica llamativa de estos sistemas es su ubicuidad. Hay sistemas que solo están presentes en algunas cepas de una especie bacteriana, pero la gran mayoría se encuentran en el genoma de todos los individuos pertenecientes a dicha especie (71).

Reconocen un gran número de compuestos farmacológicos no relacionados entre sí debido a que la identificación del sustrato está basado en las propiedades físico-químicas (hidrofobicidad,

aromaticidad, capacidad de ligar hidrógeno y carácter ionizable) y no en propiedades químicas definidas, como ocurre en el caso de enzima-sustrato o reconocimiento de ligando-receptor (41).

El hecho de que los sistemas MDR sean ubicuos e intervengan en el bombeo de numerosos antibióticos los convierte en blancos ideales para la búsqueda de nuevos inhibidores bacterianos, que hagan que las bacterias que portan estos sistemas sean más sensibles a los antibióticos actualmente existentes en el repertorio clínico. Se ha demostrado que la inactivación de dichos sistemas mutantes de *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* y *Pseudomonas aeruginosa* producen un descenso en las concentraciones inhibitorias mínimas (CIMs) de distintos antibióticos (72, 73).

Aunque los genes que codifican para las bombas de eflujo pueden hallarse en plásmidos R, el hecho de contener dichos genes en su cromosoma confiere a las bacterias un mecanismo intrínseco que les permite sobrevivir en medios hostiles. Las bacterias mutantes que puedan sobreexpresar los genes de las bombas pueden ser seleccionadas a su vez, sin la adquisición de nuevo material genético (26).

I.3. Microbiota bacteriana habitual

La microbiota bacteriana habitual es portadora de genes de resistencia. La transferencia de estos genes en medios ambientes naturales tiene un amplio rango de posibles hospedadores y puede suceder aún entre géneros bacterianos filogenéticamente diferentes, tal como entre microorganismos Gram-positivos y negativos (74).

Las bacterias saprófitas son abundantes en la piel y las mucosas tanto de los animales como del hombre. Representan lo que se conoce como microbiota normal o microflora. Cada área colonizada es un verdadero nicho ecológico donde reina el equilibrio entre las bacterias saprófitas y el hospedador. Se considera que la microbiota normal es bastante estable, dependiendo de las condiciones de salud del individuo y la estabilidad del medio ambiente (17).

La microbiota normal se adquiere con rapidez durante y poco después del nacimiento y cambia de constitución en forma permanente a lo largo de la vida. Muchos de estos microorganismos coexisten en algunos animales o bien pueden desarrollar una vida libre. Es por lo tanto bastante difícil definir la microbiota normal, ya que depende en gran parte del medio en que nos desenvolvamos.

En general, los microorganismos de la microbiota normal pueden dividirse en *simbióticos*, los cuales se benefician conjuntamente con el hospedador; *comensales*, que no resultan de ningún

beneficio para el hospedador y *oportunistas* que pueden producirle daño al hospedador ante determinadas circunstancias (75, 76).

Los órganos y tejidos internos son habitualmente estériles. Las áreas colonizadas con el mayor número de microorganismos son aquellos órganos que contienen la más diversa y compleja microbiota como la piel y el sistema digestivo (75).

- *Piel*: áreas húmedas como la región inguinal, axilar y espacio interdigital de los pies. En general, existe mayor cantidad de bacterias Gram-positivas como estafilococos coagulasa negativo (CNS), corinebacterias y micrococos. En algunos individuos un potencial patógeno como *S. aureus* es parte de la microbiota normal.
- *Tracto respiratorio*: fosas nasales, faringe.
- *Tracto digestivo*: Puede dividirse en diferentes unidades, cada una de ellas con condiciones apropiadas para el crecimiento de determinada microflora. El intestino grueso, contiene una gran población microbiana fuertemente influenciada por la dieta.
- *Tracto genitourinario*: tercio anterior, uretra, vagina.

El equilibrio de la microbiota normal puede ser alterado por el efecto de antibacterianos. Esto sugiere que la exposición a agentes antibacterianos puede incrementar la prevalencia de resistencia bacteriana entre la microbiota fecal (75).

I.3.1. Microbiota intestinal

La microbiota intestinal constituye un sistema extremadamente complejo, comprendiendo más de 2000 diferentes especies bacterianas, algunas de las cuales aún no han sido caracterizadas (17).

Debido al bajo potencial redox del contenido intestinal, las especies anaeróbicas obligatorias exceden en número a las aeróbicas o anaeróbicas facultativas en un rango de aproximadamente 1:1000. En el hombre, las bifidobacterias Gram-positivas y los bacterioides Gram-negativos representan los anaeróbicos más comunes y abundantes; mientras que la especie Gram-negativa anaeróbica facultativa más frecuente es la *E. coli*. Los enterococos son los Gram-positivos anaeróbicos facultativos más abundantes (77).

En los rumiantes las bacterias anaerobias en el rumen son prevalentes y variadas, incluyen clostridios, prevotelasy bacterias metanogénicas, entre otras. A pesar de ser diferentes a las presentes en el hombre, la *Prevotella ruminicola* se asemeja mucho a losbacterioides. La microbiota madura con la edad, en individuos jóvenes (animales y hombre), es inmadura y es por eso que muchas de sus

funciones se ven limitadas, especialmente la propiedad de la "resistencia a la colonización". *E. coli* solo constituye aproximadamente el 1% de la microbiota colónica (17, 19).

La "resistencia a la colonización", una de las funciones más importantes de la microbiota normal, es la capacidad de impedir la colonización por nuevos microorganismos en las superficies mucosas o epiteliales ocupadas por ellas (78).

La delicada relación y balance ecológico entre las especies bacterianas de la microbiota comensal del tracto intestinal aún están pobremente comprendidas (75).

E. coli y los enterococos, como fue mencionado previamente, colonizan y son parte de la microbiota del hombre, y de otras especies mamíferas como los animales domésticos y de producción (79). Además, están ampliamente distribuidos sobre la superficie del suelo y de medios acuáticos. Esta ubicuidad y la conocida resistencia de los mismos a variados antimicrobianos, los convierte en especies bacterianas indicadoras de resistencia y merecedoras de especial atención (19).

Los agentes que inducen cambios en forma más efectiva en la microbiota intestinal son los antimicrobianos, en especial aquellos no absorbibles o de amplio espectro administrados oralmente. La modificación en la microbiota también puede ocurrir cuando sucede una extensa circulación enterohepática o bien cuando los antimicrobianos son eliminados por bilis. Esto puede reducir el número de microorganismos excretados por materia fecal en gran magnitud. También pueden alterar la relación entre las distintas especies presentes, en detrimento de las especies anaeróbicas con bajo potencial patogénico y con funciones fisiológicas a nivel intestinal. Estas modificaciones pueden crear un vacío que puede ser ocupado, ya sea por la adquisición exógena de microorganismos intrínsecamente resistentes a la droga administrada, o bien por determinantes de resistencia exógenos (5).

I.3.2. Microbiota intestinal como reservorio de genes de resistencia

El tracto gastrointestinal (animal y humano) ha sido considerado como el lugar de elección de las transferencias de resistencias. De manera que comienzan a ser considerados muy importantes en este tema, el intestino de animales salvajes (especialmente roedores), animales de compañía y especialmente los peces. Por otro lado, el medio ambiente representa, en ciertas circunstancias especiales, un lugar de intensa actividad microbiana donde los intercambios podrían tener lugar en forma extensa. De manera que, ciertos lugares como la tierra, especialmente en zonas en que se

produzcan descargas de materia fecal, por ejemplo por limpieza de corrales o cursos de agua, si se los vincula con desechos cloacales, serían lugares ideales de intercambio.

La compleja microbiota intestinal puede actuar como reservorio para bacterias resistentes y genes de resistencia, resultando un sitio ideal para que la transferencia de genes de resistencia se lleve a cabo entre diferentes especies y géneros bacterianos. A este flujo de genes de resistencia se lo denomina “transmisión horizontal” que a diferencia de la transferencia vertical, puede aumentarse mediante la presión selectiva de los antimicrobianos (12).

Es por ello muy importante resaltar que la resistencia a los antibióticos no es una característica propia de microorganismos patógenos. Los genes de resistencia pueden ser adquiridos o seleccionados en las bacterias comensales luego de una exposición a antimicrobianos. Incluso, se han aislado grandes cantidades de bacterias comensales resistentes en intestino de individuos expuestos a ambientes en donde la utilización de antimicrobianos es muy frecuente como en granjas y/u hospitales (22, 80).

De las rutas de transferencia genéticas conocidas, la transformación y la conjugación son las que ocurren con mayor frecuencia entre las células que constituyen biofilms, como en el tracto gastrointestinal y en la superficie de los dientes. La transferencia de los genes de resistencia desde comensales hacia bacterias patógenas depende de la densidad celular de donantes y receptores, de la disponibilidad del mecanismo de transferencia, de la nutrición y de la presión de selección. Por lo tanto, puede concluirse que el medio ambiente intestinal puede considerarse un lugar óptimo para que ocurra la transferencia genética de resistencia (10, 19).

I.3.2.1. Enterobacterias, *Escherichia coli*

Enterobacteriaceae

Esta familia comprende un número muy variado de géneros y especies bacterianas cuyo hábitat natural es el tubo digestivo del hombre y los animales. No todos los bacilos Gram-negativos que tienen este hábitat forman parte de la familia *Enterobacteriaceae*. También se los encuentra en el suelo, agua, frutas, vegetales; y en los animales desde los insectos al hombre (81).

Algunos microorganismos entéricos, como *E. coli*, forman parte de la microbiota normal y eventualmente causan enfermedad; en tanto que otros, como *Salmonella* y *Shigella*, con gran frecuencia son patógenas para el hombre (81).

La familia muestra las siguientes características: son bacilos Gram-negativos dotados de motilidad por flagelos peritricos o carentes de motilidad; crecen sobre peptona o medios con extracto de carne sin adición de cloruro de sodio ni otros suplementos; crecen bien en agar Mac-Conkey; desarrollan en condiciones aerobias y anaerobias (son anaerobios facultativos); fermentan la glucosa en vez de oxidarla y con frecuencia producen gas; son catalasa positivos, oxidasa negativos y reducen el nitrato a nitrito (82).

La fermentación de la lactosa constituye una característica diferencial clásica para el estudio preliminar de los cultivos sospechosos, pues la inmediata fermentación de la misma se pone de manifiesto por la formación de colonias coloreadas en medio sólido y un indicador apropiado como el rojo neutro, lo cual resulta útil para la caracterización de los organismos **coliformes**. Entre los cuales encontramos principalmente *Escherichia spp.* (83).

Escherichia coli. De acuerdo a la 9na. Edición del Manual Bergey de Bacteriología Sistemática, *E. coli* pertenece al orden de las *Eubacteriales*, Familia *Enterobacteriaceae*, Tribu *Escherichieae*, Género *Escherichia*, Especie *coli*.

I.3.2.2. Resistencia en *E. coli* intestinal

La resistencia es extensa en los animales mantenidos en condiciones intensivas donde los antibióticos son de aplicación corriente (cerdos, bovinos de leche, pollos parrilleros, etc). Grandes poblaciones de *E. coli* intestinales normales presentan resistencia y en algunos casos multiresistencia, incluso hasta a diez antibióticos con utilidad clínica. Aunque las cepas resistentes no son más virulentas que las no resistentes, algunos investigadores han destacado la adquisición de genes de virulencia mediante los plásmidos R (19, 47).

En un tubo de ensayo, la resistencia a fármacos puede ser transferida con rapidez a toda la población bacteriana susceptible, pero la frecuencia de transferencia *in vivo* es inferior. A escaso tiempo de iniciarse un tratamiento antibiótico, la población comensal de *E. coli* se vuelve resistente a ese fármaco. Esto proviene principalmente de la selección de organismos resistentes y solo en menor extensión por la transferencia de resistencia. La persistencia de las bacterias resistentes se relaciona con la persistencia del antibiótico. Es el uso prolongado de éstos lo que más tiende a asociarse con la persistencia de organismos resistentes, incluso después de suspender la administración del agente antibacteriano (47).

La transferencia de genes de resistencia a los antimicrobianos puede observarse *in vitro* sin dificultad y con fluidez, por ejemplo se ha logrado transferencia de resistencia por conjugación entre *E. coli* comensal y resistente, así como con cepas de *Salmonella* en un simulador de fermentación de íleon porcino (19). Sin embargo, a pesar que existe evidencia de transmisión de genes de resistencia *in vivo*, es dificultoso realizar una investigación detallada, resultando muy engorroso obtener controles adecuados que reflejen la ocurrencia del fenómeno (84).

La persistencia de los plásmidos R, en general, es una función de la cepa bacteriana, no de los plásmidos. La presencia de un antibiótico puede seleccionar microorganismos que contienen plásmidos R, como sucede con la mayoría de las cepas de *E. coli*, a pesar de no ser buenos colonizadores. El desarrollo de resistencia en la microbiota bacteriana normal puede disminuir la eficacia del tratamiento antimicrobiano (47).

Los antimicrobianos más utilizados frente a infecciones producidas por enterobacterias son beta-lactámicos, quinolonas, aminoglucósidos, tetraciclinas y sulfonamidas. La resistencia frente a los beta-lactámicos por beta-lactamasas, es relativamente común e incluye a algunas enzimas cromosómicas inducibles, constitutivas, mediadas por plásmidos y de espectro extendido. La resistencia a quinolonas, no es tan frecuente entre enterobacterias, pero está primordialmente asociada a la modificación de la diana ADN girasa. La resistencia a los aminoglucósidos es de tipo enzimática y ocurre en el espacio periplásmico. El principal mecanismo de resistencia frente a tetraciclinas es por sobreexpresión de sistemas activos de eflujo, la modificación de la diana ribosomal no es un mecanismo de resistencia importante entre las enterobacterias como la *E. coli*. La principal resistencia a las sulfonamidas es mediada por plásmidos y se vincula con una alteración en la diana dihidropteroato sintetasa (85).

El eflujo activo y la reducción de la permeabilidad en la membrana externa, con disminución de la concentración de los antimicrobianos en el interior de la célula bacteriana, facilita la emergencia de fenotipos **multirresistentes** en la especie *E. coli* (85).

La membrana externa y el sistema de eflujo deben actuar sinérgicamente para lograr disminuir las concentraciones de los agentes antibacterianos a nivel del citoplasma y periplasma. Las bombas AcrAB como único mecanismo de resistencia en *E. coli*, pueden producir resistencia intrínseca únicamente a agentes lipofílicos de largas cadenas que atraviesan con dificultad los eficientes canales porínicos, como es el caso de la eritromicina, el ácido fusídico, secantes, detergentes, entre otros. Sin embargo, sin la colaboración de otro mecanismo que refuerce la resistencia, la bacteria permanece susceptible a antibióticos de pequeña estructura capaces de difundir rápidamente a través de dichos

canales, como las tetraciclinas, cloranfenicol y fluoroquinolonas. Este eficiente sinergismo implica que los sistemas de eflujo por multicomponentes pueden producir niveles de resistencia significativos aún cuando la velocidad máxima (V_{max}) de sus transportadores sea baja, siempre que su membrana externa funcione como una efectiva barrera (13).

Los genes *acrA* y *acrB* forman un operón. *AcrA* es una proteína periplasmática, miembro de la familia de las proteínas de fusión de membrana MFP y *AcrB* es un transportador transmembrana (CMP) perteneciente a la familia RND. *AcrAB* son cercanamente homólogas a *MexAB* de *P. aeruginosa*. El operón *acrAB* no contiene ningún gen que codifique para una proteína de membrana externa (OMP). Sin embargo, *AcrAB* se encuentra asociado a un OMP denominado TolC que sirve como canal o porina para más de un sistema de exportación de tipo proteico (63, 65).

El análisis del genoma de *E. coli* ha demostrado la presencia de genes que codifican para más de 37 transportadores. *AcrAB-TolC* es capaz de transportar a más de cinco antibióticos diferentes. Fisiológicamente es un transportador de sales biliares, esto ilustra bien el concepto de que los antibióticos son sustratos oportunistas de sistemas de transportes indispensables para la vida bacteriana en el medio ambiente natural (27).

Se han observado incrementos adicionales en la concentración inhibitoria mínima de los antibióticos luego de que ocurra la sobreexpresión de bombas de diferentes clases, resultando en una *E. coli* altamente resistente (26).

Por sí solos los sistemas de eflujo confieren de bajos a moderados niveles de resistencia (incrementos de la CIM de 1 a 64 veces). Razón por la cual su relevancia fue cuestionada. Sin embargo, esa bacteria estará mejor equipada para sobrevivir bajo la presión de los antimicrobianos y desarrollar posteriores mutaciones en sus genes. En general estos sistemas de resistencia se presentan en cooperación con otros mecanismos para conferir, no solamente elevados niveles de resistencia, sino también un mayor espectro de acción (26, 86).

I.3.2.3. *Escherichia coli* como indicador de resistencia bacteriana

Las bacterias comensales de la microbiota intestinal humana y animal, no solamente constituyen un enorme reservorio de genes de resistencia para bacterias patógenas, zoonóticas y/o comensales, sino que también el nivel de resistencia manifiesto en estos microorganismos puede ser considerado un excelente indicador del grado de presión de selección de resistencia antimicrobiana (22).

El monitoreo de este tipo de microorganismos permite dar a conocer a los médicos veterinarios cuáles antimicrobianos están generando resistencia, evitando un riesgo en salud pública, además de disminuir el riesgo de un fracaso terapéutico que genera grandes pérdidas económicas al productor (11).

Las bacterias indicadoras de resistencia son parte de la microbiota intestinal del hombre y de otros mamíferos, aves e insectos. Son capaces de sobrevivir en suelos, agua y superficies inanimadas. La mayor importancia de estas bacterias radica en que la microflora normal es considerada un reservorio de bacterias y determinantes genéticos de resistencia con posibilidad de ser transmitidos y diseminados hacia otros microorganismos patógenos, zoonóticos y/o comensales o bien a través de la cadena alimentaria (87).

La elección de *E. coli* como bacteria indicadora se justifica fundamentalmente por varias razones: (1) su elevada frecuencia de aislamiento e identificación en la materia fecal de animales, permite desarrollar estrategias de muestreo aleatorias comunes a todas las especies animales, facilitando el análisis estadístico de los datos y reduciendo el efecto de sesgo del muestreo, (2) su aislamiento e identificación son relativamente sencillos y económicos, (3) sus mecanismos de resistencia son bien conocidos y sencillos de diagnosticar (88, 89, 90).

Todas estas características permiten la posibilidad de realizar extrapolaciones desde la población muestreada al azar hacia todo el resto de los animales (91).

Este microorganismo es relevante para medicina humana, y en cuanto a las pautas que siguen diversos programas de monitoreo, se considera a esta bacteria como el mejor indicador entre los microorganismos Gram-negativos (11, 87).

Como puede observarse, son los microorganismos *comensales* dentro de la especie mencionada, los elegidos para ser utilizados como indicadores y monitorear la resistencia; no así las variantes *patógenas* de la especie (*E. coli* enterotoxigénica o verotoxigénica) (91).

El monitoreo de la resistencia a los antimicrobianos en bacterias comensales como *E. coli*, aisladas de animales clínicamente sanos y seleccionados para ser representativos de una población general, puede proveer datos valiosos acerca del pool de determinantes de resistencia presentes en las bacterias de origen animal. La ocurrencia de resistencia a los antimicrobianos en estas bacterias, ha sido considerada un buen indicador de la presión de selección ejercida por el uso de antimicrobianos sobre la población de bacterias intestinales a través de la alimentación animal (91).

A su vez, *E. coli* es representativa de la familia *Enterobacteriaceae* y permite monitorear la emergencia y los cambios en la proporción de bacterias poseedoras de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEEs) (91).

La resistencia frente a los antimicrobianos más utilizados en la clínica puede comprometer seriamente el tratamiento de infecciones extra intestinales producidas por *E. coli*. Estas infecciones, están siendo cada vez más frecuentes en todo el mundo y son un grave problema para la salud humana y animal (92).

La investigación de la prevalencia de la resistencia en bacterias indicadoras del tracto gastrointestinal de diferentes animales, permite comparar el estado de resistencia bacteriana en poblaciones disímiles y detectar la posibilidad y el riesgo de transferencia de resistencia entre hombres y animales o viceversa (22).

En medicina humana y veterinaria existen actualmente, en muchos países del mundo, programas de vigilancia y monitoreo de la resistencia bacteriana (93, 94, 95, 96). Éstos están principalmente orientados al estudio de patógenos humanos, microorganismos zoonóticos y bacterias indicadoras de la flora intestinal normal de los animales. Sin embargo, en Argentina no se ha desarrollado aún un programa de vigilancia para aislamientos de origen animal.

I.4. Importancia de la resistencia y la multiresistencia bacteriana en el hombre

Existe una relación directa entre consumo de antimicrobianos y generación de resistencia bacteriana, incluso ciertos estudios confirman disminución de la resistencia racionalizando el consumo de los agentes antibióticos. Según estudios foráneos y locales, el mayor consumo de antimicrobianos en medicina humana, se encuentra en la comunidad (6).

El problema se agrava aún más en pacientes hospitalizados. Cuando un patógeno multiresistente afecta a pacientes críticos -inmunodeprimidos, niños, ancianos, o pacientes con comportamientos farmacocinéticos alterados (insuficiencias hepática y renal, dializados, etc)-, los antimicrobianos comúnmente usados no funcionan de manera óptima y se debe trabajar con diseño de nuevas moléculas, protocolos terapéuticos combinados y muy onerosos. El empleo inadecuado de antimicrobianos y su uso no fundamentado incrementan la morbimortalidad, los costos en salud y la resistencia bacteriana a múltiples fármacos; siendo la consecuencia más grave del fracaso terapéutico la posible muerte del paciente (5, 97).

Mientras los antibióticos sean usados, las bacterias inevitablemente seleccionarán resistencia, ya sea por mutación, adquisición de genes o combinación de ambos. Las cepas sobrevivientes, como resultado de la selección por el uso de antibióticos, tendrán la capacidad de crecer en presencia de éste, reemplazarán a las cepas susceptibles y el quimioterápico perderá su efectividad a medida que esto ocurra.

La diseminación de la resistencia horizontal hacia otras bacterias en el hombre así como en los animales y en el medio ambiente, puede ocurrir por medio de contacto directo o por contaminación del alimento. Las bacterias comensales no causan enfermedad pero actúan como medio de transferencia de resistencia hacia otras bacterias que pueden resultar patógenas y estar ya presentes en el hombre (24).

Otro grupo humano de riesgo es la población rural, las explotaciones productoras de animales de consumo constituyen un complejo ecosistema compuesto por tres compartimentos con diferentes nichos de resistencia bacteriana. Estos compartimentos están constituidos por el personal humano que vive en el campo en contacto directo con los animales, los animales de producción y de compañía; y el medio ambiente inmediato (98).

Como fue presentado en el Documento de Base de la Consulta de Expertos en Uso No-Humano de Antimicrobianos y Resistencia Antimicrobiana organizada en conjunto por la OMS, FAO/OIE/WHO, 2003, hay un conjunto de factores que deben ser considerados en la diseminación exitosa de clones resistentes en humanos y animales, estos factores incluirían:

- Capacidad de la bacteria de sobrevivir y competir con otros clones en el mismo nicho u otros.
- El potencial de adaptarse a nuevos ambientes.
- La resistencia a las condiciones del medio, incluyendo factores físicos y químicos.
- La capacidad de colonizar hospedadores animales y humanos; y reproducirse luego de colonizar.
- La habilidad para superar la respuesta inmune del hospedador.
- La estructura de la industria animal: infecciones arriba en la pirámide, en animales de elite genética (extremo superior de la pirámide) pueden generar diseminación hacia abajo en la descendencia.
- El manejo en las explotaciones, esto incluye disposición de la materia fecal y movimientos de animales.
- La resistencia a otros antimicrobianos usados para otros propósitos.

La emergencia de cepas resistentes a antimicrobianos está, obviamente, ligada a la utilización de este tipo de agentes. Si los antibacterianos se usarán de forma más racional, las resistencias serían mucho más raras. Por lo tanto, la mala utilización de los mismos es una condición para la emergencia y diseminación de resistencias (5).

I.5. Uso racional de los antibióticos

La resistencia a los antimicrobianos es un fenómeno biológico natural, pero se convierte en un problema significativo para la salud pública cuando se multiplica por causa de la utilización incorrecta y el descuido humano (99).

La farmacoresistencia es el indicio más claro de que no hemos enfrentado seriamente la amenaza de las enfermedades infecciosas. Indica que hemos malepleado nuestro precioso arsenal de medicamentos que combaten enfermedades, tanto porque hemos abusado de ellos en los países desarrollados como, paradójicamente, porque los hemos empleado mal y los hemos subutilizado en los países en desarrollo. Inevitablemente, una utilización no prudente de los potentes antibióticos actuales con el tiempo dará lugar a una pérdida de eficacia de los mismos (100).

El uso racional de antibióticos tiene como objetivo obtener el mayor beneficio para el enfermo, limitar la selección y diseminación de microorganismos resistentes; y minimizar los gastos económicos.

Según la Organización Mundial de la Salud (100), cerca de la mitad de los pacientes que reciben medicamentos no los usan como deberían, y aproximadamente una tercera parte de la población mundial carece de acceso a los medicamentos esenciales.

Esa falta de acceso se ve agravada por el uso irracional, que implica: uso de más medicamentos de los clínicamente necesarios (polimedicación); uso inadecuado de antimicrobianos para infecciones no bacterianas; selección o dosificación inapropiadas de antibióticos para infecciones bacterianas; emisión de prescripciones no acordes con las directrices clínicas, y automedicación no justificada a menudo de medicamentos de venta con receta. La consecuencia suele ser una importante morbilidad y mortalidad, debido sobre todo a infecciones de la infancia, como la neumonía (100).

El uso racional de estas poderosas herramientas en el tratamiento de las enfermedades de origen bacteriano debe estar orientado fundamentalmente a:

- Erradicar y controlar severas patologías que pueden comprometer la vida de las personas, mascotas y/o animales de producción.
- Controlar la propagación de enfermedades con alto impacto en la salud pública (zoonosis) y

- **Contener el avance de la resistencia antimicrobiana.**

La quimioterapia antimicrobiana apunta al microorganismo que ocasiona el proceso infeccioso, y su objetivo debe ser eliminar al agente causal. Sin embargo, los antimicrobianos rara vez erradican un patógeno sin la colaboración de las defensas específicas e inespecíficas del hospedador (99).

En el caso de la medicina veterinaria, el uso irracional de los antibióticos comprende:

- Uso de antibióticos cuando no son necesarios, debido, con frecuencia, a un mal diagnóstico.
- No se indica la dosis a la persona que aplicará el medicamento, dicha persona muchas veces no está capacitada para tomar este tipo de decisiones que quedarán a su cargo.
- Dosis incorrecta, ya sea que supere o esté por debajo de la adecuada. En el último caso posiblemente seleccionará bacterias resistentes.
- Intervalo entre dosis demasiado prolongado.
- Tratamientos muy prolongados favorecen la selección de bacterias resistentes; y si es demasiado corto, fallará la terapia.
- Uso de medicamentos de mala calidad o bioinequivalentes (101, 102, 103).

Este amplio uso inadecuado de los antimicrobianos suscita especial inquietud. Las bacterias resistentes son un motivo de preocupación para los epidemiólogos, pues pueden propagarse a nivel local, regional o mundial a través del contacto personal, de un saneamiento deficiente, de los viajes o de la cadena alimentaria. Todos estos mecanismos de propagación se ven facilitados por el abuso de los antimicrobianos y por la falta de programas eficaces de control de las infecciones.

Sin embargo, la resistencia se puede contener. Cuando una infección se trata de una manera integral y oportuna, la resistencia rara vez se convierte en un problema de salud pública. La estrategia más eficaz contra la resistencia a los antimicrobianos es hacer bien el trabajo desde el principio, es decir, destruir inequívocamente los microbios, derrotando de ese modo la resistencia antes de que aparezca (99).

Cuando se emplean antimicrobianos, es importante utilizar el fármaco correcto, en la concentración, intervalo de dosificación y duración adecuadas. Para su elección se deben tener en cuenta varios factores, entre ellos, de fundamental importancia, son la susceptibilidad de los patógenos al agente y las propiedades PK/PD del fármaco.

Las propiedades farmacocinéticas (PK) incluyen la vía de administración, velocidad de absorción, volumen de distribución, afinidad proteica del fármaco, concentración en función del tiempo en tejidos y otros líquidos corporales, concentración en función del tiempo en el sitio de infección; y vía y velocidad de eliminación. Todos tienen influencia sobre la frecuencia de dosificación. Las propiedades

farmacodinámicas (PD) incluyen la CIM, la concentración bactericida mínima (CBM), la existencia o no de efectos de segunda exposición (efecto post-antibiótico –EPA-, efecto sub-CIM, estímulo leucocitario secundario), efecto toxicológico, y efectos antimicrobianos en el núcleo infeccioso.

La administración de un fármaco genera una curva de concentración que alcanza una concentración máxima (pico) y una duración en el tiempo de concentraciones detectables. Ambas variables determinan un área bajo la curva (ABC). Las bacterias sensibles se caracterizan por inhibir su crecimiento a una CIM y son destruidas por una determinada CBM. Las bacterias resistentes no inhiben su crecimiento frente al antimicrobiano o exhiben CIMs mayores a las concentraciones que el antibacteriano puede alcanzar en el organismo. Las bacterias tolerantes exhiben CIMs alcanzables pero tienen una fuerte disociación CIM/CBM por lo que el antimicrobiano sólo ejerce acción bacteriostática pero no bactericida (6).

Los efectos antimicrobianos en el sitio de la infección comprenden la CIM, la CBM, efecto destructivo dependiente de la concentración, efecto de primera exposición, EPA, efecto sub-CIM y efecto de potenciación leucocitaria post-antibiótico. Otros factores, de igual importancia, incluyen el costo de la terapia, y las defensas inmunes; y funciones renal y hepática del hospedador (99).

Para seleccionar un antimicrobiano adecuadamente se requiere lo siguiente:

- Establecer el diagnóstico de infección microbiana.
- Determinar la necesidad del tratamiento.
- Iniciar el tratamiento conveniente, para lo cual debemos seleccionar el antimicrobiano de acuerdo a la potencial susceptibilidad del patógeno sospechado.
- Conocimiento de los factores que afectan la concentración del fármaco en el núcleo infeccioso.
- Conocimiento de la toxicidad del fármaco y factores que la potencian.
- Costo del tratamiento.

El fármaco ideal es aquel para el cual el microorganismo es más susceptible y que alcanza concentraciones efectivas en el sitio infeccioso sin lesionar al hospedador. Los datos de la CIM pueden ser de mayor utilidad que los resultados de la difusión de disco porque las CIMs definen con mayor precisión el grado de susceptibilidad y en consecuencia la posología.

En un paciente crítico los aspectos PK adquieren mayor relevancia, ya que el mayor volumen de distribución de los fármacos determina niveles plasmáticos más bajos y a su vez, la posible disfunción de los órganos excretores, especialmente insuficiencia renal, incide en la tasa de eliminación. Lo mencionado contribuye a la variabilidad interindividual de los niveles plasmáticos de los fármacos,

requiriendo ajustes de dosis y medición de niveles para antimicrobianos con margen terapéutico estrecho (5).

Por otra parte, con frecuencia las infecciones son causadas por agentes más resistentes, con CIMs más altas, por lo que obtener concentraciones adecuadas tanto en el plasma como en el sitio de infección es fundamental para el éxito de la terapia pero también para prevenir la aparición de más resistencia al antimicrobiano (104).

Cada antimicrobiano tiene un mecanismo de acción específico que determina que algunos de ellos posean acción bactericida constante y otros que se caractericen por una acción bactericida variable dependiente de la concentración, es decir que a mayor concentración la velocidad bactericida es mayor (104).

El conocimiento de la PK y PD de los antimicrobianos es fundamental para la prescripción de dosis y determinación de intervalos adecuados.

I.5.1. Parámetros farmacocinéticos que más se vinculan con la eficacia antibacteriana

El uso racional de los medicamentos se basa, en forma central, en el conocimiento de su farmacocinética que, coordinado con el conocimiento de su farmacodinamia y toxicidad, de las características del paciente y la enfermedad, permitirá una terapia óptima (5).

La primera consideración de importancia en cuanto a la farmacocinética antimicrobiana, tiene que ver con la selección del lugar donde se medirá la concentración del fármaco, de donde derivarán los datos cinéticos finales. Puede asumirse que el fármaco alcanzará sin inconvenientes el foco infeccioso y por lo tanto el tejido o célula blanco, sería el lugar más apropiado para el análisis cinético. Sin embargo, las concentraciones plasmáticas han demostrado ser los mejores predictores en el caso de que la unión a las proteínas plasmáticas sea ínfima. Ello se debe, en este caso, a que la penetración del fármaco al fluido extravascular desde el plasma es en general completa, por lo tanto la concentración de antimicrobiano libre en el fluido plasmático, provee una medida acertada de la concentración tisular del mismo (105).

La farmacocinética de los antimicrobianos responde a los principios generales de la farmacocinética, que es la relación que se establece entre el antimicrobiano y el paciente e incluye los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción. Todos estos procesos determinan una curva plasmática de concentración-tiempo que en el caso de los antimicrobianos, es responsable de la

concentración que alcanza el fármaco en el tejido afectado donde es requerido para el control de la infección (106).

El comportamiento farmacocinético se caracteriza a través de una serie de parámetros. Los que mayor vinculación tienen con la eficacia antibacteriana son la biodisponibilidad, semivida de absorción, área bajo la curva concentración versus tiempo, concentración máxima obtenida en el plasma/tejido y tiempo al que esa concentración se alcanza, volumen de distribución corporal, semivida de eliminación y aclaramiento desde plasma (5).

- *Biodisponibilidad (F)*: Porción de la dosis administrada que alcanza el compartimiento central. Nos permite conocer la magnitud y extensión de la absorción.
- *Semivida de absorción ($T_{1/2ab}$)*: Tiempo en que se absorbe un 50% de la dosis administrada.
- *Área bajo la curva concentración versus tiempo (ABC)*: Suma de los trapecios y triángulos, cuyos lados son tiempos o concentraciones ubicados por debajo de la curva concentración en función del tiempo.
- *Concentración máxima (C_{max})*: La máxima concentración obtenida en plasma, en el humor o en el tejido donde se midan las concentraciones de la droga.
- *Tiempo al que se alcanza la C_{max} (T_{max})*: Tiempo al que se alcanza la máxima concentración en el humor o tejido en que se midan las concentraciones.
- *Volumen de distribución corporal (V_dB)*: Volumen necesario para igualar las concentraciones de la molécula entre compartimento periférico y central, nos da idea de la magnitud de la distribución.
- *Semivida de eliminación ($T_{1/2\beta}$)*: Tiempo en que se elimina un 50% de la concentración existente en el compartimento central y
- *Clearance (CLB)*: Volumen de humor corporal (por ej. plasma) que es depurado de la droga estudiada por unidad de tiempo.

En el tratamiento de las infecciones bacterianas es de considerable importancia que una concentración adecuada del antimicrobiano llegue con rapidez al foco infeccioso; y se mantenga allí durante el tiempo necesario y en la concentración adecuada para obtener éxito en la terapia. Es fundamental comprender que la concentración obtenida depende de la disponibilidad sistémica del antimicrobiano, la cual varía con la posología y vía de administración, la frecuencia de la dosis y la capacidad del fármaco para ingresar en el sitio de infección. La localización de la infección también influye enormemente en la concentración del antimicrobiano donde su acción es requerida (presencia de barreras, cambios de pH, etc) (10).

La terapia antimicrobiana efectiva depende de la susceptibilidad bacteriana, características farmacocinéticas del antimicrobiano y régimen posológico (10).

I.5.2. Parámetros farmacodinámicos

La farmacodinamia describe la compleja interrelación que se establece entre el perfil farmacocinético del antimicrobiano y la susceptibilidad *in vitro* de la bacteria (106).

Los indicadores principales que han representado la actividad y potencia de los antibióticos durante décadas han sido la CIM y la CBM (107).

La CIM se define como la concentración más baja de droga que previene el crecimiento visible de microorganismos luego de 18 - 24hs de cultivo. Si un antibiótico se mantiene en el organismo por encima de la CIM para determinada cepa de un microorganismo, será capaz de inhibir el desarrollo de esa bacteria con comodidad. La CIM es el test mediante el cual se realizan las medidas de susceptibilidad y puntos de corte (5).

Por su parte, la CBM representa la mínima concentración de antimicrobiano capaz de matar al 99.9% de los microorganismos inoculados luego de 18 - 24hs. Determinados efectos perjudiciales para las bacterias persisten luego que la exposición del microorganismo al antimicrobiano ha terminado, lo que se conoce como, "efecto post-antibiótico". Aunque el efecto post-antibiótico fue observado hace ya muchos años, más recientemente se descubrió que virtualmente todos los antimicrobianos lo producen en mayor o menor medida según el microorganismo evaluado (5).

Ambas medidas son útiles indicadores de la potencia antibiótica, pero no pueden revelar nada acerca del tiempo de acción del antimicrobiano. Por ejemplo, la CBM no puede indicar la tasa de muerte o si esa tasa de muerte está relacionada o no con el incremento de la concentración de la droga. Por otro lado, la CIM no puede indicar si existe efecto persistente que pueda perdurar luego de la exposición al antibiótico. Dicho efecto persistente podría determinar el tiempo necesario para que el microorganismo se recupere luego de la exposición. Los *efectos de persistencia*, conjuntamente con la *capacidad de muerte bacteriana ("killing")*, han sido establecidos como los mejores parámetros para definir el óptimo plan de administración de un antibiótico (104).

La *tasa de muerte* está determinada bien por la cantidad de tiempo que el antibiótico necesita para matar (Ej., muerte tiempo-dependiente); o bien por la concentración que se tiene que incrementar para que se produzca la muerte (Ej., muerte concentración-dependiente).

La curva de muerte o de letalidad bacteriana (CLB) es un método cinético de determinación del poder bactericida. Se valora la capacidad de matar en relación con el tiempo y con distintas concentraciones fijas de antimicrobiano. Consiste en enfrentar un inóculo normalizado a concentraciones fijas de antimicrobiano en un caldo (108).

Sin embargo, los estudios farmacodinámicos *in vitro* mencionados previamente, se realizan bajo condiciones ideales establecidas por normativas internacionales, que se alejan muchas veces de lo que verdaderamente acontece entre el antimicrobiano y los microorganismos en el foco infeccioso, es decir *in vivo*. Estos estudios subestiman la evaluación de la actividad antimicrobiana relacionada con el EPA, EPA sub-CIM y estímulo leucocitario post-antibiótico. Estos tres términos son los que definen la persistencia del efecto antimicrobiano en el sitio de infección (10, 105).

El EPA es el tiempo necesario para que un cultivo bacteriano, que estuvo en contacto con un antibiótico a concentraciones por encima de la CIM, reinicie el crecimiento. El antimicrobiano puede ser removido por lavado o dilución para dejar de estar en contacto con el microorganismo. El EPA se incrementa en función de la magnitud de la *concentración* de antimicrobiano a que la bacteria fue sometida (antibacterianos acción concentración-dependiente), o del *tiempo* durante el cual la bacteria estuvo en contacto con el antimicrobiano a concentraciones por encima de la CIM (antibacteriano acción tiempo-dependiente) (10).

La ocurrencia y la magnitud del EPA dependen del microorganismo, del tipo y concentración del fármaco antimicrobiano, y del tiempo de exposición al mismo (105).

El EPA sub-CIM es la mínima cantidad de antibacteriano (por debajo de la CIM) que puede afectar el crecimiento de los microorganismos y el estímulo leucocitario post-antibiótico es un efecto en el cual las bacterias son más susceptibles a la fagocitosis o a la muerte intracelular dentro de los leucocitos, cuando se encuentran en la fase post-antibiótica (109).

I.5.3. Parámetros farmacocinéticos-farmacodinámicos (PK/PD)

Históricamente un régimen de dosificación era determinado por parámetros PK y algunos PD como la CIM, sin embargo hoy se sabe que la eficacia de los antimicrobianos *in vivo* puede ser predicha a través de la integración de parámetros PK/PD.

El problema de la actividad de los agentes antimicrobianos *in vivo* es mucho más compleja que *in vitro*, pues ésta incluye no solo al fármaco y la bacteria, sino que existe una interrelación entre hospedador-microorganismo-antimicrobiano. Algunos puntos de este triángulo se conocen mejor que

otros, es decir, existe un conocimiento más extenso y profundo acerca de la infección y de los microorganismos causales que de la respuesta inmunológica del hospedador. A la hora de emplear una terapia racional y exitosa, es de fundamental importancia que el antimicrobiano utilizado sea específico para el microorganismo infeccioso, e inocuo para el hombre (Figura I.2).

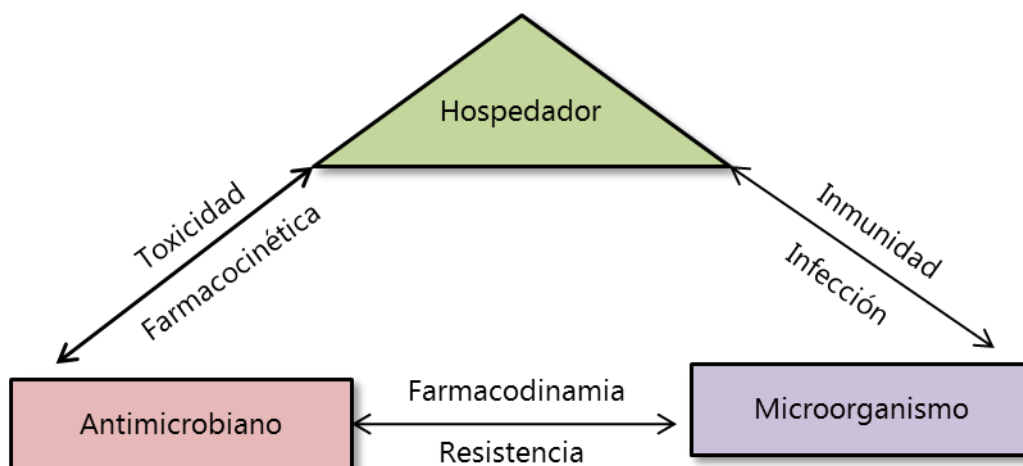


Figura I.2. Triángulo de Davis: Interacción hospedador-microorganismo-antimicrobiano. *Adaptado de Brooks et al, 2005 (81)*

La farmacología de los antimicrobianos puede dividirse en dos componentes: el primero, la farmacocinética, donde la combinación de los efectos bioquímicos (de los fármacos y sus metabolitos en el organismo); los efectos patofisiológicos de los individuos y el régimen de dosificación establecido; permiten determinar la concentración del fármaco en función del tiempo en plasma o suero o tejidos. Es decir, permite estimar la concentración lograda en el sitio de la infección, sitio blanco del antimicrobiano. Y el segundo componente, la farmacodinamia, es la relación entre la concentración sérica, los efectos farmacológicos deseados y los efectos toxicológicos o adversos, que permite determinar el nivel de actividad y de toxicidad real de un medicamento (104) (Figura I.3).

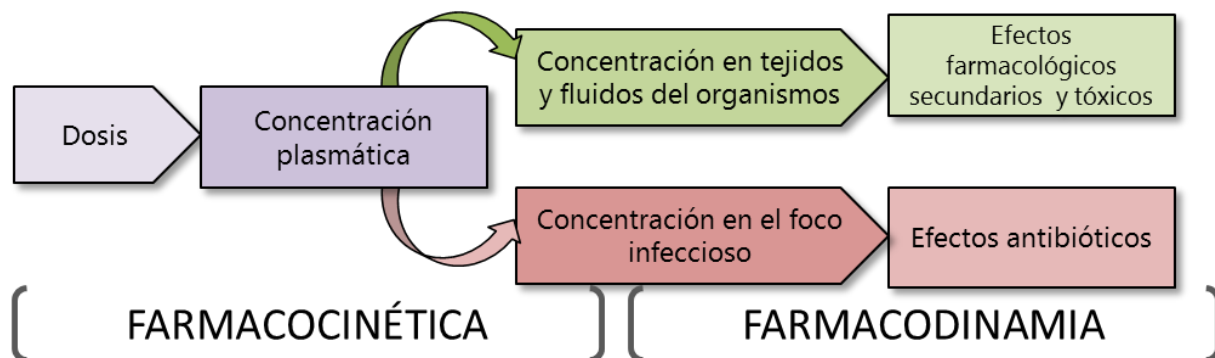


Figura 1.3: Factores determinantes de la actividad antimicrobiana. *Adaptado de Van Bambeke F, 2000 (25)*

La interacción PK/PD es una herramienta que permite relacionar los datos de la actividad microbiológica *in vitro* de un antibacteriano, con los parámetros farmacocinéticos del mismo *in vivo*.

El objetivo de la relación PK/PD es establecer un protocolo terapéutico racional que permita optimizar la utilización de los antibacterianos para maximizar la eficacia clínica y bacteriológica; y minimizar la selección de cepas resistentes. De esta manera algunos parámetros farmacocinéticos se pueden correlacionar con parámetros farmacodinámicos, a efectos de obtener predictores más robustos de la eficacia terapéutica (5), considerados actualmente como determinantes de eficacia "*in vivo*" de los agentes antimicrobianos (104).

Estos predictores de eficacia son: el área bajo la curva concentración tiempo dividida por la concentración inhibitoria mínima (ABC/CIM); la máxima concentración plasmática dividida por la concentración inhibitoria mínima (C_{max}/CIM) y el tiempo en que la concentración del antibiótico, durante el intervalo de dosis, excede a la CIM ($T > CIM$) (31).

Una gran variedad de estudios han sugerido que la magnitud de los parámetros requeridos para lograr eficacia clínica y bacteriológica no difiere entre diferentes especies animales y el hombre. Es decir, por ejemplo, el tiempo por encima de la CIM requerido para demostrar la actividad y eficacia de los beta-lactámicos en el ratón es el mismo que para los humanos. Asimismo, dicha magnitud no varía entre fármacos antimicrobianos similares pertenecientes a una misma clase (105, 107).

Sin embargo, entre los diferentes microorganismos la magnitud de los parámetros PK/PD para obtener éxito terapéutico y minimizar la emergencia de resistencia bacteriana, es diferente. Un ejemplo, es el de *S. aureus* que en comparación con bacilos Gram-negativos, necesita un tiempo menor de contacto con el antimicrobiano por encima de la CIM con penicilina o cefalosporina para obtener un resultado similar (104).

Cada vez se dispone de más datos sobre estudios *in vitro* e *in vivo* utilizando modelos animales que corroboran la importancia de los parámetros PK/PD para diferentes antimicrobianos; y su capacidad para permitirnos tratar efectivamente infecciones por gérmenes con susceptibilidades menores y así prevenir la emergencia de resistencias (110, 111).

I.5.3.1. Clasificación de los antimicrobianos según su comportamiento PK/PD

Del punto de vista PK/PD, los agentes antimicrobianos pueden ser divididos en tres grupos:

Antimicrobianos bactericidas dependientes de la concentración

Son aquellos cuya eficacia se correlaciona con concentraciones séricas elevadas, ocasionando un efecto persistente y prolongado. Dosis altas de estos antibióticos con un elevado cociente inhibitorio, producen un efecto bactericida marcado (104, 110, 111).

Las relaciones ABC/CIM y C_{max}/CIM, serían los parámetros determinantes de eficacia para este grupo de fármacos. Es decir la C_{max} y el ABC tienen relación directa con el éxito terapéutico, independientemente que luego las concentraciones séricas caigan por debajo de la CIM. Por cuanto no se alcanza a producir recrecimiento significativo, generalmente presentan fenómeno de persistencia prolongada o EPA. El objetivo farmacológico en estos casos es administrar dosis altas y espaciadas (106).

Para algunos antimicrobianos, la estrategia para obtener mayor eficacia es maximizar la concentración administrada con el objetivo de lograr una C_{max} entre 10-12 veces por encima de la CIM. Estudios *in vitro* han demostrado que una relación C_{max}/CIM menor de 10, aumenta el riesgo de selección de resistencia y la falla terapéutica (31). Pero es importante mencionar que con determinados agentes antimicrobianos no siempre es posible alcanzar una relación C_{max}/CIM de 10-12 veces, ya que esa concentración se acercaría a la dosis tóxica para el individuo (104).

En cuanto al parámetro que relaciona el ABC con la CIM, según Jacobs (2001), el objetivo central sería lograr una relación ABC/CIM >25-30 en individuos inmunocompetentes y ≥100-125 en inmunocomprometidos (30).

Los antimicrobianos representativos de este grupo son los aminoglucósidos y las fluoroquinolonas (107, 111, 110). Craig y col. (1998), han considerado que existe una mejor correlación entre la eficacia terapéutica y el parámetro ABC/CIM. Sin embargo, cuando existe un riesgo

significativo de emergencia de resistencia, o se tiene en cuenta el control del desarrollo de subpoblaciones mutantes, C_{max}/CIM es el de elección (104).

Antimicrobianos acción dependiente del tiempo con escasa o nula persistencia

Estos agentes tienen una actividad tiempo de exposición dependiente y la mayoría de ellos no presenta un EPA significativo. La estrategia para lograr el mejor resultado es optimizar la duración de la exposición. Se maximiza la eficacia cuando los niveles se mantienen constantes y entre 4-5 veces por encima de la CIM. Esto puede ser logrado administrando pequeñas dosis más frecuentemente. Aunque resulta poco práctico, la infusión IV continua de estos agentes puede teóricamente alcanzar mejores resultados (104, 106).

El tiempo de permanencia por encima de la CIM necesario para el éxito terapéutico, varía dependiendo del microorganismo, el sitio de infección y el antimicrobiano. Sin embargo, se considera que en general es suficiente con alcanzar el 40-50% del intervalo interdosis (30).

Los antibióticos beta-lactámicos tienen este tipo de actividad tiempo-dependiente (ej., penicilinas, cefalosporinas, monobactam, carbapenems), lo mismo ocurre con clindamicina, macrólidos (excepto macrólidos de última generación –tilmicosina-, azálidos y ketólidos) y linezolid (31, 107).

Antimicrobianos acción dependiente del tiempo con prolongada persistencia

Para estos agentes es esencial optimizar la cantidad de droga administrada diariamente, para que las concentraciones plasmáticas sean mantenidas por encima de la CIM. La relación ABC/CIM es el parámetro que mejor se correlaciona con eficacia en este último grupo (99).

Los antimicrobianos representativos son: tetraciclinas, gliciliclinas, cloranfenicol, sulfonamidas, macrólidos de última generación –tilmicosina-, azálidos, ketólidos y glicopéptidos (107).

I.5.4. Importancia de la relación PK/PD en la prevención de la selección de resistencia bacteriana a los antimicrobianos

Se conocen muchos factores responsables del desarrollo, selección y posterior diseminación de bacterias resistentes en el organismo del individuo, pero uno de los mayores factores de riesgo es la exposición repetida a concentraciones subóptimas del antimicrobiano (105, 112).

En un principio la CIM fue el indicador más usado durante décadas para la terapéutica. Intuitivamente si un antimicrobiano se mantiene por encima de la CIM para un determinado microorganismo, es razonable pensar que se logrará la inhibición de su desarrollo. Luego, con la integración de los parámetros PK a los PD, se mejora la eficacia terapéutica, y la selección de cepas resistentes se ve minimizada. Sin embargo, inevitablemente siguen ocurriendo mutaciones bacterianas en el sitio de infección y en nichos bacterianos comensales del organismo, en el momento en que la concentración del antimicrobiano desciende y se mantiene por el tiempo suficiente para seleccionar cepas previamente resistentes (5).

Durante la terapéutica, la PK es la responsable de los cambios de concentración del antimicrobiano en el sitio de infección. Sin embargo, muchas veces la concentración en el foco infeccioso no es la esperada, debido a diversos factores que afectan la llegada del antimicrobiano, como por ejemplo: elevada unión a proteínas plasmáticas, escasa capacidad de penetración tisular, secuestro intracelular del fármaco, captación iónica, etc. (113).

Sumado a la cinética local del fármaco como causal de dosis subóptimas, debe tenerse en cuenta como posible punto de partida al uso irracional e inadecuado de los antimicrobianos, sin seguir correctamente las pautas PK/PD para la dosificación.

Todos estos factores pueden ser responsables de que los microorganismos patógenos y/o comensales sean expuestos a una concentración inadecuada de antimicrobiano, incapaz de lograr el éxito terapéutico y con grandes probabilidades de seleccionar cepas resistentes. La presencia de concentraciones subletales ejerce presión de selección sobre la población bacteriana sin lograr su erradicación (112).

Recientemente se ha introducido una nueva hipótesis que incorpora un concepto novedoso denominado concentración preventiva de mutantes (CPM). La CPM se define como la menor concentración de antimicrobiano capaz de prevenir el desarrollo de mutaciones de primer paso. Este parámetro constituye el límite superior de un intervalo de concentraciones denominado ventana de selección de mutantes (VSM), cuyo valor inferior está dado por la CIM₉₉ del microorganismo (29, 114) (Figura I.4).

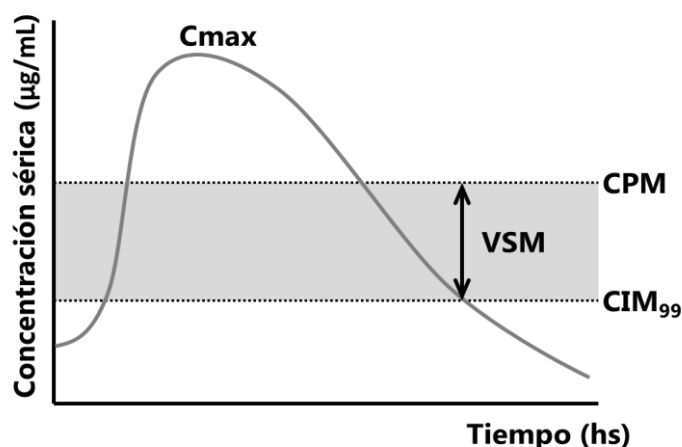


Figura I.4: Ventana de selección de mutantes. *Adaptada de Drlica, K., 2003 (29)*

Esta hipótesis sostiene que las subpoblaciones mutantes resistentes presentes en el sitio de infección, previo al momento del inicio de la terapia antimicrobiana, se enriquecen y amplifican cuando las concentraciones del antimicrobiano caen dentro de la VSM (114).

Es muy difícil evitar la aparición de subpoblaciones resistentes al ser un hecho intrínseco del microorganismo, pero es relativamente sencillo evitar su desarrollo posterior. En consecuencia, una relación PK/PD óptima, podría ser determinada con el objeto de reducir la ventana de selección de mutantes y el consecuente desarrollo de resistencia bacteriana (105).

Establecer a la CIM como el límite inferior de la VSM, contradice en cierta manera a las enseñanzas tradicionales, que sostienen que los mutantes resistentes se enriquecen y amplifican cuando la concentración se encuentra por debajo de la CIM y no por encima de ella. Sin embargo, según la nueva teoría, mantener las concentraciones solo por encima de la CIM, implicaría ubicarse dentro de la zona de riesgo de la VSM (29).

La CPM es un parámetro bacteriostático que sobreestima la concentración necesaria para evitar mutaciones de primer paso en las subpoblaciones resistentes preexistentes. Por ello, lo correcto sería que la actividad letal sea direccionada por la integración de este nuevo parámetro PD (CPM) a los parámetros PK en reemplazo de la CIM. Por ejemplo, existe evidencia empírica que indica que el ABC_{24}/CIM es un buen predictor de eficacia para algunos antimicrobianos concentración dependientes (107). Sin embargo, la aplicación de esta relación para la subpoblación de mutantes resistentes debe ser sustituida por ABC_{24}/CPM , es decir la CIM de la bacteria mutante menos sensible para lograr minimizar realmente la resistencia (114).

Actualmente este nuevo concepto de ventana de selección de mutantes, sigue siendo una medida controvertida que se encuentra en estudio con escasos datos obtenidos *in vivo*.

I.6. Antibióticos afectados por sistemas de eflujo bacteriano como mecanismo causal de multiresistencia en bacterias Gram-negativas

Las bacterias Gram-negativas se caracterizan por ser intrínsecamente más resistentes a los antimicrobianos que las Gram-positivas. Esta elevada resistencia intrínseca se atribuía en un principio, a una menor permeabilidad a través de la membrana externa, que actúa como barrera física retardando la difusión de las moléculas (115).

Sin embargo, la membrana externa por sí sola no sería capaz de impedir la entrada completa a los antimicrobianos. Fue entonces, que se descubrieron a finales de la década de 1980 los primeros sistemas transportadores por eflujo activo en bacterias (115, 116).

La mayoría de los sistemas MDR de las bacterias Gram-negativas, capaces de expulsar de forma inespecífica un amplio número de sustratos no relacionados entre sí, pertenecen a la familia RND (13, 86).

En cuanto a la cantidad de compuestos que estos sistemas pueden expulsar, se incluyen colorantes catiónicos (acriflavina, cristal violeta, bromuro de etidio, rodamina); antimicrobianos de variadas familias (penicilinas, cefalosporinas, fluoroquinolonas, macrólidos, cloranfenicol, tetraciclinas, novobiocina, ácido fusídico, oxazolidonas, rifampicinas); detergentes (Triton X-100, dodecilsulfato de sodio, ácidos biliares) (70, 117).

Es obvio que no existe similitud entre los sustratos de estas bombas, sin embargo, todos ellos tienen en común que son relativamente lipofílicos o bien contienen al menos un dominio lipófilo. Es decir, la mayoría, sino todos los transportadores reconocen moléculas con una cabeza polar, con frecuencia ligeramente cargada y asociada a un dominio hidrofóbico (es decir, una molécula anfifílica). Esto afirma la hipótesis que dice que los sustratos interactúan primero con la bicapa lipídica de la membrana, y luego son capturados desde dentro de la bicapa, o desde la fase acuosa de su interfase (25, 70).

Tetraciclinas

Las tetraciclinas son un gran grupo de fármacos con actividad antimicrobiana y propiedades farmacológicas comunes. La molécula comprende una estructura tetracíclica lineal compuesta de cuatro anillos fusionados, de donde deriva su nombre (118). La nomenclatura genérica de esta familia de compuestos, deriva de sustituciones de una gran variedad de grupos funcionales que se unen a los anillos de este núcleo central octahidronaftaceno (119) (Figura I.5).

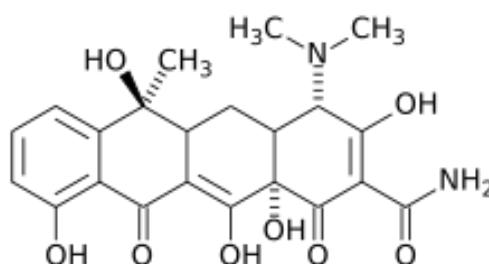


Figura I.5. Fórmula estructural de la tetraciclina

Las tetraciclinas como grupo fueron descubiertas en 1945, y las primeras estaban representadas por clortetraciclina y oxitetraciclina de origen natural, derivadas de *Streptomyces aureofaciens* y *S. rimosus*, respectivamente (118). Al poco tiempo, se obtuvo tetraciclina a partir de *S. viridofaciens*. Y posteriormente, se desarrollaron por semisíntesis un número importante de tetraciclinas entre las cuales se hallaban metaciclina, doxiciclina, minociclina y la más reciente gliciliciclina (120).

Todas las tetraciclinas tiene como mecanismo de acción, la inhibición de la proteínosíntesis de la bacteria, por unión primaria reversible a la subunidad ribosomal 30s, previniendo de este modo la unión del aminoacil-ARNt al sitio aceptor del complejo ARNm-ribosoma, con lo cual afecta la capacidad vital del microorganismo (120, 121, 122).

Para que las tetraciclinas lleguen al sitio blanco de acción, es necesario que la molécula difunda en forma pasiva por la membrana celular exterior a través de los poros hidrófilos y luego, a través de un mecanismo dependiente de energía ingresa a la célula bacteriana, y así es transportada activamente a través de la membrana citoplasmática interna (120). Las moléculas más lipofílicas como doxiciclina y minociclina, pasan la doble capa lipídica externa sin necesidad de atravesar los poros hidrófilos (123).

Debe agregarse la aptitud de penetración intracelular de las tetraciclinas, condición de valor para explicar su efectividad en determinadas enfermedades, cuyos microorganismos actúan intracelularmente (brucelas, clamidias, micoplasmás, rickettsias). Al interferir la síntesis proteica, el

efecto tetraciclínico es bacteriostático pero, frente a determinados microorganismos y a altas concentraciones puede ser bactericida. La capacidad de introducirse a las células depende de la liposolubilidad o, mejor dicho del coeficiente de partición lípido/agua de cada antibiótico (121).

Las tetraciclinas son antimicrobianos de amplio espectro con actividad frente a un extenso rango de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, clamidias, micoplasmás, rickettsias y parásitos protozoarios (120, 123).

Estos compuestos son utilizados extensamente en medicina veterinaria para el tratamiento de patologías infecciosas del tracto gastrointestinal, aparato respiratorio, infecciones cutáneas, genitourinarias y sepsis (10).

Uno de los principales problemás de la terapia con tetraciclinas es la emergencia y creciente selección de cepas resistentes. El espectro antibacteriano inicialmente amplio, fue limitándose progresivamente por el empleo irracional de esta familia de antimicrobianos (118, 123).

La emergencia de resistencia es un evento relativamente moderno, en 1953 se realizó el primer aislamiento resistente, perteneciente a la especie *Shigella dysenteriae* (124). Este fenómeno ha sido consecuencia del uso indiscriminado de tetraciclinas para la clínica médica, veterinaria y para la agricultura (118).

Los determinantes de resistencia han sido hallados presentes no solo en el genoma de microorganismos patógenos, sino también en la microbiota comensal de humanos y animales, así como también en alimentos y medio ambiente. Estas bacterias pueden actuar como reservorio de genes de resistencia, transferir los mismos a bacterias patógenas e incrementar de este modo la problemática del fracaso terapéutico (120).

Han sido descriptos tres mecanismos de resistencia para tetraciclinas: (1) eflujo activo, (2) protección ribosomal e (3) inactivación enzimática del fármaco (125). Estos mecanismos en su mayoría, se basan en la adquisición exógena de uno o varios determinantes genéticos de resistencia, ubicuamente distribuidos entre variados géneros bacterianos. Pero adicionalmente puede ocurrir que la resistencia esté vinculada a mutaciones cromosómicas relacionadas con alteraciones en el ARNr, sobreexpresión de sistemas trasportadores de eflujo o alteraciones en la permeabilidad de la membrana (120).

El mecanismo de resistencia por sistemas de eflujo es el mecanismo dominante de resistencia frente a tetraciclinas entre la familia Enterobacteriaceae y géneros relacionados (125).

El eflujo activo de tetraciclinas es mediado por proteínas de la membrana citoplasmática que bombean moléculas del fármaco hacia el exterior celular a la misma velocidad con que ocurre el ingreso del mismo a la bacteria (120, 126).

Ninguno de los genes que codifica resistencia bacteriana frente a tetraciclina, produce destrucción del compuesto. Las bombas de eflujo específicas para este antimicrobiano son energía-dependientes y el mecanismo de resistencia ribosomal involucra la elongación de una estructura proteica denominada factor G, que le confiere protección a la bacteria. Las proteínas de eflujo son sistemas de antiportador, intercambian un protón por un complejo tetraciclina-catión. Los determinantes de eflujo en Gram-negativas poseen una organización genética común, diferente de la presente en bacterias Gram-positivas. Todos ellos poseen un gen estructural y un gen represor que están expresados en direcciones opuestas respecto de las regiones operadoras (124).

Con el fin de evitar la resistencia, en la década del 90' se desarrollaron los derivados semisintéticos mencionados. Entre las novedosas modificaciones, la incorporación en la posición 9 del radical N,N-dimetilglicilamido en la minociclina, evita los dos principales mecanismos de resistencia a las tetraciclinas (la protección ribosomal y los condicionados por bombas de expulsión) y mejora el espectro de actividad (118).

También en bacterias Gram-negativas los transportadores MDR juegan un rol de importancia en la resistencia bacteriana frente a tetraciclinas. Ejemplos de los mismos son la proteína EmrE (plasmídica) miembro de la familia SMR; y AcrAB y MexAB (cromosómicas) de la familia de transportadores RND (120).

Quinolonas

Las quinolonas son un grupo de agentes antimicrobianos sintéticos, numerosos y químicamente muy heterogéneo (127, 128, 129).

El ácido nalidíxico fue la primera quinolona empleada en la clínica a principios de la década del 60'. Luego, mediante modificaciones realizadas en su estructura, se obtuvieron compuestos tales como el ácido oxolínico, el ácido pipemídico y la cinoxacina (quinolonas de primera generación) (130).

Durante los años 80, con la introducción de un átomo de flúor en la posición 6 de la molécula y un anillo de piperazina en el carbono 7, se dio origen a las fluoroquinolonas -FQ- (ciprofloxacina, ofloxacina, norfloxacina), mejorando de esta manera no solo la actividad biológica sino también las propiedades farmacocinéticas y disminuyendo la toxicidad de las mismas (127, 130) (Figura I.6).

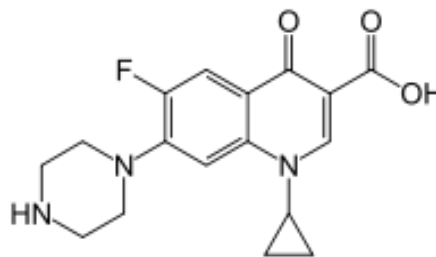


Figura I.6. Fórmula estructural de ciprofloxacina

Las quinolonas inhiben la actividad de una enzima bacteriana esencial para la replicación del ADN, interfiriendo en su síntesis. Esta enzima, topoisomerasa, es útil para superenrollar las cadenas del ADN, paso necesario para acomodar el núcleo dentro de la célula bacteriana mediante la reducción de su tamaño. La inhibición de la misma lleva a la muerte de la célula bacteriana, por lo tanto el mecanismo de acción es de tipo bactericida (121, 128).

Las quinolonas actúan por inhibición de la acción de las topoisomerasa II, ADNgirasa y topoisomerasa IV. La diana para los Gram-negativos es la ADNgirasa, mientras que para los Gram-positivos, es la topoisomerasa IV. Sin embargo, algunos estudios indican que la ADNgirasa podría actuar como diana primaria para algunos microorganismos Gram-positivos con ciertas FQs como esparfloxacina y nadifloxacina. Por otro lado, cinafloxacina y moxifloxacina, FQs de aparición reciente, tienen similar afinidad por ambas estructuras (131).

El espectro bacteriano, inicialmente confinado a las enterobacterias, se fue ampliando progresivamente a pseudomonas, cocos Gram-positivos, micoplasmás y clamidias. Los anaerobios son poco o nada sensibles (121).

La mejora tanto en la actividad biológica como en las propiedades farmacocinéticas de estos antimicrobianos, propiciaron la amplia difusión de su uso, originando la aparición de cepas resistentes entre microorganismos Gram-positivos (*S. aureus*) y Gram-negativos (*P. aeruginosa*, *E. coli*) (130).

Los mecanismos de resistencia bacteriana para las quinolonas y FQs pueden ser de tres tipos: (1) mutaciones en regiones determinantes de resistencia a quinolonas (del inglés Quinolone Resistance Determining Regions, surge la denominación QRDRs), que producen alteración de la diana farmacológica, ADNgirasa y topoisomerasa IV; (2) mutaciones que producen decremento en la acumulación intracelular del antimicrobiano por impermeabilidad de la membrana y/o sobreexpresión de bombas de eflujo y (3) plásmidos que protegen la célula bacteriana del efecto letal de las quinolonas y FQs (30, 127, 131, 132). El gen plasmídico codifica una proteína conocida como Qnr que

se une a la ADN girasa y a la topoisomerasa IV, confiriendo protección frente a la acción del antimicrobiano (130).

Estos antimicrobianos para ejercer su acción bactericida deben cruzar la pared y membrana citoplasmática de las bacterias Gram-positivas; y la membrana externa en las Gram-negativas (130). Este pasaje lo realizan a través de las porinas o bien, por difusión a través de la bicapa fosfolipídica. El grado de difusión estará directamente ligado a su nivel de hidrofobicidad. Todas las quinolonas y FQs pueden atravesar la pared externa a través de los poros, pero solamente aquellas que tengan un mayor lipofilia podrán atravesar la bicapa (131).

Las alteraciones en la permeabilidad de las membranas están usualmente asociadas con una disminución en la expresión de poros de pared. Esto ha sido descrito en *E. coli* y otras bacterias Gram-negativas (131). Las porinas de la membrana y el sistema de eflujo actúan en un eficiente sinergismo para lograr disminuir las concentraciones de antimicrobiano a nivel del citoplasma y periplasma (13, 52).

A diferencia de muchos otros mecanismos de eflujo que resultan específicos para un agente o clase de sustrato (o antimicrobiano) y codificados por elementos genéticos móviles como plásmidos o transposones; los determinantes de resistencia por eflujo para FQs, son casi invariablemente transportadores MDR cuyos genes se encuentran codificados a nivel cromosómico (66, 133).

Los transportadores pertenecientes a la familia RND son comúnmente encontrados como determinantes responsables de resistencia bacteriana frente fluoroquinolonas en el laboratorio y en aislamientos clínicos de bacterias Gram-negativas tal como *P. aeruginosa* (66).

En *E. coli*, la expresión de *acrAB* en cepas mutantes con fenotipo MDR, está controlada por el operón *marRAB* o *soxRS*. Las mutaciones que afecten *MarR* inducirán la expresión constitutiva de este operón, dando lugar a la aparición de fenotipos resistentes con sobreexpresión de las bombas AcrAB (131).

Fenicoles

Dentro de la denominación de fenicoles se incluyen tres fármacos, el cloranfenicol, el tianfenicol y el florfenicol, derivados del ácido dicloroacético (134, 135) (Figura I.7).

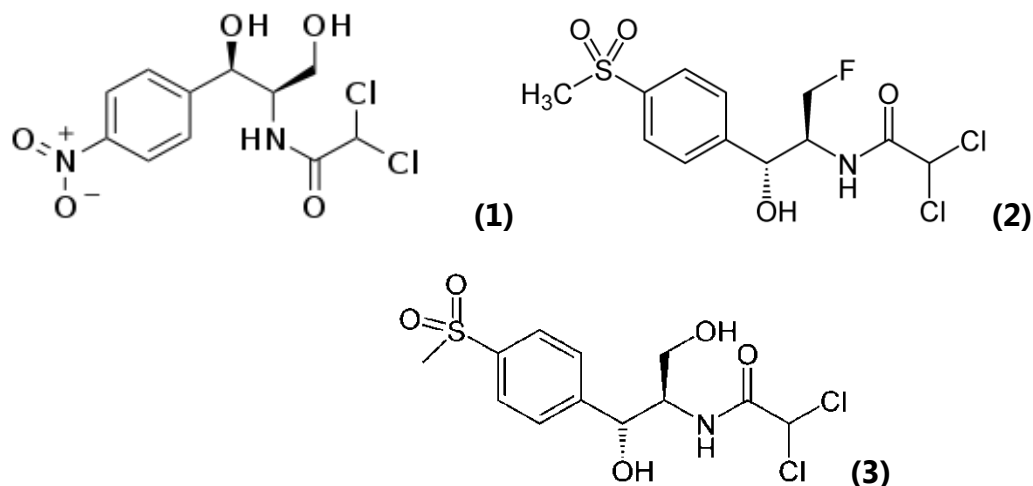


Figura I.7. Estructura química de los fenicoles: (1) cloranfenicol, (2) tianfenicol y (3) florfenicol

El cloranfenicol, posee un grupo nitro en posición *para* del anillo bencénico; este grupo es sustituido por otro sulfometil en el tianfenicol. Finalmente, se obtuvo un derivado fluorado denominado florfenicol, manteniendo el grupo sulfometil en posición *para* del anillo bencénico pero introduciendo un átomo de flúor en la función del alcohol primario terminal en el tianfenicol (136).

El mecanismo de acción es común a los tres fenicoles mencionados y se basa en una potente, aunque reversible, inhibición de la biosíntesis de proteínas en los microorganismos, actuando sobre la enzima peptidil-transferasa a nivel 50s del ribosoma bacteriano (10).

Para llevar a cabo la inhibición de la síntesis bacteriana, penetran en el interior de la célula atravesando la membrana de la misma mediante difusión facilitada. Actúan en primera instancia, uniéndose de forma reversible a la subunidad 50s del ribosoma bacteriano y de este modo, parecen impedir la unión aminoacil del ARN de transferencia (135, 137).

En cuanto a los efectos adversos, el cloranfenicol en el hombre puede dar lugar a una complicación rara, pero de elevada gravedad caracterizada por pancitopenia causado por un metabolito del cloranfenicol procedente de la reducción del grupo nitro, que puede formarse en el hígado o por la microflora (nitrorreductasa) del tracto gastrointestinal, por acción sobre el radical aniónico del grupo nitro (134). Este derivado nitroso, se une covalentemente con el ADN de las células de la médula ósea, siendo esta la principal causa de la aplasia y de la leucemia que sucede después (138).

De modo que el uso del cloranfenicol desencadena una respuesta idiosincrásica dosis-independiente desarrollando una anemia aplásica irreversible. Esta discrasia sanguínea, puede suceder después de semanas, e incluso meses, de haber cesado el tratamiento terapéutico. Este proceso se ha

descripto tras administración del cloranfenicol por las vías oral, intramuscular, intravenosa y tópica (ocular) (138).

Florfenicol, a diferencia de cloranfenicol, puede provocar discrasia sanguínea pero de tipo transitoria, producto de la inhibición de la síntesis de proteína mitocondrial tras su administración a dosis elevadas (dosis-dependiente). Esto se debe a la acción de su metabolito ácido oxámico sobre el ADN mitocondrial (139).

Es por ello, que cuando cloranfenicol fue prohibido en medicina veterinaria para ser utilizado en animales destinados al consumo humano, comenzó a implementarse florfenicol a nivel mundial para el tratamiento de diferentes patologías respiratorias en cerdos y bovinos (140).

El florfenicol es un antimicrobiano sintético de amplio espectro, con un comportamiento bacteriostático frente a la mayoría de las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (aerobias y anaerobias) aisladas en animales domésticos. Sin embargo, para algunos microorganismos, sus CIMs están próximas a sus CBMs, por lo que, en tales casos, puede comportarse como un agente bactericida (este es el caso para bacterias como *P. haemolytica* y *P. multocida*, agentes causales del Síndrome Respiratorio en ganado bovino) (139, 141).

Con la emergencia de cepas resistentes a cloranfenicol y tianfenicol, pero sensibles a florfenicol, se incrementó aún más su uso en medicina veterinaria. Florfenicol no es afectado por la acción enzimática de acetiltransferasas, principal mecanismo de resistencia bacteriana frente a cloranfenicol y tianfenicol (136, 139).

Sin embargo, otros mecanismos de resistencia afectan a los fenicoles como los sistemas de eflujo activo, inactivación por fosfotransferasas, mutación del sitio ribosomal diana e impermeabilidad de la membrana (140).

Los transportadores de membrana que afectan la susceptibilidad de este grupo de fármacos pueden ser específicos o MDR. El transportador CmlA afecta a cloranfenicol, pero no a florfenicol. Sin embargo, existe un transportador de membrana que afecta a florfenicol, cuyo gen, codificado recientemente, se denomina FloR, y pertenece a la familia de transportadores MFS (142). En cuanto a los sistemas MDR de eflujo que afectan a esta familia de antimicrobianos, encontramos por ejemplo a AcrAB-TolC de *E. coli* (140, 143).

Beta-lactámicos

Estos antimicrobianos presentan en su estructura química un anillo beta-lactámico que los define químicamente y los define como familia. Dentro de esta familia se encuentran diversos grupos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenemás, monobactamás e inhibidores de las beta-lactamasas (10).

Las penicilinas constituyen uno de los más importantes grupos de antimicrobianos, contienen un anillo beta-lactámico y un anillo de tiazolidina, formando el ácido 6-aminopenicilánico. Además tienen una cadena lateral, que varía de unas penicilinas a otras en la posición 6 del anillo beta-lactámico y que es la que define sus propiedades farmacológicas (144) (Figura I.8).

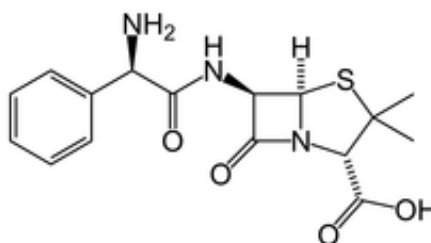


Figura I.8. Estructura química de la ampicilina

Las cefalosporinas son fármacos estructuralmente similares a las penicilinas, cuya estructura básica está constituida por el núcleo cefem, que consiste en la fusión de un anillo dihidrothiacínico (en lugar del anillo tiazolidínico característico de las penicilinas) y un anillo beta-lactámico. La introducción de modificaciones en las cadenas laterales origina las diversas cefalosporinas (Figura I.9).

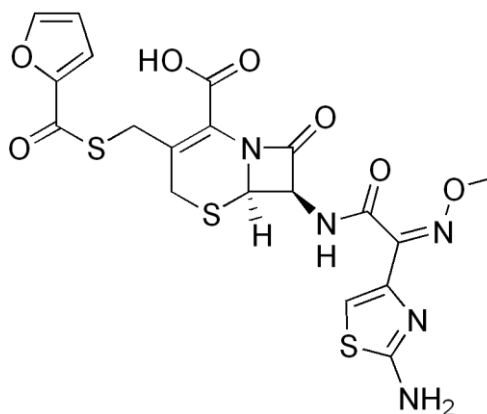


Figura I.9. Estructura química de ceftiofur

Los beta-lactámicos son antibióticos de actividad bactericida lenta, relativamente independiente de la concentración plasmática alcanzada, siempre que ésta exceda la CIM del agente causal (107). La

actividad bactericida y probablemente la eficacia clínica se relacionan mejor con el tiempo durante el cual dicha concentración excede la CIM ($T > CIM$) (104).

En cuanto a su mecanismo de acción, son agentes bactericidas que inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana e inducen además un efecto autolítico. La destrucción de la pared celular bacteriana se produce como consecuencia de la inhibición de la última etapa de la síntesis del peptidoglucano (144). En cuanto al efecto autolítico, actúan activando una autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglucano. La lisis se produce con concentraciones que superan entre 4 y 5 veces la CIM de un determinado microorganismo. Las bacterias que carecen de autolisinas son inhibidas pero no destruidas, por lo que se dice que son tolerantes (145).

El espectro de los beta-lactámicos incluye bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y espiroquetas. No son activos sobre los micoplasmás porque éstos carecen de pared celular, ni sobre bacterias intracelulares como *Chlamydia* y *Rickettsia*. La resistencia natural de las micobacterias se debe a la producción de beta-lactamasas probablemente unida a una lenta penetración por las características de la pared (146).

Las bacterias pueden desarrollar resistencia a los beta-lactámicos, básicamente mediante mecanismos diferentes que, en ocasiones, pueden ir asociados a otros mecanismos causantes de resistencia como el eflujo activo por sobreexpresión de bombas (66).

Los principales mecanismos implicados en la resistencia son los siguientes:

(1) Producción de enzimas beta-lactamasas: representan el principal mecanismo de resistencia frente a los beta-lactámicos, especialmente en Gram-negativos (aunque también pueden producirlas los microorganismos Gram-positivos y anaerobios). Son enzimas que hidrolizan el anillo beta-lactámico y que, por tanto, inactivan el antibiótico antes de su unión con las PBP. Su producción puede estar mediada por plásmidos o puede estar cromosómicamente codificada (60, 147).

(2) Modificación de la diana en las PBP: diferentes alteraciones en las PBP (mutaciones, hiperexpresión y modificación de la afinidad) pueden dificultar la unión del beta-lactámico a la proteína, lo que disminuye su actividad. Este es el mecanismo principal de resistencia a beta-lactámicos de los microorganismos Gram-positivos, como *S. pneumoniae*, *S. aureus* resistente a metilina y *Enterococcus faecium* (55).

(3) Alteraciones en la permeabilidad y bombas de expulsión. Ante la barrera que supone la presencia de una membrana celular (Gram-negativos) las sustancias poco lipofílicas (como los beta-lactámicos) precisan proteínas, es decir, poros de membrana, que les faciliten la entrada al espacio

periplásmico para poder unirse a las PBP. Algunos microorganismos presentan además sistemas de bombeo de antimicrobianos que incluyen dentro de sus sustratos posibles a los beta-lactámicos. Algunas alteraciones en la permeabilidad (mutaciones, hiperexpresiones) pueden modificar la resistencia basal a los beta-lactámicos (148, 149, 150).

Existe evidencia acerca de la cooperación en la resistencia a penicilinas que existe entre los sistemas de eflujo y la acción de las enzimas beta-lactamasas. El eflujo permite que el sistema enzimático no se sature. Estas bacterias muestran un fenotipo con alto nivel de resistencia a las penicilinas sin ser grandes productoras de beta-lactamasas (25).

Un ejemplo de lo expuesto es el que se observa con el estudio del rol de la beta-lactamasa cromosómica AmpC y el sistema de eflujo AcrAB a nivel de la resistencia intrínseca y susceptibilidad en *E. coli*. La expresión de beta-lactamasas clase C confiere resistencia a cefalosporinas de primera y segunda generación. Las bombas de eflujo, generan resistencia a penicilinas. El resultado global de la combinación de ambos mecanismos es que su susceptibilidad queda restringida solamente a cefalosporinas de tercera y de cuarta generación (151).

I.7. Estrategias para modificar la resistencia bacteriana por eflujo

Existe creciente evidencia sobre la importancia de las bombas de eflujo en la resistencia bacteriana a los antimicrobianos. A pesar de no generar elevados niveles de resistencia por sí solas, la sobreexpresión de las mismas en combinación y cooperación con otros mecanismos de resistencia adquiere significancia clínica. Razón por la cual es importante analizar diversas estrategias para modificar y revertir la resistencia bacteriana por eflujo (52):

(1) *Evasión de los mecanismos de bombas de eflujo*: A pesar que no han sido totalmente elucidados los determinantes moleculares responsables del reconocimiento de antibióticos por bombas de eflujo, pueden observarse diferencias en el transporte de miembros estructuralmente análogos de una familia de antimicrobianos. Se han desarrollado nuevas moléculas que poseen menor susceptibilidad al eflujo si se las compara con las moléculas originarias de los principales grupos de antibióticos. Así se ha demostrado para las fluoroquinolonas de tercera y cuarta generación versus las de primera y segunda; ketólidos versus macrólidos o gliciliclinas versus tetracilinas (86).

(2) *Inhibición biológica de la actividad de eflujo*: Otra estrategia para inhibir la actividad de las bombas, puede ser mediante bloqueo de las proteínas responsables del eflujo por medio del uso de anticuerpos neutralizantes; o bien, bloqueando los genes correspondientes responsables de la

expresión de las mismas. La utilización de esta estrategia está basada en la demostración de que la delección del gen *acrAB* en *E. coli* restaura la sensibilidad a los antibióticos, mientras que la mutación en el regulador genético Mar tiene el efecto contrario (39, 152).

(3) *Inhibición farmacológica del eflujo*: La inducción de una competencia por la bomba de eflujo es probablemente el mecanismo de acción más razonable de los inhibidores de bomba. La reserpina es el inhibidor más popular, aunque también se han descrito otros compuestos con similares efectos como fenotiazinas, antagonistas de calcio, inhibidores selectivos de serotonina o bien, inhibidores de las bombas de protones. La mayor limitación de combinar estas moléculas con los antibióticos es que ellas necesitan ser utilizadas en concentraciones significativamente elevadas como inhibidores en comparación con la concentración usada para ejercer sus efectos farmacológicos más conocidos; lo cual las hace inviables por razones de seguridad (86).

Una primera categoría de inhibidores originales son las moléculas antibióticas análogas a los antibióticos de uso clínico, pero con menor efecto antibacteriano. Tres familias han sido patentadas, análogas de tetraciclinas, aminoglucósidos y quinolonas, las cuales logran disminuir el eflujo de los antibióticos respectivos (153).

Una segunda categoría la conforman los inhibidores no relacionados estructuralmente a antibióticos conocidos, es decir, totalmente nuevos. Algunos de ellos logran inhibir bombas que efluyen múltiples clases de antibióticos (42).

Basándose en observaciones empíricas de las propiedades de estos inhibidores puede concluirse que la estructura química de varios de ellos, tiene características recurrentes como por ejemplo: *anillos aromáticos* presentes en todas las moléculas (con excepción de análogos de los aminoglucósidos) y *grupos ionizables* encontrados en muchos de ellos. Esto es consistente con el hecho de que las bombas de eflujo transportan preferentemente sustancias anfífilas como sustrato y poseen afinidad de unión a grupos con cadenas aminoácidas de superficie, propensas a establecer uniones hidrofóbicas, uniones aromáticas e interacciones van der Waals (42).

Algunos de los inhibidores también pueden modular transportadores de células eucariotas como P-glicoproteína, MRP o BCRP, como se demostró con el verapamilo, VX-710, VX-853 y GF120918. Por otra parte, otros inhibidores como MC207 o el MC110 no interactúan con los transportadores de las células eucariotas, sino que son específicos de las bombas procariontas. Esto favorece la especificidad de acción y minimiza efectos indeseables que involucran inhibición de funciones fisiológicas (154).

I.8. La multirresistencia y la actualidad

El impacto clínico de la multirresistencia por bombas de eflujo es difícil de establecer debido a que no contamos con estadística ni nacional e internacional a gran escala, que permita comparar la prevalencia de este mecanismo de resistencia con otros. Existen numerosas publicaciones referentes a la descripción de las bombas y los sistemas de eflujo en los diferentes microorganismos, pero muy poco referente a su importancia en la clínica.

Varios autores (14, 33, 34, 35, 40, 42, 155) evalúan la aplicación de inhibidores de bomba como posibles alternativas para revertir o reducir la resistencia a los antimicrobianos involucrados.

En cuanto a microorganismos patógenos, en diferentes lugares del mundo se han publicado diversos trabajos sobre multirresistencia ocasionada por bombas de eflujo, en su mayoría pertenecientes a la familia de resistencia RND. En muchos de ellos, se evalúa la importancia de la utilización de inhibidores de bombas de eflujo como herramienta para bloquear la sobreexpresión de estos sistemas (responsables de dar origen a cepas MDR), así como la prevalencia de la resistencia de tales microorganismos en aislamientos de origen animal y del hombre. Entre los microorganismos más estudiados pueden mencionarse *Campylobacter* (155, 156, 157), *Pseudomonas* (33, 151), *Enterobacter* (34), *Klebsiella* (158) y *Salmonella* (159).

Por otra parte, en cuanto a las cepas comensales, es sabido que el intestino es el principal sitio de transferencia de la antibiotorresistencia. *E. coli* es una de las bacterias comensales con mayores posibilidades de generar resistencias en el campo humano y veterinario. Uno de los mecanismos de multirresistencia de *E. coli* a antibióticos lipofílicos/ anfifílicos, como mencionamos en párrafos anteriores, está representado por la sobreexpresión de bombas de eflujo (13, 14). Su monitoreo permite conocer qué antimicrobianos están generando resistencia, evitar riesgos en salud pública, disminuir el fracaso terapéutico y por lo tanto; evitar pérdidas económicas al productor. Por esta razón se están realizando diversos estudios donde se evalúa el efecto de los inhibidores de bombas sobre esta cepa comensal. La mayoría de ellos se realiza en aislamientos de origen humano o mutantes experimentales (35, 40, 160).

En diversos países ya se han puesto en marcha numerosos programas de monitoreo de la resistencia en animales y en el hombre, orientados principalmente a la vigilancia de la resistencia en patógenos humanos, microorganismos zoonóticos y bacterias indicadoras de la microbiota intestinal normal de los animales.

I.9. Hipótesis

La ineficacia de un antimicrobiano para tratar una infección producida por un microorganismo resistente al mismo, puede ser revertida, en consideración de los parámetros farmacocinéticos/farmacodinámicos (modelización PK/PD), del mecanismo de resistencia y del eventual bloqueo de éste último.

I.10. Objetivos

I.10.1. Objetivo general

Demostrar que la antibióticorresistencia (considerando la *Escherichia coli* como modelo) puede ser revertida, *in vitro* y, eventualmente *in vivo*, en función de la correcta interpretación de los parámetros farmacocinéticos/farmacodinámicos (modelización PK/PD) para una correcta dosificación, del mecanismo de resistencia y del eventual bloqueo de éste último. De esta manera, contribuir al desarrollo de planes de máxima eficacia antimicrobiana y mínimo riesgo de emergencia y diseminación de resistencia permitiendo así la obtención de productos de origen animal de excelencia sanitaria.

II.10.2. Objetivos particulares

1) Evaluar cantidad, calidad y tipo de antimicrobianos utilizados en el último año mediante formularios de recopilación de información o encuestas, tanto en explotaciones animales, como en personas y animales de compañía vinculados a esa unidad productiva y en las veterinarias/distribuidoras de la región en cuestión.

2) Obtener muestras de materia fecal y agua mediante el desarrollo de estrictos POEs (Procedimientos Operativos Estándares) que resulten representativas de la tríada animal, ambiente, hombre.

3) Seleccionar, aislar y tipificar cepas de *E. coli* dentro del total de muestras obtenidas.

4) Someter las cepas aisladas a pruebas cualitativas (antibiograma) frente a un listado de antimicrobianos constituido por aquellos que se ubicaron entre los más utilizados a partir de la encuesta.

5) Seleccionar como cepas de estudio aquellas que resulten multirresistentes, es decir que resistan a tres o más antimicrobianos en cada grupo poblacional. En caso de no hallar multirresistentes, seleccionar aquellas cepas que resistan a por lo menos un antimicrobiano cuyo mecanismo de resistencia pueda vincularse con bombas de eflujo.

6) Comparar susceptibilidad antibiótica entre las cepas de los integrantes de cada grupo poblacional (animal – hombre – ambiente) a fin de encontrar coincidencias en los perfiles fenotípicos de resistencia.

7) Someter las cepas seleccionadas a pruebas cuantitativas con determinación de la CIM frente a los antimicrobianos vinculados con el mecanismo de resistencia por eflujo. En cada caso la evaluación de la CIM se hará en presencia y en ausencia de un inhibidor competitivo de amplio espectro para bombas de eflujo.

8) Determinar la mínima concentración efectiva (MEC) del inhibidor de bombas de eflujo (EPI) seleccionado mediante la evaluación del efecto obtenido tras el enfrentamiento del EPI a concentraciones crecientes versus cada antimicrobiano evaluado.

9) Evaluar complementariamente la concentración bactericida mínima (CBM) y la curva de letalidad bacteriana (CLB). Esta última se realizará con y sin EPIs en combinación con el antimicrobiano en cuestión.

10) A partir del conocimiento de estos parámetros farmacodinámicos realizar una modelización PK/PD a los efectos de maximizar la eficacia antimicrobiana.

11) De acuerdo a los resultados obtenidos analizar los riesgos de transmisión de resistencia de los animales al hombre.

12) En base a los datos epidemiológicos obtenidos sumados a datos PK/PD establecer un diagrama de flujo de control de puntos críticos (HACCP) para prevenir y minimizar el desarrollo de resistencias bacterianas en los animales destinados a producción de alimentos y su transmisión a los seres humanos (vinculados estrechamente a la producción en este caso) y al medio ambiente inmediato.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II. MATERIALES Y METODOS

II.1. MATERIALES

II.1.1. Productos biológicos y medios para microbiología

1. Agar agar (Laboratorios Britania, Argentina)
2. Cepa de referencia *Escherichia coli* ATCC 25922
3. Cepa isogénica AG100 (wild type)
4. Cepa isogénica AG100A (AG100 Δ acrAB)
5. Cepa isogénica AG112 (AG100 marR)
6. Extracto de levadura (Laboratorio Britania, Argentina)
7. Medio de cultivo agar citrato de Simmons (Laboratorios Britania, Argentina)
8. Medio de cultivo agar EMB (Laboratorio Britania, Argentina)
9. Medio de cultivo agar hierro tres azúcares (TSI) (Laboratorios Britania, Argentina)
10. Medio de cultivo agar nutritivo (Laboratorio Britania, Argentina)
11. Medio de cultivo agar SIM (Laboratorios Britania, Argentina)
12. Medio de cultivo agar y caldo Mueller Hinton (Laboratorios Britania, Argentina)
13. Medio de cultivo caldo Mac Conkey (Biokar Diagnostic, Francia)
14. Medio de cultivo caldo RM-VP (Laboratorios Britania, Argentina)
15. Medios de cultivo agar y caldo Luria Bertani (elaboración artesanal, ver VI.3.Anexo C)
16. Medios de cultivo agar y caldo tripticasa soya (Laboratorio Britania, Argentina)
17. Tripteína bacteriológica (Laboratorio Britania, Argentina)

II.1.2. Reactivos, solventes y diluyentes para microbiología

1. Agua bidestilada
2. Agua destilada o desionizada
3. Ácido clorhídrico 1N (Anedra, Argentina)
4. Ácido sulfúrico 1.84, >95% pureza (UCB, Bélgica)
5. Alcohol absoluto
6. Alcohol etílico 96°
7. Alfa naftol (Anedra, Argentina)
8. Cintas indicadoras de pH 5-10 (Merck KGaA, Germany)
9. Cloruro de bario dihidrato (Anedra, Argentina)
10. Cloruro de sodio (Cicarelli Laboratorios, Argentina)
11. Dimetilsulfóxido, DMSO (Anedra, Argentina)
12. Fosfato de sodio dibásico anhidro (Anedra, Argentina)

13. Fosfato de sodio monobásico anhidro (Anedra, Argentina)
14. Fucsina básica
15. Glicerol (Anedra, Argentina)
16. Hidróxido de potasio (Anedra, Argentina)
17. Hidróxido de sodio (Anedra, Argentina)
18. Kit para tinción de Gram (Laboratorios Britania, Argentina)
19. Metanol PA (Dorwil, Argentina)
20. Reactivo de Kovacs (Merck, Alemania)
21. Reactivo rojo de metilo (RM) (Anedra, Argentina)
22. Rojo de metilo (Anedra, Argentina)
23. Solución fisiológica (0.85 g de cloruro de sodio en 100 mL de agua destilada)

II.1.3. Productos farmacológicos

1. Amoxicilina/ácido clavulánico, 86% p/p (relación 4:1) (Tecnofarm, Argentina)
2. Ampicilina trihidrato, 96% p/p (Fluka, Suiza)
3. Ceftiofur HLC (hidroclorado), 102.2 % p/p (BinZhou NeoPharm Pharmaceutilca, Ltd)
4. Ciprofloxacina clorhidrato, 99.8 % p/p (Parafarm, Argentina)
5. Florfenicol, 99.3 % p/p (Romikin, Argentina)
6. Gentamicina sulfato, 99 % p/p (634 UI/mg) (Parafarm, Argentina)
7. Tetraciclina hidroclorado, 97.03% p/p (Parafarm, Argentina)
8. Trimetoprima, 100.2 % p/p (Parafarm, Argentina)
9. Sulfametoxazol, 99 % p/p (Parafarm, Argentina)
10. 1-(1-naphthylmethyl)piperazine, 97 % p/p (Sigma-Aldrich, Argentina)
11. Discos de antibiograma: amoxicilina-ácido clavulánico (20-10 µg), ciprofloxacina (5 µg), gentamicina (10 µg), tetraciclina (30 µg), trimetoprima-sulfametoxazol (1.25-23.75 µg), ampicilina (10 µg), de Laboratorios Britania, Argentina. Florfenicol (30 µg) y ceftiofur (30 µg) de Oxoid, Inglaterra.

II.1.4. Material descartable y de laboratorio

1. Algodón hidrófilo
2. Ansa de platino (Laboratorios Britania, Argentina)
3. Bandas elásticas de látex
4. Calibre Vernier

5. Cinta adhesiva 15 mm de diámetro
6. Crioviales estériles y autoclavables de 3 mL y tapa a rosca (Simport, Canadá)
7. Cubetas para espectrofotometría de poliestireno óptico de 4.5 mL (Deltalab, España)
8. Cuchara-espátula de acero inoxidable
9. Diagrama guía para ubicación de los discos de antibiograma
10. Erlenmeyers graduados de 100, 250, 500 y 1000 mL (IVA, Argentina)
11. Gradillas para tubos de ensayo de 10 y 16 mm de ancho (Deltalab, España)
12. Guantes de látex no estériles (Dexal, Malasia)
13. Hisopos estériles (Tecnon, Argentina)
14. Matraces aforados de vidrio de 10, 100 y 250 mL (IVA, Argentina)
15. Micropipeta multicanal automática 20-200 μ L (High Tech Lab, Poland)
16. Micropipetas automáticas de 10 μ L, 20-200 μ L, 100-1000 μ L y de 1-5 mL (High Tech Lab, Poland)
17. Papel de aluminio
18. Papel film
19. Perlas de vidrio 1-2 mm de diámetro
20. Pinzas anatómicas
21. Pipetas de vidrio estériles de 1, 2, 5, 10 y 20 mL (IVA, Argentina)
22. Placas de Petri estériles descartables de 90 x 15 mm (Mássobact, Argentina)
23. Planillas para registro de datos
24. Policubeta fondo cónico estériles descartables 96 pocillos (Deltalab, España)
25. Portaobjetos y cubreobjetos (Tecnon, Argentina)
26. Probetas de vidrio de 50, 100, 250, 500 y 1000 mL (IVA, Argentina)
27. Puntas para micropipetas de 5-200 μ L y 100-1000 μ L (Deltalab, España)
28. Tapas para policubetas estériles descartables (Deltalab, España)
29. Taponos de algodón estériles
30. Taponos de goma (Monoject, Sherwood Medical, USA)
31. Taponos de polipropileno (Deltalab, España)
32. Termómetro de laboratorio 0-100 $^{\circ}$ C (IVA, Argentina)
33. Tijeras
34. Tubos de vidrio borosilicato fondo redondo de 16 x 150 mm y 22 mL (Deltalab, España)
35. Tubos de vidrio fondo redondo de 16 x 100 mm y 11 mL (Monoject, Sherwood Medical, USA)
36. Varillas de vidrio

II.1.5. Instrumental y equipamiento

1. Agitador multitubo (Genie 2, Scientific Industries Inc., USA)
2. Autoclave de Chamberland
3. Balanza de precisión (Sartorius, Germany)
4. Balanza granataria (OHAUS CS200, China)
5. Baño termostático modelo Másson (Vicking S.R.L., Argentina)
6. Baño ultrasónico modelo 250 (Acuasonic, VWR Scientific Products, USA)
7. Cabina de bioseguridad Tipo II (Sherico, Taiwan)
8. Cámara fotográfica (Sony W620)
9. Centrífuga (Presvac, Argentina)
10. Espectrofotómetro UV-2100PC (UNICOM-OPTICS, China))
11. Estufa de cultivo modelo SL70C (SanJor, Argentina)
12. Estufa de secado (Elibet, Argentina)
13. Flujo laminar (Filtrar, J.F. Pregliasco)
14. Freezers -20 °C (Whirlpool, Argentina)
15. Heladera con freezer WD365ASW (White-Westinghouse, Argentina)
16. Mecheros de Bunsen
17. Microscopio óptico Zeiss-Wirkel

II.1.6. Equipamiento informático

1. Calculadora científica S-VPAM FX-95MS
2. Computadora personal HP Compaq Presario CQ42 Notebook PC
3. Impresora Hewlett-Packard PSC 1410
4. Software SigmaPlot versión 11.0 (Systat Software, USA, Canadá, 2008)
5. Software estadístico Instat versión 3.033 (Statistical Services Centre, University of Reading UK, 2006)
6. Software Farmacocinético WinNonlin Professional 5.3 (Pharsigh, Certara Company, Scientific Consulting Inc., Cary, N.C.)

II.2. METODOS

II.2.1. Diseño experimental

Para la realización del muestreo, se llevó a cabo un estudio no experimental observacional de tipo transversal o "cross sectional". El objetivo de este tipo de diseño se fundamenta en obtener muestras de toda o la mayoría de la población, y de esta manera poder lograr datos de prevalencia del fenómeno de resistencia y/o multirresistencia, sin influir de manera alguna en la ocurrencia de ello (161, 162).

II.2.2. Selección de explotaciones agropecuarias

Se seleccionaron cuatro regiones rurales de distintas zonas de la Provincia de Buenos Aires, a fin de realizar un muestreo representativo del territorio. De cada una de ellas se eligieron explotaciones bovinas con fuerte presión antimicrobiana. Estas explotaciones fueron tambos localizados en Tandil, San Vicente, Luján y Trenque Lauquen.

Se estableció contacto con el establecimiento pecuario y se solicitó a sus responsables completar distintos formularios de captura de datos a modo de encuestas (ver VI.1. Anexo A).

La primera encuesta fue diseñada con el fin de recabar información acerca de los antimicrobianos más utilizados, en los últimos 12 meses, para los distintos grupos etarios de los animales en producción, en relación con las patologías de estación más frecuentes. Del mismo modo, la segunda encuesta contiene información del uso de antimicrobianos por parte del personal y de los animales de compañía que cohabitan en la explotación en estudio. Finalmente, se entrevistaron también diferentes unidades expendedoras de antimicrobianos y veterinarias de la zona urbana adyacente.

II.2.3. Aislamiento, identificación y selección de cepas de *Escherichia coli*

II.2.3.1. Toma de muestras

A los efectos de aislar cepas de *E. coli* MDR y establecer la incidencia de resistencia en la triada animal-ambiente-hombre, se tomaron muestras de materia fecal (animal y humana) y de agua en los establecimientos seleccionados, según los procedimientos descritos por el Manual de diagnóstico y vacunas para animales terrestres de la OIE 2004-2008 y el Manual para análisis básicos de calidad del agua de bebida de la OPS-OMS 2004, respectivamente (163, 164, 165).

La toma de muestras de las cuatro zonas se realizó en el período de tiempo comprendido entre diciembre de 2006 y diciembre de 2008.

Muestras de materia fecal

En los animales (vacas en ordeño, terneros y animales de compañía) las muestras fecales se obtuvieron mediante hisopado rectal, previa limpieza local del periné. Cada hisopo fue colocado cuidadosamente dentro de tubos transportadores estériles conteniendo agar nutritivo como se puede observar en las figuras II.1 y II.2 (164, 165).



Figura II.1. Toma de muestra de materia fecal mediante hisopado rectal con hisopo estéril



Figura II.2. Muestra rectal de materia fecal colocada dentro del tubo estéril transportador rotulado

Las muestras de materia fecal humana fueron obtenidas de los pozos sépticos en frascos limpios y esterilizados, para poder lograr una muestra representativa de todos los habitantes del lugar. Se recolectaron aproximadamente 100 mL de agua de los pozos, sumergiendo un cucharón de acero inoxidable previamente esterilizado y desplazándolo en sentido horizontal para crear una corriente artificial (Figura II.3). Posteriormente se vertió el contenido cuidadosamente dentro de los frascos correspondientes perfectamente rotulados (163).



Figura II.3. Toma de muestra de pozo séptico.

Todas las muestras se mantuvieron adecuadamente refrigeradas hasta su llegada al laboratorio, donde fueron procesadas dentro de las 24 hs posteriores a su recolección (164, 165).

Muestras del medio ambiente

Se muestreó la bomba estercolera de cada tambo, pues en ningún caso hubo lagunas presentes. Para la toma de las mismas, en este caso se utilizó igual técnica a la descrita en el párrafo anterior para el pozo séptico, ver figura II.4 A y B (163).



Figura II.4 A y B. Toma de muestra de bomba estercolera

Muestras de agua

Se utilizaron recipientes estériles conteniendo 0.04 g de tiosulfato de sodio cada 500 mL de agua para neutralizar los residuos clorados. Previamente a la obtención de la muestra, se esterilizó cada uno de los grifos, luego se dejó fluir agua durante 5 minutos a fin de remover todo sedimento adherido a las tuberías y finalmente se recolectaron aproximadamente 400 mL (Figura II.5). Cada botella colectora se mantuvo refrigerada hasta su llegada al laboratorio dentro de las 24 hs de obtenida la muestra (163).



Figura II.5. Toma de muestra de agua de grifo de un tambo

II.2.3.2. Procesamiento de las muestras

Muestras fecales de los animales

Los hisopos conteniendo las muestras fecales de los animales, se sembraron directamente en el medio sólido selectivo-diferencial de Levine (EMB), utilizando la técnica de estriado por agotamiento o cuadrante radial con el fin de obtener colonias puras aisladas e inhibir la flora acompañante como se observa en la figura II.6 (ver VI.3. Anexo C).

Se incubaron a 37°C durante 24 hs y luego se seleccionaron una o dos colonias por muestra con características macroscópicas típicas de coliformes. Estas fueron aisladas individualmente y se repicaron en EMB con la misma técnica de siembra. Las colonias típicas de coliformes se presentan separadas, lisas, circulares, convexas con bordes bien diferenciados, nucleadas con o sin brillo metálico, ver figura II.6 (82).



Figura II.6. *Escherichia coli* ATCC 25922 sembrada en estría por agotamiento en agar EMB

Muestras fecales humanas

Para las muestras fecales humanas, obtenidas de los pozos sépticos, el procedimiento consistió en homogeneizar el contenido de los frascos y tomar submuestras con hisopos estériles. Estas fueron colocadas dentro de tubos con caldo tripticasa soya (VI.3. Anexo C), por 24hs a 35°C, como medio de pre-enriquecimiento. Luego, de cada tubo con turbidez, es decir con crecimiento bacteriano notable, se tomaron 10 μ L de caldo y se sembraron por la técnica de agotamiento o diseminación en placas de Petri con medio sólido EMB. Fueron incubadas por 24 hs a 35°C para luego seguir el aislamiento de colonias puras típicas, del mismo modo que fue descrito para las muestras fecales de animales (166).

Muestras del medio ambiente

En el caso de las muestras obtenidas de las bombas estercoleras, representando la contaminación fecal ambiental de la explotación, la técnica empleada fue igual a la descrita para la del pozo séptico.

Muestras de agua

Para aislar cepas de *E. coli* a partir de las muestras de agua se aplicó el método tradicional del número más probable (NMP) en caldo Mac Conkey (VI.3. Anexo C). A las muestras positivas que

manifestaron turbidez con producción de ácido y/o gas, se les practicó un ensayo confirmatorio. Se incubaron a 35-37 °C durante 24 horas. A partir del caldo de los tubos positivos se procedió al aislamiento por agotamiento en superficie de una placa de Petri con agar EMB (163).

II.2.3.3. Conservación y mantenimiento de las cepas aisladas

De cada placa con medio selectivo, conteniendo colonias puras sospechosas de pertenecer a la especie *E. coli*, se realizó la conservación a temperatura ambiente y a -20°C.

Se prepararon dos crioviales estériles por muestra seleccionada, se rotularon cuidadosamente y se cargaron con caldo tripticasa soya (3 mL/criovial) conteniendo un 15% de glicerol. Luego, se volvieron a esterilizar por autoclave y una vez fríos, cada criovial fue sembrado con una ansada de la cepa a conservar desde un medio sólido conteniendo el cultivo de 24 hs (45, 167, 168).

Para la conservación a temperatura ambiente, se prepararon por duplicado viales, correctamente rotulados, con 3 mL de agar nutritivo para cada muestra y se dejaron solidificar en posición vertical. La siembra se realizó por punción y en superficie.

II.2.3.4. Biotipificación de las cepas aisladas

Mediante tinción de Gram y pruebas bioquímicas se realizó la tipificación bioquímica de los aislamientos. La identificación bioquímica fue realizada mediante pruebas básicas, siguiendo la descripción del Manual de determinación sistemática de Bergey (169).

Una vez aisladas las colonias puras se llevó a cabo la observación directa y coloración de Gram (VI.3. Anexo C y Figura II.7).



Figura II.7. Coloración de Gram de bacilo Gram-negativo

Tras la observación de los bacilos Gram-negativos, se practicó la resiembra en agar-tres azúcares-hierro (TSI del inglés *Triple Sugar Iron*). Este medio se utiliza para determinar la fermentación de lactosa, sacarosa y dextrosa; y para la producción de H₂S y de gas. La siembra se realizó por picadura y en superficie. Al mismo tiempo la identificación se completó con la prueba llamada IMViC, siglas de formación de indol (I), prueba del rojo de metilo (M), reacción de Voges-Proskauer (V) y utilización del citrato (C) (ver VI.3. Anexo C).

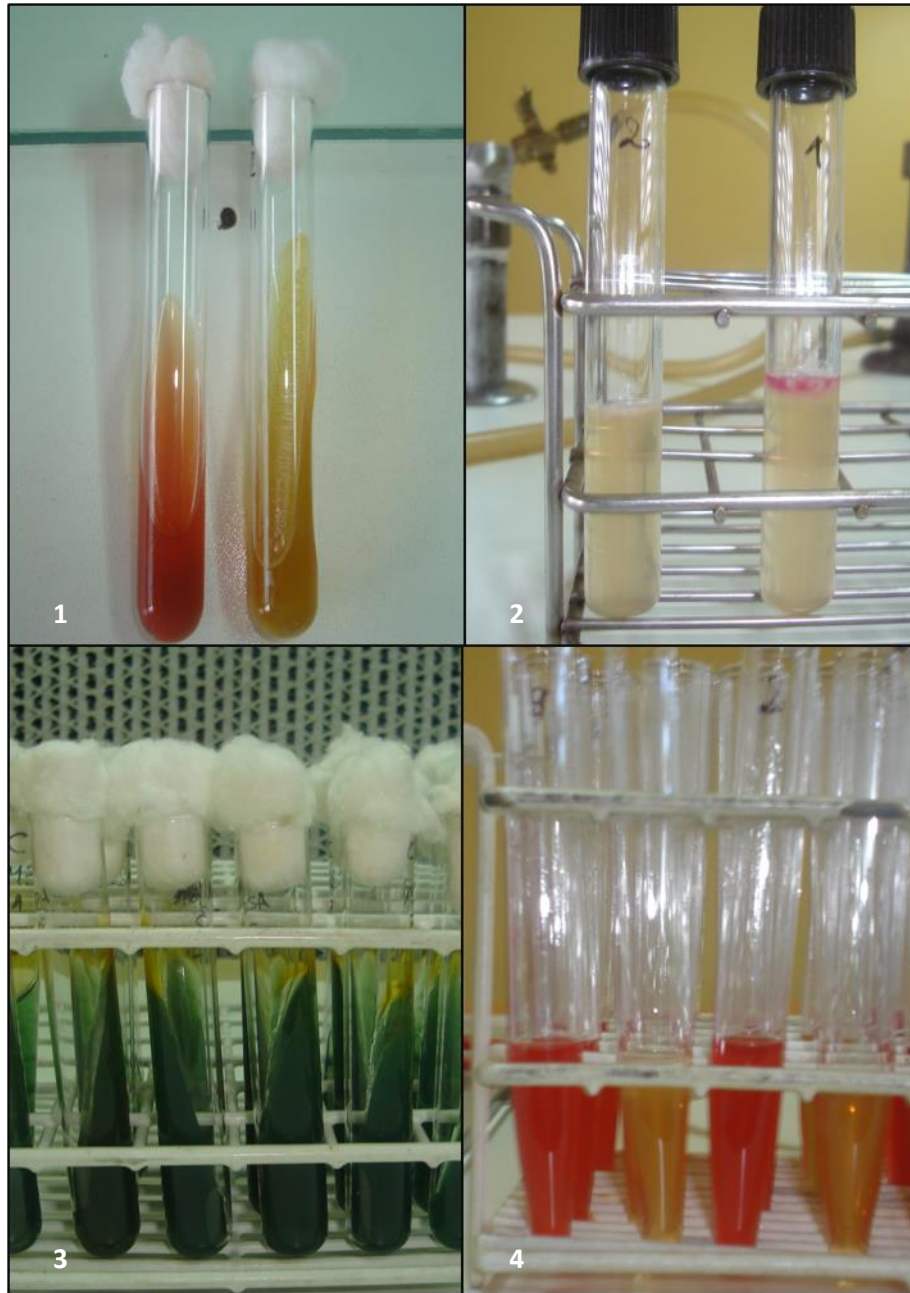


Figura II.8. Pruebas bioquímicas IMViC realizadas a cepas de la especie *E. coli*

Foto 1: Prueba TSI, tubo de la derecha sembrado con E. coli; tubo de la izquierda sin sembrar. Foto 2: Prueba de indol en agar SIM, tubo derecho positivo, tubo izquierdo negativo. Foto 3: Citrato de Simmons, prueba negativa. Foto 4: Rojo de metilo-Voges Proskauer: tubos rojos, rojo de metilo positivo; tubos amarillos Voges Proskauer negativo.

En estas pruebas se utilizó una batería de medio de cultivo como el agar SIM (medio de motilidad con indol y sulfuro), caldo rojo de metilo-Voges Proskauer (RM-VP) y agar citrato de Simmons (VI.3. Anexo C).

En todos los casos se utilizó *E. coli* ATCC 25922 como control de calidad de cada una de las pruebas. La misma fue obtenida del Servicio de Antimicrobianos del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS "Dr. C. G. Malbrán".

E. coli se caracteriza por ser indol positivo, rojo de metilo positivo, Voges Proskauer negativo y citrato negativo.

II.2.4. Estudio de susceptibilidad por antibiograma

El test de susceptibilidad por el método de difusión en agar fue el utilizado para la evaluación de los perfiles de resistencia en los aislamientos obtenidos. Este método estandarizado es el recomendado por el Subcomité de Estudios de Susceptibilidad Antimicrobiana en Veterinaria del Instituto de Estándares de Laboratorios Clínicos (de sus siglas en inglés CLSI: *Clinical and Laboratory Institute*) originalmente descrito por Bauer y col.; y adaptado del documento *M2-Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test* de la CLSI (45, 167).

Fueron seleccionadas únicamente aquellas bacterias que luego de la tipificación bioquímica pudieron ser clasificadas dentro de la especie *E. coli*.

Este método consiste en colocar sobre la superficie de un medio de cultivo sólido inoculado con una concentración estandarizada de la bacteria a analizar, varios discos de papel impregnados con una cantidad específica de antimicrobiano.

Una vez colocados los discos en contacto con la superficie húmeda del agar y como resultado de la formación de un gradiente de concentración, el antimicrobiano difunde desde el disco (lugar de mayor concentración) hacia el agar (lugar de menor concentración) en forma radial (45, 167, 170).

Transcurridas 18-24 hs de incubación, y luego que la concentración del antimicrobiano se diluye al punto de no lograr la inhibición del crecimiento bacteriano, queda en el agar claramente demarcada la zona de inhibición. El diámetro de esta zona, se correlaciona inversamente con la concentración mínima inhibitoria (CIM) de la bacteria testada.

Generalmente, cuanto mayor sea el diámetro medido, menor será la concentración de antimicrobiano necesaria para inhibir el crecimiento de la misma y la bacteria será considerada

susceptible. Sin embargo, esto dependerá de la concentración de antimicrobiano presente en el disco, y de su adecuada difusibilidad (167, 170).

La medida de los diámetros de los halos de inhibición permite interpretar los resultados de acuerdo a las siguientes categorías: sensible (S), intermedia (I) o resistente (R) (167).

II.2.4.1. Selección de los agentes antimicrobianos

La selección de los antimicrobianos para las pruebas de susceptibilidad se fundamentó en los resultados de las encuestas realizadas a los encargados, productores de los establecimientos analizados, y veterinarias o distribuidoras vecinas a las explotaciones. Estos datos permitieron conocer cuáles fueron los antimicrobianos más utilizados en los últimos 12 meses (Ver VI.1 Anexo A).

Finalmente, se complementó la información obtenida en las encuestas con los datos establecidos en los documentos M31-A2 (171) y M31-A3 *-Performance standards for antimicrobial dilution and susceptibility tests for bacteria isolated from animals -*(167) y los de ciprofloxacina aportados por el M100-S19 *-Performance standards for antimicrobial susceptibility testing-* (CLSI, 2009) para la realización de los estudios de susceptibilidad en medicina veterinaria.

II.2.4.2. Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado fue el agar Mueller Hinton, considerado el mejor de los medios disponibles para las pruebas de sensibilidad de rutina por demostrar buena reproducibilidad, contener baja cantidad de inhibidores de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclinas y ser adecuado para el desarrollo de la mayoría de las bacterias patógenas entre otras ventajas (167, 170).

Para la preparación del medio se siguieron las recomendaciones del fabricante. Inmediatamente luego de esterilizarlo por autoclave, se llevó a baño termostático hasta alcanzar una temperatura de 48–50 °C. Una vez atemperado, se colocaron 25 mL del medio con pipeta de vidrio estéril dentro de placas de Petri de 90 mm de diámetro.

El procedimiento fue realizado sobre una superficie horizontal nivelada a fin de lograr una distribución homogénea del agar dentro de las placas y obtener una altura uniforme de 4 mm de profundidad. Las placas terminadas se dejaron reposar a temperatura ambiente por lo menos durante 2 hs previo a ser utilizadas. Todas aquellas que no fuesen usadas en el día de la preparación, fueron conservadas en heladera a 4°C durante un máximo de 7 días. Estas últimas, usadas días ulteriores, fueron sacadas de la heladera y dejadas a temperatura ambiente durante 2 hs, aproximadamente, antes de ser utilizadas (167, 170).

Para las placas que mostraban presencia notoria de humedad en la superficie, se procedió a su colocación dentro de estufa a 35°C durante media hora con la tapa ligeramente abierta a fin de evitar su contaminación. Como control de esterilidad del medio preparado se dejaron placas control dentro de la estufa a 35°C durante 24 hs (167).

Para el control del pH del medio de cultivo gelificado a temperatura ambiente se emplearon cintas indicadoras de pH (Merck KGaA, Germany). De esta manera se comprobó que el medio de cultivo tuviese siempre el pH adecuado (7.2 – 7.4).

II.2.4.3. Inóculo bacteriano

Debido a la gran cantidad de muestras a analizar, se optó por el método de suspensión directa de colonias para la preparación del inóculo. Este se llevó a cabo mediante la realización de una suspensión salina directa de colonias seleccionadas de un cultivo en agar de 18-24 hs.

Para obtener las colonias, se sembraron en agar nutritivo todas las cepas a evaluar ese día conjuntamente con la de referencia (*E. coli* ATCC 25922). Se incubaron a 37°C durante 24 hs y luego se tomaron 2 a 4 colonias de cada aislamiento, las que se inocularon en 5 mL de solución salina estéril. Se ajustó a la turbidez necesaria para lograr una concentración equivalente a 0.5 de la escala de McFarland (VI.3. Anexo C) en solución fisiológica (contiene aproximadamente a 1 a 2×10^8 UFC/mL para *E. coli* ATCC 25022). Para ajustar la turbidez del inóculo se utilizó la comparación visual contra el estándar mirando ambos tubos con buena iluminación contra un fondo blanco con líneas negras como contraste. Cuando la turbidez era mayor en la muestra que en el estándar, se ajustó agregando solución salina estéril. Caso contrario, cuando la turbidez era menor, se agregaron más colonias (167).

II.2.4.4. Discos de antibiograma

Se utilizaron discos de papel impregnados en antimicrobianos donados por el Laboratorio Britania. Cada uno de ellos provisto de certificado de análisis, número de lote y control de calidad.

Los discos en sus envases (frascos o dispensadores) fueron conservados a -20°C, libres de humedad según recomendaciones del fabricante. Fueron sacados del freezer 2 horas antes de ser utilizados para que adquiriesen la temperatura ambiente, con el fin de minimizar la condensación que podría ocurrir cuando la humedad ambiente alcanzara a los frascos fríos (45, 167, 172).

Los antimicrobianos analizados fueron ocho, por cada cepa estudiada se utilizaron dos placas con cuatro discos cada una, con el fin de obtener halos bien definidos y separados en caso de que la

cepa resultase susceptible. La CLSI recomienda no más de cinco discos en placas de 100 mm de diámetro para evitar la superposición de halos. El procedimiento se realizó por duplicado (45, 167).

Los discos incluidos en la prueba descrita fueron: amoxicilina-ácido clavulánico (20-10 µg), ciprofloxacina (5 µg), gentamicina (10 µg), tetraciclina (30 µg), trimetoprima-sulfametoxazol (1.25-23.75 µg), ceftiofur (30 µg), ampicilina (10 µg), florfenicol (30 µg). Todos gentilmente donados por el laboratorio Britania a excepción de florfenicol y ceftiofur de la marca Oxoid, donados por el laboratorio CEVASA S.A.

II.2.4.5. Procedimiento para la realización del test de susceptibilidad por difusión en placa

Una vez lograda la turbidez deseada, equivalente a 0.5 de la Escala de McFarland, se procedió a la inoculación de las placas. Se utilizaron dos placas de Petri de 90 mm con 25 mL de agar Mueller Hinton para los ocho antimicrobianos por cada cepa analizada (45).

La siembra de las placas se realizó dentro de los 15 minutos posteriores de ajustada la turbidez. Para ello, se sumergió un hisopo estéril por cada cepa dentro del tubo correspondiente, descargando el exceso de inóculo contra las paredes por encima del nivel del líquido. Se sembró luego la superficie seca del agar por hisopado en tres direcciones, rotando la placa 60° cada vez y recorriendo finalmente la circunferencia de la misma para asegurar no dejar ninguna zona libre de bacterias.

De esta manera se obtuvieron zonas de inhibición uniformemente circulares y desarrollo bacteriano homogéneo (45, 172).

Después de unos minutos, con el fin de que el exceso de humedad sea absorbido, se procedió a la colocación de los discos de papel con antimicrobiano.

Algunos de los discos estaban contenidos en frascos y otros en dispensadores, la colocación de los mismos sobre el agar se realizó con la ayuda de una pinza estéril. Dentro de los 15 minutos posteriores, las placas se colocaron en estufa y se incubaron a 35°C durante 18 hs, en posición invertida y apiladas en grupos de cinco. Pasado ese tiempo, la lectura se realizó con la ayuda de un calibre de Vernier contra un fondo negro e iluminado con luz reflejada (167).

II.2.4.6. Lectura e interpretación de los halos de inhibición

Para la correcta lectura se midió el área de halo que no mostró desarrollo bacteriano obvio a ojo desnudo, no incluyendo velo de crecimiento o colonias muy pequeñas que pudiesen ser detectadas en el borde de la zona.

En el caso particular de los discos de trimetoprima/sulfametoxazol, se tuvo en consideración la posibilidad de observar un crecimiento con aspecto de niebla dentro de la zona del halo de inhibición, por la presencia de sustancias antagónicas contenidas en el medio Mueller Hinton. En estos casos, se consideraron únicamente los márgenes más obvios para determinar la zona de inhibición (45, 167).

Según la CLSI (2009), se definen como resistentes a las cepas que no son inhibidas por las concentraciones séricas que normalmente se alcanzan con las dosis habituales por caer por debajo de sus correspondientes CIMs.

Debido a que el objetivo central de nuestro estudio, al realizar el test de susceptibilidad por el método de difusión en placa, era seleccionar cepas multirresistentes, se hizo mayor hincapié en la búsqueda y obtención de cepas que expresaran halos de inhibición claramente pequeños o nulos, fundamentalmente a varios antimicrobianos al mismo tiempo. La interpretación de los resultados de dicha lectura se basó en los datos establecidos en la tabla 2 del documento M31-A3 y en la 2A del M100-S19, para la discriminación de los microorganismos sensibles, intermedios y resistentes; ver a continuación tabla II.1. (45, 167).

Tabla II.1. Valores de referencia utilizados para la interpretación de los resultados de antibiogramas frente a *Enterobacterias (E. coli)*

Antimicrobiano	Contenido del disco	Diámetro(mm)		
		S	I	R
Ampicilina ^a	10 µg	≥17	14/16	≤13
Amoxicilina/Ac.clavulánico ^a	20-10 µg	≥18	14/17	≤13
Ceftiofur ^a	30 µg	≥21	18/20	≤17
Ciprofloxacina ^b	5 µg	≥21	16/20	≤15
Gentamicina ^a	10 µg	≥15	13/14	≤12
Florfenicol ^{a **}	30 µg	≥19	15/18	≤14
Tetraciclina ^a	30 µg	≥19	15/18	≤14
Trimetoprima/Sulfametoxazole ^a	1.25/23.75 µg	≥16	11/15	≤10

^aValores de referencia tomados del documento CLSI M31-A3

^bValores de referencia tomados del documento CLSI M100-19

**Los valores de florfenicol se basaron en los establecidos para los microorganismos causantes de la enfermedad respiratoria bovina (BRD)

II.2.4.7. Control de calidad

Con el fin de monitorear las pruebas y obtener resultados confiables, se utilizó la cepa de referencia *E. coli* ATCC 25922 con sensibilidad conocida para los antimicrobianos evaluados.

Para su mantenimiento por tiempo prolongado, se realizó la conservación a -20°C en crioviales con caldo tripticasa soya y 15% de glicerol. Para su uso rutinario, la cepa de control de calidad de trabajo se conservó a 4°C en agar tripticasa soya y se subcultivó semanalmente (168).

A continuación se presenta la tabla II.2 con los valores de referencia de los diámetros de los halos establecidos por la CLSI para la cepa *E. coli* ATCC 25922

Tabla II.2. Valores de referencia de los diámetros de los halos establecidos por la CLSI para la cepa *E. coli* ATCC 25922

ANTIMICROBIANO	CONTENIDO DEL DISCO	DIAMETRO ACEPTABLE (mm) <i>E.coli</i> ATCC 25922
Ampicilina	10 µg	19-26 ^a
Amoxicilina/Ac.clavulánico	20-10 µg	18-24 ^a
Ceftiofur	30 µg	26-31 ^a
Ciprofloxacina	5 µg	30-40 ^b
Gentamicina	10 µg	19-26 ^a
Florfenicol	30 µg	22-28 ^a
Tetraciclina	30 µg	18-25 ^a
Trimetoprima/Sulfametoxazol	1.25/23.,75 µg	23-29 ^a

^aValores de referencia tomados del documento CLSI M31-A3

^bValores de referencia tomados del documento CLSI M100-19

II.2.5. Prueba cuantitativa para evaluar la disminución de la susceptibilidad bacteriana

Una vez identificadas las cepas de *E. coli* multirresistentes, se procedió a la determinación de la CIM a través de la prueba cuantitativa de microdilución en caldo, basada en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes de antimicrobiano.

Se determinó la CIM₅₀ y la CIM₉₀ analizando cada uno de los antimicrobianos seleccionados, solos y combinados con cinco concentraciones diferentes del inhibidor de bombas de eflujo 1-(1-naphthylmethyl)piperazine (NMP).

El valor que se obtiene de la CIM por el método de dilución es un valor que orienta (no es un valor real) acerca de cuál es la concentración necesaria en el sitio de infección para que un microorganismo dado pueda inhibirse. La CIM puede estar entre la menor concentración de antibiótico que inhibe al microorganismo y la siguiente donde se observa desarrollo del mismo (45, 167, 173).

Para la prueba de sensibilidad por microdilución para cada antimicrobiano y para cada cepa, se emplearon 2 policubetas (Nº 1 y Nº 2) descartables estériles de 96 pocillos con fondo en "U". Cada una de las policubetas contenía el rango completo de diluciones del antimicrobiano, repetido cuatro veces, la serie total de concentraciones evaluadas comprendía dos filas de la policubeta, desde la columna 1 a la 10. La columna 11 contenía el inóculo sin antimicrobiano ni inhibidor, permitiendo de esta manera tener un control positivo de crecimiento y la número 12 fue el control negativo, pues solo contenía caldo (Figura II.10). Nuevamente este procedimiento se realizó por duplicado (Nº 1' y Nº 2').

Las policubetas fueron cargadas con 100 µL de caldo LB utilizando una pipeta multicanal. Luego los primeros pocillos de cada fila, se cargaron individualmente con 100 µL del antimicrobiano a una concentración cuatro veces mayor que la deseada para dicho pocillo. Es decir, que al agregar 100 µL de la solución stock de trabajo concentrada al caldo, se obtuvo una dilución 1:2 y una vez realizada, las diluciones seriadas desde la columna 1 hasta la 10 con la pipeta multicanal el volumen volvió a quedar en 100 µL. Posteriormente, se agregaron 100 µL de caldo conteniendo el inóculo problema, diluyendo de esta manera, la concentración anterior, nuevamente 1:2. En consecuencia, la concentración final resultó ser cuatro veces menor que la preparada inicialmente. Una vez cargado el inóculo, el volumen final por pocillo fue de 200 µL.

Se empleó un amplio rango de diluciones a fin de observar el efecto de la combinación del NMP en concentraciones crecientes con los distintos antimicrobianos, en el VI.2. Anexo B se pueden observar las planillas utilizadas para cada antimicrobiano según las diluciones probadas.

El inhibidor de bombas de eflujo se incorporó a la policubeta Nº1 en las filas C y D a una concentración de 6.25 µg/mL, en E y F, 12.5 µg/mL y en G y H, 25 µg/mL. En la segunda policubeta (Nº 2), se agregaron 50 µg/mL en las filas C y D, 100 µg/mL en E y F. En ambas policubetas las filas A y B no fueron cargadas con inhibidor de bombas en función de obtener la CIM real del antimicrobiano solo y en las G y H de la policubeta Nº 2 se evaluó la CIM de NMP sin antibacteriano en el rango de concentraciones de 1.56 µg/mL a 800 µg/mL (Figura II.10).

En el Anexo (VI.2. Anexo B), se esquematizan las concentraciones de los antimicrobianos y el NMP, en las planillas que se utilizaron para la lectura de los resultados de las policubetas.

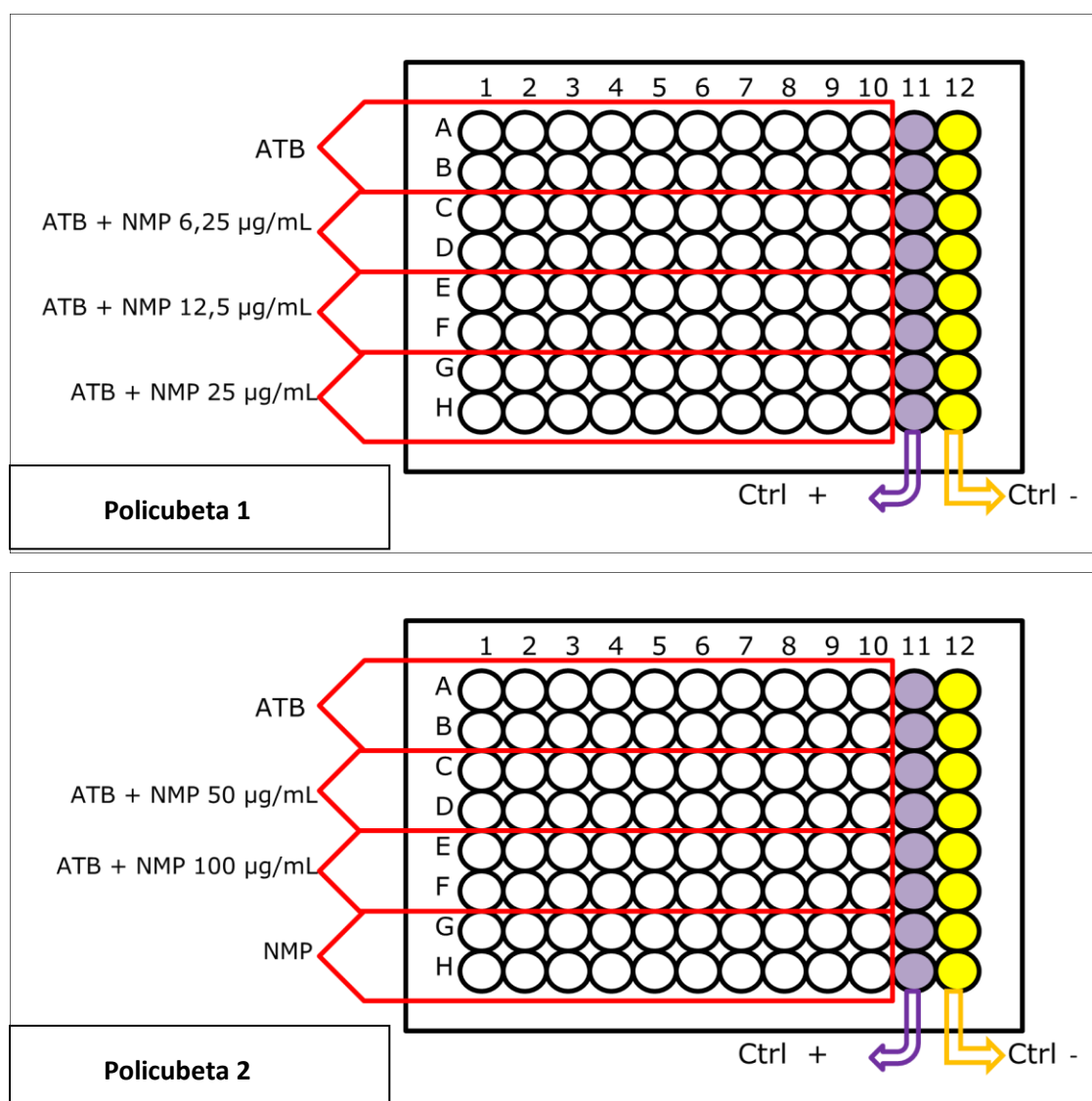


Figura II.10. Esquematización de policubetas para la realización de las CIMs de los antimicrobianos por microdilución con y sin inhibidor.

ATB: antimicrobiano, NMP: 1-(1-naphthylmethyl)piperazine, Ctrl +: control positivo, Ctrl -: control negativo.

II.2.5.1. Selección de los antimicrobianos

Para la realización de la prueba de susceptibilidad por dilución o CIM de las cepas de campo *E. coli* MDR, se utilizaron únicamente aquellos antimicrobianos a los que fueron resistentes en la prueba de susceptibilidad por difusión o antibiograma.

En el caso de las cepas de referencia se emplearon los ocho antimicrobianos seleccionados para la prueba de antibiograma. Esto se realizó con el fin de analizar el comportamiento de cepas con distintos niveles de expresión de bombas de eflujo, frente a diferentes familias de antimicrobianos en combinación con el inhibidor NMP (ver apartado II.2.5.7).

Por lo tanto, para las cepas MDR se obtuvo la CIM de ampicilina, florfenicol, ciprofloxacina, tetraciclina y trimetoprima/sulfametoxazol. Mientras que para las cepas de referencia, además de los antimicrobianos mencionados, también se estudiaron amoxicilina/ácido clavulánico, gentamicina y ceftiofur.

Todos los antimicrobianos utilizados fueron estándares secundarios a excepción de ampicilina que se utilizó un estándar de referencia. En todos los casos se contó con la información precisa del lote, la potencia (generalmente expresada en microgramos [µg] ó Unidades Internacionales [UI] por miligramo de masa) y la fecha de vencimiento.

Preparación y conservación de las soluciones madres o stock de los antimicrobianos

Cada uno de los antimicrobianos se pesó en la balanza analítica de precisión correctamente calibrada. Previamente se realizó el cálculo de potencia basado en la ecuación propuesta por la CLSI donde se tienen en cuenta los datos de pureza ensayada por HPLC y el contenido de agua mencionados en los certificados de análisis correspondientes:

$$\text{Potencia} = (\text{Ensayo de pureza}) \times (\text{Fracción activa}) \times (1 - \text{Contenido de agua}) \quad \text{Ecuación II.1}$$

En todos los casos, las soluciones stock madre y las de trabajo fueron preparadas utilizando los solventes y diluyentes recomendados por la CLSI en los documentos M31-A3 (167), M100-S19 (173) y M7-A8 (173), como se indica en la tabla II.3.

Tabla II.3. Solventes y diluyentes utilizados para la preparación de las soluciones stock y diluciones seriadas de los antimicrobianos en la determinación de las CIMs

Antimicrobiano	Solvente	Diluyente
Ampicilina	Buffer fosfato, pH8, 0.1 mol/L	Buffer fosfato, pH6, 0.1 mol/L
Amoxicilina, Ácido Clavulánico	Buffer fosfato, pH6, 0.1 mol/L	Buffer fosfato, pH6, 0.1 mol/L
Ceftiofur	Agua o caldo	Agua
Florfenicol	Etanol 95%	Agua
Ciprofloxacina	Agua	Agua
Tetraciclina	Agua	Agua
Gentamicina	Agua o caldo	Agua
Sulfometoxazol	½ volumen de agua y cantidad mínima de 2.5 mol/L de NaOH para disolver	Agua
Trimetoprima	10% del volumen final de 0.05N de ácido láctico o clorhídrico	Agua tibia

Una vez preparadas las soluciones madres, conteniendo en todos los casos una concentración mayor a 1000 µg/mL, se conservaron en pequeños volúmenes en el freezer a -20°C, sin esterilización previa, pues es muy poco frecuente que padezcan contaminación (172).

Preparación de las soluciones de trabajo de los antimicrobianos

Para cada antimicrobiano se realizaron diluciones seriadas a partir de la solución stock madre, utilizando los diluyentes recomendados hasta obtener una solución stock de trabajo cuatro veces mayor a la concentración que se deseaba evaluar. Esta solución de trabajo fue el punto de partida para las diluciones seriadas que luego fueron confrontadas con el inóculo bacteriano.

En general, el rango de diluciones para las cepas MDR se estableció en función de los datos de susceptibilidad para ese antimicrobiano en particular, obtenidos en la prueba de difusión en placa. Las cepas en cada caso se clasificaron como *MDR resistentes* al antimicrobiano analizado o *MDR susceptibles* al mismo.

Diluciones seriadas de florfenicol

Se empleó florfenicol en su forma anhidra con una potencia de 99.3% p/p. La solución stock madre se preparó usando como solvente etanol 95%. A partir de ésta, se prepararon dos diluciones: la mayor, fue la primer concentración de las filas impares de la policubeta y la menor, la primera de las pares, lo cual permitió obtener un rango de diluciones más amplio. Cada una de estas, contenía cuatro veces la concentración más alta a analizar y los diluyentes empleados fueron primero agua y luego caldo LB en ambos casos.

Para las filas impares, la primera dilución fue de 1024 µg/mL con el fin de lograr una concentración final de 256 µg/mL en el primer pocillo. El rango de diluciones seriadas fue: 256 µg/mL, 128 µg/mL, 64 µg/mL, 32 µg/mL, 16 µg/mL, 8 µg/mL, 4 µg/mL, 2 µg/mL, 1 µg/mL y 0.5 µg/mL del antimicrobiano.

La segunda concentración, para las filas pares fue de 16 µg/mL y el rango obtenido fue: 4 µg/mL, 2 µg/mL, 1 µg/mL, 0.5 µg/mL, 0.25 µg/mL, 0.125 µg/mL, 0.062 µg/mL, 0.031 µg/mL, 0.015 µg/mL y 0.007 µg/mL de florfenicol.

En consecuencia para florfenicol el rango de diluciones seriadas comprendió concentraciones desde 256 µg/mL hasta 0.007 µg/mL, tanto para las cepas MDR-resistentes como para las MDR-susceptibles.

Diluciones seriadas de tetraciclina

Se empleó tetraciclina hidrocloreto en su forma anhidra con 97.03 % p/p de pureza. El solvente utilizado para la preparación de la solución madre fue agua y las soluciones stock de trabajo se diluyeron en caldo LB. La técnica fue idéntica a la explicada para florfenicol, obteniendo también un rango de diluciones comprendido entre 256 µg/mL y 0.007 µg/mL.

Todas las cepas MDR mostraron resistencia frente a tetraciclina, de modo que el rango de diluciones empleado para todas fue exactamente el mismo.

Diluciones seriadas de ciprofloxacina

La solución stock madre se preparó utilizando ciprofloxacina clorhidrato anhidra con 99.8 % p/p de pureza. Se empleó agua como solvente y diluyente.

En este caso particular la CIM de las cepas MDR-susceptibles y de las MDR-resistentes fueron analizadas con rangos de diluciones diferentes debido a que las segundas fueron inhibidas a

concentraciones muy elevadas comparadas con las primeras, resultando imposible incluir en las mismas policubetas el rango completo.

Para las *MDR-resistentes a ciprofloxacina* el rango fue de 256 µg/mL a 0.007 µg/mL coincidiendo con los casos anteriores, mientras que en el caso de las *MDR-susceptibles a ciprofloxacina*, las concentraciones evaluadas fueron: 0.25 µg/mL, 0.125 µg/mL, 0.0625 µg/mL, 0.0312 µg/mL, 0.0156 µg/mL, 0.0078 µg/mL, 0.0039 µg/mL, 0.0019 µg/mL, 0.00097 µg/mL, 0.00048 µg/mL.

Diluciones seriadas de ampicilina

En el caso de ampicilina, la solución stock madre se preparó con ampicilina trihidrato con una pureza de 96 % p/p. El solvente utilizado para la madre fue buffer fosfato pH 8, 0.1 mol/L y el diluyente de la primer dilución de las soluciones de trabajo fue buffer fosfato pH 6, 0.1 mol/L. El resto fue preparado empleando caldo LB.

El rango de diluciones analizado fue de 256 µg/mL a 0.007 µg/mL, coincidiendo con la misma metodología descrita para florfenicol tanto para las cepas *MDR-resistentes* como para las *MDR-susceptibles a ampicilina*.

Diluciones seriadas de amoxicilina/ácido clavulánico

Se utilizó una combinación de amoxicilina trihidrato y ácido clavulánico, sal potásica, con una pureza de 99.31 % p/p y 86% p/p respectivamente, en una proporción amoxicilina:ácido clavulánico de 4:1. A partir de esta, se preparó una solución stock madre empleando como solvente y diluyente buffer fosfato pH 6, 0.1 mol/L.

Partiendo de una concentración inicial de 256 µg/mL (204.8:51.2 µg/mL), las diluciones sucesivas fueron de 128 µg/mL (102.4:25.6 µg/mL), 64 µg/mL (51.2:12.8 µg/mL), 32 µg/mL (25.6:6.4 µg/mL), 16 µg/mL (12.8:3.2 µg/mL), 8 µg/mL (6.4:1.6 µg/mL), 4 µg/mL (3.2:0.8 µg/mL), 2 µg/mL (1.6:0.4 µg/mL), 1 µg/mL (0.8:0.2 µg/mL), 0.5 µg/mL (0.4:0.1 µg/mL), 0.25 µg/mL (0.2:0.05 µg/mL), 0.125 µg/mL (0.1:0.025 µg/mL), 0.062 µg/mL (0.05:0.012 µg/mL), 0.031 µg/mL (0.025:0.006 µg/mL), 0.015 µg/mL (0.012:0.003 µg/mL) y 0.007 µg/mL (0.006:0.001 µg/mL).

Diluciones seriadas de ceftiofur

Para la solución stock madre de ceftiofur, se empleó ceftiofur HLC (hidroclorado) en su forma anhidra, con 102.2 % p/p de pureza. Como solvente se utilizó agua y como diluyente de las soluciones de trabajo, caldo LB.

Las diluciones analizadas contemplaron un rango de concentraciones de 256 µg/mL a 0.007 µg/mL, se aplicó para ello la misma metodología descripta para florfenicol.

Diluciones seriadas de gentamicina

Se utilizó gentamicina sulfato anhidra, con 99 % p/p de pureza (634 UI/mg). La solución stock madre y las de trabajo fueron solubilizadas y diluídas respectivamente con agua primero, y luego con caldo LB.

El rango de concentraciones analizadas fue de 256 µg/mL a 0.007 µg/mL.

Diluciones seriadas de trimetoprima/sufametoxazol

La solución stock madre de sulfametoxazol (anhidra) con 99.8 % p/p de pureza se preparó solubilizándola con 5 mL de agua destilada estéril caliente, más el agregado de cinco gotas de hidróxido de sodio a una concentración de 2.5 mol/L, para finalmente llevar a 10 mL con agua a temperatura ambiente. Para la solución stock madre de trimetoprima, se utilizó un compuesto con 100.2 % p/p en base seca, y el solvente empleado fue ácido hidrociorhídrico 0.05 N. En ambos casos se prepararon las soluciones de trabajo utilizando agua como diluyente.

Una vez preparadas cada una de las madres, se combinaron en una solución que contenía trimetoprima:sulfametoxazol en una proporción equivalente a 1:19. Con lo cual se logró que las concentraciones analizadas para la prueba de susceptibilidad fueran: 1280 µg/mL (64:1216 µg/mL), 640 µg/mL (32:608 µg/mL), 320 µg/mL (16:304 µg/mL), 160 µg/mL (8:152 µg/mL), 80 µg/mL (4:76 µg/mL), 40 µg/mL (2:38 µg/mL), 20 µg/mL (1:19 µg/mL), 10 µg/mL (0.5:9.5 µg/mL), 5 µg/mL (0.25:4.75 µg/mL), 2.5 µg/mL (0.125:2.37 µg/mL).

II.2.5.2. Preparación y conservación del inhibidor de bombas de eflujo NMP

Para la preparación del inhibidor 1-(1-naphthylmethyl)piperazine (Sigma-Aldrich S.A.) primero se procedió al cálculo de potencia del mismo modo descripto en el apartado anterior para los

antimicrobianos. Por tratarse de una molécula en etapa de análisis experimental, la preparación de la misma fue realizada según lo informado por (37). Para lo cual, el inhibidor se solubilizó siguiendo la siguiente proporción: cada 100 mg de NMP se agregaron 2 mL de DMSO, luego de mezclar se adicionaron 2 mL de ácido clorhídrico 0.25 M y por último 6 mL de agua destilada estéril como solventes; se homogeneizó la mezcla y se llevó a ultrasonido para favorecer la disolución (37).

La preparación de NMP se planificó en función del volumen a utilizar durante dos semanas de análisis, y en base a ello, se fraccionó y conservó en freezer a -20°C , renovando el stock cada 15 días. Se determinó la estabilidad de la nueva solución de NMP mediante la repetición de ensayos previos y obtención de resultados idénticos.

Preparación de las soluciones de trabajo seriadas del NMP

Se determinó la mínima concentración efectiva (MEC) de 1-(1-naphthylmethyl)piperazina, es decir, la menor concentración de inhibidor que produce la máxima reducción de la CIM de un antimicrobiano. Para ello, se repitió cinco veces más por cada cepa MDR la misma batería de diluciones de antimicrobiano utilizadas para la CIM, pero se agregó en cada caso una concentración constante y creciente de NMP.

Para las soluciones de trabajo, el diluyente empleado fue caldo Luria Bertani (LB) de preparación artesanal esterilizado en autoclave y llevado a temperatura ambiente previo a su utilización.

Se prepararon cinco concentraciones de NMP para agregar posteriormente a las policubetas conteniendo diluciones idénticas a las usadas para la CIM de cada antimicrobiano. Partiendo de una solución madre con una concentración de 10 mg/mL, se preparó una dilución en caldo LB de 1:5 para obtener una solución stock de trabajo de 2 mg/mL ($20\mu\text{g}/10\mu\text{L}$). Como cada cubeta de la microplaca al momento de incorporar el NMP ya contenía 200 μL de volumen (100 μL de caldo con antimicrobiano y 100 μL de caldo con inóculo), se agregó un volumen pequeño de NMP (10 μL final por cubeta) a fin de no modificar la dilución.

A partir de la solución stock de trabajo de 2 mg/mL ($20\mu\text{g}/10\mu\text{L}$), se realizaron diluciones seriadas 1:2 para obtener las siguientes concentraciones: $10\mu\text{g}/10\mu\text{L}$, $5\mu\text{g}/10\mu\text{L}$, $2.5\mu\text{g}/10\mu\text{L}$ y $1.25\mu\text{g}/10\mu\text{L}$. Es decir, que las concentraciones finales a las cuales se evaluó la efectividad de NMP frente a los antimicrobianos fueron: 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($20\mu\text{g}/200\mu\text{L}$), 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($10\mu\text{g}/200\mu\text{L}$), 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($5\mu\text{g}/200\mu\text{L}$), 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($2.5\mu\text{g}/200\mu\text{L}$) y 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($1.25\mu\text{g}/200\mu\text{L}$). Estas diluciones se descartaron una vez terminado el día de trabajo y en cada nueva jornada se prepararon nuevamente.

Por otra parte, también se evaluó la actividad antimicrobiana intrínseca del inhibidor de bombas (es decir, sin antimicrobiano) frente a cada aislamiento problema. Para lo cual se emplearon las dos últimas filas de la segunda policubeta donde el rango de diluciones de NMP evaluado fue de: 800 µg/mL, 400 µg/mL, 200 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12.5 µg/mL, 6.25 µg/mL, 3.12 µg/mL y 1.56 µg/mL. Para ello, se cargó el primer pocillo de las dos últimas filas con 3200 µg/mL de NMP, con el fin de lograr una concentración final de 800 µg/mL. A partir de esta primera concentración, se realizaron diluciones seriadas 1:2 en los pocillos restantes de las correspondientes filas, de modo que se obtuvo el rango mencionado.

II.2.5.3. Medio de cultivo

Se utilizó caldo LB, medio nutricionalmente rico empleado desde 1950 en estudios de microbiología molecular de *E. coli*. Es adecuado para el cultivo de células recombinantes que no crecen correctamente en medios pobres.

Este medio de cultivo contiene triptona, extracto de levadura y cloruro de sodio; y fue preparado en forma artesanal. *E. coli* crece más rápidamente porque el medio le provee aminoácidos, precursores de nucleótidos, vitaminas y otros metabolitos que debería sintetizar por sí mismo.

Una vez preparado, el caldo fue esterilizado en autoclave. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y con una pipeta multicanal se colocaron 100 µL del mismo en cada pocillo de las policubetas correspondientes. Luego de realizadas las diluciones, cada fila contenía en dicho volumen caldo con antimicrobiano en concentraciones decrecientes de izquierda a derecha.

El inóculo, también contenido en caldo LB, se incorporó finalmente logrando un volumen final de 200 µL por pocillo.

II.2.5.4. Inóculo bacteriano

Para la prueba de susceptibilidad bacteriana por microdilución, se preparó el inóculo bacteriano de las cepas problema y de las de referencia por método directo a partir de colonias aisladas (173).

Al igual que fue descrito en el apartado II.2.4.3 de antibiograma, se preparó una suspensión de colonias, en solución salina estéril, provenientes de un cultivo en medio no selectivo de 24 hs a 37°C. La densidad de dicha suspensión, fue ajustada a la escala 0.5 de Mc Farland es decir, 1 a 2×10^8 UFC/mL para *E. coli* ATCC 25922.

Para la preparación del inóculo final de cada cepa analizada, se diluyó 1:100 la suspensión inicial obtenida, es decir en 9.9 mL de caldo LB se colocaron 100 μ L del inóculo inicial obteniendo 10^6 UFC/mL. Luego se colocaron 100 μ L de esta última en cada pocillo de la policubeta previamente cargada con antimicrobiano y caldo (100 μ L). De este modo, se obtuvo una dilución 1:2 logrando así un inóculo final de 5×10^5 UFC/mL.

La suspensión bacteriana finalmente obtenida, fue colocada con ayuda de una pipeta multicanal a razón de 100 μ L/pocillo de cada policubeta dentro de los 15 minutos posteriores a su preparación (173). Por cada cepa analizada, se necesitaron dos placas de microdilución de 96 pocillos, que a su vez fueron analizadas por duplicado.

II.2.5.5. Incubación de las placas

Luego de haber colocado el inóculo, se procedió a la incubación de las placas en estufa a 37°C por 20 hs, apiladas en grupos de a cuatro y cubiertas con tapa plástica para evitar su desecación (173).

II.2.5.6. Lectura y determinación de la CIM

La determinación de la CIM fue realizada a simple vista obteniendo como punto final al primer pocillo que presentó falta de turbidez. Cada pocillo con turbidez evidente fue comparado con la columna de control positivo, es decir aquella que contenía caldo e inóculo sin antimicrobiano ni inhibidor de bombas. De este modo, se consideró válido solo cuando se observó un botón de crecimiento >2 mm de diámetro o turbidez neta (173).

Basándonos en las recomendaciones de la CLSI 2009, en aquellos casos donde se encontró un pocillo salteado, se leyó la CIM más alta. Asimismo, también se tuvo en consideración que para bacterias Gram-negativas como *E. coli* las CIMs obtenidas por el método de microdilución generalmente tienden a ser iguales o bien una dilución inferior a las obtenidas por macrodilución.

La interpretación de los resultados de dicha lectura se basó en los datos establecidos en la tabla 2 del documento M31-A3 y en la 2A del M100-S19, para la discriminación de los microorganismos sensibles, intermedios y resistentes (Tabla II.4) (167, 173).

Tabla II.4. Valores de referencia utilizados para la interpretación de los resultados de los estudios de susceptibilidad frente a *Enterobacterias (E. coli)*

Antimicrobiano	Punto de corte para la CIM (µg/mL)		
	S	I	R
Ampicilina ^{a*}	≤8	16	≥32
Amoxicilina/Ác. clavulánico ^a	≤8/4	16/8	≥32/16
Ceftiofur ^a	≤2	4	≥8
Ciprofloxacina ^{b*}	≤1	2	≥4
Gentamicina ^{a**}	≤4	8	≥16
Florfenicol ^{a***}	≤4	8	≥16
Tetraciclina ^a	≤4	8	≥16
Trimetoprima/Sulfametoxazole ^a	≤2/38	—	≥4/76

S: sensible. I: intermedia. R: resistente.

^aValores de referencia tomados del documento CLSI M31-A3

^bValores de referencia tomados del documento CLSI M100-19

*Ampicilina en perros se considera sensible ≤0.25 µg/mL, intermedia 0.5 µg/mL y resistente a ≥1.0 µg/mL.

**Gentamicina en perros se considera sensible ≤2 µg/mL, intermedia 4 µg/mL y resistente a ≥8 µg/mL.

***Los valores de florfenicol se basaron en los establecidos para los microorganismos causantes de la enfermedad respiratoria bovina (BRD)

II.2.5.7. Interacciones entre los antimicrobianos y el NMP

Para la determinación de las interacciones entre los tres antimicrobianos seleccionados (florfenicol, ciprofloxacina y tetraciclina) se calculó el Índice de Concentración Inhibitoria Fraccionaria (CIF del inglés: *Concentration Index Fractionary*) a partir de la siguiente ecuación:

$$\frac{(A)}{(CIM)_a} + \frac{(B)}{(CIM)_b} = CIFA + CIBb = \text{Indice CIF} \quad \text{Ecuación II.2}$$

Donde (A) se corresponde con la concentración del antimicrobiano cuando se encuentra en combinación con NMP; (B) es la concentración de NMP presente en la mezcla con el antimicrobiano, (CIM) a: es la CIM del antimicrobiano solo frente al microorganismo problema y (CIM) b es la CIM de NMP solo.

Se considera sinergismo verdadero cuando los valores de CIF son ≤ 0.5; sinergismo parcial o adición para CIFs en el rango > 0.5 y < 1; indiferencia o adición si es ≥ 1 y < 2; y finalmente antagonismo cuando el valor es ≥ 2-4.

II.2.5.8. Control de calidad

Al igual que en el método de determinación de susceptibilidad por difusión, la cepa de referencia para el control de calidad fue *E. coli* ATCC 25922 (167).

Para la puesta a punto de la técnica de determinación de susceptibilidad por microdilución con inhibidor de bombas de eflujo, se utilizaron tres cepas además de la ATCC. Estas fueron la cepa isogénica con sobreexpresión de bombas de eflujo AG112, una cepa "normal" o wild type, AG100 y una con delección total de todas sus bombas, AG100A (72, 152, 174, 175). Todas ellas generosamente donadas por el Dr. Hiroshi Nikaido y la Dra. Laura McMurry. Fueron utilizadas con el objeto de validar la metodología evaluando el comportamiento del inhibidor de bombas de eflujo en combinación con los distintos antimicrobianos, cuando el único mecanismo de resistencia presente es la sobreexpresión de bombas, y comparar dichos resultados con la cepa que carece en forma completa de sistemas de eflujo.

Las características genóticas de cada cepa se mencionan en la tabla II.5 presentada a continuación.

Tabla II.5. Características genóticas de las cepas isogénicas y el fenotipo wild type

Nombre	Genotipo	Construcción	Ref.
AG100	argE3 thi-3 rpsL xyl mtl supE44		(175)
AG112	AG100 marR (5-bp delección cerca 5' final)	Mutante espontáneo de AG100	(152)
AG100A	AG100 Δ acrAB::Kan		(72)

Para el mantenimiento y la conservación de las cepas de referencia, se utilizaron crioviales cargados con caldo tripticasa soya conteniendo 15% de glicerol. Debido a la labilidad propia de las cepas isogénicas, el caldo utilizado fue LB. Luego fueron conservadas en freezer a -20°C. Para su uso rutinario, se mantuvieron a 4°C en agar tripticasa soya o agar LB, y se subcultivaron semanalmente (168).

Las cepas de referencia debieron ser utilizadas para controlar cada lote de tubos y evaluar los valores de CIM a fin de corroborar que se mantuvieran dentro de los rangos que figuran en la tabla II.7.

A continuación se presenta la tabla II.6, con los valores de referencia establecidos por la CLSI (167) para la cepa *E. coli* ATCC 25922 como rango de CIMs.

Tabla II.6. Valores de referencia utilizados para la interpretación de los resultados de los estudios de susceptibilidad en las cepa control *E. coli* ATCC 25922

ANTIMICROBIANO	RANGO DE CIMs ($\mu\text{g/mL}$) <i>E. coli</i> ATCC 25922
Ampicilina	2-8 ^a
Amoxicilina/Ác. clavulánico	2/1-8/4 ^a
Ceftiofur	0.25-1 ^a
Ciprofloxacina	0.004-0.015 ^b
Gentamicina	0.25-1 ^a
Florfenicol	2-8 ^a
Cloranfenicol	21-27 ^b
Tetraciclina	0.5-2 ^a
Trimetoprima/Sulfametoxazol	<0.5/9.5 ^a

^aValores de referencia tomados del documento CLSI M31-A3

^bValores de referencia tomados del documento CLSI M100-19

Tabla II.7. Valores de referencia utilizados para la interpretación de los resultados de los estudios de susceptibilidad en las cepas AG100, AG100A y AG112

ANTIMICROBIANO	RANGO DE CIMs ($\mu\text{g/mL}$)		
	AG112	AG100	AG100A
Ampicilina	5 ^a -12 ^d	2.5 ^a -4 ^d -2 ^e	0,6 ^a -0.75 ^d
Amoxicilina/Ác. clavulánico	NP	NP	NP
Ceftiofur	NP	NP	NP
Ciprofloxacina	0.06 ^b	$\leq 0.015^b$	$\leq 0.015^b$
Gentamicina	NP	NP	NP
Florfenicol	NP	NP	NP
Cloranfenicol	24 ^d	8 ^c -6 ^d -4 ^e	2 ^c -1.5 ^d
Tetraciclina	5 ^a -8 ^d	1.25 ^a -3 ^d -2 ^e	0.3 ^a
Trimetoprima/Sulfametoxazol	NP	NP	NP

^a(72), ^b(152), ^c(176), ^d(177), ^e(178). NP: Valores no publicados.

II.2.6. Concentración bactericida mínima (CBM)

La concentración bactericida mínima (CBM), también conocida como concentración letal mínima (CLM), se define como la mínima concentración de droga capaz de producir la muerte de la mayoría de los organismos viables (> 99.9%) después de 24 hs de incubación bajo condiciones estandarizadas (108). Esta determinación está sujeta a variables metodológicas por lo cual se utiliza como un complemento de los datos obtenidos por la CIM, pero con una relevancia clínica prácticamente imposible de apreciar, fundamentalmente para ciertos fármacos y en determinadas circunstancias.

II.2.6.1 Procedimiento para la determinación de la CBM por microdilución

Para la determinación de la CBM se utilizó el método de microdilución. Es decir, se emplearon policubetas estériles de 96 pocillos, fondo en "U", conteniendo un volumen final de 200 µL de caldo. Según menciona la CLSI en su documento M26-A *Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents* (108) una ventaja de la determinación por microdilución es que no se ha encontrado que la adherencia de los microorganismos a las paredes de los pocillos sea un problema, a diferencia de lo que se observa cuando se usan tubos de plástico en la macrodilución.

El procedimiento básico se realizó, según fue descrito para la CIM en el apartado II.2.5, por microdilución en caldo LB para las cepas de referencia y las MDR.

Partiendo de la policubeta donde fue determinada la CIM, tras 24 hs de incubación, y luego de la lectura del resultado de esta última, se tomaron muestras de los pocillos que no presentaban turbidez apreciable a simple vista ni un botón de precipitado en el fondo. Es decir, que fueron muestreadas las cubetas que contenían concentraciones mayores al valor establecido como CIM.

Se tomó el volumen total de cada pocillo y se sembró uniformemente en una placa con agar LB, luego se incubó 24hs a 37°C a fin de determinar el número de bacterias viables remanentes, método alternativo recomendado por la CLSI (108).

II.2.6.2 Lectura e interpretación de la CBM

El punto final letal es determinado por un subcultivo cuantitativo usando una pipeta calibrada. Cada pocillo que mostró inhibición de crecimiento a las 24 hs fue subcultivado en una placa de agar LB. Considerando que el inóculo final en la prueba de la CIM fue de 5×10^5 UFC/mL, y teniendo en cuenta que la CBM se define como la muerte del 99.9% de las bacterias presentes en el mismo, las

placas que presentaron 500 UFC/mL o menos, fueron las que representaron la concentración bactericida mínima del antimicrobiano evaluado.

II.2.7. Curva de muerte o letalidad bacteriana (CLB)

Se realizó la curva de letalidad o muerte bacteriana, gráfico resultante del estudio de la actividad letal que se expresa como el porcentaje de muerte alcanzado por una concentración fija de antimicrobiano bajo condiciones controladas. Dicho porcentaje se determina midiendo el número de células viables (UFC: unidades formadoras de colonias) a varios intervalos de tiempo. Este método es particularmente útil para medir la cinética de muerte de un agente antimicrobiano.

II.2.7.1. Procedimiento para la realización de la CLB

El método para la CLB se realizó empleando tres baterías de tubos por cada cepa analizada. En la primera, se determinó la curva de muerte frente al antimicrobiano solo. En la segunda, se combinó el antimicrobiano con 50 µg/mL del inhibidor de bombas de eflujo NMP y en la tercera con 100 µg/mL de NMP.

Cada una de estas baterías, estuvo conformada por cuatro tubos de vidrio conteniendo concentraciones del antimicrobiano correspondientes con las concentraciones de la CIM y 2, 4 y 8 veces la CIM. Un quinto tubo sin antimicrobiano fue usado como control de crecimiento bacteriano.

El inóculo bacteriano se enfrentó al antimicrobiano a diferentes concentraciones y a determinados intervalos de tiempo (0, 2, 4, 8, 24 y 48 hs). Se tomaron submuestras de cada uno de los tubos de las baterías y se realizaron diluciones seriadas que fueron sembradas en placas de Petri con agar LB.

Cada placa se incubó a 37°C durante 24 hs. Luego se realizó la lectura con el consiguiente conteo de las unidades formadoras de colonias a fin de observar el efecto del antimicrobiano sobre la cepa analizada. El límite de detección para esta prueba fue de 100 UFC/mL de muestra.

Preparación de las diluciones de los antimicrobianos

Se seleccionaron tres antimicrobianos a partir de los resultados obtenidos en la pruebas de la CIM: tetraciclina, ciprofloxacina y florfenicol.

El volumen final en los tubos de las baterías de diluciones fue de 10 mL de caldo conteniendo el antimicrobiano, el inóculo, y en las baterías que correspondía, el NMP.

Para agilizar la realización de las diluciones seriadas del antimicrobiano, cada tubo se cargó inicialmente con 4.5 mL de caldo solo, luego al primero de la batería se le añadió la solución stock de antimicrobiano 4 veces más concentrado, logrando un volumen total de 9 mL. Se mezcló adecuadamente y se transfirió la mitad del volumen al siguiente tubo, proceso que se repitió hasta el último de la serie. Al finalizar, cada uno de los tubos contenían 4.5 mL de caldo con el doble de la concentración final del antimicrobiano. Posteriormente, se les agregó el inóculo bacteriano (0.5 mL) y/o el caldo con NMP (0.5 mL) y se llevó a 10 mL de volumen final con caldo solo.

Cada batería quedó formada por cinco tubos, 4 de ellos conteniendo el antimicrobiano en concentraciones decrecientes y un tubo control de crecimiento: 8 x CIM (tubo 1), 4 x CIM (tubo 2), 2 x CIM (tubo 3), CIM (tubo 4), control (tubo 5).

Las concentraciones de los antimicrobianos fueron calculadas individualmente en base a los valores de las CIMs de los antimicrobianos frente a cada cepa analizada (dos cepas problema y dos de referencia por cada antimicrobiano).

Preparación del inhibidor de bombas

Para obtener la solución stock de trabajo de NMP, se comenzó con la preparación de una solución stock madre de 10 mg/mL siguiendo los pasos descritos en el apartado II.2.5.2 de la CIM para su disolución.

A partir de la misma, se realizó una dilución 1:10 en caldo LB y se añadió 0.5 mL (500 µg de NMP) a cada tubo (del 1 al 4) de la segunda batería previamente cargado con la dilución correspondiente del antimicrobiano. En consecuencia, se obtuvo una concentración final de 50 µg/mL de NMP en cada tubo.

Al mismo tiempo, se preparó una dilución de 1:5 de la misma solución madre de NMP en caldo LB, y se agregaron 0.5 mL (1000 µg) a cada tubo (1-4) de la tercera batería de diluciones a efectos de lograr una concentración final de NMP de 100 µg/mL (ver Figura II.11).

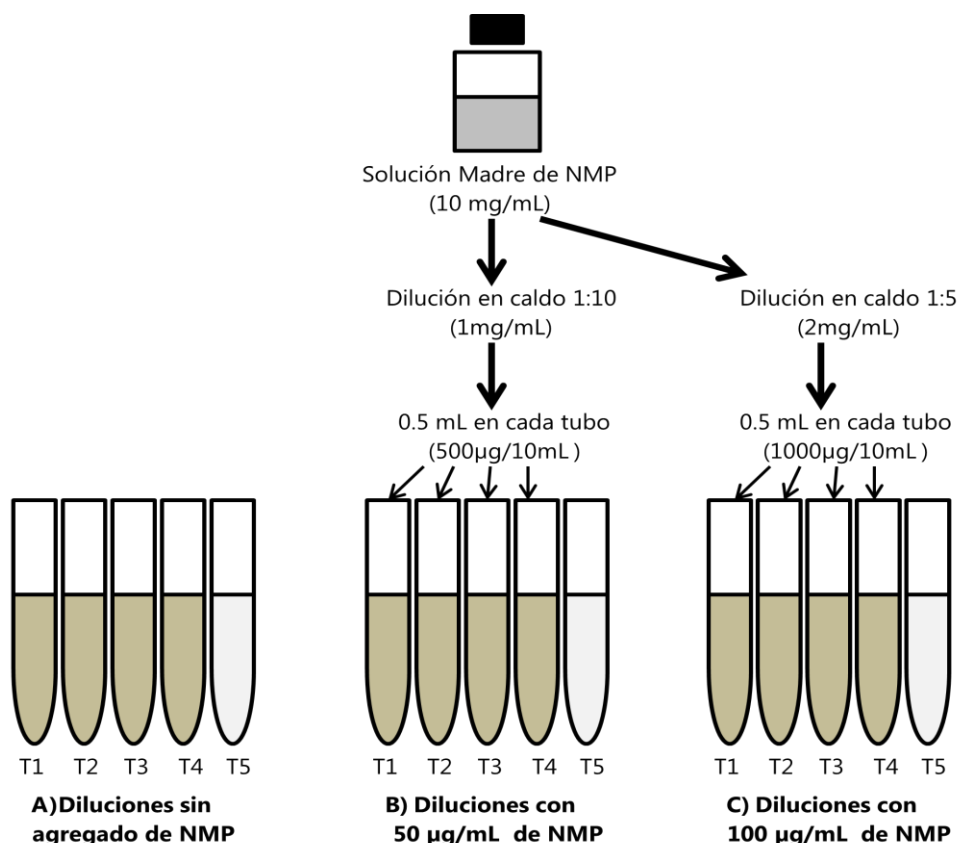


Figura II.11. Esquema de la preparación de las diluciones de NMP para las curvas de muerte bacteriana

II.2.7.2. Inóculo bacteriano

El inóculo bacteriano de las cepas problema y de las de referencia fue preparado de acuerdo al documento M26-A *Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents*(108), incorporando a cada tubo de las baterías una concentración constante de UFC/mL.

Partiendo de una placa de agar de 24 hs, se tomó con ansa un promedio estimado de 5-10 colonias que luego se inocularon en un tubo de vidrio conteniendo 0.5 mL de caldo LB estéril. Se llevó a estufa a 37°C durante 3 hs hasta presentar turbidez por crecimiento.

La densidad de dicha suspensión con crecimiento activo, se ajustó a la escala 0.5 de Mc Farland, es decir 1 a 2×10^8 UFC/mL para *E. coli* ATCC 25922. Posteriormente, se preparó una suspensión intermedia (8×10^6 UFC/mL) a partir de la cual se tomaron 0.5 mL para cada uno de los tubos de las baterías, se obtuvo así una dilución 1:10 logrando una suspensión bacteriana de 4×10^5 UFC/mL que fue el inóculo inicial (pre-incubación, es decir, de tiempo cero). El tubo 5 fue el único que contenía inóculo bacteriano sin antimicrobiano.

Los tubos fueron homogeneizados por agitación antes de cada siembra con el fin de re-suspender las bacterias que quedasen adheridas a las paredes del mismo.

II.2.7.3. Control de calidad

Para la puesta a punto y control de calidad de la prueba de curva de muerte bacteriana se utilizaron dos cepas como referencia, la cepa isogénica con sobreexpresión de bombas de eflujo AG112 y la cepa "normal" AG100.

II.2.7.4. Lectura e interpretación de la CLB

La lectura de los resultados de la CLB, se realizó mediante el recuento de colonias viables de submuestras obtenidas a partir de los tubos de cada batería, sembradas en placas de Petri con 10 mL de agar LB a diferentes tiempos (0, 2, 4, 8, 24, 48 hs). Para ello, Las submuestras se prepararon tomando 0.5 mL de cada tubo y se diluyeron en 4.5 mL de caldo LB, a partir de esta primera dilución se realizaron diluciones seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}) a fin de poder realizar el conteo de colonias en la placa. Este proceso se efectuó mediante la siembra de 100 μ L de cada una de las submuestras, en placas con medio sólido LB. Luego de incubar durante 24 hs a 37°C, las placas que mostraron entre 20 y 200 colonias fueron seleccionadas para realizar el conteo y calcular la concentración final de UFC/mL presentes en la muestra, corrigiendo en cada caso por el factor de dilución correspondiente.

El inóculo inicial fue controlado en cada ensayo a fin de verificar que la concentración de UFC/mL presentes, tanto para las cepas de referencia como para las cepas problema fuese la correcta.

La lectura de las placas se realizó contando las colonias (UFC) a ojo desnudo. Con los datos obtenidos se graficó el logaritmo de las UFC en función del tiempo. Se consideró efecto bactericida del antimicrobiano (utilizado solo) cuando se logró una disminución de 3 \log_{10} (99.9 % de muerte bacteriana) de UFC en el tiempo evaluado. Mientras que para evaluar el efecto sinérgico de la combinación antimicrobiano/NMP, nos basamos en la CLSI que estipula que el efecto bactericida en una combinación sinérgica se manifiesta como una disminución de 2 \log_{10} de UFC/mL.

Evaluación cuantitativa de la intensidad del efecto antibacteriano en las CLBs

La medición de la actividad antibacteriana y el análisis farmacodinámico se realizó estableciendo una medida global de la muerte bacteriana en el tiempo, a través del cálculo matemático del área bajo la curva de muerte bacteriana (ABC; \log UFC.h/mL) en relación al tiempo experimental (ABC_{24h} y/o

ABC_{48h}), de cada cepa analizada, a cada una de las concentraciones establecidas (CIM, 2 x CIM, 4 x CIM, 8 x CIM) para los antimicrobianos, y en combinación o no con 50 µg/mL y 100 µg/mL de NMP.

El ABC se calculó a través del método trapezoidal (10). Se utilizaron como controles las áreas bajo la curva de crecimiento de las 5 cepas de campo MDR analizadas y la cepa control AG112, en medio LB sin antimicrobiano, durante 24 y 48 hs (ABCC_{24h} y ABCC_{48h} Log UFC.h/mL, respectivamente).

Se determinaron las diferencias obtenidas entre ABCCs y ABCs con los tres antimicrobianos a todas las concentraciones mencionadas, con y sin NMP, para establecer el área comprendida entre la curva de crecimiento control y la de muerte bacteriana de cada cepa analizada (ABBC_{24h} y ABBC_{48h}; Log UFC.h/mL) (179, 180).

Posteriormente, se llevó a cabo la división entre las ABBCs obtenidas y las CIMs correspondientes, a fin de poder comparar el efecto del inhibidor de bombas en combinación con los antimicrobianos a través de un análisis estadístico.

La nomenclatura utilizada se presenta a continuación:

t₀; tiempo de inicio del ensayo (0 horas)

t₂₄; tiempo de la finalización del ensayo (24 horas)

t₄₈; tiempo de la finalización del ensayo (48 horas)

ABC_{24h}; área bajo la curva de muerte bacteriana con antimicrobiano desde t₀ a t₂₄

ABC_{48h}; área bajo la curva de muerte bacteriana con antimicrobiano desde t₀ a t₄₈

ABCC_{24h}; área bajo la curva control de crecimiento bacteriano, sin antimicrobiano desde t₀ a t₂₄

ABCC_{48h}; área bajo la curva control de crecimiento bacteriano, sin antimicrobiano desde t₀ a t₄₈

ABBC_{24h}; área comprendida entre la curva de crecimiento control y la de muerte bacteriana de cada cepa analizada desde t₀ a t₂₄

ABBC_{48h}; área comprendida entre la curva de crecimiento control y la de muerte bacteriana de cada cepa analizada desde t₀ a t₄₈

Análisis estadístico

Para la realización del análisis estadístico de los resultados se utilizó el programa Instat versión 3.033 (Statistical Services Centre, University of Reading UK, 2006). Los valores de las variables

farmacodinámicas halladas, se sometieron a un estudio descriptivo y se expresaron como media aritmética, corregida por una medida de dispersión (desviación estándar-DE-). Sobre la base de estos resultados crudos o transformados se aplicó el análisis paramétrico de la Varianza (ANOVA) y contraste de rango múltiple. De no ser posible se aplicó el análisis no paramétrico de Kruskal Wallis. El límite de significancia fue establecido en un valor $\alpha \leq 0.05$.

Evaluación de la eficacia antimicrobiana

Para cada concentración de antimicrobiano (CIM, 2 x CIM, 4 x CIM y 8 x CIM), se calculó el porcentaje de eficacia de dicho antimicrobiano solo, o combinado con 50 µg/mL y con 100 µg/mL de NMP. Luego, los tres valores de eficacia obtenidos se compararon estadísticamente.

Los parámetros de eficacia para florfenicol, tetracilina y ciprofloxacina fueron calculados como se expresa a continuación:

$$\% \text{ Eficacia total del antibiótico (ETA)} = ((\text{ABCC} - \text{ABC}) / \text{ABCC}) \times 100 \quad \text{Ecuación II.3}$$

II.2.8. Modelización PK/PD

A partir de la información farmacodinámica obtenida se realizó una modelización PK/PD. Para lo cual se utilizaron datos farmacocinéticos de florfenicol, danofloxacina y oxitetraciclina. Estas dos últimas en representación de las fluoroquinolonas y las tetraciclinas, respectivamente. Estos datos fueron generados por el grupo de investigación de la Cátedra de Farmacología en estudios previos (181, 182, 183).

II.2.8.1. Análisis farmacocinético

II.2.8.1.1. Florfenicol

Para el estudio experimental de florfenicol (FLF) se utilizaron 6 terneros Holando Argentino sanos, de 150-175 kg de peso. El protocolo siguió los lineamientos de la Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching (Federation of Animal Science Societies, FASS).

El preparado utilizado fue Nuflor® de Shering-Plough, solución inyectable 300 mg/mL, a razón de 20 mg/kg por la vía intramuscular en la zona de la tabla del cuello.

Se obtuvieron muestras de sangre en jeringas heparinizadas, previamente a la administración y, posteriormente a los siguientes tiempos: 2, 4, 8, 12, 24, 48 y 72 horas.

El ensayo fue realizado por cromatografía líquida de alta resolución con detección ultravioleta siguiendo un método analítico validado en nuestro laboratorio (SOP: FLF-PL-VMA-01/03) (183).

A 1 mL de plasma (problema o fortificado) se le agregó 1 mL de buffer fosfato 0.10 M, se mezcló homogéneamente y posteriormente se realizó una doble extracción líquido-líquido con acetato de etilo. En cada proceso se fue obteniendo la fase superior (orgánica), la que fue evaporada con N₂ y a 45°C. El residuo seco obtenido se resuspendió con fase móvil para su inyección en el equipo cromatográfico (100 µL), cuyas condiciones cromatográficas fueron:

Columna Phenomenex Luna C18 5µm (150 x 4.6 mm)

Guarda columna: C₁₈ Phenomenex

Fase móvil: Acetato de amonio 0.05 M: Acetonitrilo

Flujo: 1 mL/min

Temperatura columna: ambiente

Detección: ultravioleta (224 nm)

Tiempo de corrida: 15 min

Las concentraciones de FLF en plasma fueron determinadas por interpolación de áreas en la curva de calibración estándar obtenida de fortificar plasma blanco con concentraciones conocidas de analito.

II.2.8.1.2. Oxitetracilina

Se utilizaron 12 bovinos jóvenes de 6 a 12 meses de edad de la raza Aberdeen Angus, de 150-280 kg de peso. El protocolo siguió los lineamientos de la Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching (Federation of Animal Science Societies, FASS).

El producto experimental usado fue Terramicina LA® de Pfizer, solución inyectable 20%, a razón de 20 mg/kg por la vía intramuscular a nivel de los glúteos. Se obtuvieron muestras de sangre a los siguientes tiempos: 0 (previo a la administración del antimicrobiano), 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 24, 36, 48, 60, 72, 96 y 120 hs post administración. El ensayo fue realizado por cromatografía líquida de alta resolución con detección ultravioleta siguiendo un método analítico validado en nuestro laboratorio (SOP: OTC-PL-VMA-12/05) (182).

A 0.1 mL de plasma se le agregó 0.2 mL de acetonitrilo para precipitar proteínas, se mezcló con vortex durante 5 minutos y luego se centrifugó 10 minutos a 3500 rpm. El sobrenadante obtenido, fue evaporado a seco a 45°C bajo corriente de nitrógeno. El residuo fue reconstituido con 100% de fase

móvil y luego una alícuota de 50µL fue inyectada directamente en el sistema HPLC, cuyas condiciones cromatográficas fueron:

Columna Phenomenex Luna C₁₈ 5µm (150 x 4.6 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA)

Guarda columna: C₁₈ Phenomenex

Fase móvil: buffer fosfato 0.05 M (pH 4.5) : acetonitrilo (85:15, v/v)

Flujo: 1.5 mL/min

Temperatura columna: ambiente

Detección: ultravioleta (254 nm)

Tiempo de corrida: 10 min

Las concentraciones de OTC en plasma fueron determinadas por interpolación de áreas en la curva de calibración estándar obtenida de fortificar plasma blanco con concentraciones conocidas de analito.

II.2.8.1.3. Danofloxacin

Se seleccionaron 21 bovinos de leche raza Holstein, sanas, con un peso entre 500 y 650 kg; y una producción de leche entre 10 y 25 L. El protocolo siguió los lineamientos de la Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching (Federation of Animal Science Societies, FASS).

Se utilizó danofloxacin mesilato al 18%, Advocin® 180, Pfizer Inc. USA, a razón de 6 mg/kg por la vía subcutánea. Luego de la administración del antimicrobiano, se obtuvieron muestras de sangre heparinizada a los siguientes tiempos horarios: 0 (previo a la administración del antimicrobiano), 1, 2, 4, 8, 12, 24 y 48 hs post administración.

La determinación de danofloxacin (DAN) en plasma bovino, tras su extracción en fase sólida automatizada, utilizando cartuchos SPE C₁₈, fue realizada por cromatografía líquida de alta presión con detección por fluorescencia.

La separación cromatográfica se llevó a cabo utilizando las siguientes condiciones:

Columna Phenomenex Luna C₁₈ 5µm (150 x 4.6 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA)

Guarda columna: C₁₈ Phenomenex

Fase móvil: buffer fosfato de Na 0.05M (pH 3.5) : de acetonitrilo (87.5:12.5 v/v)

Flujo: 1.5 mL/min

Temperatura columna: ambiente

Detección: de fluorescencia tuvo 280 nm de excitación y 440 nm de emisión

Tiempo de corrida: 10 min

Las concentraciones de DAN en plasma fueron determinadas por interpolación de áreas en la curva de calibración estándar obtenida de fortificar plasma blanco con concentraciones conocidas de analito.

II.2.8.2. Validación del método analítico

El método analítico para la cuantificación plasmática de los antimicrobianos descritos, fue validado evaluando los siguientes parámetros: linealidad, precisión, exactitud y especificidad.

Adecuabilidad del sistema

Se preparó una solución estándar de cada antimicrobiano y se determinó la precisión del sistema cromatográfico mediante la colocación de veinte (20) inyecciones. De esta manera se evaluó la eficiencia de la columna y del sistema, a través del conocimiento del coeficiente de variación existente.

Linealidad

Para cada método se preparó por duplicado una batería de 6 diluciones stock del metabolito en un rango de concentraciones preestablecido. Las cuales fueron inyectadas en el HPLC a los efectos de obtener curvas de calibración en las que se pudo evaluar: coeficiente de variación, coeficiente de correlación, medias y desviación estándar de cada concentración.

Límite de detección (LOD)

Se denomina LOD a la menor cantidad de analito que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada. Este fue estimado a través del análisis de 20 alícuotas de plasma control, libre de antimicrobiano. Fue medido el ruido de la línea de base; y fueron calculados los promedios y desvíos estándares (DS), correspondiéndose el LOD con 3 DS (señal/ruido $\geq 3/1$).

Exactitud y precisión intradía

Para testear la exactitud y precisión intradía de los ensayos realizados, se prepararon por sextuplicado 3 sets de plasmás fortificados, compuestos por la concentración correspondiente al límite de cuantificación además de otras concentraciones conocidas del analito; todos ellos fueron analizados en el HPLC. Sus concentraciones fueron obtenidas a partir de la curva de calibración stock.

La exactitud se define como el porcentaje de recuperación de la concentración actual (% RE), es decir, la cercanía existente entre las medidas de los valores experimentales y las concentraciones reales. Resulta aceptable cuando dicho valor se encuentra en el rango de 85-115 %) (184).

En cuanto a la precisión (expresada como el coeficiente de variación, % CV) debe estar por debajo del 20 % para las 4 concentraciones. Esta fue determinada a fin de estimar la variación cromatográfica existente entre corrida y corrida del método utilizado (184).

Exactitud y precisión inter-ensayo

Se prepararon muestras de control de calidad (QC) de los analitos en plasma, se ensayaron por sextuplicado en tres ocasiones separadas. Fueron estimadas la exactitud y la consecuente precisión inter-ensayo, considerando aceptable los valores mencionados en la evaluación de la exactitud y la precisión intradía.

Especificidad

Se inyectaron 6 muestras diferentes de plasma blanco y 6 muestras de plasma cargado con el estándar correspondiente, y se compararon las áreas cromatográficas al tiempo de retención (TR) de cada molécula a ensayar.

Límite de cuantificación (LOQ)

El LOQ es definido como el nivel donde la reproducibilidad de las muestras replicadas no excede un coeficiente de variación de 20%, y cuya exactitud es de un 85-115% luego del análisis de 12 réplicas de muestras fortificadas con la menor concentración (184).

La eficiencia de extracción fue determinada por comparación entre las áreas cromatográficas obtenidas con los plasmás fortificados con diferentes concentraciones y aquellas obtenidas de inyecciones directas de soluciones estándares en cantidades equivalentes.

Los datos de validación pueden encontrarse en la tabla VI.51 del Anexo E

II.2.8.3. Procedimientos comunes a los tres ensayos farmacocinéticos

En los tres ensayos los animales experimentales fueron sometidos a un análisis clínico previo, a efectos de confirmar la normalidad de su estado. Se tomaron muestras de sangre en jeringas heparinizadas, previamente a la administración y, posteriormente a diferentes tiempos preestablecidos para cada molécula. El plasma fue separado por centrifugación y almacenado a – 20°C hasta su posterior análisis cromatográfico.

Cálculo de concentraciones

Las concentraciones de los antimicrobianos fueron calculadas utilizando la ecuación lineal $y=mx+b$, donde y fue el área de pico cromatográfico del analito, y x fue la concentración del analito. Los valores de la pendiente m y de la intersección b fueron obtenidos a partir de la razón entre la ponderación de la regresión de mínimos cuadrados de las concentraciones pretendidas de la curva de soluciones estándar versus las correspondientes áreas cromatográficas.

$$\text{Concentración } (\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{área pico } y - b}{m} \quad \text{Ecuación II.4}$$

Fueron calculadas las constantes m y b y el coeficiente de regresión r , medida de linealidad. La concentración del analito en las muestras desconocidas fue obtenida mediante la sustitución del área pico observada en la ecuación 1.

Las concentraciones para cada uno de los antimicrobianos utilizados para establecer los parámetros predictores de eficacia se presentan en las tablas VI.52-54 del Anexo E.

Análisis farmacocinético e integración PK/PD

El análisis farmacocinético fue realizado con WinNonlin Professional versión 5.3 (Pharsight Corp. 2009). Para el cálculo del área bajo la curva concentración plasmática en función del tiempo (ABC) se utilizó la regla trapezoidal lineal (185).

Entre los parámetros de relevancia clínica para cada antimicrobiano en cuestión se encuentran: $C_{\text{máx}}$, ABC_{0-24} , $T_{\text{máx}}$, TMR ; los cuales son necesarios para llevar a cabo la integración PK/PD y establecer los parámetros predictores de eficacia.

Máxima concentración observada ($C_{\text{máx}}$)

Tiempo a la concentración máxima ($T_{\text{máx}}$)

Área bajo la curva concentración en función del tiempo desde el momento 0 hasta las 24 h (ABC_{0-24h}).

Tiempo medio de residencia (TMR), o promedio del tiempo que permanece una partícula en el sistema.

$$\text{TMR} = \frac{\text{ABMC}}{\text{ABC}}$$

Ecuación II.4

Donde ABMC es el área bajo el momento de la curva.

A partir de los parámetros PK mencionados y de las CIMs₉₀ determinadas frente a las cepas de referencia (AG112-AG100-AG100A) y las de campo MDR, se realizó la integración PK/PD y se establecieron las relaciones PK/PD correspondientes de acuerdo al tipo de antimicrobiano utilizado.

II.2.9. Realización de un análisis de riesgo de transferencia de resistencias entre animales-medio ambiente y el hombre

Se elaboró un esquema donde se presentan las recomendaciones necesarias para lograr el control de la transmisión de la resistencia bacteriana entre animales y hombre, esperando minimizarlo. Mediante el análisis de riesgos se intenta evaluar y distinguir con claridad si la transferencia horizontal de resistencia resulta un verdadero peligro para la salud humana y animal, o es un hecho controlable desde el punto de vista de su relación con la Salud Pública y la Producción.

III. RESULTADOS

III. RESULTADOS

III.1. Selección de explotaciones agropecuarias

Se eligieron tambos como explotaciones modelo de este estudio por ser producciones bovinas con fuerte presión antimicrobiana y con mayor riesgo de selección de cepas multirresistentes.

Las cuatro explotaciones tamberas pertenecían a diferentes sectores de la provincia de Buenos Aires citos en las localidades de Tandil, San Vicente, Luján y Trenque Lauquen respectivamente.

A partir de las encuestas realizadas se determinó que los antimicrobianos más utilizados, en los últimos doce meses para las cuatro explotaciones tamberas, según las patologías de estación de los animales de producción, tratamientos de los animales de compañía y del personal fueron: ampicilina, tetraciclina, ciprofloxacina, gentamicina, amoxicilina asociada con ácido clavulánico, ceftiofur, florfenicol, trimetoprima y sulfametoxazol.

III.2. Muestras obtenidas para aislamiento de cepas de *E. coli* multirresistentes

La cantidad de muestras totales obtenidas en los 4 establecimientos fueron:

- 711 muestras de materia fecal de vacas en ordeño y toros,
- 38 muestras de materia fecal de terneros de guachera,
- 14 muestras de materia fecal de animales de compañía,
- 15 muestras de pozos sépticos y bombas estercoleras, y
- 9 muestras de agua

Sumando un total de 787 muestras analizadas, en las cuales se obtuvieron 765 aislamientos pertenecientes a la especie *Escherichia coli*.

Las muestras fueron divididas en subgrupos según el lugar geográfico y la especie animal de donde fueron obtenidas (Tabla III.1).

Tabla III.1: Resultado del total de muestras y aislamientos obtenidos luego de la biotipificación *in vitro*, pertenecientes a la especie *Escherichia coli*

Localidad	Origen de la Muestra	N muestra	N aislamiento
Tandil	Vaca en ordeño	186	182
	Toro	1	1
	Ternero	15	15
	Animal de compañía	5	5
	Pozo séptico	3	3
	Bomba estercolera	1	1
	Agua	2	0
	Total	213	207
San Vicente	Vaca en ordeño	63	62
	Toro	0	0
	Ternero	4	4
	Animal de compañía	3	3
	Pozo séptico	1	1
	Bomba estercolera	1	1
	Agua	2	0
	Total	74	71
Lujan	Vaca en ordeño	218	213
	Toro	0	0
	Ternero	8	8
	Animal de compañía	4	3
	Pozo séptico	2	2
	Bomba estercolera	1	1
	Agua	2	0
	Total	235	227
Trenque Lauquen	Vaca en ordeño	243	243
	Toro	0	0
	Ternero	11	11
	Animal de compañía	2	2
	Pozo séptico	3	3
	Bomba estercolera	3	1
	Agua	3	0
	Total	265	260

III.3. Estudio de susceptibilidad por antibiograma

Se determinaron los perfiles de sensibilidad por difusión en agar – método de Kirby-Bauer - (antibiograma) de las 765 cepas pertenecientes a la especie *E. coli*, aisladas de las muestras de los tambos de Tandil, Luján, San Vicente y Trenque Lauquen.

Los agentes antimicrobianos fueron seleccionados a partir de los datos obtenidos en las encuestas realizadas. Es decir, ampicilina, tetraciclina, ciprofloxacina, gentamicina, amoxicilina

con ácido clavulánico, ceftiofur, florfenicol, trimetoprima y sulfametoxazol, antimicrobianos previamente mencionados, por resultar ser los más utilizados en cada una de las unidades experimentales (tanto en el hombre como en los animales) y de acuerdo a las recomendaciones CLSI 2008 (M31-A3 Vol. 28 No. 8) (167).

En la tabla III.2 se observan los resultados del estudio cualitativo de susceptibilidad en placa expresados en porcentajes de las cepas sensibles, intermedias y resistentes (Figura III.1) de las cepas de *E. coli* de campo.

En los tambos analizados de la provincia de Buenos Aires, la resistencia promedio a tetraciclina resultó ser un 49% de la resistencia total, seguida por un 19% de resistencia bacteriana frente a ampicilina. También existió un porcentaje menor de resistencia a trimetoprima-sulfametoxazol (7%), ciprofloxacina (3.6%), florfenicol (3.6%) y amoxicilina-ácido clavulánico (0.1 %). No se halló resistencia frente a ceftiofur y gentamicina (Tabla III.3 y Figura III.2).

En cuanto a la resistencia frente a más de un antimicrobiano, los resultados fueron: 11% frente a dos antimicrobianos al mismo tiempo y 16.7% frente a tres o más agentes antibacterianos, es decir multirresistencia (Tabla III.3 y Figura III.2).

Los aislamientos resistentes pertenecen no solamente a vacas en ordeño sino también a terneros, animales domésticos (perros), bomba estercolera y cámara séptica. Sin embargo, no se obtuvo ningún aislamiento resistente de las muestras obtenidas a partir del agua de las casas o de los galpones.

Tabla III.2. Resultados del estudio cualitativo de susceptibilidad en placas, expresados en porcentajes, de las cepas sensibles, intermedias y resistentes obtenidos a partir de los aislamientos de campo de *E. coli*

ATM	Tandil (n=207)			Luján (n=227)			San Vicente (n=71)			T. Lauquen (n=260)		
	S (%)	I (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)
CIP	100	0	0	100	0	0	98.6	0	1.4	98.5	0	1.5
FLR	99.5	0.5	0	99.6	0	0.4	98.6	0	1.4	98.5	0.4	1.2
TMS	100	0	0	98.7	0	1.3	97.2	0	2.8	97.7	0	2.3
CEF	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
AMP	98.6	0	1.4	96.5	0.4	3.1	94.4	1.4	4.2	93.8	0	6.2
AMC	99	0.5	0.5	99.1	0.9	0	100	0	0	99.2	0.8	0
TET	96.6	0	3.4	82.4	0	17.6	85.9	0	14.1	93.1	0.4	6.5
GEN	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0

CIP: ciprofloxacina. *FLR*: florfenicol. *TMS*: trimetoprima-sulfametoxazol. *CEF*: ceftiofur. *AMP*: ampicilina. *AMC*: amoxicilina con ácido clavulánico. *TET*: tetraciclina. *GEN*: gentamicina. *R 2 ATM*: resistente a dos antimicrobianos al mismo tiempo. *R 3 ATM*: resistente a 3 antimicrobianos al mismo tiempo. *S*: sensible. *I*: intermedio. *R*: resistente

Tabla III.3. Resultados del estudio cualitativo de resistencia en placas, expresados en porcentajes, a partir de los aislamientos de campo de *E. coli*, provincia de Bs. As.

ATM	Número (%) de aislamientos de cepas de <i>E. coli</i> resistentes					
	Tandil (n=207)	Luján (n=227)	S.Vicente (n=71)	T. Lauquen (n=260)	Promedio (%) ± DS	Total (%)
CIP	0 (0)	0 (0)	1.4 (1)	1.5 (4)	0.7 ± 0.9	3.5
FLR	0 (0)	0.4 (1)	1.4 (1)	1.2 (3)	0.7 ± 0.6	3.6
TMS	0 (0)	1.3 (3)	2.8 (2)	2.3 (6)	1.4 ± 1.2	7.7
CEF	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 ± 0	0.0
AMP	1.4 (3)	3.1 (7)	4.2 (3)	6.2(16)	3.8 ± 2	17.8
AMC	0.5 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.1 ± 0.2	0.6
TET	3.4 (7)	17.6 (40)	14.1 (10)	6.5 (17)	9.7 ± 6.6	49.5
GEN	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 ± 0	0.0
R 2 ATM	1 (2)	1.8 (4)	2.8 (2)	3.1 (8)	2.1 ± 1	10.3
R +3 ATM	0 (0)	0.9 (2)	2.8 (2)	2.3 (6)	1.3 ± 1.3	7.1

CIP: ciprofloxacina. FLR: florfenicol. TMS: trimetoprima-sulfametoxazol. CEF: ceftiofur. AMP: ampicilina. AMC: amoxicilina con ácido clavulánico. TET: tetraciclina. GEN: gentamicina. R 2 ATM: resistente a dos antimicrobianos al mismo tiempo. R 3 ATM: resistente a 3 antimicrobianos al mismo tiempo.

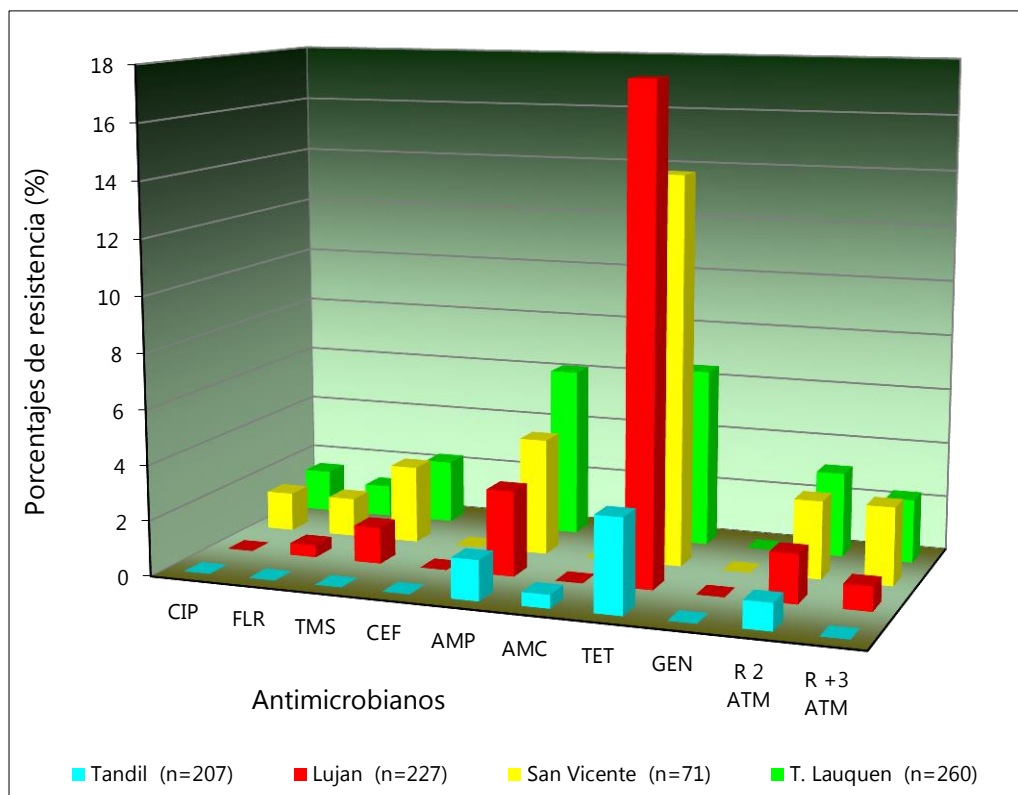


Figura III.1. Gráfico representativo de los porcentajes de cepas resistentes aisladas en los 4 tambos analizados de la provincia de Bs. As.

CIP: ciprofloxacina. FLR: florfenicol. TMS: trimetoprima-sulfametoxazol. CEF: ceftiofur. AMP: ampicilina. AMC: amoxicilina con ácido clavulánico. TET: tetraciclina. GEN: gentamicina. R 2 ATM: resistente a dos antimicrobianos al mismo tiempo. R 3 ATM: resistente a 3 antimicrobianos al mismo tiempo.

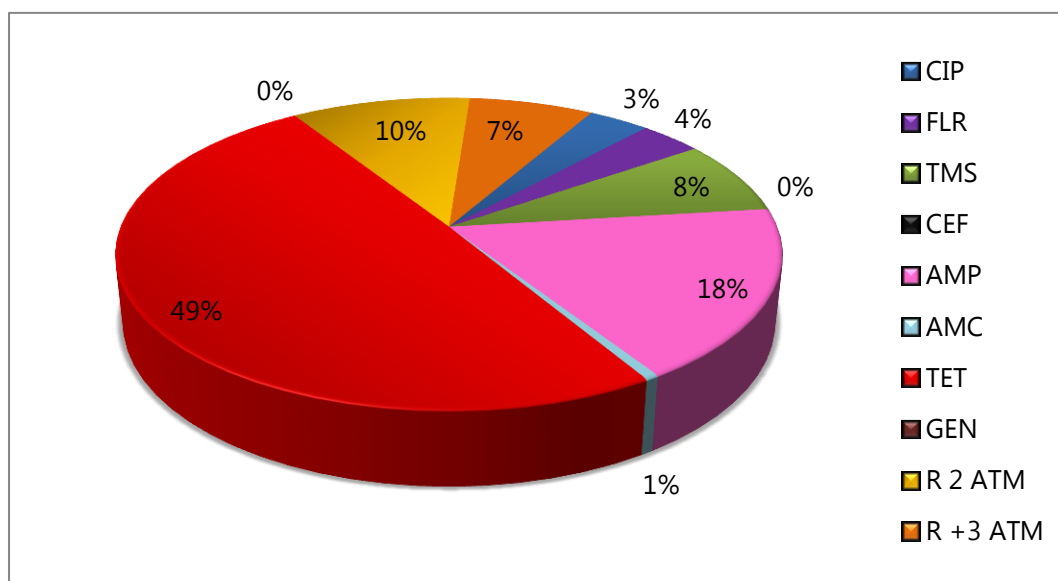


Figura III.2. Resistencia promedio en los tambos de la provincia de Bs.As., en cepas comensales de *E. coli* expresado en porcentaje.

CIP: ciprofloxacina. FLR: florfenicol. TMS: trimetoprima/sulfametoxazol. CEF: ceftiofur. AMP: ampicilina. AMC: amoxicilina con ácido clavulánico. TET: tetraciclina. GEN: gentamicina. R 2 ATM: resistente a dos antimicrobianos al mismo tiempo. R 3 ATM: resistente a 3 antimicrobianos al mismo tiempo.

III.3.1. Selección de cepas de *Escherichia coli* multirresistentes

A partir de la prueba de susceptibilidad bacteriana se obtuvieron 10 cepas que mostraron un fenotipo de resistencia múltiple, es decir, resistencia frente a tres o más antimicrobianos de diferentes grupos químicos: *E. coli* multirresistentes (*MDR*).

Las cepas multirresistentes pertenecían a vacas en ordeño, terneros y animales de compañía (perros). No se hallaron cepas multirresistentes en las muestras de los pozos sépticos en ninguna de las explotaciones analizadas.

Tres de los cuatro tambos analizados fueron origen de dichos aislamientos. No aislamos cepas de *E. coli* MDR representativas del sector geográfico Tandil pues los aislamientos resistentes allí obtenidos, presentaron un fenotipo de solo uno o dos antimicrobianos.

Los fenotipos se presentan a continuación en las tablas III.4-III.5 y los antibiogramas pueden observarse en las figuras III.3-III.6.

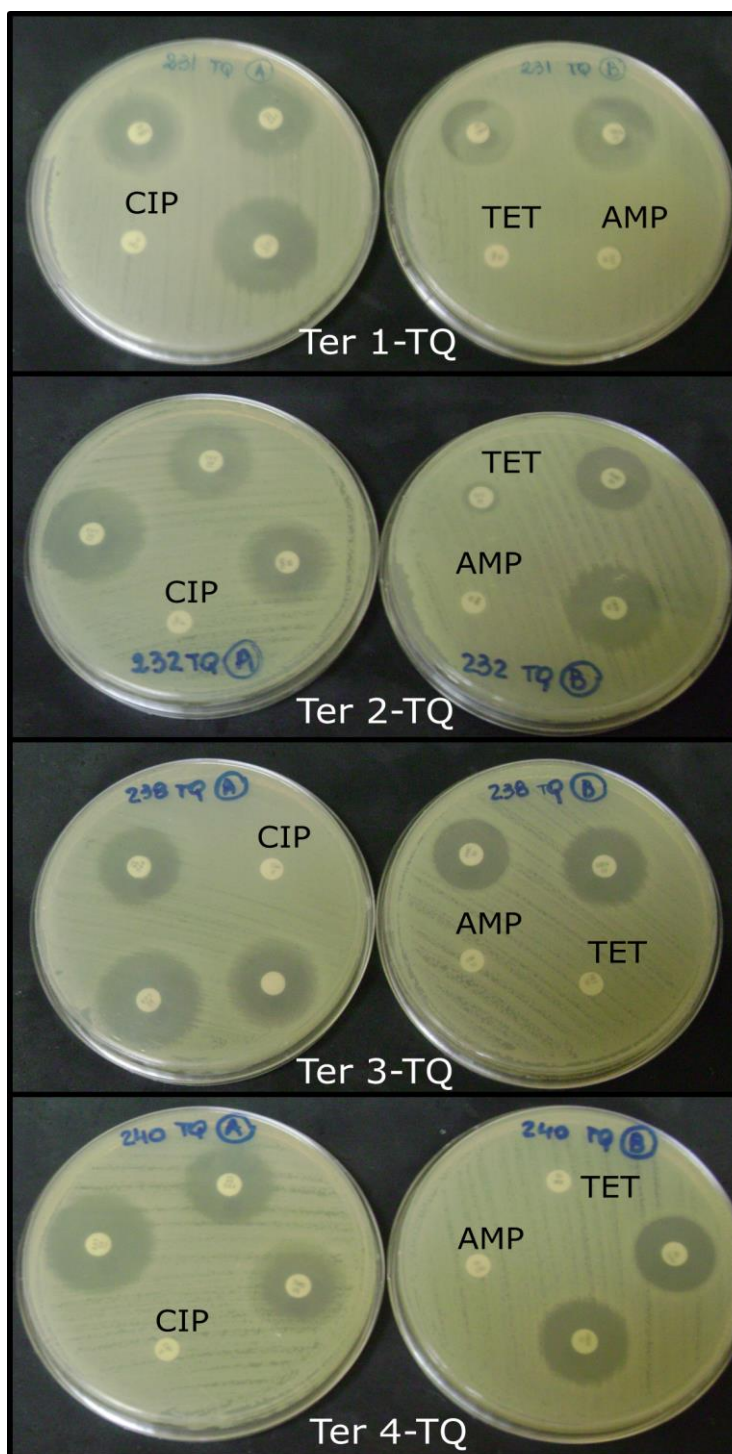


Figura III.3. Antibiogramas de 4 cepas de *E. coli* multirresistentes de terneros de guachera de la localidad de Trenque Lauquen

Ter-TQ: muestra de ternero 1, 2, 3 y 4 - Trenque Lauquen. *AMP:* ampicilina. *CIP:* ciprofloxacina. *TET:* tetraciclina. *TMS:* trimetoprima-sulfametoxazol.

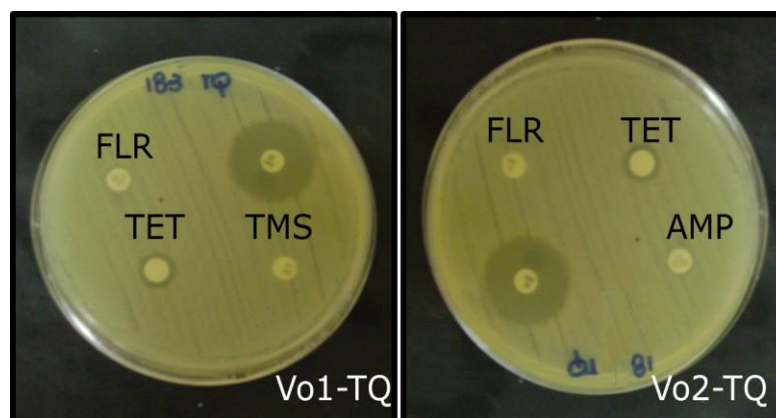


Figura III.4. Antibiogramas de 2 cepas de *E. coli* multirresistentes obtenidas de materia fecal de vacas en ordeño en la localidad de Trenque Lauquen

Vo-TQ: muestra de vaca en ordeño 1 y 2 - Trenque Lauquen. *FLR*: florfenicol. *TET*: tetraciclina. *TMS*: trimetoprima-sulfametoxazol.

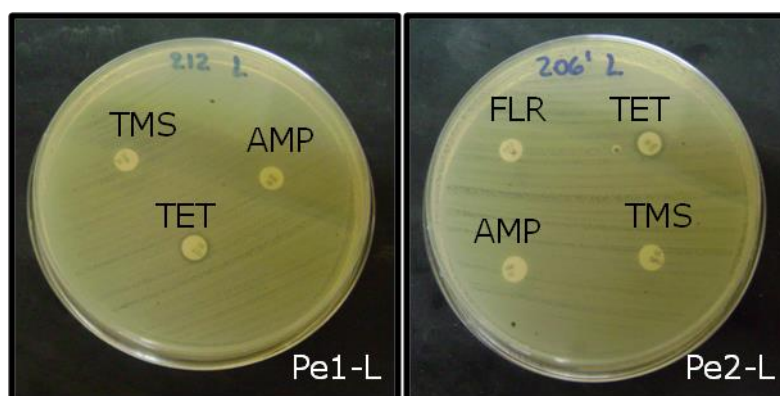


Figura III.5. Antibiogramas de 2 cepas de *E. coli* multirresistentes obtenidas de materia fecal de dos perros en la localidad de Luján

L-Pe: muestra de perro 1 y perro 2- Luján. *AMP*: ampicilina. *FLR*: florfenicol. *TET*: tetraciclina. *TMS*: trimetoprima-sulfametoxazol.

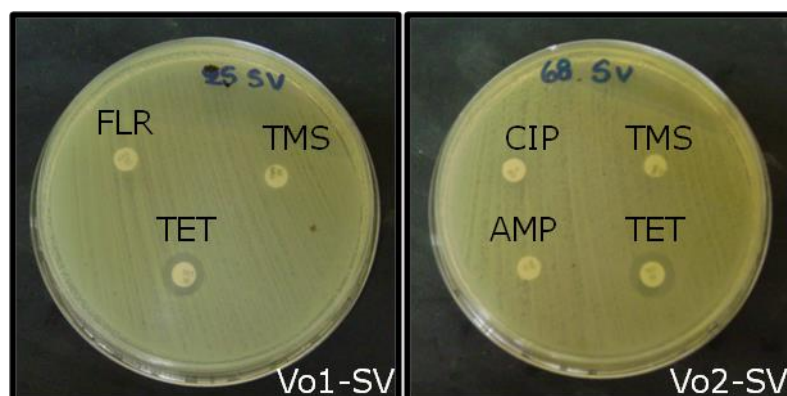


Figura III.6. Antibiógramas de 2 cepas de *E. coli* multirresistentes obtenidas de materia fecal de dos vacas en ordeño en la localidad de San Vicente.

Vo-SV: muestra de vaca en ordeño - San Vicente. *AMP*: ampicilina. *CIP*: ciprofloxacina. *FLR*: florfenicol. *TET*: tetraciclina. *TMS*: trimetoprima-sulfametoxazol.

Tabla III.4. Perfiles de resistencia de las cepas de campo *E. coli* en la provincia de Bs. As.

Perfiles de resistencia	No. de aislamientos	% de aislamientos	No. de ATM resistentes
TET	49	59	1
AMP	7	8.4	1
FLR	1	1.2	1
TET-AMP	13	15.7	2
AMP-AMC	1	1.2	2
TET-TMS	2	2.4	2
TET-TMS-FLR	2	2.4	3
TET-AMP-TMS	1	1.2	3
TET-AMP-FLR	1	1.2	3
TET-AMP-TMS-CIP	4	4.8	4
TET-AMP-TMS-FLR	1	1.2	4
TET-AMP-TMS-CIP – (FLR)*	1	1.2	5

CIP: ciprofloxacina. *FLR*: florfenicol. *TMS*: trimetoprima-sulfametoxazol. *AMP*: ampicilina. *AMC*: amoxicilina con ácido clavulánico. *TET*: tetraciclina. *ATM*: antimicrobianos. *(FLR)**: florfenicol sensible por antibiograma, pero resistente por CIM.

Tabla III.5. Perfiles de resistencia de las cepas de campo *E. coli* clasificadas como multirresistentes de cada uno de los tambos analizados

Localidad	Origen	Muestra	Perfiles de resistencia
San Vicente	vaca en ordeño	Vo1-SV	FLR-TMS-TET
	vaca en ordeño	Vo2-SV	(FLR)-CIP-TMS-AMP-TET
Luján	perro	Pe1-L	TMS-AMP-TET
	perro	Pe2-L	FLR-TMS-AMP-TET
Trenque Lauquen	vaca en ordeño	Vo1-TQ	FLR-AMP- TET
	vaca en ordeño	Vo2-TQ	FLR-TMS-TET
	ternero	Ter1-TQ	CIP-TMS-AMP-TET
	ternero	Ter2-TQ	CIP-TMS-AMP-TET
	ternero	Ter3-TQ	CIP-TMS-AMP-TET
	ternero	Ter4-TQ	CIP-TMS-AMP-TET

CIP: ciprofloxacina. FLR: florfenicol. TMS: trimetoprima-sulfametoxazol. AMP: ampicilina. TET: tetraciclina. (FLR): florfenicol sensible por antibiograma, pero resistente por CIM.

III.4. Prueba cuantitativa para evaluar la disminución de la susceptibilidad bacteriana

Para la interpretación de la CIM de los antimicrobianos evaluados en combinación con el inhibidor de bombas, se consideró un resultado positivo y significativo cuando se obtuvo una disminución de cuatro o más veces la CIM inicial (39, 40).

III.4.1. Efectos de la combinación de los antimicrobianos con el inhibidor de bombas NMP en las cepas mutagénicas

III.4.1.1. Tetraciclina y ciprofloxacina

Los resultados de las CIMs para tetraciclina y ciprofloxacina frente a la cepa mutagénica de *E. coli* con sobreexpresión de bombas de eflujo *acrAB*, AG112, arrojaron valores de 8 µg/mL y 0.0625 µg/mL respectivamente, es decir, que si nos basamos en la CLSI la cepa posee un fenotipo susceptible frente a ambos antimicrobianos (45).

De todos modos, al evaluar la combinación de estos antimicrobianos con NMP se observó una notable sinergia, permitiendo que los valores de las CIMs descendieran notablemente. Estas se redujeron 4 veces o más cuando se combinaron con el inhibidor a concentraciones de 50 µg/mL y 100 µg/mL (Tabla III.6 y Figura III.7).

Frente a la cepa de *E. coli* isogénica con delección total de bombas de eflujo *acrAB* (AG100A), no se observó ningún tipo de actividad sinérgica entre ninguno de los antimicrobianos ensayados y el inhibidor. En ningún caso la CIM de los antimicrobianos se vio modificada frente a ésta cepa.

Cuando NMP fue evaluado solo, sin el agregado de antimicrobianos, la CIM del inhibidor fue ≥ 400 $\mu\text{g/mL}$ en las tres cepas de *E. coli* genéticamente modificadas.

Teniendo en cuenta los puntos de cohorte establecidos por la CLSI para los antimicrobianos evaluados en este estudio, la concentración mínima efectiva de NMP para la cepa AG112, fue 50 $\mu\text{g/mL}$ para florfenicol y tetraciclina, y de 100 $\mu\text{g/mL}$ para ciprofloxacina.

Para tetraciclina, la concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ de NMP disminuyó 4 veces su CIM frente a AG112 y la incorporación de 100 $\mu\text{g/mL}$ de NMP la redujo 16 veces. Frente a AG100, la CIM de tetraciclina fue reducida 2 veces en presencia de NMP tanto con 50 $\mu\text{g/mL}$ como con 100 $\mu\text{g/mL}$ (Tabla III.6 (A) y Figura III.7 (A)).

Cuando NMP se combinó a concentraciones de 50 $\mu\text{g/mL}$ y 100 $\mu\text{g/mL}$ con ciprofloxacina frente a la cepa AG112, se obtuvo una disminución de la CIM de ciprofloxacina de 2 y 4 veces, respectivamente. La CIM de ciprofloxacina asociada a NMP frente a la cepa AG100 se modificó de manera similar que en el caso de tetraciclina (Tabla III.6 (B) y Figura III.7 (B)).

En el caso particular de florfenicol, se logró reducir la CIM 16 veces frente a AG112, al combinarse con 50 $\mu\text{g/mL}$ de NMP y 32 veces con 100 $\mu\text{g/mL}$ del mismo. Frente a AG100 (cepa "wild type"), la CIM de florfenicol se redujo 4 y 8 veces cuando se combinó con 50 $\mu\text{g/mL}$ y 100 $\mu\text{g/mL}$ de NMP respectivamente (Tabla III.6 (C) y Figura III.7 (C)).

Al observar las curvas se ve claramente que se produce el bloqueo total de las bombas de eflujo en AG112 con 100 $\mu\text{g/mL}$ de NMP, la CIM desciende hasta la misma concentración necesaria para inhibir el crecimiento de la cepa isogénica AG100A con delección total del sistema de eflujo.

Tabla III.6. Concentración inhibitoria mínima de: (A) tetraciclina, (B) ciprofloxacina y (C) florfenicol; con y sin NMP frente a las cepas de referencia

A	CIM ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de tetraciclina				
	NMP ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	<i>E.coli</i> ATCC 25922	AG100	AG100A	AG112
0		2	1	0.5	8
6.25		2	1	0.5	8
12.5		1	1	0.5	8
25		1	0.5	0.5	4
50		0.5	0.5	0.5	2
100		0.5	0.5	0.5	0.5

B	CIM ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de ciprofloxacina				
	NMP ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	<i>E.coli</i> ATCC 25922	AG100	AG100A	AG112
0		0.015	0.015	0.015	0.062
6.25		0.015	0.015	0.015	0.062
12.5		0.015	0.015	0.015	0.062
25		0.015	0.007	0.015	0.031
50		0.007	0.007	0.015	0.031
100		0.007	0.007	0.015	0.015

C	CIM ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de florfenicol				
	NMP ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	<i>E.coli</i> ATCC 25922	AG100	AG100A	AG112
0		8	8	1	32
6.25		8	8	1	32
12.5		4	4	1	16
25		4	4	1	16
50		2	2	1	8
100		1	1	1	1

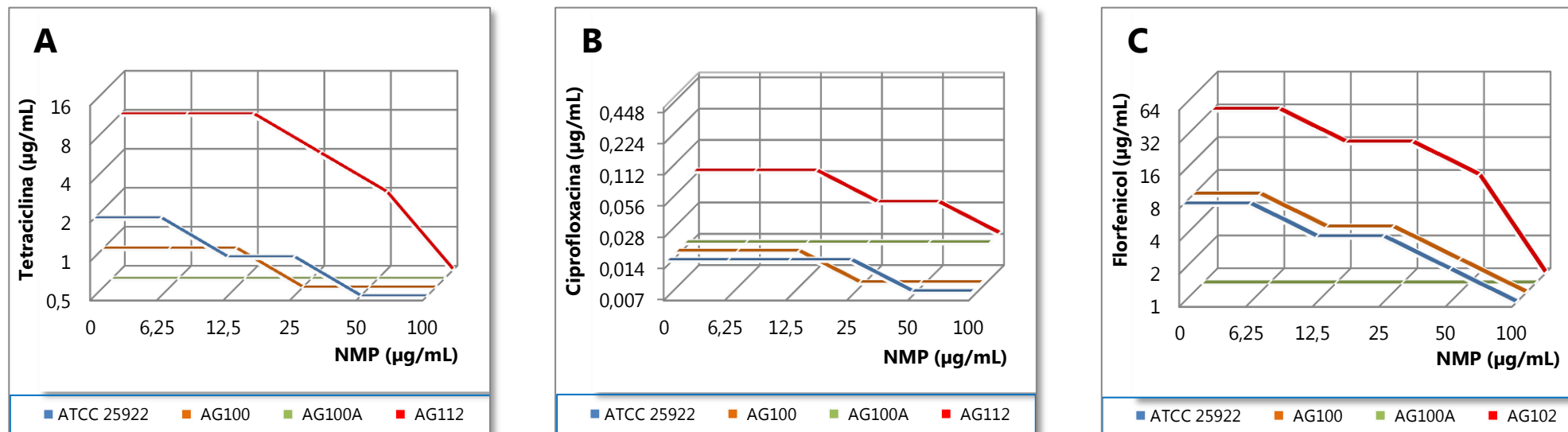


Figura III.7. Concentración inhibitoria mínima de: (A) tetraciclina, (B) ciprofloxacina y (C) florfenicol; con y sin NMP frente a las cepas de referencia

III.4.1.2. Ampicilina, ceftiofur, amoxicilina-ácido clavulánico, gentamicina y trimetoprima-sulfametoxazol

En cuanto a las CIMs para ampicilina (4 µg/mL), ceftiofur (1 µg/mL), amoxicilina-ácido clavulánico (8 µg/mL -6.4:1.6 µg/mL-), gentamicina (8 µg/mL) y trimetoprima-sulfametoxazol (<0.125/2.37 µg/mL) frente a la cepa isogénica AG112 los resultados, según la CLSI (2009), se corresponden con fenotipos susceptibles (45, 45). No obstante ello, se realizó la prueba de susceptibilidad en combinación con las 5 concentraciones de NMP con el fin de observar si ocurría alguna modificación en los valores iniciales de los antimicrobianos, producto de un posible efecto sinérgico.

Sin embargo, el resultado obtenido fue que las CIMs de los antimicrobianos evaluados no se modificaron con la incorporación del NMP, independientemente de la concentración del mismo. Es decir, no cambió en absoluto el perfil de susceptibilidad al inhibir el eflujo de las bombas bacterianas y tratar con ampicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, gentamicina o trimetoprima-sulfametoxazol.

El mismo fenómeno se observó frente a las cepas AG100, AG100A y *E. coli* ATCC 25922 como puede observarse en las tabla III.7 (A-E), III.8 y la figura III.8 (A-E).

Tabla III.7. Concentración inhibitoria mínima de: (A) ceftiofur-CEF-, (B) ampicilina-AMP-, (C) amoxicilina/ácido clavulánico-AMC-, (D) gentamicina –GEN- y (E) trimetoprima-sulfametoxazol -TMS-; con y sin NMP frente a las cepas isogénicas control

A		CIM (µg/mL) de CEF		
NMP (µg/mL)	AG100	AG100A	AG112	
0	0.5	0.01562	1	
6.25	0.5	0.01562	1	
12.5	0.5	0.01562	1	
25	0.5	0.01562	1	
50	0.5	0.01562	1	
100	0.5	0.01562	1	

B		CIM (µg/mL) de AMP		
NMP (µg/mL)	AG100	AG100A	AG112	
0	2	1	4	
6.25	2	1	4	
12.5	2	1	4	
25	2	1	4	
50	2	1	4	
100	2	1	4	

C		CIM (µg/mL) de AMC		
NMP (µg/mL)	AG100	AG100A	AG112	
0	4 (2/1)	4 (2/1)	8 (4/2)	
6.25	4 (2/1)	4 (2/1)	8 (4/2)	
12.5	4 (2/1)	4 (2/1)	8 (4/2)	
25	4 (2/1)	4 (2/1)	8 (4/2)	
50	4 (2/1)	4 (2/1)	8 (4/2)	
100	4 (2/1)	4 (2/1)	8 (4/2)	

D		CIM (µg/mL) de GEN		
NMP (µg/mL)	AG100	AG100A	AG112	
0	4	8	8	
6.25	4	8	8	
12.5	4	8	8	
25	4	8	8	
50	4	8	8	
100	4	8	8	

E		CIM (µg/mL) de TMS		
NMP (µg/mL)	AG100	AG100A	AG112	
0	2.5(0.125/2.37)	2.5(0.125/2.37)	2.5(0.125/2.37)	
6.25	2.5(0.125/2.37)	2.5(0.125/2.37)	2.5(0.125/2.37)	
12.5	2.5(0.125/2.37)	2.5(0.125/2.37)	2.5(0.125/2.37)	
25	2.5(0.125/2.37)	2.5(0.125/2.37)	2.5(0.125/2.37)	
50	2.5(0.125/2.37)	2.5(0.125/2.37)	2.5(0.125/2.37)	
100	2.5(0.125/2.37)	2.5(0.125/2.37)	2.5(0.125/2.37)	

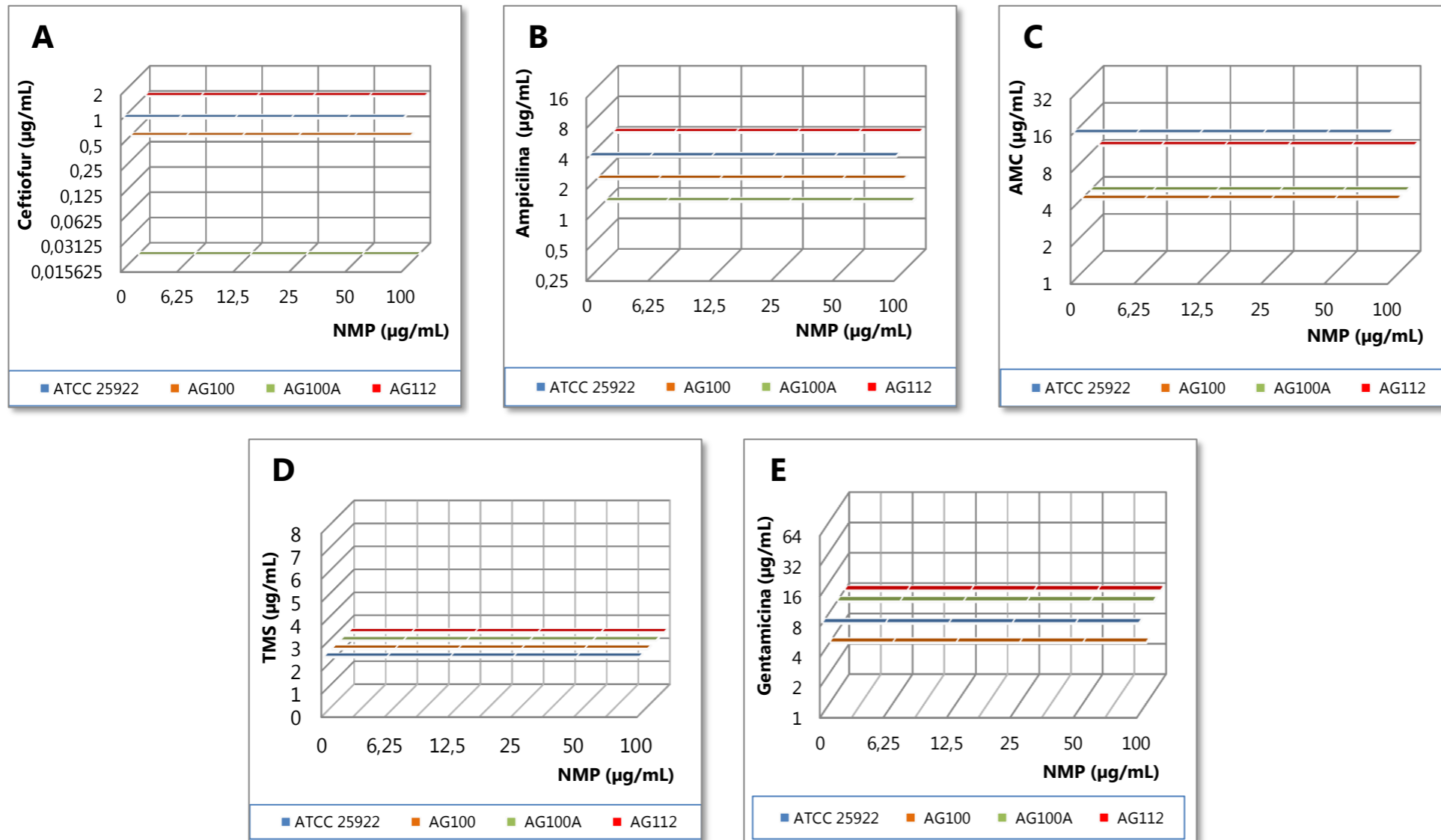


Figura III.8. CIM de: (A) ceftiofur, (B) ampicilina y (C) amoxicilina/ácido clavulánico, (D) trimetoprima/sulfometoxazol y (E) gentamicina; con y sin NMP frente a las cepas de referencia

Tabla III.8. Efecto del NMP en la CIMs de los antimicrobianos en cepas isogénicas control AG100, AG100A y AG112

Cepa	Genotipo	Expresión de bombas <i>acrAB</i>	ATM	CIM (µg/ml) frente a concentraciones de NMP(µg/ml)						NMP CIM (µg/ml)	Veces que decreció la CIM	
				0	6,25	12,5	25	50	100		con 50 µg/ml NMP	con 100 µg/ml NMP
AG100	<i>wild type</i>	normal	FLR	8	8	4	4	2	1	400	4	8
			CIP	0.015	0.015	0.015	0.007	0.007	0.007	400	2	2
			TET	1	1	1	0,5	0,5	0,5	400	2	2
			CEF	1	1	1	1	1	1	400	1	1
			AMP	2	2	2	2	2	2	400	1	1
			AMC	4	4	4	4	4	4	400	1	1
			GEN	4	4	4	4	4	4	400	1	1
			TMS	<0.125/2.37	<0.125/2.37	<0.125/2.37	<0.125/2.37	<0.125/2.37	<0.125/2.37	400	1	1
AG100A	<i>AG100ΔacrAB</i>	Delección	FLR	1	1	1	1	1	1	400	1	1
			CIP	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	400	1	1
			TET	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	400	1	1
			CEF	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	400	1	1
			AMP	1	1	1	1	1	1	400	1	1
			AMC	4	4	4	4	4	4	400	1	1
			GEN	8	8	8	8	8	8	400	1	1
			TMS	<0.125/2.37	<0.125/2.37	<0.125/2.37	<0.125/2.37	<0.125/2.37	<0.125/2.37	400	1	1
AG112	<i>AG100 marR</i>	Sobreexpresión	FLR	32	32	16	16	2	1	400	16	32
			CIP	0.062	0.062	0.062	0.031	0.031	0.015	400	2	4
			TET	8	8	8	4	2	0.5	400	4	16
			CEF	1	1	1	1	1	1	400	1	1
			AMP	4	4	4	4	4	4	400	1	1
			AMC	8	8	8	8	8	8	400	1	1
			GEN	8	8	8	8	8	8	400	1	1
			TMS	<0.125/2.37	<0.125/2.37	<0.125/2.37	<0.125/2.37	<0.125/2.37	<0.125/2.37	400	1	1

FLR: florfenicol. CIP: ciprofloxacina. TET: tetraciclina. CEF: ceftiofur. AMP: ampicilina. AMC: amoxicilin-ácido clavulánico. GEN: gentamicina. TMS: trimetoprima-sulfametoxazol. ATM: antimicrobiano. CIM: concentración inhibitoria mínima. NMP: 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine. Emax, relación entre la CIM sin NMP y la CIM en presencia del inhibidor.

Tabla III.9. Comparación de las razones de las CIMs de los antimicrobianos, estimadas al dividir los valores de CIMs obtenidos en las cepas AG112 y AG100A; y en presencia o en ausencia de NMP

Antibiótico	Veces en que decreció la CIM (CIM ratio)				
	Con o sin sobreexpresión de <i>acrAB-TolC</i>	Con y sin NMP (50 µg/mL) para		Con y sin NMP (100 µg/mL) para	
		AG112	AG100A	AG112	AG100A
	$CIM_{AG112}:CIM_{AG100A}$	$CIM_{ATB}:CIM_{ATB+NMP}$	$CIM_{ATB}:CIM_{ATB+NMP}$	$CIM_{ATB}:CIM_{ATB+NMP}$	$CIM_{ATB}:CIM_{ATB+NMP}$
FLR	32	16	1	32	1
CIP	4	2	1	4	1
TET	16	4	1	16	1
CEF	66	1	1	1	1
AMP	4	1	1	1	1
AMC	2	1	1	1	1
GEN	1	1	1	1	1
TMS	1	1	1	1	1

FLR: florfenicol. CIP: ciprofloxacina. TET: tetraciclina. CEF: ceftiofur. AMP: ampicilina. AMC: amoxicilina-ácido clavulánico. GEN: gentamicina. TMS: trimetoprima-sulfametoxazol. NMP: 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine

III.4.2. Efectos de la combinación de los antimicrobianos con el inhibidor de bombas NMP en las cepas de campo de *E. coli* MDR

Para un mejor análisis de los resultados, se subclasificaron los 10 aislamientos de *E. coli* MDR basándonos en los perfiles de resistencia de cada uno de ellos, de manera que las cepas se subdividieron en: 8 cepas MDR- ampicilina resistentes (MDR-RA), 5 cepas MDR-florfenicol resistentes (MDR-RF), 5 cepas MDR-ciprofloxacina resistentes (MDR-RC), 10 cepas MDR-tetraciclina resistentes (MDR-RT) y 8 cepas MDR-trimetoprima/sulfametoxazol resistentes (MDR-RTMS).

Igualmente las cepas MDR sensibles a ampicilina (MDR-SA), florfenicol (MDR-SF), ciprofloxacina (MDR-SC), tetraciclina (MDR-ST) y trimetoprima-sulfametoxazol (MDR-STMS) fueron analizadas enfrentando al antimicrobiano correspondiente con el NMP.

III.4.2.1. Ampicilina

No se observaron modificaciones en la CIM de ampicilina en combinación con NMP frente a las cepas de *E. coli* MDR-RA. La incorporación de concentraciones crecientes de NMP no modificó en ningún caso el perfil de resistencia de las cepas (tabla III.10 y figura III.9)

En el caso de las dos cepas restantes que en su espectro no manifestaron resistencia a ampicilina, es decir que fueron MDR-SA, los resultados fueron en una de ellas similar a lo ocurrido con las resistentes, es decir sin cambios en la CIM con y sin el NMP. Mientras que para la otra la CIM descendió de 8 µg/mL a 4 µg/mL cuando el antimicrobiano se combinó con 25, 50 y 100 µg/mL de NMP (Tabla III.11 y Figura III.10).

La CIM₅₀ y la CIM₉₀ de las cepas MDR-RA y MDR-SA, se pueden observar en la tabla III.12 y la figura III.11.

En la figura V.12 pueden observarse los porcentajes de cepas *E. coli* multirresistentes (MDRs) inhibidos por ampicilina combinada con diferentes concentraciones de NMP durante la determinación de la CIM. Los datos de la figura mencionada se encuentran en la tabla VI.3 del Anexo E.

Tabla III.10. Concentración inhibitoria mínima de ampicilina ($\mu\text{g/mL}$) con y sin NMP frente a las cepas *E. coli*MDR-RA

NMP ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ($\mu\text{g/mL}$) de ampicilina							
	Pe1-L	Pe2-L	Vo2-SV	Vo2-TQ	Ter1-TQ	Ter2-TQ	Ter3-TQ	Ter4-TQ
0	256	256	256	256	256	256	256	256
6.25	256	256	256	256	256	256	256	256
12.5	256	256	256	256	256	256	256	256
25	256	256	256	256	256	256	256	256
50	256	256	256	256	256	256	256	256
100	256	256	256	256	256	256	256	256

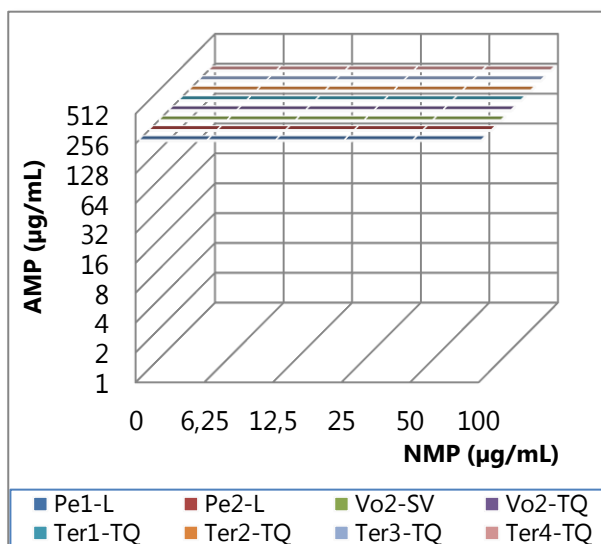


Figura III.9. Concentración inhibitoria mínima de ampicilina (AMP) con y sin NMP frente a las cepas de *E. coli* MDR-RA

Tabla III.11. Concentración inhibitoria mínima de ampicilina ($\mu\text{g/mL}$) con y sin NMP frente a las cepas *E. coli* MDR-SA

NMP ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ($\mu\text{g/mL}$) de ampicilina	
	Vo1-SV	Vo1-TQ
0	8	4
6.25	8	4
12.5	8	4
25	4	4
50	4	4
100	4	4

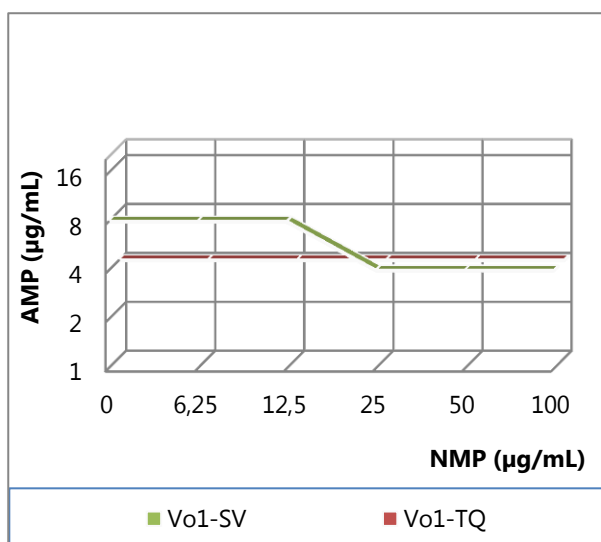


Figura III. 10. Concentración inhibitoria mínima de ampicilina (AMP) con y sin NMP frente a las cepas *E. coli* MDR-SA

Tabla III.12. CIM₉₀ y CIM₅₀ de ampicilina frente a *E. coli* MDR-RA (n=8) y a *E. coli* MDR-SA (n=2) con y sin NMP

NMP (µg/mL)	<i>E. coli</i> MDR-RA		<i>E. coli</i> MDR-SA	
	CIM ₅₀	CIM ₉₀	CIM ₅₀	CIM ₉₀
0	256	256	4	8
6.25	256	256	4	8
12.5	256	256	4	8
25	256	256	4	4
50	256	256	4	4
100	256	256	4	4

CIM₉₀: concentración inhibitoria mínima para el 90% de las cepas analizadas. CIM₅₀: concentración inhibitoria mínima para el 50% de las cepas analizadas. *E. coli* MDR-RA: cepa MDR con fenotipo resistente a ampicilina. *E. coli* MDR-SA: cepa MDR con fenotipo susceptible a ampicilina. NMP: 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine

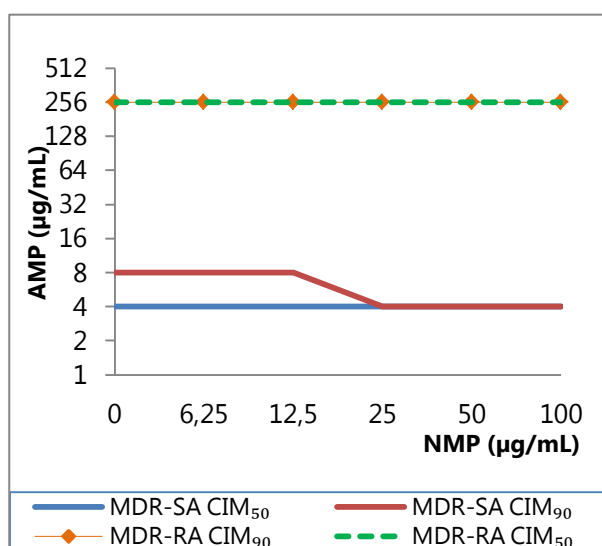


Figura III. 11. CIM₉₀ y CIM₅₀ de ampicilina (AMP) frente a *E. coli* MDR-RA (n=8) y a *E. coli* MDR-SA (n=2) con y sin NMP

AMP: ampicilina. CIM₉₀: concentración inhibitoria mínima para el 90% de las cepas analizadas. CIM₅₀: concentración inhibitoria mínima para el 50% de las cepas analizadas. *E. coli* MDR-RA: cepa MDR con fenotipo resistente a ampicilina. *E. coli* MDR-SA: cepa MDR con fenotipo susceptible a ampicilina. NMP: 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine

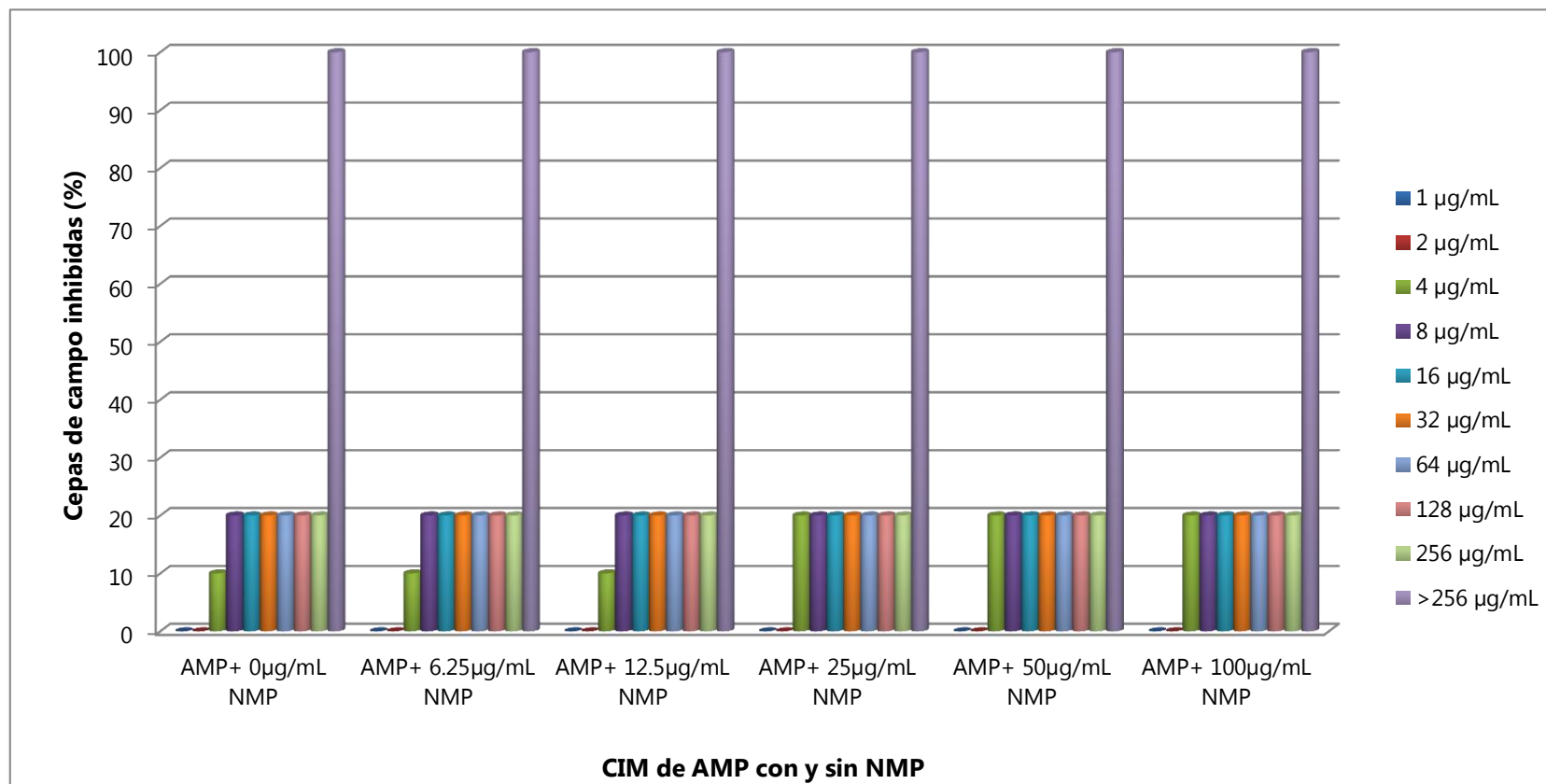


Figura III.12. Porcentaje de *E. coli* multirresistentes (MDRs) inhibidas por ampicilina (AMP) combinada con diferentes concentraciones de NMP durante la determinación de la CIM

III.4.2.2. Florfenicol

En la mayoría de las cepas de *E.coli MDR-RF* (n=3), la CIM de florfenicol disminuyó 4 veces al combinarse con las dos concentraciones mayores de NMP. Una cepa de *E.coli MDR-RF* en particular, manifestó una modificación en su perfil de susceptibilidad con una reducción de la CIM de florfenicol de 8 y 16 veces con 50 µg/mL y 100 µg/mL de NMP, respectivamente (Tabla III.13 y Figura III.13).

En 4 de las 5 cepas *E.coli MDR-SF* se obtuvo una disminución de 4 veces la CIM de florfenicol con 50 µg/mL de NMP y 2 veces en la restante. Mientras que con 100 µg/mL de NMP la CIM, en las 5 cepas, se redujo 8 veces (Tabla III.14 y Figura III.14).

La CIM₅₀ de las cepas *E. coli MDR-RF* fue de 256 µg/mL de florfenicol y con la incorporación de 50 µg/mL y 100 µg/mL de NMP, descendió a 64 µg/mL. En cuanto a la CIM₉₀ de florfenicol, descendió de un valor de 256 µg/mL hasta 128 µg/mL con la incorporación de 50 µg/mL y 100 µg/mL de NMP (Tablas III.15 y Figura III.15).

En las cepas *E. coli MDR-SF* también la CIM₅₀ y la CIM₉₀ de florfenicol se modificaron con la incorporación de las dos concentraciones más elevadas de NMP tal como se puede ver en la tabla III.15 y figura III.15.

En la figura III.16 pueden observarse los porcentajes de cepas *E. coli* multirresistentes (MDRs) inhibidos por florfenicol combinado con diferentes concentraciones de NMP durante la determinación de la CIM. Los datos de la figura mencionada se encuentran en la tabla VI.5 del Anexo E.

Tabla III. 13. Concentración inhibitoria mínima de florfenicol ($\mu\text{g/mL}$) con y sin NMP frente a las cepas *E. coli* MDR-RF

NMP ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ($\mu\text{g/mL}$) de florfenicol				
	Pe2-L	Vo1-SV	Vo2-SV	Vo1-TQ	Vo2-TQ
0	256	256	16	256	256
6.25	256	256	16	128	256
12.5	256	128	16	128	128
25	256	128	8	128	128
50	128	64	2	64	64
100	128	64	1	64	64

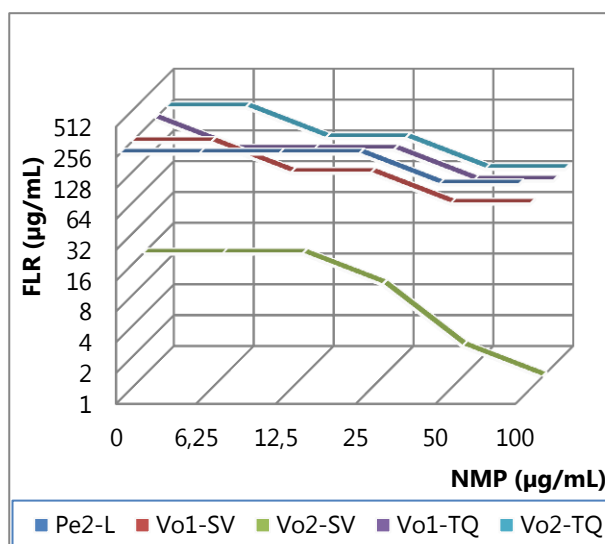


Figura III.13. Concentración inhibitoria mínima de florfenicol (FLR) con y sin NMP frente a las cepas *E. coli* MDR-RF

Tabla III.14. Concentración inhibitoria mínima de florfenicol ($\mu\text{g}/\text{mL}$) con y sin NMP frente a las cepas *E. coli* MDR-SF

NMP ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	CIM ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de florfenicol				
	Ter1-TQ	Ter2-TQ	Ter3-TQ	Ter4-TQ	Pe1-L
0	8	8	8	8	8
6.25	8	8	8	8	8
12.5	8	8	8	8	4
25	4	4	4	8	4
50	2	2	2	4	2
100	1	1	1	1	2

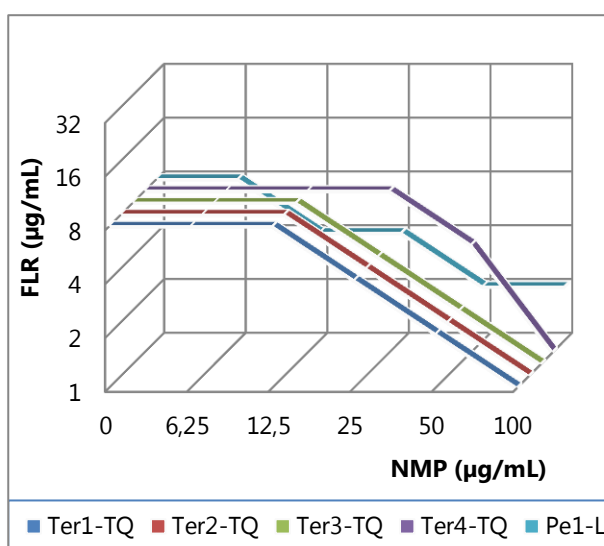


Figura III.14. Concentración inhibitoria mínima de florfenicol (FLR) con y sin NMP frente a las cepas *E. coli* MDR-SF

Tabla III.15. CIM₅₀ y CIM₉₀ de florfenicol frente a las cepas *E. coli* MDR subclasificadas según fenotipo resistente y susceptible a florfenicol con y sin el agregado de NMP

NMP ($\mu\text{g/mL}$)	<i>E. coli</i> MRD-RF		<i>E. coli</i> MDR-SF	
	CIM ₅₀	CIM ₉₀	CIM ₅₀	CIM ₉₀
0	256	256	8	8
6.25	256	256	8	8
12.5	128	256	8	8
25	128	256	4	8
50	64	128	2	4
100	64	128	1	1

CIM₉₀: concentración inhibitoria mínima para el 90% de las cepas analizadas. CIM₅₀: concentración inhibitoria mínima para el 50% de las cepas analizadas. *E. coli* MDR-RF: cepa MDR con fenotipo resistente a florfenicol. *E. coli* MDR-SF: cepa MDR con fenotipo susceptible a florfenicol. NMP: 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine

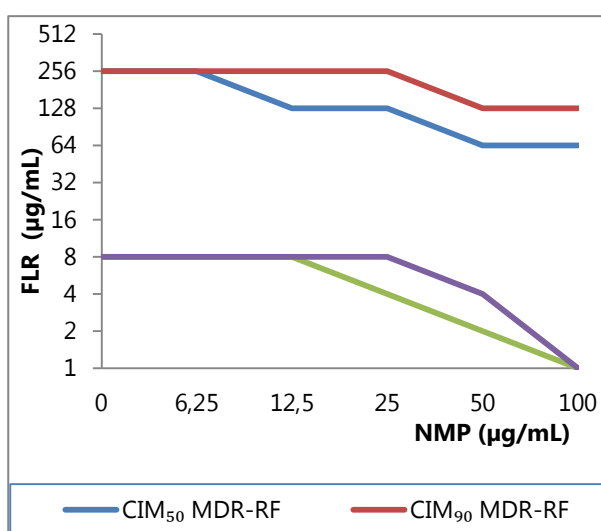


Figura III.15. CIM₉₀ y CIM₅₀ de florfenicol (FLR) frente a *E. coli* MDR-RF (n=5) y a *E. coli* MDR-SF (n=5) con y sin NMP

FLR: florfenicol. CIM₉₀: concentración inhibitoria mínima para el 90% de las cepas analizadas. CIM₅₀: concentración inhibitoria mínima para el 50% de las cepas analizadas. *E. coli* MDR-RF: cepa MDR con fenotipo resistente a florfenicol. *E. coli* MDR-SF: cepa MDR con fenotipo susceptible a florfenicol. NMP: 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine.

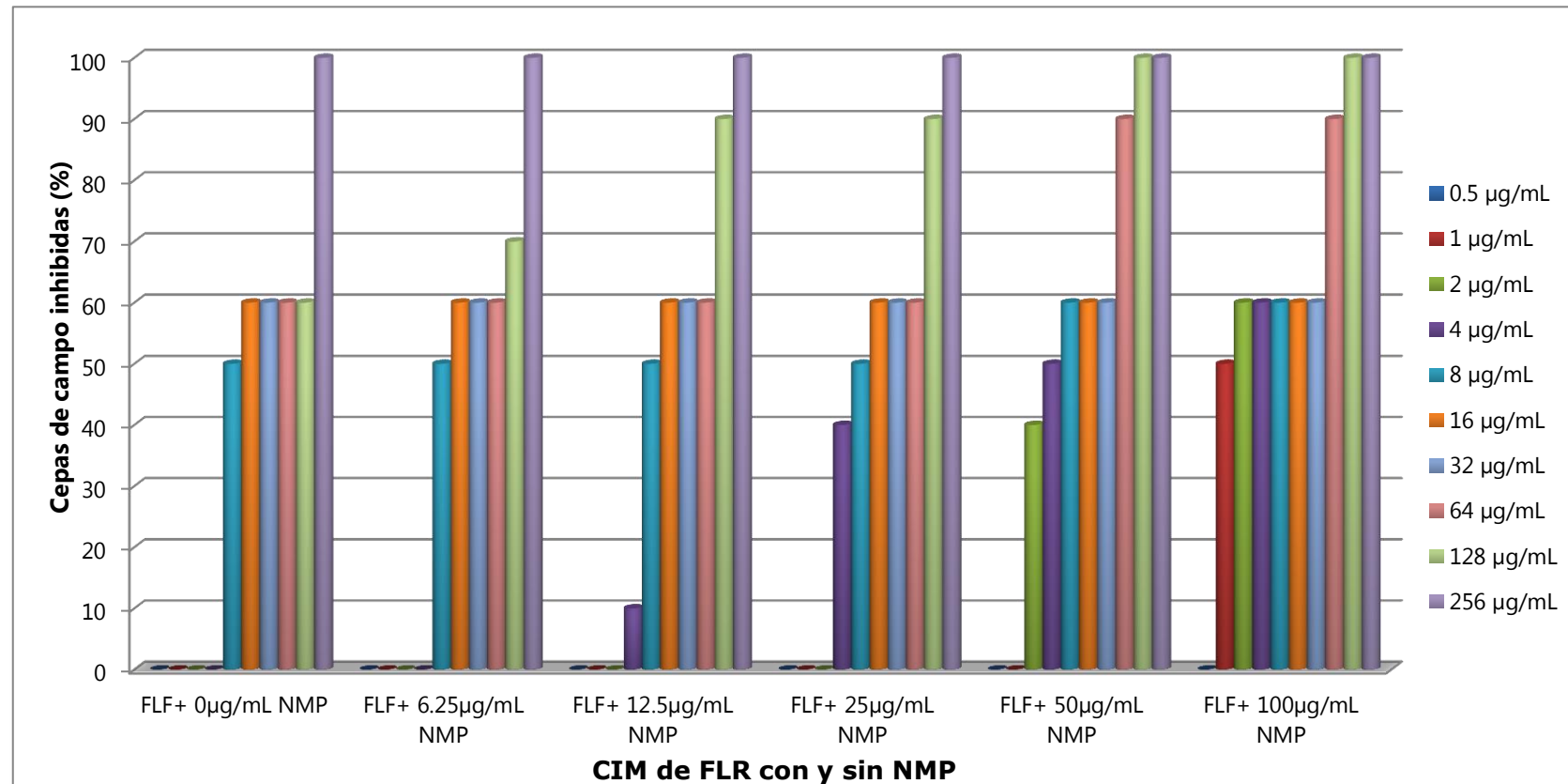


Figura III.16. Porcentaje de *E. coli* multiresistentes (MDRs) inhibidas por florfenicol (FLR) combinado con diferentes concentraciones de NMP durante la determinación de la CIM

III.4.2.3. Ciprofloxacina

La concentración de NMP que permitió una disminución de la CIM de ciprofloxacina de 4 veces en todas las cepas *E.coli MDR-RC* fue 100 µg/mL. Sólo en 2 de las 5 cepas *E.coli MDR-RC* se obtuvo un resultado similar (descenso de 4 veces la CIM de ciprofloxacina) con 50 µg/mL de NMP, mientras que en las otras dos cepas el descenso fue de 2 veces la CIM a esa concentración del inhibidor (Tabla III.15 y Figura III.17).

En todas las cepas *E.coli MDR-SC* se obtuvo una disminución de 2 veces la CIM de ciprofloxacina con 50 µg/mL de NMP. Con 100 µg/mL de NMP la CIM siguió reduciéndose 2 veces como con 50 µg/mL, a excepción de una de las cepas que redujo la CIM 4 veces (Tabla III.16 y Figura III.18).

Las CIM₅₀ y la CIM₉₀ de las cepas *E. coli MDR-RC* descendió de 128 µg/mL hasta 64 µg/mL con la incorporación de 50 µg/mL; y a 32 µg/mL con 100 µg/mL de NMP. En cuanto a las MDR-SR, la CIM₉₀ de ciprofloxacina, se mantuvo invariable a pesar de la incorporación creciente del inhibidor, y la CIM₅₀ descendió de un valor de 0.015 µg/mL hasta 0.0078 µg/mL con 50 µg/mL y 100 µg/mL de NMP respectivamente (Tablas III.17 y Figura III.19).

En la figura III.20, pueden observarse los porcentajes de cepas *E. coli* MDRs inhibidos por ciprofloxacina, combinado con diferentes concentraciones de NMP durante la determinación de la CIM. Los datos de la figura mencionada se encuentran en la tabla VI.7 del Anexo E.

Tabla III.15. Concentración inhibitoria mínima de ciprofloxacina ($\mu\text{g/mL}$) con y sin NMP frente a las cepas *E. Coli MDR-RC*

NMP ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ($\mu\text{g/mL}$) de ciprofloxacina				
	Vo2-SV	Ter1-TQ	Ter2-TQ	Ter3-TQ	Ter4-TQ
0	32	128	128	128	128
6.25	32	128	128	128	128
12.5	32	128	128	128	128
25	16	64	64	64	64
50	8	64	64	64	32
100	8	32	32	32	32

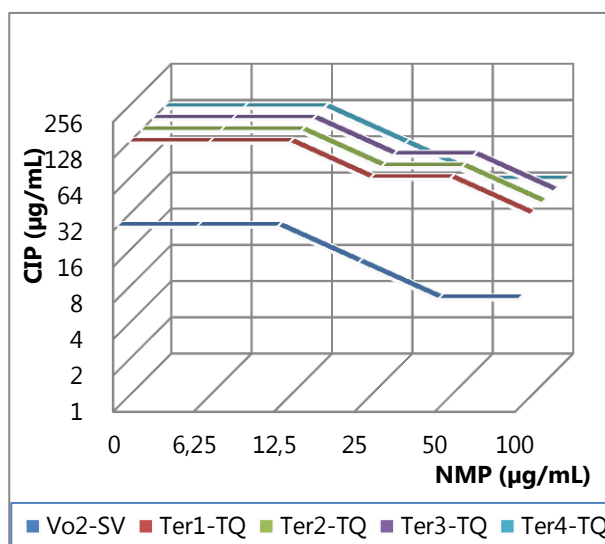


Figura III.17. Concentración inhibitoria mínima de ciprofloxacina con y sin NMP frente a las cepas *E. coli MDR-RC*

Tabla III.16. Concentración inhibitoria mínima de ciprofloxacina ($\mu\text{g/mL}$) con y sin NMP frente a las cepas *E. coli* MDR-SC

NMP ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ($\mu\text{g/mL}$) de ciprofloxacina				
	Pe1-L	Pe2-L	Vo1-SV	Vo1-TQ	Vo2-TQ
0	0.0156	0.0312	0.0156	0.0156	0.0078
6.25	0.0156	0.0312	0.0156	0.0156	0.0078
12.5	0.0156	0.0312	0.0156	0.0156	0.0078
25	0.0078	0.0312	0.0156	0.0156	0.0078
50	0.0078	0.0156	0.0078	0.0078	0.0039
100	0.0078	0.0078	0.0078	0.0078	0.0039

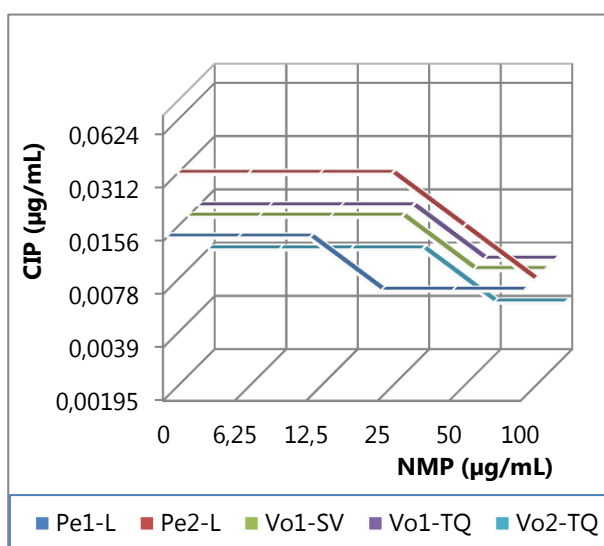


Figura III.18. Concentración inhibitoria mínima de ciprofloxacina con y sin NMP frente a las cepas *E. coli* MDR-SC

Tabla III.17. CIM₅₀ y CIM₉₀ de ciprofloxacina frente a las cepas *E. coli* MDR subclasificadas según fenotipo resistente y susceptible a ciprofloxacina, con y sin el agregado de NMP

NMP (µg/mL)	<i>E coli</i> MRD-RC		<i>E coli</i> MDR-SC	
	CIM ₅₀	CIM ₉₀	CIM ₅₀	CIM ₉₀
0	128	128	0.015	0.031
6.25	128	128	0.015	0.031
12.5	128	128	0.015	0.031
25	64	64	0.015	0.031
50	64	64	0.0078	0.031
100	32	32	0.0078	0.031

CIM₉₀: concentración inhibitoria mínima para el 90% de las cepas analizadas. CIM₅₀: concentración inhibitoria mínima para el 50% de las cepas analizadas. *E. coli* MDR-RC: cepa MDR con fenotipo resistente a ciprofloxacina. *E. coli* MDR-SC: cepa MDR con fenotipo susceptible a ciprofloxacina. NMP: 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine

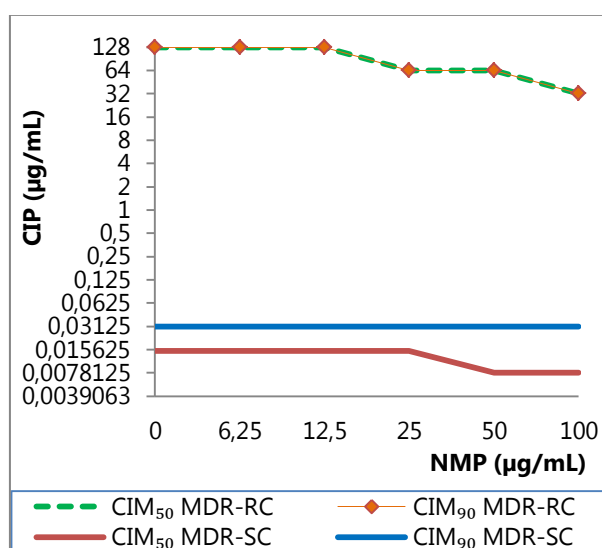


Figura III.19. CIM₉₀ y CIM₅₀ de ciprofloxacina frente a *E. coli* MDR-RC (n=5) y a *E. coli* MDR-SC (n=5) con y sin NMP

CIP: ciprofloxacina. CIM₉₀: concentración inhibitoria mínima para el 90% de las cepas analizadas. CIM₅₀: concentración inhibitoria mínima para el 50% de las cepas analizadas. *E. coli* MDR-RC: cepa MDR con fenotipo resistente a ciprofloxacina. *E. coli* MDR-SC: cepa MDR con fenotipo susceptible a ciprofloxacina. NMP: 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine.

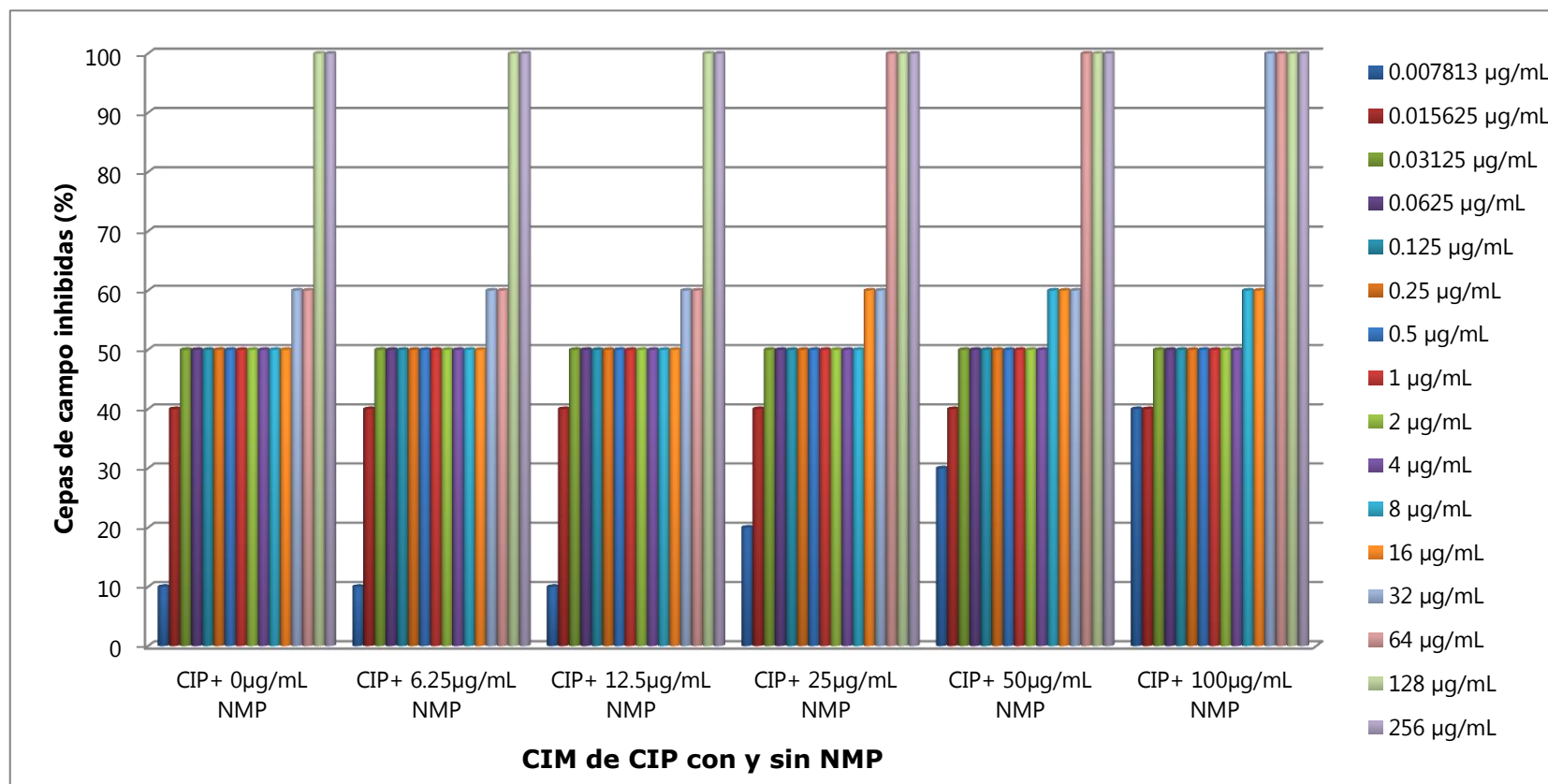


Figura III.20. Porcentaje de *E. coli* multirresistentes (MDRs) inhibidas por ciprofloxacina combinada con diferentes concentraciones de NMP durante la determinación de la CIM

III.4.2.4. Tetraciclina

Para el caso de tetraciclina, todas las cepas MDR resultaron ser resistentes a tetraciclina. En 9 de las 10 cepas *E.coli MDR-RT*, se obtuvo una disminución de 4 veces la CIM con 100 µg/mL de NMP y en una de ellas descendió 8 veces la CIM inicial de tetraciclina. Sin embargo cuando el antimicrobiano fue combinado con 50 µg/mL de NMP, solo en 6 de las 10 cepas *E.coli MDR-RT* la CIM de tetraciclina se redujo 4 veces, mientras que en las 4 restantes solo disminuyó 2 veces (Tabla III.18 y Figura III.21).

Tanto la CIM₅₀ como la CIM₉₀ de tetraciclina frente a las cepas *E. coli MDR-RT* descendieron desde un valor de 250 µg/mL hasta 64 µg/mL con la combinación con 100 µg/mL de NMP (Tablas III.19 y Figura III.22).

En la figura III.23 pueden observarse los porcentaje de cepas *E. coli* multirresistentes (MDRs) inhibidos por tetraciclina combinada con diferentes concentraciones de NMP durante la determinación de la CIM. Los datos correspondientes a la figura mencionada se encuentran en la tabla VI.9 del Anexo E.

Tabla III.18. Concentración inhibitoria mínima de tetraciclina ($\mu\text{g/mL}$) con y sin NMP frente a las cepas *E. coli* MDR-RT

NMP ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ($\mu\text{g/mL}$) de tetraciclina									
	Pe1-L	Pe2-L	Vo2-SV	Vo1-SV	Vo1-TQ	Vo2-TQ	Ter2-TQ	Ter1-TQ	Tet3-TQ	Tet4-TQ
0	128	256	64	256	256	64	256	256	256	256
6.25	128	256	64	128	256	64	256	256	256	256
12.5	128	256	64	128	128	64	256	256	256	128
25	64	128	32	128	128	32	128	256	128	128
50	64	128	16	64	64	16	128	64	64	64
100	32	64	16	32	64	16	64	64	64	64

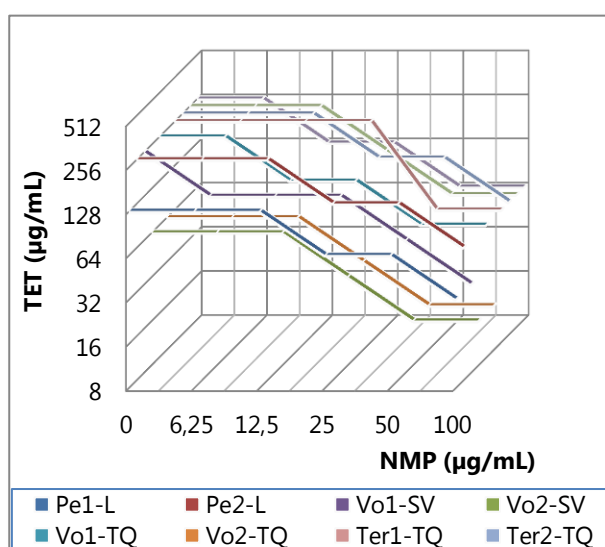
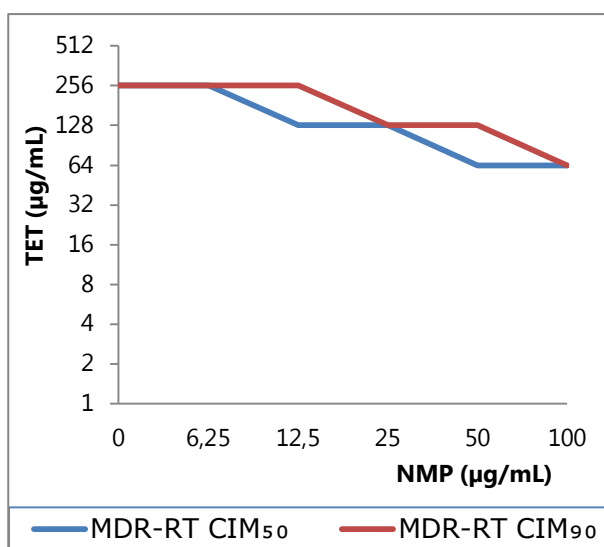


Figura III.21. Concentración inhibitoria mínima de tetraciclina con y sin NMP frente a las cepas *E. coli* MDR-RT

Tabla III.19. CIM₅₀ y CIM₉₀ de tetraciclina con y sin NMP frente a *E. coli* MDR-RT (n=10)

NMP ($\mu\text{g/mL}$)	Tetraciclina ($\mu\text{g/mL}$)	
	CIM ₅₀	CIM ₉₀
0	256	256
6.25	256	256
12.5	128	256
25	128	128
50	64	128
100	64	64

NMP: 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine. CIM₉₀: concentración inhibitoria mínima para el 90% de las cepas analizadas. CIM₅₀: concentración inhibitoria mínima para el 50% de las cepas analizadas.

**Figura III.22.** CIM₉₀ y CIM₅₀ de tetraciclina con y sin NMP para *E. coli* MDR-RT (n = 10)

TET: tetraciclina. CIM₉₀: concentración inhibitoria mínima para el 90% de las cepas analizadas. CIM₅₀: concentración inhibitoria mínima para el 50% de las cepas analizadas.

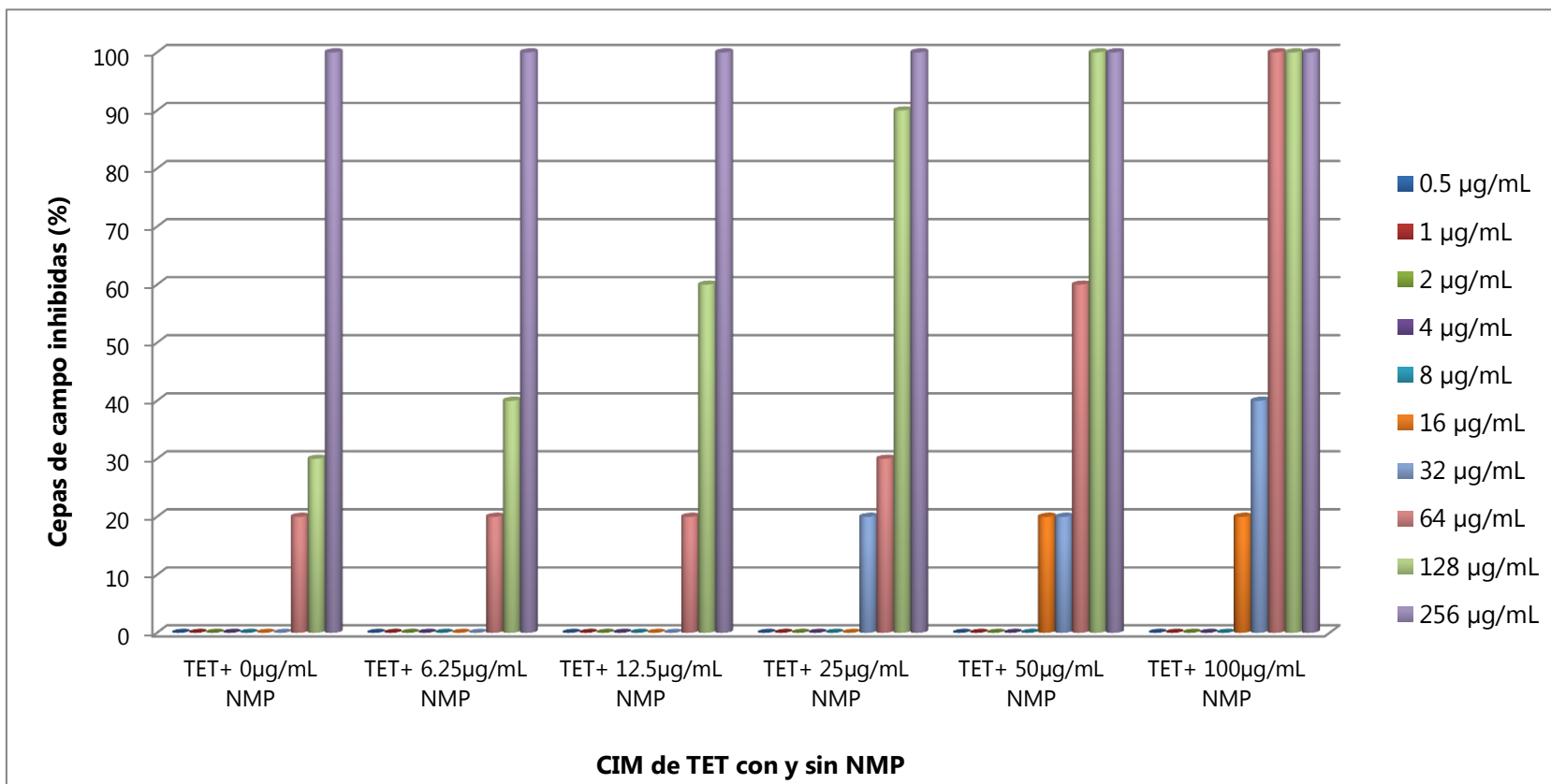


Figura III.23. Porcentaje de *E. coli* multirresistentes (MDRs) inhibidas por tetraciclina combinada con diferentes concentraciones de NMP durante la determinación de la CIM.

III.4.2.5. Trimetoprima-sulfametoxazol

No se observaron modificaciones en la CIM de trimetoprima-sulfametoxazol en combinación con NMP frente a las cepas de *E. coli* MDR-RTMS. La incorporación de concentraciones crecientes de NMP no modificó en ningún caso el perfil de resistencia de las cepas (Tabla III.20 y Figura III.24).

Sin embargo, en las cepas *E. coli* MDR-STMS, se modificaron las CIMs, descendiendo a razón de 4 veces al combinar los antimicrobianos con 50 y 100 µg/mL (Tabla III.21 y Figura III.25).

La CIM₅₀ y la CIM₉₀ para las cepas *E. coli* MDR-RTMS fueron de 256 µg/mL para todas las cepas independientemente de la concentración de NMP utilizado (Tabla III.21 y Figura III.25).

En la figura III.26 pueden observarse los porcentajes de cepas *E. coli* multirresistentes (MDRs) inhibidos por trimetoprima-sulfametoxazol en combinación con diferentes concentraciones de NMP durante la determinación de la CIM. Los datos presentes en la figura mencionada se encuentran en la tabla VI.10 del Anexo E.

Tabla III.20. Concentración inhibitoria mínima de trimetoprima-sulfametoxazol ($\mu\text{g/mL}$) con y sin NMP frente a las cepas *E. coli* MDR-RTMS

NMP ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ($\mu\text{g/mL}$) de trimetoprima-sulfametoxazol				
	Pe1-L	Pe2-L	Vo1-SV	Vo2-SV	Vo1-TQ
0	1280 (>64/1216)	1280 (>64/1216)	1280 (>64/1216)	1280 (>64/1216)	1280 (>64/1216)
6.25	1280 (>64/1216)	1280 (>64/1216)	1280 (>64/1216)	1280 (>64/1216)	1280 (>64/1216)
12.5	1280 (>64/1216)	1280 (>64/1216)	1280 (>64/1216)	1280 (>64/1216)	1280 (>64/1216)
25	1280 (>64/1216)	1280 (>64/1216)	1280 (>64/1216)	1280 (>64/1216)	1280 (>64/1216)
50	1280 (>64/1216)	1280 (>64/1216)	1280 (>64/1216)	1280 (>64/1216)	1280 (>64/1216)
100	1280 (>64/1216)	1280 (>64/1216)	1280 (>64/1216)	1280 (>64/1216)	1280 (>64/1216)

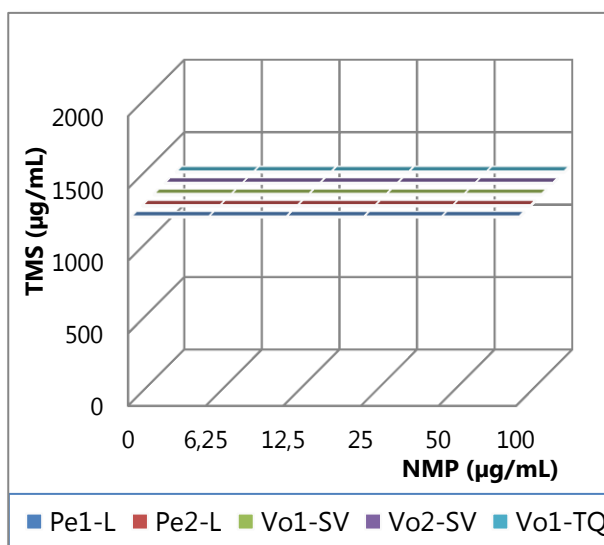


Figura III.24. Concentración inhibitoria mínima de trimetoprima-sulfametoxazol con y sin NMP frente a las cepas *E. coli* MDR-RTMS

Tabla III.21. Concentración inhibitoria mínima de trimetoprima-sulfametoxazol ($\mu\text{g/mL}$) con y sin NMP frente a las cepas *E. coli* MDR-STMS

NMP ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ($\mu\text{g/mL}$) de trimetoprima-sulfametoxazol				
	Vo2-TQ	Ter1-TQ	Ter2-TQ	Ter3-TQ	Ter4-TQ
0	10 (0.5/9.5)	10 (0.5/9.5)	10 (0.5/9.5)	10 (0.5/9.5)	10 (0.5/9.5)
6.25	10 (0.5/9.5)	10 (0.5/9.5)	10 (0.5/9.5)	10 (0.5/9.5)	10 (0.5/9.5)
12.5	10 (0.5/9.5)	10 (0.5/9.5)	10 (0.5/9.5)	10 (0.5/9.5)	10 (0.5/9.5)
25	5 (0.25/4.75)	10 (0.5/9.5)	5 (0.25/4.75)	5 (0.25/4.75)	5 (0.25/4.75)
50	2.5 (<0.125/2.37)	5 (0.25/4.75)	2.5 (<0.125/2.37)	2.5 (<0.125/2.37)	2.5 (<0.125/2.37)
100	2.5 (<0.125/2.37)	2.5 (<0.125/2.37)	2.5 (<0.125/2.37)	2.5 (<0.125/2.37)	2.5 (<0.125/2.37)

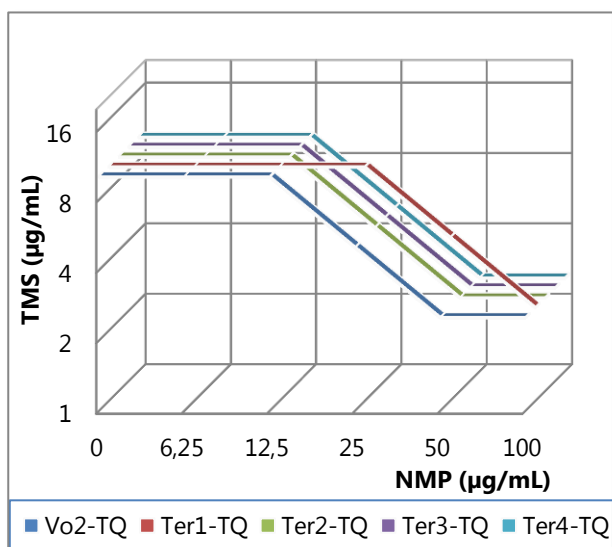


Figura III.25. Concentración inhibitoria mínima de trimetoprima-sulfametoxazol con y sin NMP frente a las cepas *E. coli* MDR-STMS

Tabla III.22. CIM₅₀ y CIM₉₀ de trimetoprima-sulfametoxazol frente a las cepas *E. coli* MDR subclasificadas según fenotipo resistente y susceptible a TMS con y sin NMP

NMP (µg/mL)	<i>E. coli</i> MRD-RTMS		<i>E. coli</i> MDR-STMS	
	CIM ₅₀	CIM ₉₀	CIM ₅₀	CIM ₉₀
0	10 (0.5/9.5)	10 (0.5/9.5)	1280 (>64/1216)	1280 (>64/1216)
6.25	10 (0.5/9.5)	10 (0.5/9.5)	1280 (>64/1216)	1280 (>64/1216)
12.5	10 (0.5/9.5)	10 (0.5/9.5)	1280 (>64/1216)	1280 (>64/1216)
25	5 (0.25/4,75)	10 (0.5/9.5)	1280 (>64/1216)	1280 (>64/1216)
50	<2.5(<0.125/2.37)	2.5 (0.125/2.37)	1280 (>64/1216)	1280 (>64/1216)
100	<2.5(<0.125/2.37)	<2.5(<0.125/2.37)	1280 (>64/1216)	1280 (>64/1216)

CIM₉₀: concentración inhibitoria mínima para el 90% de las cepas analizadas. CIM₅₀: concentración inhibitoria mínima para el 50% de las cepas analizadas. *E. coli* MDR-RTMS: cepa MDR con fenotipo resistente a trimetoprima-sulfametoxazol. *E. coli* MDR-STMS: cepa MDR con fenotipo susceptible a trimetoprima-sulfametoxazol. NMP: 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine

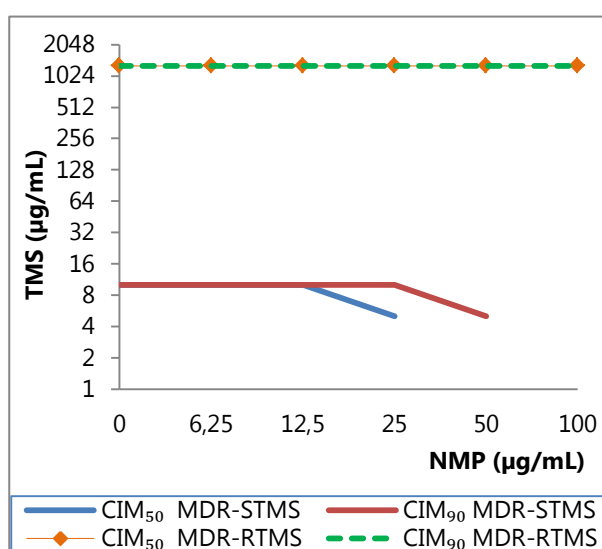


Figura III.26. CIM₉₀ y CIM₅₀ de TMS frente a *E. coli* MDR-RTMS (n=5) y a *E. coli* MDR-STMS (n=5) con y sin NMP

TMS: trimetoprima-sulfametoxazol. CIM₉₀: concentración inhibitoria mínima para el 90% de las cepas analizadas. CIM₅₀: concentración inhibitoria mínima para el 50% de las cepas analizadas. *E. coli* MDR-RTMS: cepa MDR con fenotipo resistente a TMS. *E. coli* MDR-STMS: cepa MDR con fenotipo susceptible a trimetoprima-sulfametoxazol. NMP: 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine.

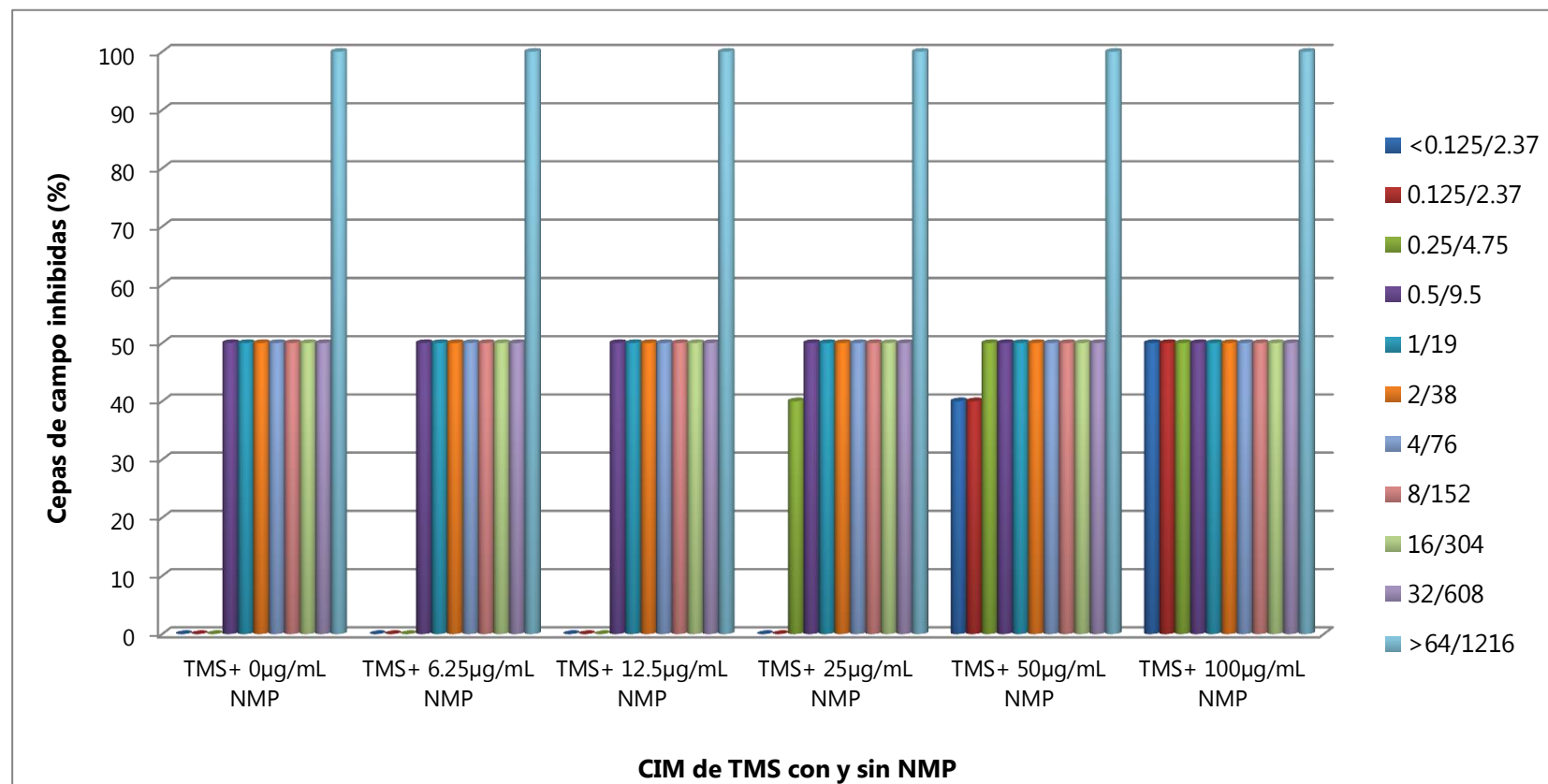


Figura III.27. Porcentaje de *E. coli* multirresistentes (MDRs) inhibidas por la asociación trimetoprima-sulfametoxazol combinadas con diferentes concentraciones de NMP durante la determinación de la CIM

Cuando NMP fue evaluado solo frente a las cepas de campo MDR, sin el agregado de antimicrobianos, la CIM del inhibidor fue $\geq 800 \mu\text{g/mL}$ en todos los casos.

En la tabla III.22 se presentan las CIMs de los antimicrobianos asociados a 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine (NMP) frente a cepas de campo MDR aisladas de animales.

Tabla III.22. Efecto del NMP en las CIMs de los antimicrobianos frente a cepas *E. coli* MDR

ATM	Fenotipo	Muestra	Perfiles de Resistencia	CIM (µg/ml) frente a concentraciones de NMP(µg/ml)						CIM de NMP (µg/ml)	Veces que decrece la CIM	
				0	6,25	12,5	25	50	100		c/ 50 µg/mL NMP	c/ 100 µg/mL NMP
AMP	MDR-RA	Vo2-SV	FLR CIP TMS AMP TET	256	256	256	256	256	256	800	1	1
		Pe1-L	TMS AMP TET	256	256	256	256	256	256	800	1	1
		Pe2-L	FLR TMS AMP TET	256	256	256	256	256	256	800	1	1
		Vo2-TQ	FLR AMP TET	256	256	256	256	256	256	800	1	1
		Ter1-TQ	CIP AMP TET	256	256	256	256	256	256	800	1	1
		Ter2-TQ	CIP AMP TET	256	256	256	256	256	256	800	1	1
		Ter3-TQ	CIP AMP TET	256	256	256	256	256	256	800	1	1
		Ter4-TQ	CIP AMP TET	256	256	256	256	256	256	800	1	1
FLR	MDR-RF	Vo1-SV	FLR TMS TET	256	256	128	128	64	64	800	4	4
		Vo2-SV	FLR CIP TMS AMP TET	16	16	16	8	2	1	800	8	16
		Pe2-L	FLR TMS AMP TET	256	256	256	256	128	128	800	2	2
		Vo1-TQ	FLR TMS TET	256	128	128	128	64	64	800	4	4
		Vo2-TQ	FLR AMP TET	256	256	128	128	64	64	800	4	4
CIP	MDR-RC	Vo2-SV	FLR CIP TMS AMP TET	32	32	32	16	8	8	800	4	4
		Ter1-TQ	CIP AMP TET	128	128	128	64	64	32	800	2	4
		Ter2-TQ	CIP AMP TET	128	128	128	64	64	32	800	2	4
		Ter3-TQ	CIP AMP TET	128	128	128	64	64	32	800	2	4
		Ter4-TQ	CIP AMP TET	128	128	128	64	32	32	800	4	4
TET	MDR-RT	Vo1-SV	FLR TMS TET	256	128	128	128	64	32	800	4	8
		Vo2-SV	FLR CIP TMS AMP TET	64	64	64	32	16	16	800	4	4
		Pe1-L	TMS AMP TET	128	128	128	64	64	32	800	2	4
		Pe2-L	FLR TMS AMP TET	256	256	256	128	128	64	800	2	4
		Vo1-TQ	FLR TMS TET	256	256	128	128	64	64	800	4	4
		Vo2-TQ	FLR AMP TET	64	64	64	32	16	16	800	4	4
		Ter1-TQ	CIP AMP TET	256	256	256	256	64	64	800	4	4
		Ter2-TQ	CIP AMP TET	256	256	256	128	128	64	800	2	4
		Ter3-TQ	CIP AMP TET	256	256	256	128	64	64	800	4	4
		Ter4-TQ	CIP AMP TET	256	256	128	128	64	64	800	4	4
TMS	MDR-RTMS	Pe1-L	TMS AMP TET	>64/1216	>64/1216	>64/1216	>64/1216	>64/1216	>64/1216	800	1	1
		Pe2-L	FLR TMS AMP TET	>64/1216	>64/1216	>64/1216	>64/1216	>64/1216	>64/1216	800	1	1
		Vo1-SV	FLR TMS TET	>64/1216	>64/1216	>64/1216	>64/1216	>64/1216	>64/1216	800	1	1
		Vo2-SV	FLR CIP TMS AMP TET	>64/1216	>64/1216	>64/1216	>64/1216	>64/1216	>64/1216	800	1	1
		Vo1-TQ	FLR TMS TET	>64/1216	>64/1216	>64/1216	>64/1216	>64/1216	>64/1216	800	1	1

CIP: Ciprofloxacina. FLR: Florfenicol. AMP: Ampicilina. TET: Tetraciclina. TMS: trimetoprina-sulfametoxazol. ATM: antimicrobiano. CIM: concentración inhibitoria mínima. NMP: 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine. MDR-RA: multirresistente, con resistencia a ampicilina. MDR-RF: multirresistente, con resistencia a florfenicol. MDR-RC: multirresistente, con con resistencia a ciprofloxacina. MDR-RT multirresistente, con resistencia a tetraciclina. MDR-RTMS multirresistente, con resistencia a trimetoprima-sulfametoxazol. Muestras: Vo: vaca en ordeño. Ter: ternero. Pe: perro. SV: San Vicente. L: Luján. TQ: Trenque Lauquen.

III.4.3. Índice de Concentración Inhibitoria Fraccionada (CIF)

III.4.3.1. Florfenicol

En las cepas de genotipo conocido evaluadas frente a florfenicol -AG100, AG112 y *E. coli* ATCC 25922-, se obtuvo como resultado el fenómeno de adición al combinar el antimicrobiano con concentraciones de 12.5 µg/mL y 25 µg/mL de NMP. Mientras que con las concentraciones más elevadas (50 µg/mL y 100 µg/mL) existe una clara actividad antibacteriana sinérgica. Este último fenómeno se ve notoriamente manifiesto frente a la cepa AG112 con sobreexpresión de bombas de eflujo como se muestra en la tabla III.23. Sin embargo, no existió ni adición ni sinergismo frente a la cepa AG100A con delección total de bombas.

Tabla III.23. Índice CIF obtenido a partir de la CIM de florfenicol y la CIM de NMP frente a las cepas *E. coli* ATCC 25922, AG100, AG100A y AG112

NMP (µg/mL)	ATCC 25922	AG100	AG100A	AG112
0	1.00	1.00	1.00	1.00
6.25	1.02	1.02	1.02	1.02
12.5	0.53	0.53	1.03	0.53
25	0.56	0.56	1.06	0.56
50	0.38	0.38	1.13	0.38
100	0.38	0.38	1.25	0.28

Sinergismo cuando los valores de CIF son ≤ 0.5

Adición para CIFs en el rango de > 0.5 y < 1

Indiferencia o adición si es ≥ 1 y < 2

En cuanto a las cepas de campo MDR-RF, en 4 de ellas se obtuvieron resultados similares a los descriptos para las cepas de genotipo conocido, es decir adición a concentraciones de 12.5 µg/mL y 25 µg/mL, y sinergismo con 50 µg/mL y 100 µg/mL de NMP. Solo una de las cepas MDR-RF no manifestó sinergismo a las concentraciones más elevadas (Tabla III.24).

En las cepas con fenotipo MDR-SF también se manifestaron los fenómenos de adición y sinergismo (Tabla III.25).

TablaIII.24. Índice CIF obtenido a partir de la CIM de florfenicol y la CIM de NMP frente a las cepas de *E. coli* MDR-RF de campo

NMP($\mu\text{g/mL}$)	Pe2-L	Vo1-SV	Vo2-SV	Vo1-TQ	Vo2-TQ
0	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
6.25	1.02	1.02	1.02	0.52	1.02
12.5	1.03	0.53	1.03	0.53	0.53
25	1.06	0.56	0.56	0.56	0.56
50	0.63	0.38	0.25	0.38	0.38
100	0.75	0.50	0.31	0.50	0.50

Sinergismo cuando los valores de CIF son ≤ 0.5

Adición para CIFs en el rango de > 0.5 y < 1

Indiferencia o adición si es ≥ 1 y < 2

TablaIII.25. Índice CIF obtenido a partir de la CIM de florfenicol y la CIM de NMP frente a las cepas de *E. coli* MDR-SF de campo

NMP($\mu\text{g/mL}$)	Ter1-TQ	Ter2-TQ	Ter3-TQ	Ter4-TQ	Pe1-L
0	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
6.25	1.03	1.02	1.02	1.02	1.02
12.5	1.06	1.03	1.03	1.03	0.53
25	0.63	0.56	0.56	1.06	0.56
50	0.50	0.38	0.38	0.63	0.38
100	0.63	0.38	0.38	0.38	0.50

Sinergismo cuando los valores de CIF son ≤ 0.5

Adición para CIFs en el rango de > 0.5 y < 1

Indiferencia o adición si es ≥ 1 y < 2

III.4.3.2. Ciprofloxacina

En la tabla III.26. se observa que al evaluar el índice CIF con ciprofloxacina la asociación de NMP es sinérgica únicamente a la concentración de 100 µg/mL de NMP cuando existe sobreexpresión de bombas de eflujo, es decir frente a AG112. En las cepas que expresan una cantidad “normal” de bombas sobre su superficie se observó el fenómeno de adición y nada ocurrió frente a AG100A, es decir que la combinación de NMP y ciprofloxacina es indiferente cuando no hay bombas de eflujo en la bacteria.

Tabla III.26. Índice CIF obtenido a partir de la CIM de ciprofloxacina y la CIM de NMP frente a las cepas *E. coli* ATCC 25922, AG100, AG100A y AG112

NMP (µg/mL)	ATCC 25922	AG100	AG100A	AG112
0	1.00	1.00	1.00	1.00
6.25	1.02	1.02	1.02	1.02
12.5	1.03	1.03	1.03	1.03
25	1.06	0.56	1.06	0.56
50	0.63	0.63	1.13	0.62
100	0.75	0.75	1.25	0.50

Sinergismo cuando los valores de CIF son ≤ 0.5

Adición para CIFs en el rango de > 0.5 y < 1

Indiferencia o adición si es ≥ 1 y < 2

En las 5 cepas con fenotipo MDR-RC y en una MDR-SC, se logró sinergia en la combinación del antimicrobiano y el inhibidor de bombas cuando este último se utilizó a una concentración de 100 µg/mL. Solo en dos de las MDR-RC, la sinergia se manifestó también con 50 µg/mL (Tablas III.27 y III.28).

Tabla III.27. Índice CIF obtenido a partir de la CIM de ciprofloxacina y la CIM de NMP frente a las cepas de *E. coli* MDR-RC de campo

NMP (µg/mL)	Pe1-L	Pe2-L	Vo2-SV	Vo1-SV	Vo1-TQ
0	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
6.25	1.02	1.02	1.02	1.02	1.02
12.5	1.03	1.03	1.03	1.03	1.03
25	0.56	0.56	0.56	0.56	0.56
50	0.38	0.63	0.63	0.63	0.38
100	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50

Sinergismo cuando los valores de CIF son ≤ 0.5

Adición para CIFs en el rango de > 0.5 y < 1

Indiferencia o adición si es ≥ 1 y < 2

Tabla III.28. Índice CIF obtenido a partir de la CIM de ciprofloxacina y la CIM de NMP frente a las cepas de *E. coli* MDR-SC de campo

NMP (µg/mL)	Pe1-L	Pe2-L	Vo2-SV	Vo1-SV	Vo1-TQ
0	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
6.25	1.02	1.02	1.02	1.02	1.02
12.5	1.03	1.03	1.03	1.03	1.03
25	0.56	1.06	1.06	1.06	1.06
50	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63
100	0.75	0.50	0.75	0.75	0.75

Sinergismo cuando los valores de CIF son ≤ 0.5

Adición para CIFs en el rango de > 0.5 y < 1

Indiferencia o adición si es ≥ 1 y < 2

III.4.3.3. Tetraciclina

En la cepa AG112 y en la *E. coli* ATCC 25922, se observó la presencia de sinergismo al evaluar el índice CIF obtenido de la relación entre las CIMs de tetraciclina y NMP (Tabla III.29).

Tabla III.29. Índice CIF obtenido a partir de la CIM de tetraciclina y la CIM de NMP frente a las cepas *E. coli* ATCC 25922, AG100, AG100A y AG112

NMP (µg/mL)	ATCC 25922	AG100	AG100A	AG112
0	1.00	1.00	1.00	1.00
6.25	1.02	1.02	1.02	1.02
12.5	0.53	1.03	1.03	1.03
25	0.56	0.56	1.06	0.56
50	0.38	0.63	1.13	0.38
100	0.50	0.75	1.25	0.31

Sinergismo cuando los valores de CIF son ≤ 0.5

Adición para CIFs en el rango de > 0.5 y < 1

Indiferencia o adición si es ≥ 1 y < 2

En las 10 cepas de campo MDR-RT se logró sinergismo en la asociación entre el antimicrobiano y el inhibidor de bombas cuando la concentración de NMP fue de 100 µg/mL. Mientras que con 50 µg/mL, 7 cepas de las 10 mencionadas manifestaron la sinergia.

Hubo adición en algunas cepas con concentraciones de 25 µg/mL y 50 µg/mL de NMP. Los resultados mencionados pueden observarse en la tabla III.30.

Tabla III.30. Índice CIF obtenido a partir de la CIM de tetraciclina y la CIM de NMP frente a las cepas de *E. coli* MDR-RT de campo

NMP (µg/mL)	Pe1-L	Pe2-L	Vo2-SV	Vo1-SV	Vo1-TQ	Vo2-TQ	Ter2-TQ	Ter1-TQ	Tet3-TQ	Tet4-TQ
0	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
6.25	1.01	1.01	1.01	0.51	1.01	1.01	1.01	1.01	1.01	1.01
12.5	1.02	1.02	1.02	0.52	0.52	1.02	1.02	1.02	1.02	0.52
25	0.53	0.53	0.53	0.53	0.53	0.53	0.53	1.03	0.53	0.53
50	0.56	0.56	0.31	0.31	0.31	0.31	0.56	0.31	0.31	0.31
100	0.38	0.38	0.38	0.25	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38

Sinergismo cuando los valores de CIF son ≤ 0.5

Adición para CIFs en el rango de > 0.5 y < 1

Indiferencia o adición si es ≥ 1 y < 2

III.5. Evaluación de variables farmacodinámicas de primera exposición

III.5.1. Concentración bactericida mínima (CBM)

Para las cepas de referencia y los aislamientos MDRs, se determinaron las concentraciones bactericidas mínimas (CBMs), considerando como CBM a aquella concentración que logró matar el 99.9% del inóculo original (≤ 500 UFC/mL), como fue previamente desarrollado en el apartado II.2.9.2 de "Métodos".

Los antimicrobianos analizados fueron ampicilina, florfenicol, tetraciclina y ciprofloxacina. La elección de los tres últimos antimicrobianos, se fundamentó en la elevada resistencia observada al realizar la CIM de los aislamientos de campo frente a los mismos, y los cambios observables luego de la adición de NMP, con reducción de la CIM de 4 veces o más. Ampicilina se evaluó a fin de determinar si existían cambios en la CBM con la incorporación de NMP a pesar que no se había manifestado ninguna modificación considerable en la CIM.

III.5.1.1. Ampicilina

TablaIII.31. Efecto del NMP en la CBMs ($\mu\text{g/mL}$) de ampicilina en cepas control isogénicas y en la cepa de referencia *E. coli* ATCC 25922

NMP ($\mu\text{g/mL}$)	ATCC 25922			AG100A			AG100			AG112		
	CIM	CBM	CBM:CIM	CIM	CBM	CBM:CIM	CIM	CBM	CBM:CIM	CIM	CBM	CBM:CIM
0	4	8	2	1	1	1	2	2	1	4	8	2
6.25	4	8	2	1	1	1	2	2	1	4	8	2
12.5	4	8	2	1	1	1	2	2	1	4	8	2
25	4	8	2	1	1	1	2	2	1	4	8	2
50	4	4	1	1	1	1	2	2	1	4	4	1
100	4	4	1	1	1	1	2	2	1	4	4	1

CIM: concentración inhibitoria mínima. CBM: concentración bactericida mínima. NMP: 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine

TablaIII.32. Efecto del NMP en la CBMs de ampicilina en cepas *E. coli* MDR-SA

NMP ($\mu\text{g/mL}$)	Vo1-SV			Vo1-TQ		
	CIM	CBM	CBM:CIM	CIM	CBM	CBM:CIM
0	8	8	1	4	16	4
6.25	8	8	1	4	4	1
12.5	8	8	1	4	4	1
25	4	8	2	4	4	1
50	4	8	2	4	16	4
100	4	8	2	4	8	2

CIM: concentración inhibitoria mínima. CBM: concentración bactericida mínima. NMP: 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine. *E. coli* MDR-SA: multirresistentes sensibles a ampicilina.

III.5.1.2. Florfenicol

Tabla III.33. Efecto del NMP en la CBMs ($\mu\text{g/mL}$) de florfenicol en cepas control isogénicas y en la cepa de referencia *E. coli* ATCC 25922

NMP ($\mu\text{g/mL}$)	ATCC 25922			AG100A			AG100			AG112		
	CIM	CBM	CBM:CIM	CIM	CBM	CBM:CIM	CIM	CBM	CBM:CIM	CIM	CBM	CBM:CIM
0	8	>256	32	1	16	16	8	16	2	32	>256	≥ 8
6.25	8	>256	32	1	16	16	8	16	2	32	>256	≥ 8
12.5	4	>256	64	1	16	16	4	8	2	16	>256	≥ 16
25	4	>256	64	1	16	16	4	4	1	16	>256	≥ 16
50	2	>256	128	1	16	16	2	4	2	8	256	32
100	1	>256	256	1	16	16	1	2	2	1	64	64

CIM: concentración inhibitoria mínima. CBM: concentración bactericida mínima. NMP: 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine.

Tabla III.34. Efecto del NMP en la CBMs de florfenicol en cepas *E. coli* MDR-RF

NMP ($\mu\text{g/mL}$)	Vo1-SV			Vo2-SV			Vo1-TQ			Vo2-TQ			Pe2-L		
	CIM	CBM	CBM:CIM	CIM	CBM	CBM:CIM	CIM	CBM	CBM:CIM	CIM	CBM	CBM:CIM	CIM	CBM	CBM:CIM
0	256	>256	≥ 1	16	256	16	256	>256	≥ 1	256	>256	≥ 1	256	>256	≥ 1
6.25	256	>256	≥ 1	16	256	16	128	>256	≥ 2	256	>256	≥ 1	256	>256	≥ 1
12.5	128	>256	≥ 2	16	256	16	128	>256	≥ 2	128	256	2	256	>256	≥ 1
25	128	>256	≥ 2	8	256	32	128	>256	≥ 2	128	128	1	256	>256	≥ 1
50	64	>256	≥ 4	2	256	128	64	>256	≥ 4	64	128	4	128	>256	≥ 2
100	64	>256	≥ 4	1	256	256	64	>256	≥ 4	64	64	1	128	>256	≥ 2

CIM: concentración inhibitoria mínima. CBM: concentración bactericida mínima. NMP: 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine. *E. coli* MDR-RF: multirresistentes resistentes a florfenicol.

Tabla III.35. Efecto del NMP en la CBMs de florfenicol en cepas *E. coli* MDR-SF

NMP ($\mu\text{g/mL}$)	Ter1-TQ			Ter2-TQ			Ter3-TQ			Ter4-TQ			Pe1-L		
	CIM	CBM	CBM:CIM	CIM	CBM	CBM:CIM	CIM	CBM	CBM:CIM	CIM	CBM	CBM:CIM	CIM	CBM	CBM:CIM
0	8	256	32	8	32	4	8	128	16	8	256	32	8	256	32
6.25	8	128	16	8	16	2	8	64	8	8	256	32	8	128	16
12.5	8	64	8	8	8	1	8	64	8	8	256	32	4	32	8
25	4	32	8	4	8	2	4	32	8	8	256	32	4	16	4
50	2	16	8	2	4	2	2	32	4	4	256	64	2	16	8
100	1	16	16	1	2	2	1	16	1	1	256	256	2	16	8

CIM: concentración inhibitoria mínima. CBM: concentración bactericida mínima. NMP: 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine. *E. coli* MDR-SF: multirresistentes sensibles a florfenicol.

III.5.1.3. Ciprofloxacina

Tabla III.36. Efecto del NMP en la CBMs ($\mu\text{g/mL}$) de ciprofloxacina en cepas control isogénicas y en la cepa *E. coli* ATCC 25922

NMP ($\mu\text{g/mL}$)	ATCC 25922			AG100A			AG100			AG112		
	CIM	CBM	CBM:CIM	CIM	CBM	CBM:CIM	CIM	CBM	CBM:CIM	CIM	CBM	CBM:CIM
0	0.0156	0.0312	2	0.0156	0.0156	1	0.0156	0.0312	2	0.0625	0.0625	1
6.25	0.0156	0.0312	2	0.0156	0.0156	1	0.0156	0.0312	2	0.0625	0.0625	1
12.5	0.0156	0.0312	2	0.0156	0.0156	1	0.0156	0.0156	1	0.0625	0.0625	1
25	0.0156	0.0312	2	0.0156	0.0156	1	0.0078	0.0156	2	0.0312	0.0625	2
50	0.0078	0.0312	4	0.0156	0.0156	1	0.0078	0.0156	2	0.0312	0.0625	2
100	0.0078	0.0156	2	0.0156	0.0156	1	0.0078	0.0156	2	0.0156	0.0625	4

CIM: concentración inhibitoria mínima. CBM: concentración bactericida mínima. NMP: 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine

Tabla III.37. Efecto del NMP en la CBMs de ciprofloxacina en cepas *E. coli* MDR-RC

NMP ($\mu\text{g/mL}$)	Ter1-TQ			Ter2-TQ			Ter3-TQ			Ter4-TQ			Vo2-SV		
	CIM	CBM	CBM:CIM	CIM	CBM	CBM:CIM	CIM	CBM	CBM:CIM	CIM	CBM	CBM:CIM	CIM	CBM	CBM:CIM
0	128	>256	≥ 2	128	128	1	128	>256	≥ 2	128	>256	≥ 2	32	64	2
6.25	128	>256	≥ 2	128	128	1	128	>256	≥ 2	128	>256	≥ 2	32	32	1
12.5	128	>256	≥ 2	128	128	1	128	>256	≥ 2	128	>256	≥ 2	32	32	1
25	64	>256	≥ 4	64	64	1	64	64	1	64	>256	4	16	16	1
50	64	128	2	64	64	1	64	64	1	32	64	2	8	16	2
100	32	128	4	32	64	2	32	64	2	32	64	2	8	8	1

CIM: concentración inhibitoria mínima. CBM: concentración bactericida mínima. NMP: 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine. *E. coli* MDR-RC: multirresistentes resistentes a ciprofloxacina.

III.5.1.4. Tetraciclina

Tabla III.38. Efecto del NMP en la CBMs ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de tetraciclina en cepas control isogénicas y en la cepa de referencia *E. coli* ATCC 25922

NMP ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	ATCC 25922			AG100A			AG100			AG112		
	CIM	CBM	CBM:CIM	CIM	CBM	CBM:CIM	CIM	CBM	CBM:CIM	CIM	CBM	CBM:CIM
0	2	128	64	0.5	2	4	1	128	128	8	256	32
6.25	2	128	64	0.5	2	4	1	128	128	8	256	32
12.5	1	128	128	0.5	2	4	1	128	128	8	128	16
25	1	128	128	0.5	2	4	0.5	128	256	4	128	32
50	0.5	64	128	0.5	0.5	1	0.5	64	128	2	128	64
100	0.5	64	128	0.5	0.5	2	0.5	64	128	0.5	128	256

CIM: concentración inhibitoria mínima. CBM: concentración bactericida mínima. NMP: 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine.

Tabla III.39. Efecto del NMP en la CBMs de tetraciclina en cepas *E. coli* MDR-RT

NMP (µg/mL)	Pe1-L			Pe2-L			Vo1-SV			Vo2-SV			Vo1-TQ		
	CIM	CBM	CBM:CIM	CIM	CBM	CBM:CIM	CIM	CBM	CBM:CIM	CIM	CBM	CBM:CIM	CIM	CBM	CBM:CIM
0	128	128	1	256	256	1	256	256	1	64	128	2	256	256	1
6.25	128	128	1	256	256	1	128	128	1	64	128	2	256	256	1
12.5	128	128	1	256	256	1	128	128	1	64	128	2	128	128	1
25	64	128	2	128	128	1	128	128	1	32	128	4	128	128	1
50	64	128	2	128	128	1	64	64	1	16	128	8	64	64	1
100	32	128	4	64	128	2	32	64	2	16	128	8	64	64	1

NMP (µg/mL)	Vo2-TQ			Ter1-TQ			Ter2-TQ			Ter3-TQ			Ter4-TQ		
	CIM	CBM	CBM:CIM	CIM	CBM	CBM:CIM	CIM	CBM	CBM:CIM	CIM	CBM	CBM:CIM	CIM	CBM	CBM:CIM
0	64	256	4	256	256	1	256	256	1	256	256	1	256	256	1
6.25	64	256	4	256	256	1	256	256	1	256	256	1	256	256	1
12.5	64	256	4	256	256	1	256	256	1	256	256	1	128	128	1
25	32	256	8	256	256	1	128	128	1	128	128	1	128	128	1
50	16	256	16	64	64	1	128	128	1	64	64	1	64	64	1
100	16	256	16	64	64	1	64	64	1	64	64	1	64	64	1

CIM: concentración inhibitoria mínima. CBM: concentración bactericida mínima. NMP: 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine

III.5.2. Curva de letalidad bacteriana (CLB)

Por último, se realizó la curva de letalidad o muerte bacteriana (CLB), método cinético del poder bactericida. Se valoró la capacidad de matar en relación con el tiempo y con distintas concentraciones fijas de antimicrobiano en combinación con 50 µg/mL y 100 µg/mL de NMP y sin inhibidor de bombas de eflujo. Se enfrentó un inóculo normalizado a concentraciones fijas de antimicrobiano en caldo. Las concentraciones fueron la CIM, 2, 4 y 8 veces la CIM; y un control sin antibiótico. Se realizó un recuento de colonias a los siguientes tiempos: 0, 2, 4, 8, 24 y 48 horas. Los recuentos se expresaron en logaritmo de unidades formadoras de colonia (Log_{10} UFC). El poder bactericida se determina en la caída de 3 logaritmos decimales en un tiempo determinado.

A continuación se presentan los gráficos con los resultados de las cepas analizadas para cada antimicrobiano.

III.5.2.1. Florfenicol

En el caso de florfenicol, se evaluaron 4 cepas, AG112 y AG100 como cepas control y 2 cepas de campo Vo1-SV y Vo2-TQ. A fin de visualizar la cinética de muerte de cada una de ellas frente a florfenicol, se presentan los gráficos correspondientes a continuación.

En primer lugar, pueden observarse los resultados obtenidos para la AG112 frente a florfenicol a todas las concentraciones (CIM, 2 x CIM, 4 x CIM y 8 x CIM) sin NMP (Figura III.27 (A)); con 50 µg/mL de NMP (Figura III.27 (B)) y con 100 µg/mL de NMP (Figura III.27 (C)). En la figura III.28 (A), se presentan las 3 curvas de muerte obtenidas al exponer el inóculo de la cepa mencionada a la concentración de la CIM sin NMP con 50 µg/mL y 100 µg/mL de NMP, en la misma gráfica a fin de poder realizar una comparación visual del comportamiento cinéticos de muerte. Lo mismo puede observarse con cada una de las concentraciones analizadas antes (2 x CIM, 4 x CIM y 8 x CIM) (Figuras III.27 (B), (C) y (D)). Las tablas con los valores correspondientes a las figuras mencionadas se encuentran en las tablas VI.12-14 del Anexo E para las cepas de referencia AG112 y AG100.

En cuanto a las cepas de campo Vo1-SV y Vo2-TQ se realizaron las curvas de muerte para dos cepas de campo con fenotipo MDR-RF cuyos resultados se presentan en las figuras III.30-33. Las tablas correspondientes se encuentran en el Anexo E (Tablas VI.15-18)

III.5.2.1.1. Cepa control AG112

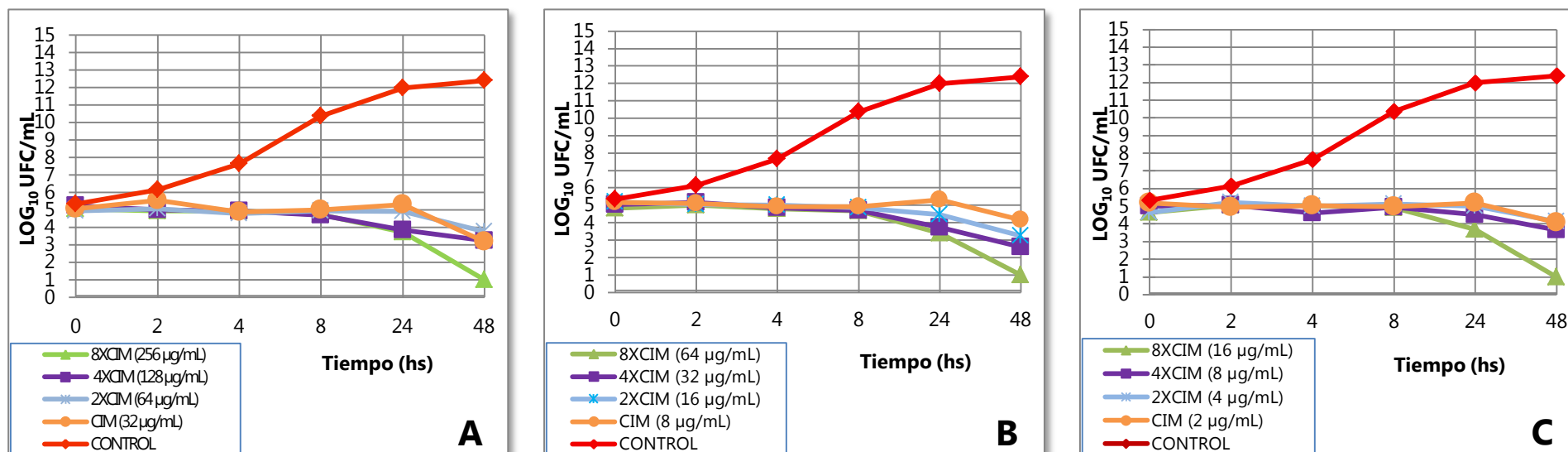
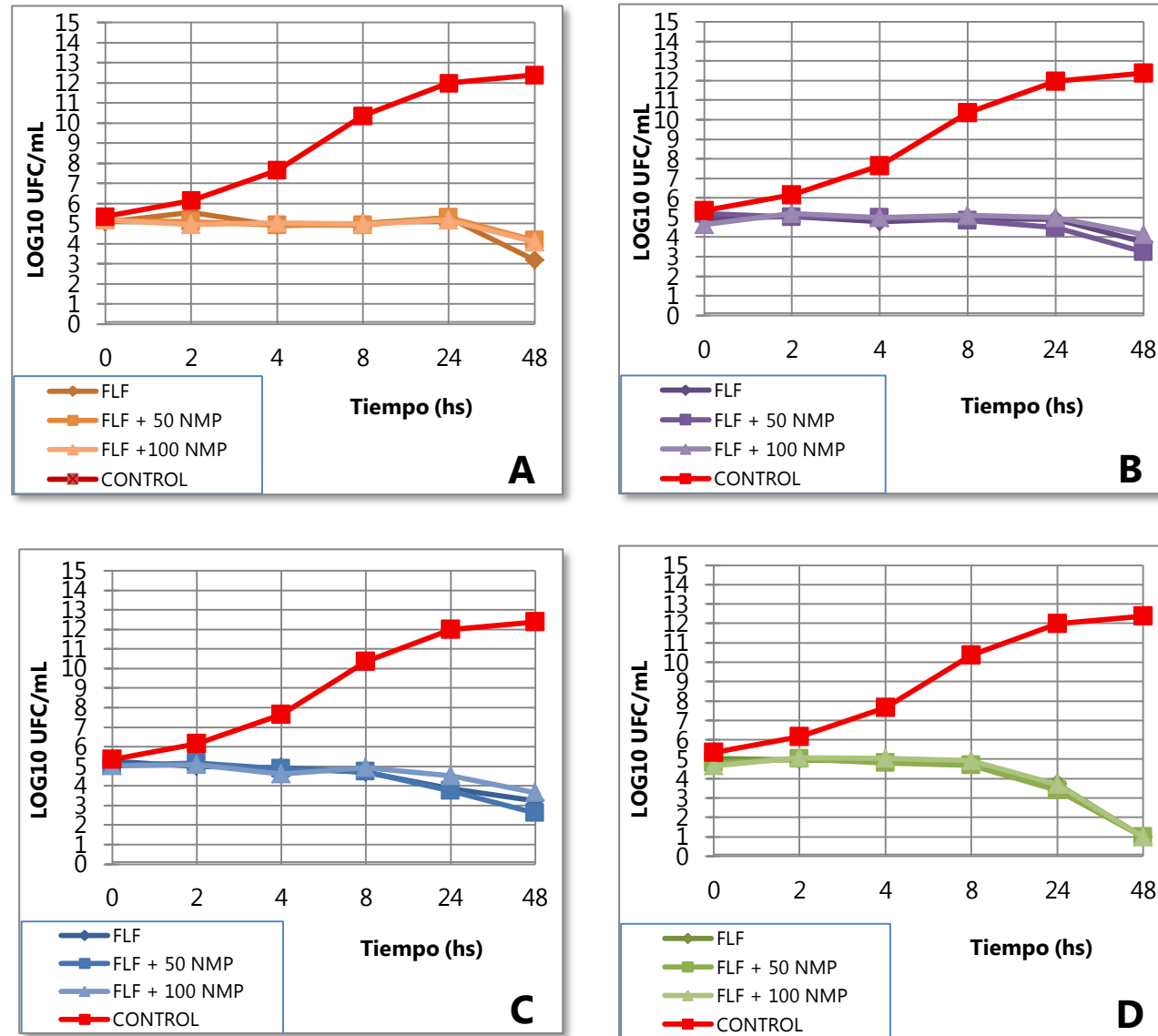


Figura III.27. Curvas de letalidad de la cepa control AG112 (Log UFC/mL), frente a florfenicol a las concentraciones de la CIM, 2, 4, y 8 veces la CIM, A) sin NMP; B) con 50 µg/mL de NMP y C) con 100 µg/mL de NMP



Figuras III.28. Comparación del efecto del uso de NMP en la CLB de la cepa AG112 cuando la concentración de florfenicol es igual; A) CIM; B) 2 x CIM; C) 4 x CIM y D) 8 x CIM

III.5.2.1.2. Cepa control AG100

La cepa AG100 se utilizó como cepa control "wild type".

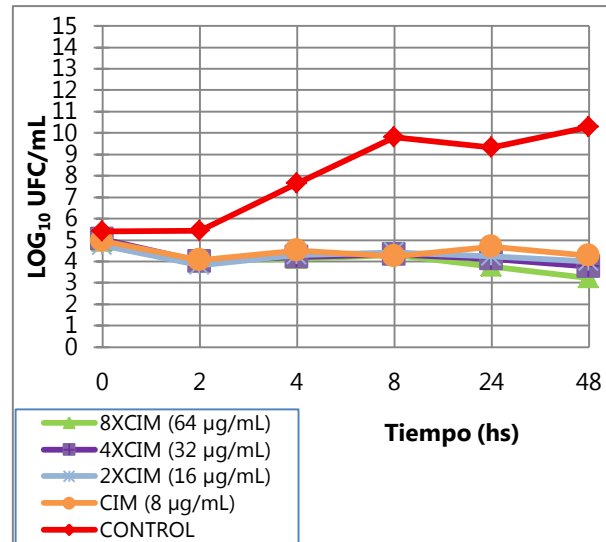


Figura III.29. Letalidad de la cepa control AG100 frente a florfenicol a las concentraciones de la CIM, 2, 4, y 8 veces la CIM sin NMP

III.5.2.1.3. Cepa Vo1-SV

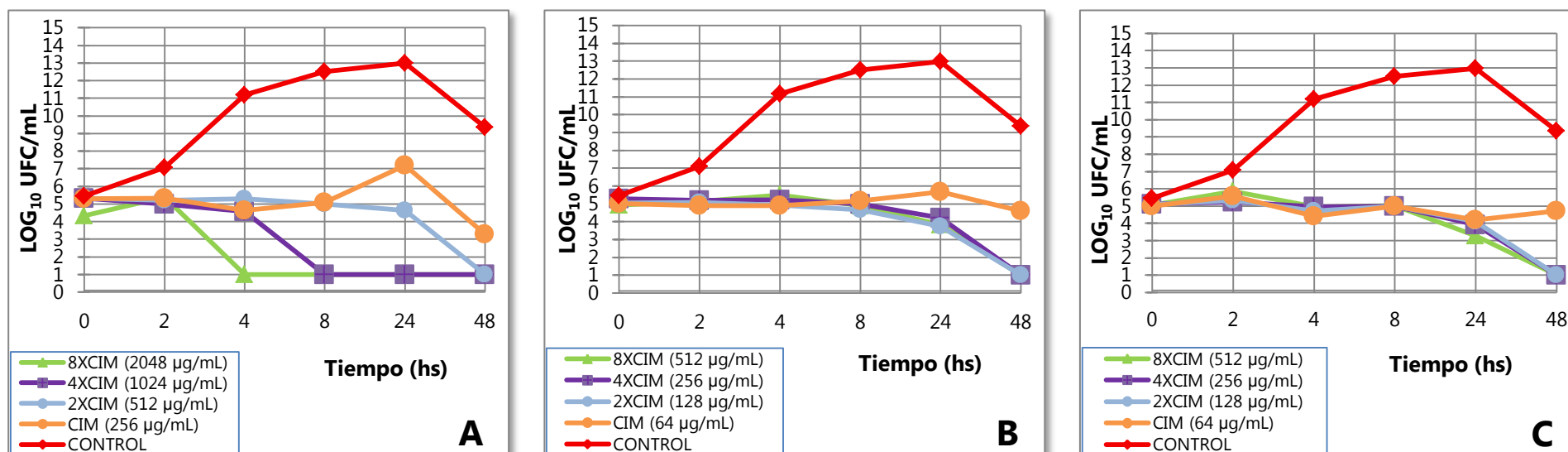
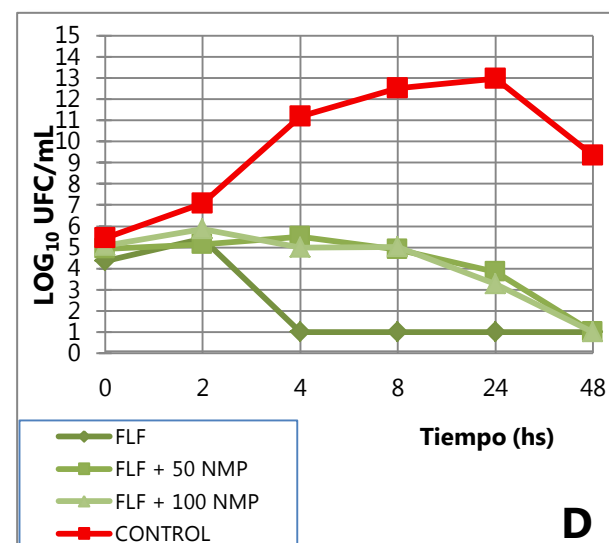
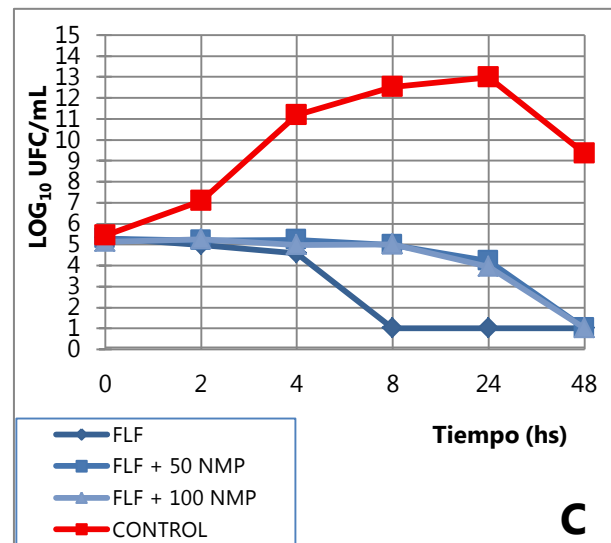
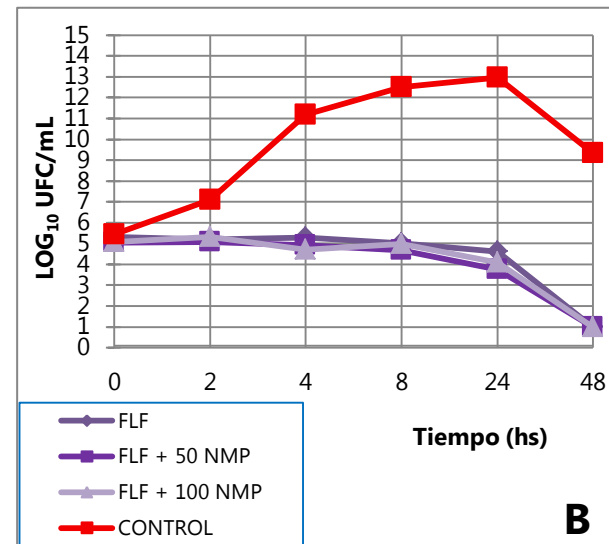
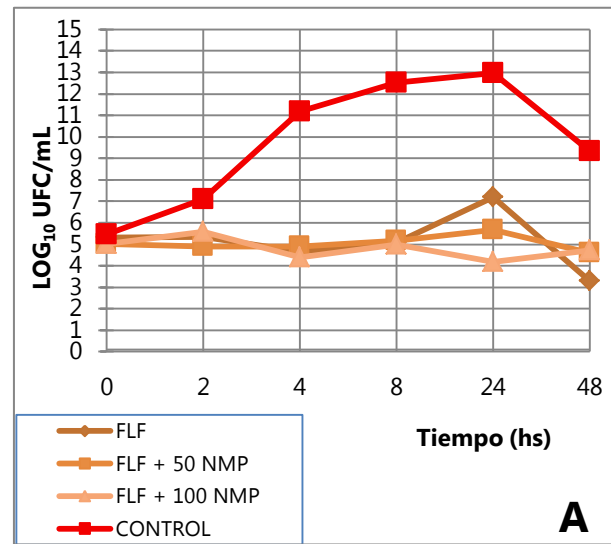


Figura III.30. Letalidad de la cepa Vo1-SV en Log UFC/mL, frente a florfenicol, a las concentraciones de la CIM, 2, 4, y 8 veces la CIM; A) sin NMP; B) con 50 µg/mL de NMP y C) con 100 µg/mL de NMP



Figuras III.31. Comparación del efecto del uso de NMP en la CLB de la cepa Vo1-SV cuando la concentración de florfenicol es igual A) la CIM; B) 2 x CIM; C) 4 x CIM y D) 8 x CIM

III.5.2.1.4. Cepa Vo2-TQ

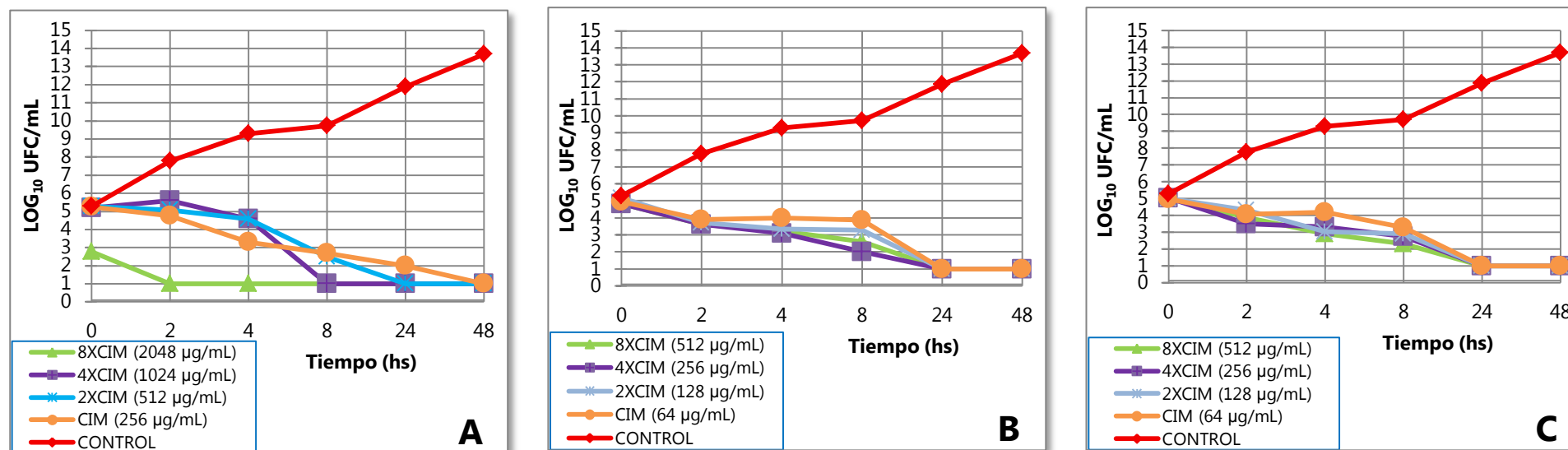
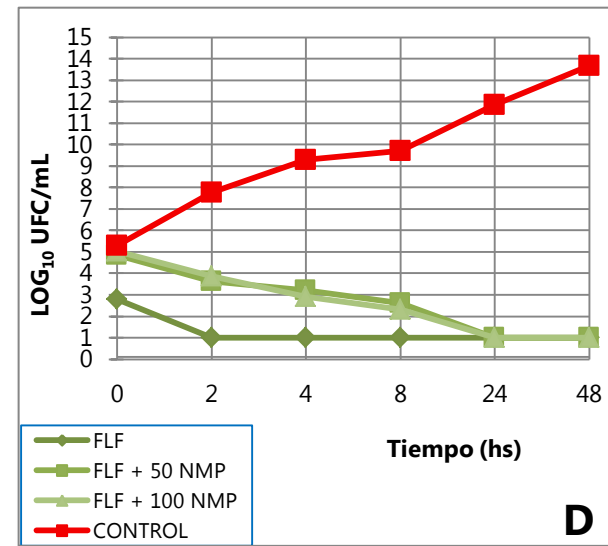
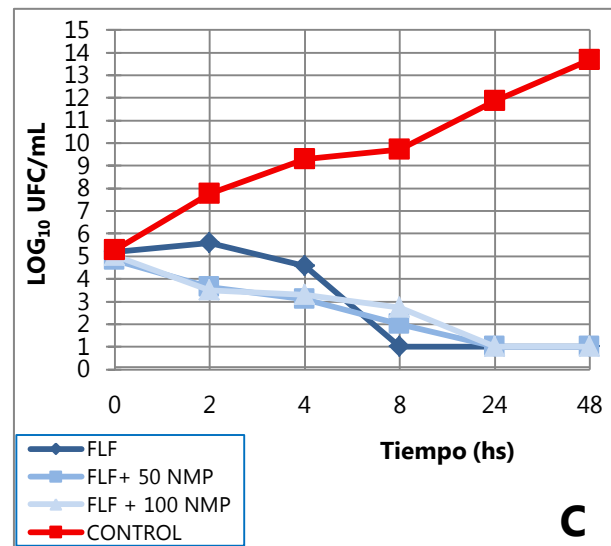
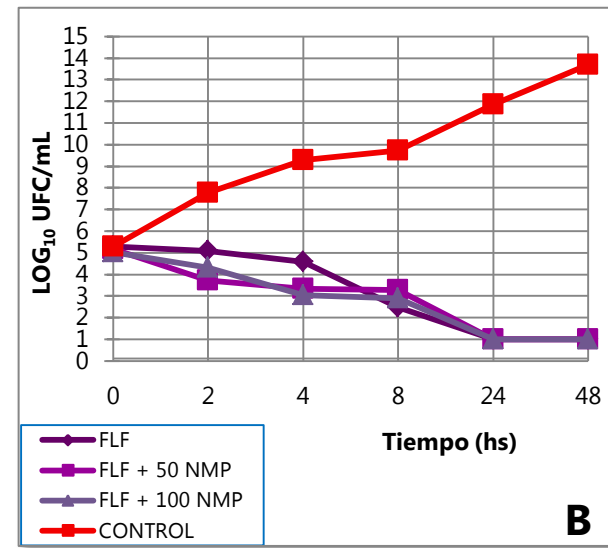
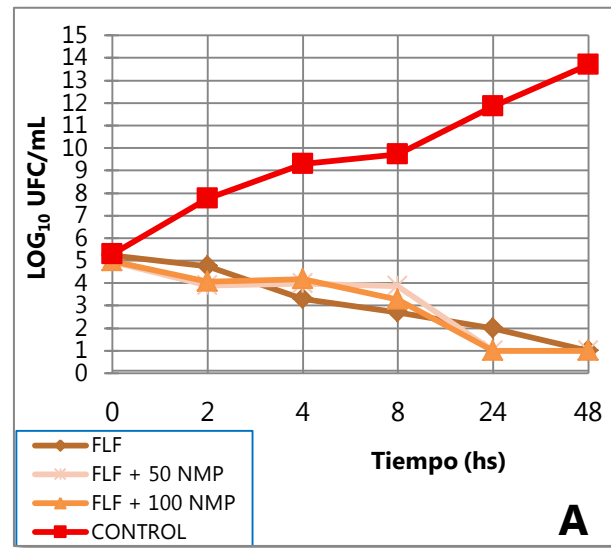


Figura III.32. Letalidad de la cepa Vo2-TQ en Log UFC/mL, frente a florfenicol, a las concentraciones de la CIM, 2, 4, y 8 veces la CIM A) sin NMP; B) con 50 µg/mL de NMP y C) con 100 µg/mL de NMP



Figuras III.33. Comparación del efecto del uso de NMP en la CLB de la cepa Vo2-TQ cuando la concentración de florfenicol es igual A) la CIM; B) 2 veces la CIM; C) 4 veces la CIM y D) 8 veces la CIM

III.5.2.2. Ciprofloxacina

Para ciprofloxacina se evaluaron las cepas de referencia AG112 y AG100 cuyos resultados se presentan en las figuras III.34 y III.36. Las tablas correspondientes a dichos gráficos se encuentran en el Anexo E (Tablas VI.19-21).

Lasas cepas de campo MDR-RC evaluadas fueron Ter1-TQ y Ter2-TQ, la cinética de las curvas de letalidad se presenta en las figuras III.37-40 y en las tablas VI.22-25 del Anexo E.

III.5.2.2.1. Cepa control AG112

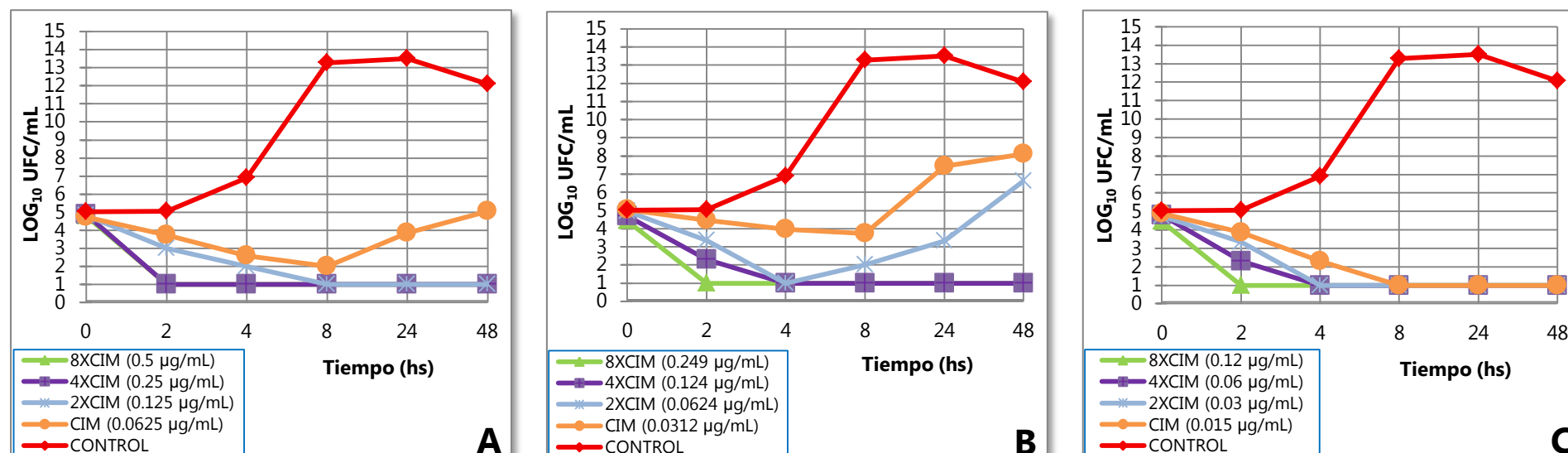
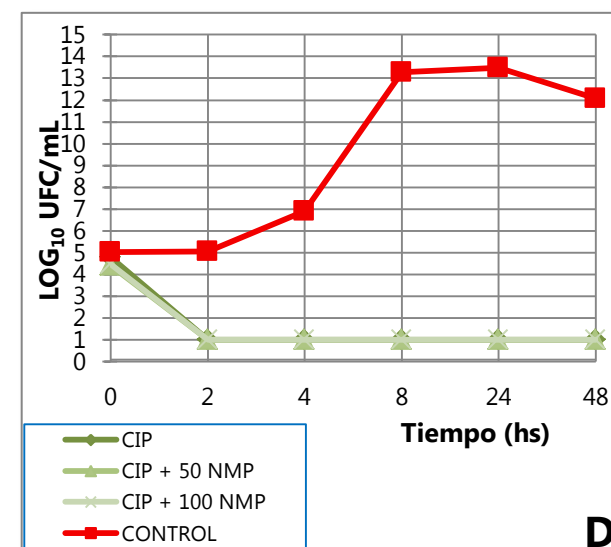
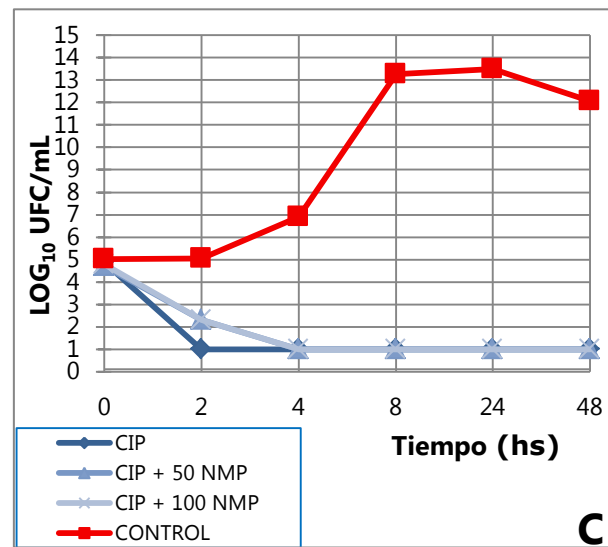
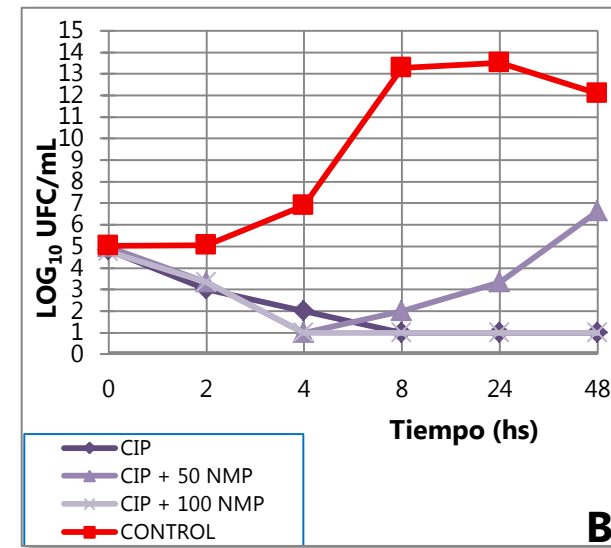
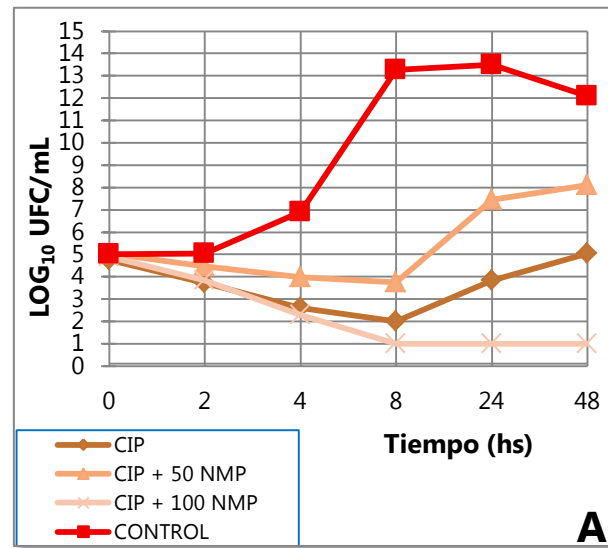


Figura III.34. Letalidad de la cepa AG112 en Log UFC/mL, frente a ciprofloxacina, a las concentraciones de la CIM, 2, 4, y 8 veces la CIM,

A) sin NMP; B) con 50 µg/mL de NMP y C) con 100 µg/mL de NMP



Figuras III.35. Comparación del efecto del uso de NMP en la CLB de la cepa AG112 cuando la concentración de ciprofloxacina es igual A) la CIM; B) 2 x CIM; C) 4 x CIM y D) 8 x CIM

III.5.2.2.2. Cepa AG100

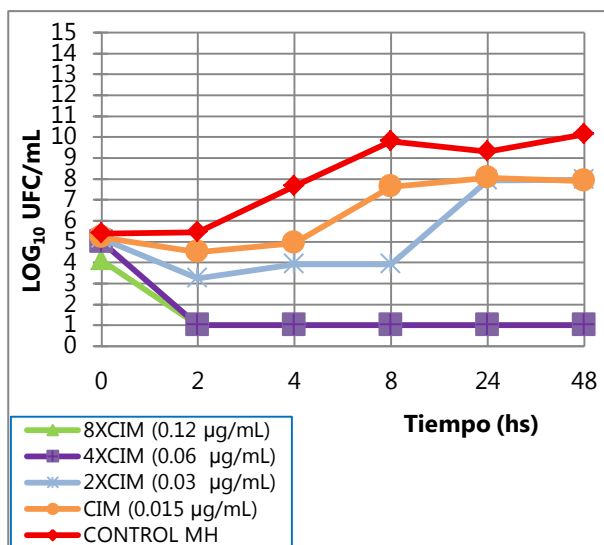


Figura III.36. Gráfico de la curva de letalidad de la cepa control AG100 frente a ciprofloxacina a las concentraciones de la CIM, 2, 4, y 8 veces la CIM sin NMP

III.5.2.2.3. Cepa Ter1-TQ

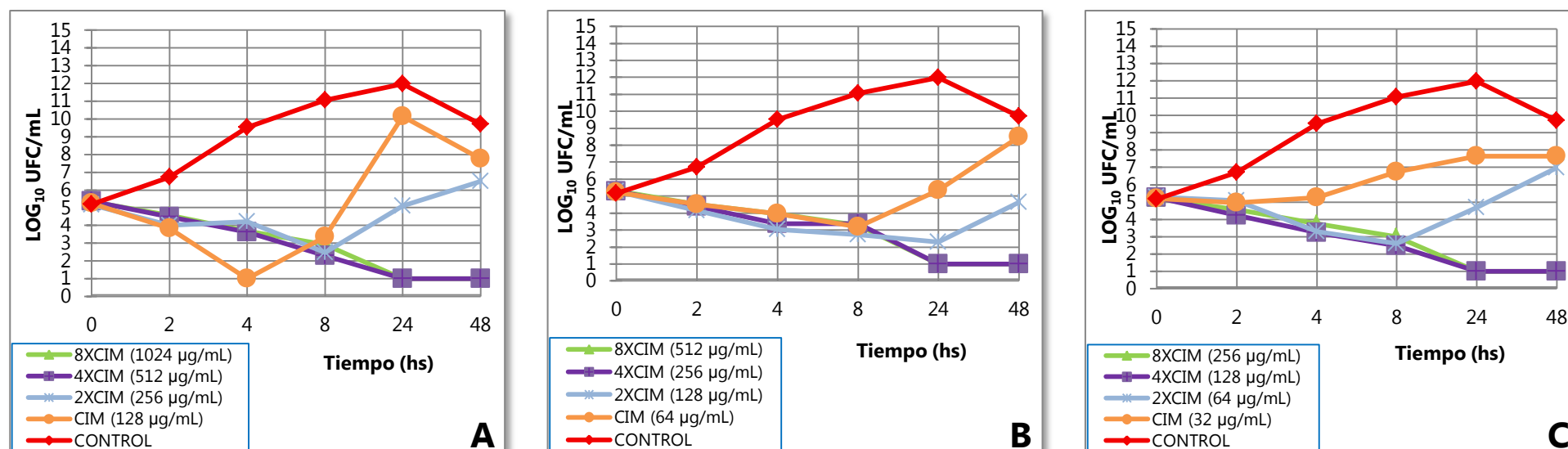
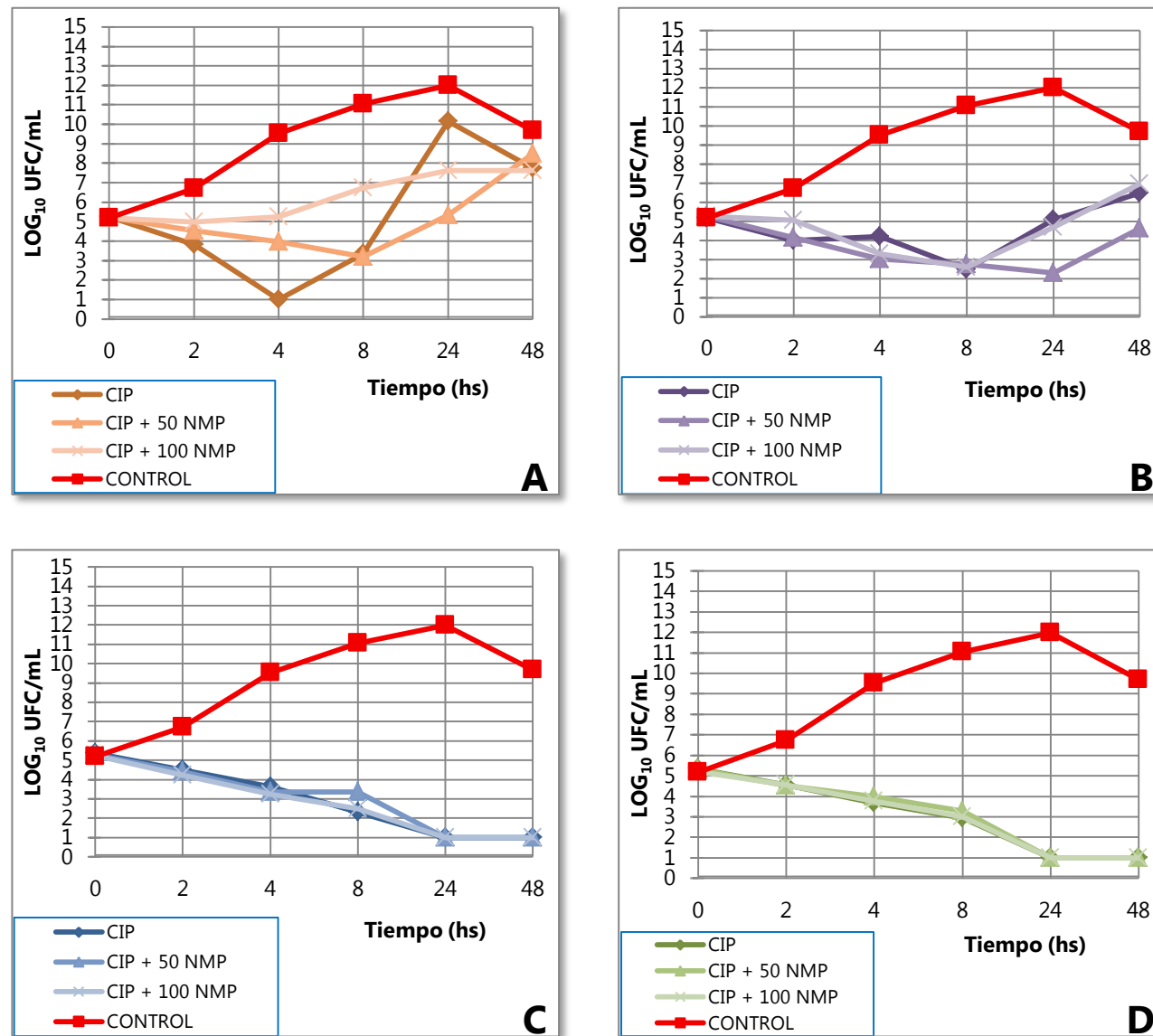


Figura III.37. Letalidad de la cepa Ter1-TQ en Log UFC/mL, frente a ciprofloxacina, a las concentraciones de la CIM, 2, 4, y 8 veces la CIM

A) sin NMP; B) con 50 µg/mL de NMP y C) con 100 µg/mL de NMP



Figuras III.38. Comparación del efecto del uso de NMP en la CLB de la cepa Ter1-TQ cuando la concentración de ciprofloxacina es igual A) la CIM; B) 2 x CIM; C) 4 x CIM y D) 8 x CIM

III.5.2.2.4. Cepa Ter2-TQ

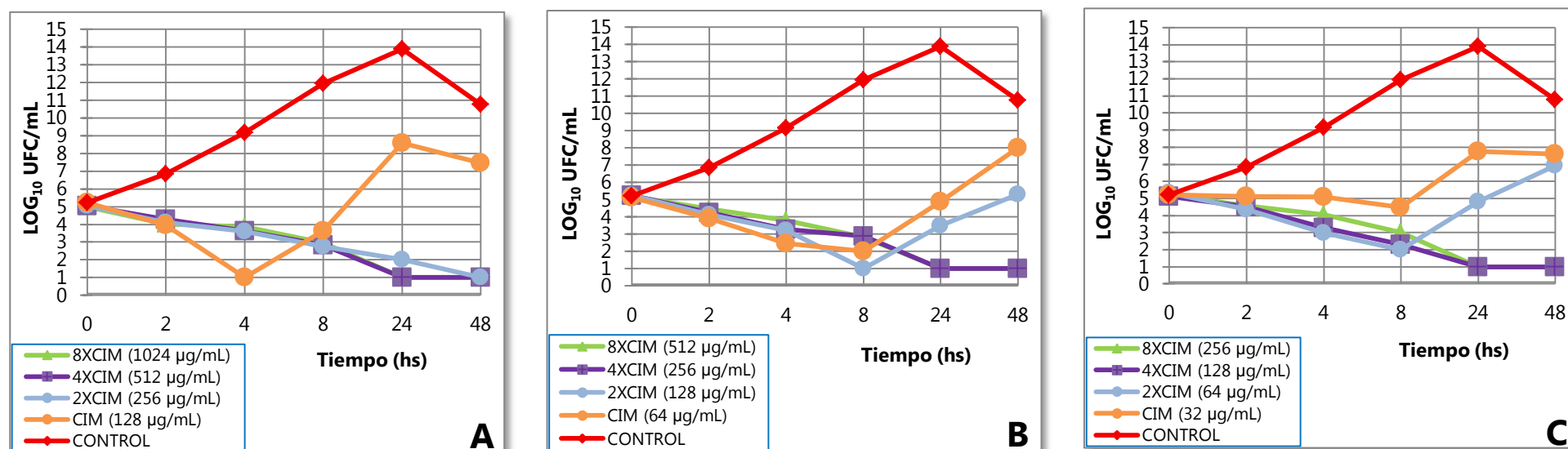
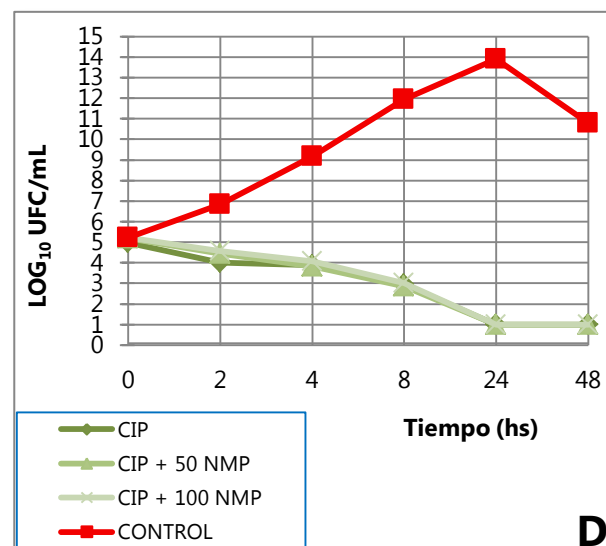
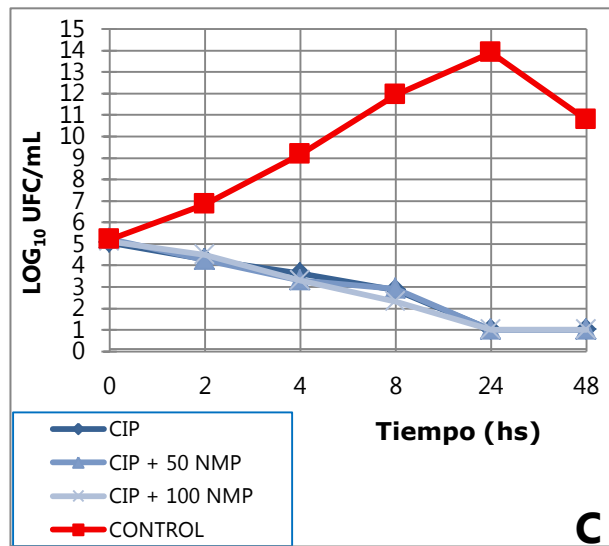
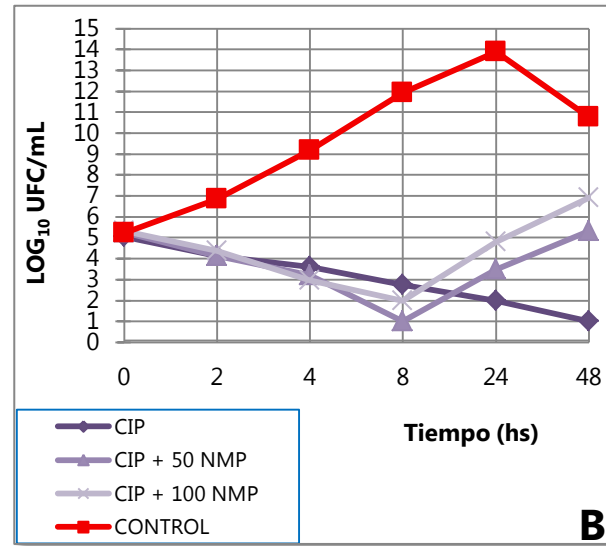
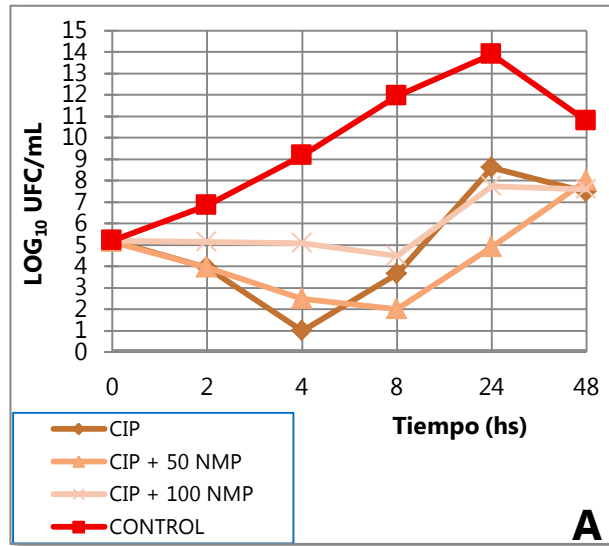


Figura III.39. Gráficos de las curvas de letalidad de la cepa Ter1-TQ en Log UFC/mL, frente a ciprofloxacina, a las concentraciones de la CIM, 2, 4, y 8 veces la CIM A) sin NMP; B) con 50 µg/mL de NMP y C) con 100 µg/mL de NMP



Figuras III.40. Gráficos comparativos del efecto del NMP en la CLB de la cepa Ter2-TQ cuando la concentración de ciprofloxacina es A) la CIM; B) 2 veces la CIM; C) 4 veces la CIM y D) 8 veces la CIM

III.5.2.3. Tetraciclina

Se evaluaron las curvas de muerte de AG112 y AG100 frente a tetraciclina, como cepas de referencia. Los resultados se encuentran graficados en las figuras III.41-43 y en las tablas VI.26-28 del Anexo E.

Como cepas de campo se analizaron Ter1-TQ y Ter2-TQ, ambas con fenotipo MDR-RT. Los resultados obtenidos se presentan en las figuras III.44-47 y en las tablas VI.29-32 del Anexo E.

III.5.2.3.1. Cepa control AG112

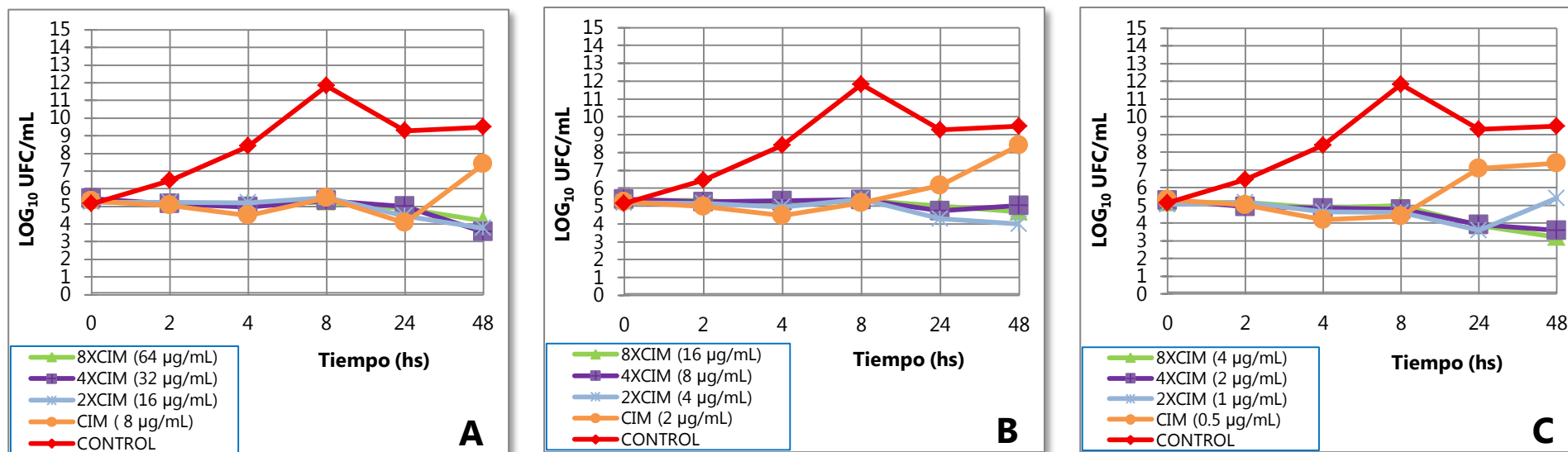
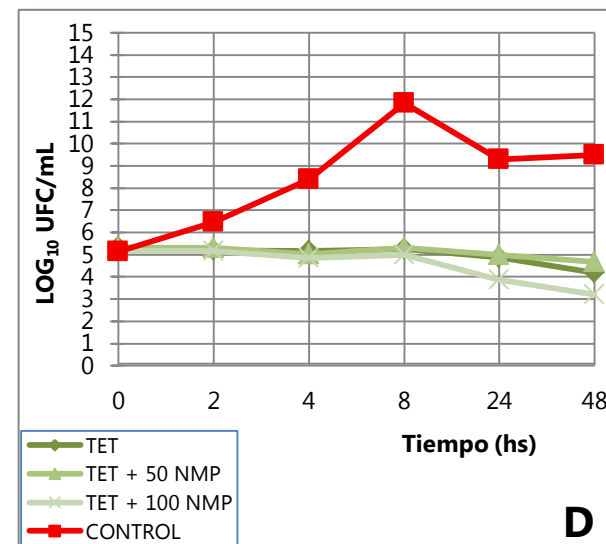
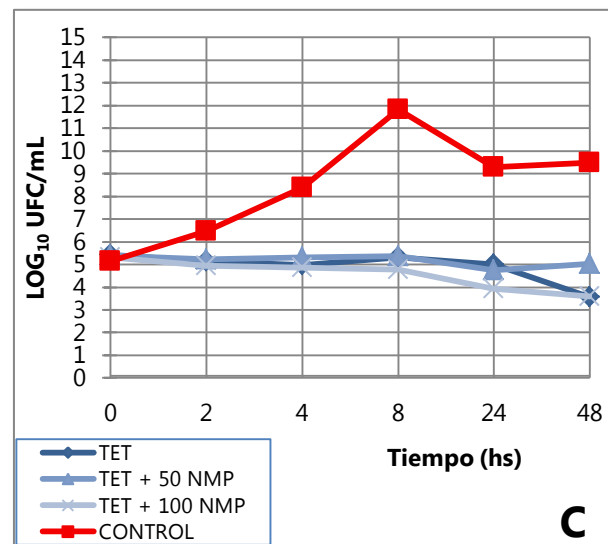
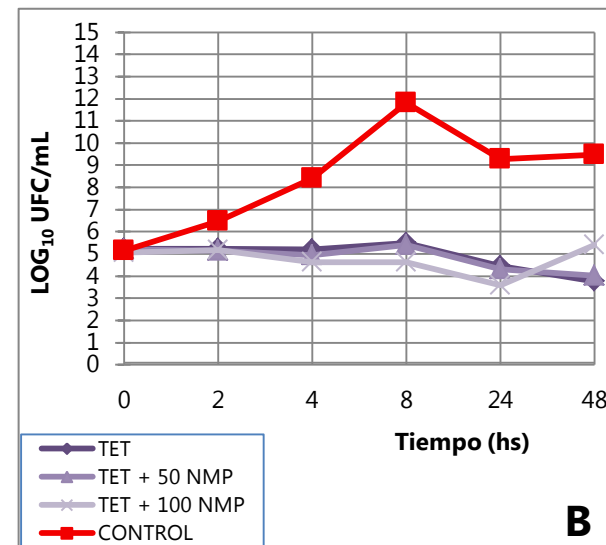
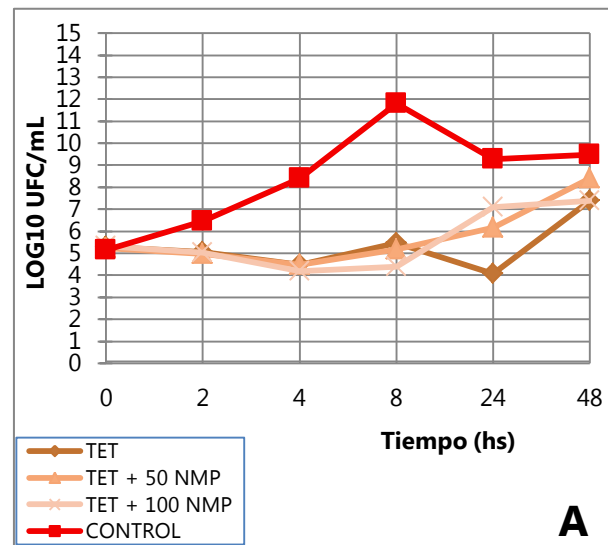


Figura III.41. Letalidad de la cepa AG112 en Log UFC/mL, frente a tetraciclina, a las concentraciones de la CIM, 2, 4, y 8 veces la CIM A) sin NMP; B) con 50 µg/mL de NMP y C) con 100 µg/mL de NMP



Figuras III.42. Comparación del efecto del uso de NMP en la CLB de la cepa AG112 cuando la concentración de tetraciclina es igual A) la CIM; B) 2 x CIM; C) 4 x CIM y D) 8 x CIM

III.5.2.3.2. Cepa AG100

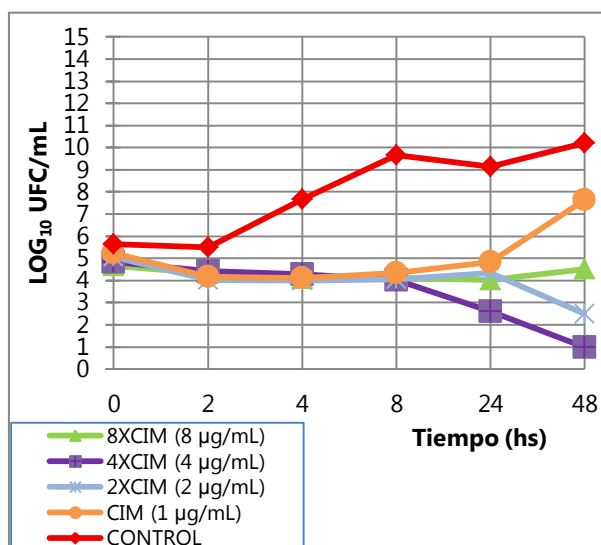


Figura III.43. Letalidad de la cepa control AG100 frente a tetraciclina a las concentraciones de la CIM, 2, 4, y 8 veces la CIM sin NMP

III.5.2.3.3. Cepa Ter2-TQ

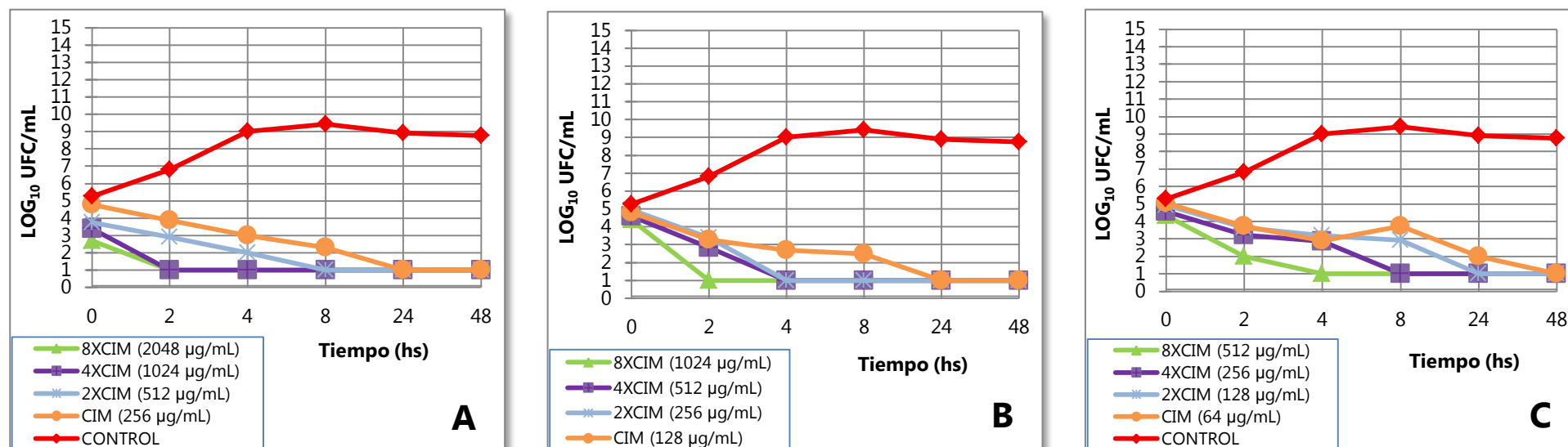
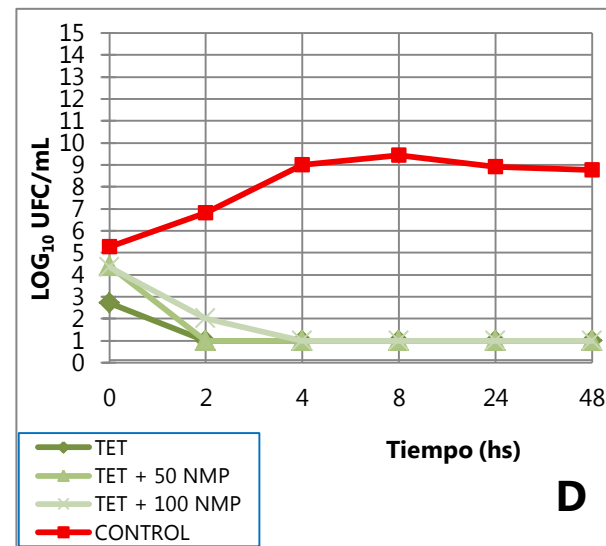
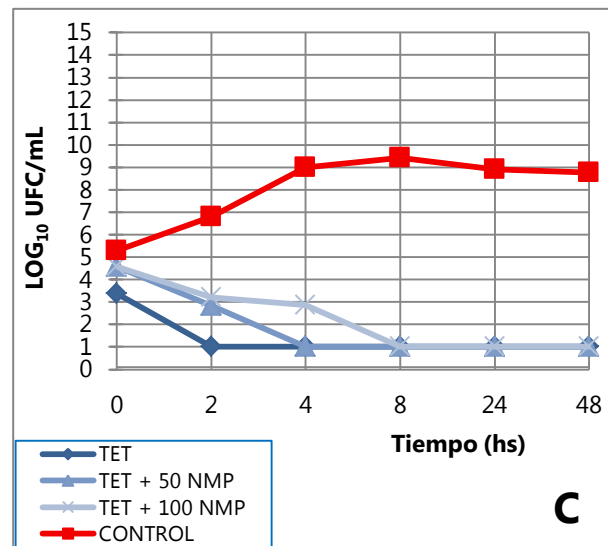
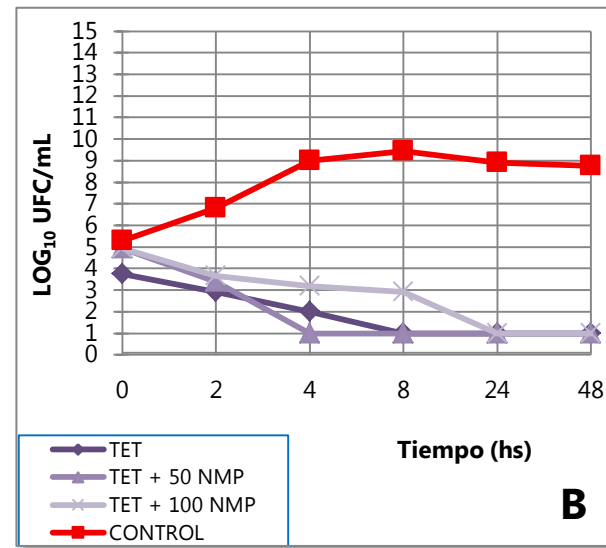
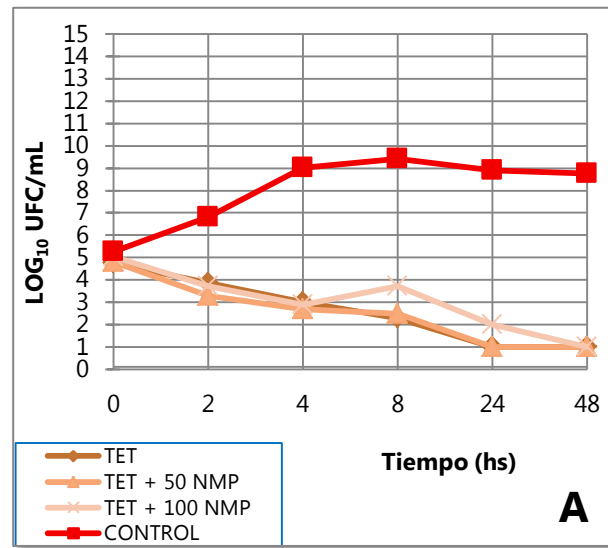


Figura III.44. Letalidad de la cepa Ter2-TQ en Log UFC/mL, frente a tetraciclina, a las concentraciones de la CIM, 2, 4, y 8 veces la CIM A) sin NMP; B) con 50 µg/mL de NMP y C) con 100 µg/mL de NMP



Figuras III.45. Comparación del efecto del uso de NMP en la CLB de la cepa Ter2-TQ cuando la concentración de tetraciclina es igual A) la CIM; B) 2 x CIM; C) 4 x CIM y D) 8 x CIM

III.5.2.3.4. Cepa Ter4-TQ

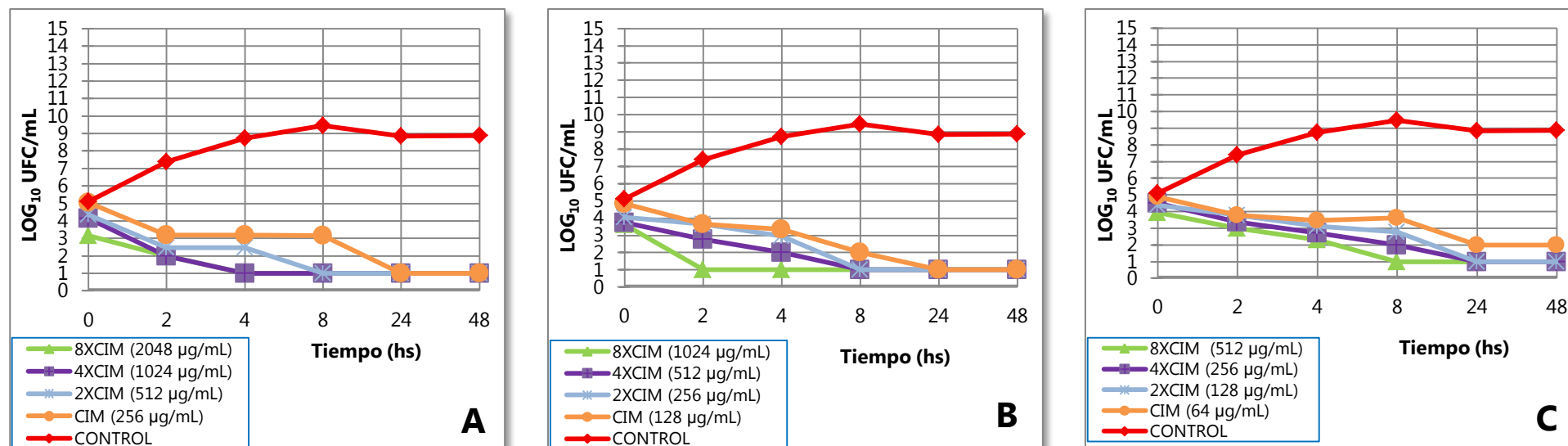


Figura III.46. Letalidad de la cepa Ter4-TQ en Log UFC/mL, frente a tetraciclina, a las concentraciones de la CIM, 2, 4, y 8 veces la CIM A) sin NMP; B) con 50 µg/mL de NMP y C) con 100 µg/mL de NMP

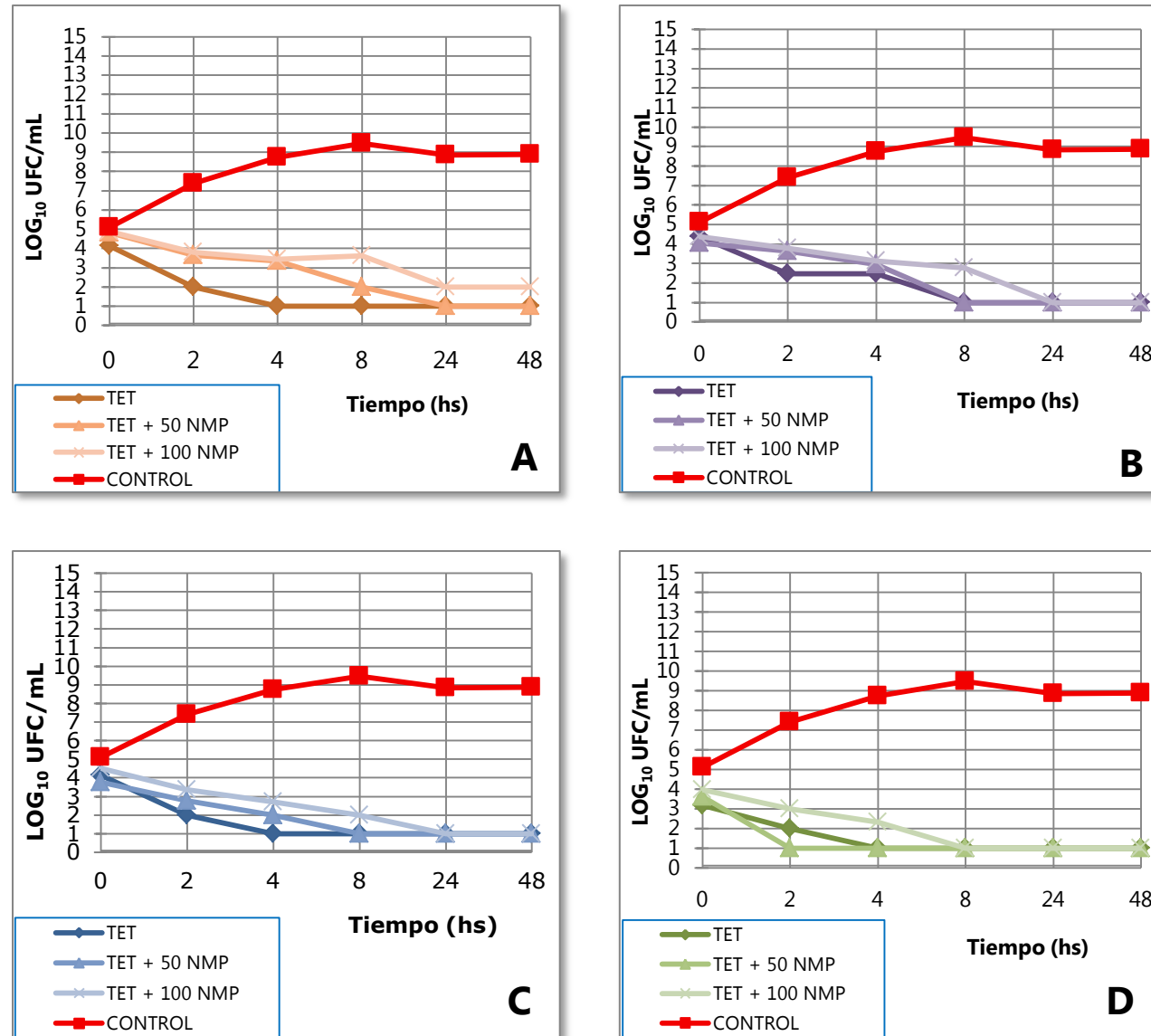


Figura III.47. Comparación del efecto del uso de NMP en la CLB de la cepa Ter4-TQ cuando la concentración de tetraciclina es igual A) la CIM; B) 2 veces la CIM; C) 4 veces la CIM y D) 8 veces la CIM

III.5.2.4. Evaluación cuantitativa del efecto antibacteriano en las CLB

Para cada bacteria y cada antimicrobiano evaluado se calculó el ABC a través del método trapezoidal (10). Se utilizaron como controles las áreas bajo la curva de crecimiento de las 5 cepas de campo MDR analizadas y la cepa control AG112, en medio LB sin antimicrobiano, durante 24 y 48 hs ($ABCC_{24h}$ y $ABCC_{48h}$ log UFC.h/mL, respectivamente), ver tablas III.61-63.

Se determinaron las diferencias obtenidas entre las ABCCs (área bajo la curva control de crecimiento y las ABCs (área bajo la curva de muerte) con los tres antimicrobianos a todas las concentraciones mencionadas, con y sin NMP, para establecer un nuevo parámetro farmacodinámico, establecido por el área comprendida entre ambas curvas, denominado con las siglas $ABBC_{24h}$ y $ABBC_{48h}$ (Log UFC.h/mL), según el tiempo establecido para el análisis (179, 180). Dichos resultados se encuentran en las tablas VI.33-41 del Anexo E.

Posteriormente, se llevó a cabo la división entre las $ABBC_{24h}$ obtenidas y las CIMs correspondientes, a fin de poder comparar el efecto del inhibidor de bombas en combinación con los antimicrobianos a través de un análisis estadístico (Tablas VI.33-41 del Anexo E).

A continuación se presentan tablas con resultados de estos últimos parámetros mencionados.

III.5.2.4.1. Florfenicol

Tabla III.61. Resultados obtenidos de la división de las ABBCs_{24h} y las CIMs con y sin NMP para florfenicol frente a las cepas A) AG112, B) Vo1-SV, C)Vo2-TQ y porcentaje de eficacia

A	ABBC _{24h} :CIM			Eficacia 24h (%)		
	CIM	FLR	FLR+NMP (50 µg/mL)	FLR+NMP (100 µg/mL)	FLR	FLR+NMP (50 µg/mL)
1	3.7	14.8	59.4	47.7	48.3	48.4
2	3.8	15.7	59.6	49.8	51.2	48.6
4	4.1	16.6	63.0	53.9	54.3	51.3
8	4.2	17.1	65.8	54.4	55.8	53.6

B	ABBC _{24h} :CIM			Eficacia 24h (%)		
	CIM	FLR	FLR+NMP (50 µg/mL)	FLR+NMP (100 µg/mL)	FLR	FLR+NMP (50 µg/mL)
1	0.56	2.44	2.65	50.07	54.31	58.99
2	0.64	2.75	2.65	56.86	61.17	59.05
4	0.92	2.61	2.66	81.80	58.24	59.22
8	0.96	2.67	2.72	85.78	59.47	60.48

C	ABBC _{24h} :CIM			Eficacia 24h (%)		
	CIM	FLR	FLR+NMP (50 µg/mL)	FLR+NMP (100 µg/mL)	FLR	FLR+NMP (50 µg/mL)
1	0.68	2.65	2.73	70.40	69.03	71.11
2	0.70	2.78	2.84	72.70	72.38	73.85
4	0.75	3.01	2.88	78.34	78.25	74.92
8	0.84	2.91	2.96	87.91	75.60	76.91

III.5.2.4.2. Ciprofloxacina

Tabla III.62. Resultados obtenidos de la división de las ABBC_{24h} y las CIMs con y sin NMP para ciprofloxacina frente a las cepas A) AG112, B) Ter1-TQ y C) Ter2-TQ porcentaje de eficacia

A	ABBC_{24-CIP}: CIM			Eficacia 24h (%)		
CIM	CIP	CIP+NMP (50 µg/mL)	CIP+NMP (100 µg/mL)	CIP	CIP+NMP (50 µg/mL)	CIP+NMP (100 µg/mL)
1	3313.52	4956.92	16017.00	73.43	54.84	85.19
2	3890.47	6948.26	16377.70	86.22	76.87	87.11
4	4008.00	7949.31	16522.74	88.82	87.94	87.88
8	4010.69	8053.73	16747.92	88.88	89.10	89.08

B	ABBC_{24-CIP}: CIM			Eficacia 24h (%)		
CIM	CIP	CIP+NMP (50 µg/mL)	CIP+NMP (100 µg/mL)	CIP	CIP+NMP (50 µg/mL)	CIP+NMP (100 µg/mL)
1	0.98	2.41	2.98	48.17	59.38	36.67
2	1.28	2.91	5.19	63.03	71.78	63.99
4	1.55	2.95	6.21	76.44	72.74	76.48
8	1.50	2.93	5.97	73.86	72.20	73.59

C	ABBC_{24-CIP}: CIM			Eficacia 24h (%)		
CIM	CIP	CIP+NMP (50 µg/mL)	CIP+NMP (100 µg/mL)	CIP	CIP+NMP (50 µg/mL)	CIP+NMP (100 µg/mL)
1	0.78	2.22	2.60	44.47	62.85	36.86
2	1.20	2.50	4.37	68.04	70.93	61.91
4	1.25	2.50	5.19	70.88	70.95	73.52
8	1.24	2.48	4.88	70.35	70.35	69.19

III.5.2.4.3. Tetraciclina

Tabla III.63. Resultados obtenidos de la división de las ABBCs_{24h} y las CIMs con y sin NMP para tetraciclina frente a las cepas A) AG112, B) Ter2-TQ y C) Ter4-TQ portaje de eficacia

A	ABBC _{24-TET} : CIM			Eficacia 24h (%)		
	CIM	TET	TET+NMP (50µg/mL)	TET+NMP (100µg/mL)	TET	TET+NMP (50µg/mL)
1	14.92	53.10	215.18	50.49	45.13	45.69
2	14.22	58.44	263.02	48.21	49.48	55.44
4	13.97	56.04	253.24	47.38	47.52	53.45
8	14.11	55.68	249.26	47.86	47.23	52.64

B	ABBC _{24-TET} : CIM			Eficacia 24h (%)		
	CIM	TET	TET+NMP (50µg/mL)	TET+NMP (100µg/mL)	TET	TET+NMP (50µg/mL)
1	0.63	1.26	2.17	73.84	74.02	63.72
2	0.71	1.41	2.41	83.06	83.12	70.76
4	0.74	1.43	2.75	86.67	83.92	80.86
8	0.74	1.46	2.89	87.20	85.90	84.95

C	ABBC _{24-TET} : CIM			Eficacia 24h (%)		
	CIM	TET	TET+NMP (50µg/mL)	TET+NMP (100µg/mL)	TET	TET+NMP (50µg/mL)
1	0.60	1.27	2.16	70.11	74.88	63.41
2	0.70	1.37	2.44	82.32	80.71	71.82
4	0.72	1.41	2.60	85.10	83.18	76.37
8	0.73	1.47	2.80	85.85	86.49	82.37

III.5.2.5. Análisis estadístico

Se realizó una estadística descriptiva a partir de los datos obtenidos para la variable farmacodinámica $ABBC_{24}:CIM$, de cada antimicrobiano con y sin NMP frente a las cepas bacterianas correspondientes. El test de Levene fue utilizado para corroborar homogeneidad de los datos, a fin de verificar que entre las medias de las columnas (CIM, 2 x CIM, 4 x CIM y 8 x CIM) no existan diferencias significativas entre sí, pues las diferencias entre los valores no dependen de las concentraciones de la CIM -factor que se extrajo al dividirlo por ABBC-; sino de la incorporación o no de inhibidor de bombas de eflujo. Al no ser significativas las diferencias entre dichas medias, entonces los datos son homogéneos y pueden ser comparadas las variables de las filas (ATB, ATB + 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de NMP y ATB + 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Consecuentemente, se aplicó el análisis paramétrico de la varianza (ANOVA) y a posteriori, contraste para comparaciones múltiples (Test de Tukey-Framer). Los valores de P determinados se presentan a continuación en las tablas III.64-72.

En cuanto a la evaluación de la eficacia antibacteriana, se evaluaron estadísticamente los porcentajes de eficacia con los 3 antimicrobianos con y sin inhibidor en las diferentes cepas. Para lo cual se aplicó ANOVA y posteriormente el Test de Bartlett.

III.5.2.5.1. Florfenicol

Cepa AG112

Para la cepa AG112, en el análisis de ANOVA, el valor de P fue < 0.0001 , es decir, que las diferencias halladas entre las medias de las muestras con florfenicol solo, con el agregado de 50 $\mu\text{g/mL}$ y con 100 $\mu\text{g/mL}$ de NMP, fueron extremadamente significativas.

Se realizó a posteriori el Test de Tukey-Kramer, cuyos resultados se presentan a continuación en la tabla III.64 y en la tabla VI.42 del Anexo E.

Tabla III.64. Valores de probabilidad determinados aplicando el Test de Tukey-Kramer para la comparación estadística de los parámetros farmacodinámicos ($\text{ABBC}_{0-24}:\text{CIM}$) de florfenicol con y sin NMP frente a la cepa AG112

Comparación	Valor de P
$\text{ABBC}_{\text{FLR}}:\text{CIM}$ vs $\text{ABBC}_{\text{FLR}+50 \text{ NMP}}:\text{CIM}$	$P < 0.001$
$\text{ABBC}_{\text{FLR}}:\text{CIM}$ vs $\text{ABBC}_{\text{FLR}+100 \text{ NMP}}:\text{CIM}$	$P < 0.001$
$\text{ABBC}_{\text{FLR}+50 \text{ NMP}}:\text{CIM}$ vs $\text{ABBC}_{\text{FLR}+100 \text{ NMP}}:\text{CIM}$	$P < 0.001$

Si el valor de q es mayor a 4.339, entonces P es menor a 0.05.

La evaluación estadística de los porcentajes para el cálculo de la eficacia total antibacteriana (ETA) de florfenicol, no arrojó diferencias significativas ($P = 0.2482$) entre los resultados obtenidos sin NMP y con 50 $\mu\text{g/mL}$ y 100 $\mu\text{g/mL}$ del inhibidor, con la cepa AG112.

Cepa Vo1-SV

Para la cepa Vo1-SV, el análisis de ANOVA arrojó un valor de P de < 0.0001 , es decir, que las diferencias halladas entre las medias de las muestras con florfenicol solo, con el agregado de 50 $\mu\text{g/mL}$ y con 100 $\mu\text{g/mL}$ de NMP, fueron extremadamente significativas.

Se realizó a continuación el Test de Tukey-Kramer, cuyos resultados se pueden observar a continuación en tabla III.65 y en Anexo E, tabla VI.43.

Tabla III.65. Valores de probabilidad determinados aplicando el Test de Tukey-Kramer para la comparación estadística de los parámetros farmacodinámicos ($\text{ABBC}_{0-24}:\text{CIM}$) de florfenicol con y sin NMP frente a la cepa Vo1-SV

Comparación	Valor de P
$\text{ABBC}_{\text{FLR}}:\text{CIM}$ vs $\text{ABBC}_{\text{FLR}+50 \text{ NMP}}:\text{CIM}$	$P < 0.001$
$\text{ABBC}_{\text{FLR}}:\text{CIM}$ vs $\text{ABBC}_{\text{FLR}+100 \text{ NMP}}:\text{CIM}$	$P < 0.001$
$\text{ABBC}_{\text{FLR}+50 \text{ NMP}}:\text{CIM}$ vs $\text{ABBC}_{\text{FLR}+100 \text{ NMP}}:\text{CIM}$	$P > 0.05$ (NS)

Si el valor de q es mayor a 3.949, entonces P es menor a 0.05.

La evaluación estadística de los porcentajes para el cálculo de la eficacia total antibacteriana (ETA) de florfenicol, no arrojó diferencias significativas ($P = 0.3502$) entre los resultados obtenidos sin NMP y con 50 $\mu\text{g/mL}$ y 100 $\mu\text{g/mL}$ del inhibidor, con la cepa Vo1-SV.

Cepa Vo2-TQ

Para la cepa Vo2-TQ, el análisis de ANOVA arrojó un valor de P de < 0.0001 , es decir, que las diferencias halladas entre las medias de las muestras con florfenicol solo, con el agregado de 50 $\mu\text{g/mL}$ y con 100 $\mu\text{g/mL}$ de NMP, fueron extremadamente significativas.

Se realizó a continuación el Test de Tukey-Kramer, cuyos resultados se pueden observar a continuación en tabla III.66 y en Anexo E, tabla VI.44.

Tabla III.66. Valores de probabilidad determinados aplicando el Test de Tukey-Kramer para la comparación estadística de los parámetros PDs ($\text{ABBC}_{0-24}:\text{CIM}$) de florfenicol con y sin NMP frente a la cepa Vo2-TQ

Comparación	Valor de P
$\text{ABBC}_{\text{FLR}}:\text{CIM}$ vs $\text{ABBC}_{\text{FLR}+50 \text{ NMP}}:\text{CIM}$	$P < 0.001$
$\text{ABBC}_{\text{FLR}}:\text{CIM}$ vs $\text{ABBC}_{\text{FLR}+100 \text{ NMP}}:\text{CIM}$	$P < 0.001$
$\text{ABBC}_{\text{FLR}+50 \text{ NMP}}:\text{CIM}$ vs $\text{ABBC}_{\text{FLR}+100 \text{ NMP}}:\text{CIM}$	$P > 0.05$ (NS)

Si el valor de q es mayor a 3.949, entonces P es menor a 0.05.

La evaluación estadística de los porcentajes para el cálculo de la eficacia total antibacteriana (ETA) de florfenicol, no arrojó diferencias significativas ($P = 0.5990$) entre los resultados obtenidos sin NMP y con 50 $\mu\text{g/mL}$ y 100 $\mu\text{g/mL}$ del inhibidor, con la cepa Vo2-TQ.

III.5.2.5.2. Ciprofloxacina

Cepa AG112

Para la cepa AG112, en el análisis de ANOVA, el valor de P fue < 0.0001 , es decir, que las diferencias halladas entre las medias de las muestras con ciprofloxacina sola, con el agregado de 50 $\mu\text{g/mL}$ y con 100 $\mu\text{g/mL}$ de NMP, fueron extremadamente significativas.

Se realizó a posteriori el Test de Tukey-Kramer, ver resultados a continuación en la tabla III.67 y en la tabla VI.45 del Anexo E.

Tabla III.67. Valores de probabilidad determinados aplicando el Test de Tukey-Kramer para la comparación estadística de los parámetros PDs ($\text{ABBC}_{0-24:\text{CIM}}$) de ciprofloxacina con y sin NMP frente a la cepa AG112

Comparación	Valor de P
$\text{ABBC}_{\text{CIP}:\text{CIM}}$ vs $\text{ABBC}_{\text{CIP}+50 \text{ NMP}:\text{CIM}}$	$P < 0.01$
$\text{ABBC}_{\text{CIP}:\text{CIM}}$ vs $\text{ABBC}_{\text{CIP}+100 \text{ NMP}:\text{CIM}}$	$P < 0.001$
$\text{ABBC}_{\text{CIP}+50 \text{ NMP}:\text{CIM}}$ vs $\text{ABBC}_{\text{CIP}+100 \text{ NMP}:\text{CIM}}$	$P < 0.001$

Si el valor de q es mayor a 3.949, entonces P es menor a 0.05.

La evaluación estadística de los porcentajes para el cálculo de la eficacia total antibacteriana (ETA) de ciprofloxacina, no arrojó diferencias significativas ($P 0.3890$) entre los resultados obtenidos sin NMP y con 50 $\mu\text{g/mL}$ y 100 $\mu\text{g/mL}$ del inhibidor, con la cepa AG112.

Cepa Ter1-TQ

Para la cepa Ter1-TQ, en el análisis de ANOVA, el valor de P fue < 0.0006 , es decir, que las diferencias halladas entre las medias de las muestras con ciprofloxacina sola, con el agregado de 50 $\mu\text{g/mL}$ y con 100 $\mu\text{g/mL}$ de NMP, fueron extremadamente significativas.

Se realizó a posteriori el Test de Tukey-Kramer, ver resultados a continuación en la tabla III.68 y en la tabla VI.46 del Anexo E.

Tabla III.68. Valores de probabilidad determinados aplicando el Test de Tukey-Kramer para la comparación estadística de los parámetros PDs ($\text{ABBC}_{0-24}:\text{CIM}$) de ciprofloxacina con y sin NMP frente a la cepa Ter1-TQ

Comparación	Valor de P
$\text{ABBC}_{\text{CIP}}:\text{CIM}$ vs $\text{ABBC}_{\text{CIP}+50 \text{ NMP}}:\text{CIM}$	$P > 0.05$ (NS)
$\text{ABBC}_{\text{CIP}}:\text{CIM}$ vs $\text{ABBC}_{\text{CIP}+100 \text{ NMP}}:\text{CIM}$	$P < 0.001$
$\text{ABBC}_{\text{CIP}+50 \text{ NMP}}:\text{CIM}$ vs $\text{ABBC}_{\text{CIP}+100 \text{ NMP}}:\text{CIM}$	$P < 0.05$

Si el valor de q es mayor a 3.949, entonces P es menor a 0.05.

La evaluación estadística de los porcentajes para el cálculo de la eficacia total antibacteriana (ETA) de ciprofloxacina, no arrojó diferencias significativas ($P 0.8015$) entre los resultados obtenidos sin NMP y con 50 $\mu\text{g/mL}$ y 100 $\mu\text{g/mL}$ del inhibidor, con la cepa Ter1-TQ.

Cepa Ter2-TQ

Para la cepa Ter2-TQ, en el análisis de ANOVA, el valor de P fue < 0.0004 , es decir, que las diferencias halladas entre las medias de las muestras con ciprofloxacina sola, con el agregado de 50 $\mu\text{g/mL}$ y con 100 $\mu\text{g/mL}$ de NMP, fueron extremadamente significativas.

Se realizó a posteriori el Test de Tukey-Kramer, ver resultados a continuación en la tabla III.69 y en la tabla VI.47 del Anexo E.

Tabla III.69. Valores de probabilidad determinados aplicando el Test de Tukey-Kramer para la comparación estadística de los parámetros PDs ($\text{ABBC}_{0-24}:\text{CIM}$) de ciprofloxacina con y sin NMP frente a la cepa Ter2TQ

Comparación	Valor de P
$\text{ABBC}_{\text{CIP}}:\text{CIM}$ vs $\text{ABBC}_{\text{CIP}+50 \text{ NMP}}:\text{CIM}$	$P > 0.05$ (NS)
$\text{ABBC}_{\text{CIP}}:\text{CIM}$ vs $\text{ABBC}_{\text{CIP}+100 \text{ NMP}}:\text{CIM}$	$P < 0.001$
$\text{ABBC}_{\text{CIP}+50 \text{ NMP}}:\text{CIM}$ vs $\text{ABBC}_{\text{CIP}+100 \text{ NMP}}:\text{CIM}$	$P < 0.05$

Si el valor de q es mayor a 3.949, entonces P es menor a 0.05.

La evaluación estadística de los porcentajes para el cálculo de la eficacia total antibacteriana (ETA) de ciprofloxacina, no arrojó diferencias significativas ($P 0.6300$) entre los resultados obtenidos sin NMP y con 50 $\mu\text{g/mL}$ y 100 $\mu\text{g/mL}$ del inhibidor, con la cepa Ter2-TQ.

III.5.2.5.3. Tetraciclina

Cepa AG112

Para la cepa AG112, en el análisis de ANOVA, el valor de P fue < 0.0001 , es decir, que las diferencias halladas entre las medias de las muestras con tetraciclina sola, con el agregado de 50 $\mu\text{g/mL}$ y con 100 $\mu\text{g/mL}$ de NMP, fueron extremadamente significativas.

Se realizó a posteriori el Test de Tukey-Kramer, ver resultados en la tabla III.70 y en la tabla VI.48 del Anexo E.

Tabla III.70. Valores de probabilidad determinados aplicando el Test de Tukey-Kramer para la comparación estadística de los parámetros PDs ($\text{ABBC}_{0-24}:\text{CIM}$) de tetraciclina con y sin NMP frente a la cepa AG112

Comparación	Valor de P
$\text{ABBC}_{\text{TET}}:\text{CIM}$ vs $\text{ABBC}_{\text{TET}+50 \text{ NMP}}:\text{CIM}$	$P > 0.01$
$\text{ABBC}_{\text{TET}}:\text{CIM}$ vs $\text{ABBC}_{\text{TET}+100 \text{ NMP}}:\text{CIM}$	$P < 0.001$
$\text{ABBC}_{\text{TET}+50 \text{ NMP}}:\text{CIM}$ vs $\text{ABBC}_{\text{TET}+100 \text{ NMP}}:\text{CIM}$	$P < 0.001$

Si el valor de q es mayor a 3.949, entonces P es menor a 0.05

La evaluación estadística de los porcentajes para el cálculo de la eficacia total antibacteriana (ETA) de tetraciclina, no arrojó diferencias significativas ($P 0.1136$) entre los resultados obtenidos sin NMP y con 50 $\mu\text{g/mL}$ y 100 $\mu\text{g/mL}$ del inhibidor, con la cepa AG112.

Cepa Ter2-TQ

Para la cepa Ter2-TQ, en el análisis de ANOVA, el valor de P fue < 0.0001 , es decir, que las diferencias halladas entre las medias de las muestras con tetraciclina sola, con el agregado de 50 $\mu\text{g/mL}$ y con 100 $\mu\text{g/mL}$ de NMP, fueron extremadamente significativas.

Se realizó a posteriori el Test de Tukey-Kramer, ver resultados en la tabla III.71 y en la tabla VI.49 del Anexo E.

Tabla III.71. Valores de probabilidad determinados aplicando el Test de Tukey-Kramer para la comparación estadística de los parámetros PDs($\text{ABBC}_{0-24}:\text{CIM}$) de tetraciclina con y sin NMP frente a la cepa Ter2-TQ

Comparación	Valor de P
$\text{ABBC}_{\text{TET}}:\text{CIM}$ vs $\text{ABBC}_{\text{TET}+50 \text{ NMP}}:\text{CIM}$	P<0.01
$\text{ABBC}_{\text{TET}}:\text{CIM}$ vs $\text{ABBC}_{\text{TET}+100 \text{ NMP}}:\text{CIM}$	P<0.001
$\text{ABBC}_{\text{TET}+50 \text{ NMP}}:\text{CIM}$ vs $\text{ABBC}_{\text{TET}+100 \text{ NMP}}:\text{CIM}$	P<0.001

Si el valor de q es mayor a 3.949, entonces P es menor a 0.05.

La evaluación estadística de los porcentajes para el cálculo de la eficacia total antibacteriana (ETA) de tetraciclina, no arrojó diferencias significativas (P 0.3188) entre los resultados obtenidos sin NMP y con 50 $\mu\text{g/mL}$ y 100 $\mu\text{g/mL}$ del inhibidor, con la cepa Ter2-TQ.

Cepa Ter4-TQ

Para la cepa Ter4-TQ, en el análisis de ANOVA, el valor de P fue < 0.0001 , es decir, que las diferencias halladas entre las medias de las muestras con tetraciclina sola, con el agregado de 50 $\mu\text{g/mL}$ y con 100 $\mu\text{g/mL}$ de NMP, fueron extremadamente significativas.

Se realizó a posteriori el Test de Tukey-Kramer, ver resultados en la tabla III.72 y en la tabla VI.50 del Anexo E.

Tabla III.72. Valores de probabilidad determinados aplicando el Test de Tukey-Kramer para la comparación estadística de los parámetros PDs ($\text{ABBC}_{0-24:\text{CIM}}$) de tetraciclina con y sin NMP frente a la cepa Ter4-TQ

Comparación	Valor de P
$\text{ABBC}_{\text{TET}:\text{CIM}}$ vs $\text{ABBC}_{\text{TET}+50 \text{ NMP}:\text{CIM}}$	$P < 0.001$
$\text{ABBC}_{\text{TET}:\text{CIM}}$ vs $\text{ABBC}_{\text{TET}+100 \text{ NMP}:\text{CIM}}$	$P < 0.001$
$\text{ABBC}_{\text{TET}+50 \text{ NMP}:\text{CIM}}$ vs $\text{ABBC}_{\text{TET}+100 \text{ NMP}:\text{CIM}}$	$P < 0.001$

Si el valor de q es mayor a 3.949, entonces P es menor a 0.05.

La evaluación estadística de los porcentajes para el cálculo de la eficacia total antibacteriana (ETA) de tetraciclina, no arrojó diferencias significativas ($P = 0.2482$) entre los resultados obtenidos sin NMP y con 50 $\mu\text{g/mL}$ y 100 $\mu\text{g/mL}$ del inhibidor, con la cepa Ter4-TQ.

III.6. Modelización farmacocinética – farmacodinámica

III.6.1. Estudios farmacocinéticos

III.6.1.1. Procedimiento analítico

III.6.1.1.2. Validación de las técnicas analíticas para cuantificar florfenicol, tetraciclina y ciprofloxacina en plasma

Las curvas de calibración de los estándares en plasma fueron caracterizadas por su pendiente, intersección y coeficiente de correlación. A partir de las rectas de calibración, se determinó la precisión del método. Los resultados del análisis de regresión de los datos, variabilidad intradía, interdía, LOQ y LOD para los tres antimicrobianos; se encuentran en la tabla VI.51 del Anexo E.

III.6.1.1.3. Cuantificación de florfenicol, danofloxacina y oxitetraciclina en plasma bovino

Las concentraciones obtenidas en el plasma de los animales tratados en los tres ensayos, tras la administración de cada uno de los antimicrobianos se presentan en las tablas VI.52-54 del Anexo E.

Los parámetros farmacocinéticos de importancia para la integración PK/PD obtenidos para cada antimicrobiano se presentan a continuación en la tabla III.64.

Tabla III.64. Parámetros farmacocinéticos en plasma obtenidos tras la administración parenteral de florfenicol, oxitetraciclina y danofloxacin en bovinos

ATM	Parámetros (unidad)	MEDIA	DS
FLR (n=6)	C_{max} (µg/mL)	6.73	0.92
	T_{max} (h)	5.33	2.07
	AUC₀₋₂₄ (µg.h/mL)	9.68	1.92
	TMR (h)	12.81	3.16
OTC (n=12)	C_{max} (µg/mL)	8.73	3.66
	T_{max} (h)	3.58	0.9
	AUC₀₋₂₄ (µg.h/mL)	118.29	45.46
	TMR (h)	51.41	13.97
DAN (n=21)	C_{max} (µg/mL)	0.53	0.13
	T_{max} (h)	2.17	0.98
	AUC₀₋₂₄ (µg.h/mL)	9.69	1.41
	TMR (h)	18.38	2.52

ATM: antimicrobiano. DAN: danofloxacin. OTC: oxitetraciclina. FLR: florfenicol. C_{max}: máxima concentración observada post-administración; T_{max}: tiempo al que se produce la C_{max}; AUC_{0-24h}: área bajo la curva concentración plasmática en función del tiempo desde el momento 0 hasta las 24 h; TMR: tiempo medio de residencia.

III.6.2. Integración PK/PD

De la integración de los parámetros farmacocinéticos con la CIM_{90} calculada para florfenicol, ciprofloxacina y tetraciclina con y sin NMP (50 $\mu\text{g/mL}$ y 100 $\mu\text{g/mL}$), surgen los valores expresados en la tabla III.65 para las cepas de referencia y en la tabla III.66 para las cepas de campo MDR.

Se relacionó el ABC_{0-24h} con la CIM_{90} calculada para obtener la relación ABC_{0-24h}/CIM_{90} . A su vez se determinó la C_{max}/CIM_{90} y el período de tiempo (h) durante el intervalo entre dosis en el cual la concentración se mantuvo sobre la CIM_{90} , es decir el $T > CIM_{90}$.

En la figura III.48 se observa gráficamente como se modifica la relación PK/PD de los antimicrobianos frente a la cepa AG112 con la incorporación de NMP a razón de 50 $\mu\text{g/mL}$ y 100 $\mu\text{g/mL}$

Tabla III.65. Parámetros PK/PD para florfenicol, danofloxacina y oxitetraciclina en plasma bovino frente a las cepas de referencia AG112, AG100 y AG100A

ATM	Cepas de referencia	Parámetros PK/PD								
		ABC_{0-24}/CIM_{90} (h)			C_{max}/CIM_{90}			$T > MIC_{ATB}$ (h)		
		ATM	ATM+NMP		ATB	ATM+NMP		ATB	ATM+NMP	
			50 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$		50 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$		50 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$
FLR	AG112	3.40	13.62	108.93	0.21	0.84	6.73	0	0	24
	AG100	13.62	54.47	108.93	0.84	3.37	6.73	0	0	24
	AG100A	108.93	108.93	108.93	6.73	6.73	6.73	24	24	24
OTC	AG112	14.79	59.15	236.58	1.09	4.37	17.46	1	60	96
	AG100	118.29	236.58	236.58	8.73	17.46	17.46	96	96	120
	AG100A	236.58	236.58	236.58	17.46	17.46	17.46	120	120	120
DAN	AG112	156.29	312.58	646.00	8.55	17.10	35.33	>24	>24	>24
	AG100	646.00	1384.29	1384.29	35.33	75.71	75.71	>24	>24	>24
	AG100A	646.00	646.00	646.00	35.33	35.33	35.33	>24	>24	>24

DAN: Por ser un ATM acción bactericida dependiente de la concentración, los principales parámetros PK/PD predictores de eficacia son ABC_{0-24}/CIM_{90} y C_{max}/CIM_{90}

FLR Y OTC: Por ser ATMs acción bacteriostática dependiente del tiempo de exposición y con prolongada persistencia, los principales parámetros PK/PD predictores de eficacia son ABC_{0-24}/CIM_{90} y $T > CIM$

Tabla III.66. Parámetros PK/PD de florfenicol, danofloxacina y oxitetraciclina en plasma frente a las cepas de campoMDR

ATM	Cepas de campo MDR	Parámetros PK/PD								
		ABC ₀₋₂₄ /CIM ₉₀ (h)			C _{max} /CIM ₉₀			T>MIC _{ATB} (h)		
		ATM	ATM+NMP		ATM	ATM+NMP		ATM	ATM+NMP	
50 µg/mL	100 µg/mL		50 µg/mL	100 µg/mL		50 µg/mL	100 µg/mL			
FLR	Pe2-L	0.43	0.85	0.85	0.03	0.05	0.05	0	0	0
	Vo1-SV	0.43	1.70	1.70	0.03	0.11	0.11	0	0	0
	Vo2-SV	6.81	54.47	108.93	0.42	3.37	6.73	0	12	24
	Vo1-TQ	0.43	1.70	1.70	0.03	0.11	0.11	0	0	0
	Vo2-TQ	0.43	1.70	1.70	0.03	0.11	0.11	0	0	0
	Prom±DS	1.70±2.85	12.08±23.69	22.98±48.05	0.11±0.18	0.75±1.46	1.42±2.97	-	-	-
OTC	Pe1-L	0.92	1.85	3.70	0.07	0.14	0.27	0	0	0
	Pe2-L	0.46	0.92	1.85	0.03	0.07	0.14	0	0	0
	Vo2-SV	1.85	7.39	7.39	0.14	0.55	0.55	0	0	0
	Vo1-SV	0.46	1.85	3.70	0.03	0.14	0.27	0	0	0
	Vo1-TQ	0.46	1.85	1.85	0.03	0.14	0.14	0	0	0
	Vo2-TQ	1.85	7.39	7.39	0.14	0.55	0.55	0	0	0
	Ter2-TQ	0.46	0.92	1.85	0.03	0.07	0.14	0	0	0
	Ter1-TQ	0.46	1.85	1.85	0.03	0.14	0.14	0	0	0
	Tet3-TQ	0.46	1.85	1.85	0.03	0.14	0.14	0	0	0
	Tet4-TQ	0.46	1.85	1.85	0.03	0.14	0.14	0	0	0
	Prom±DS	0.79±0.58	2.77±2.46	3.33±2.27	0.06±0.04	0.20±0.18	0.25±0.17	-	-	-
DAN	Vo2-SV	0.30	1.21	1.21	0.02	0.07	0.07	0	0	0
	Ter1-TQ	0.08	0.15	0.30	0.00	0.03	0.02	0	0	0
	Ter2-TQ	0.08	0.15	0.30	0.00	0.15	0.02	0	0	0
	Ter3-TQ	0.08	0.15	0.30	0.00	0.15	0.02	0	0	0
	Ter4-TQ	0.08	0.30	0.30	0.00	0.57	0.02	0	0	0
	Prom±DS	0.12±0.10	0.39±0.46	0.48±0.41	0.01±0.01	0.20±0.22	0.03±0.02	-	-	-

DAN: Por ser un ATM acción bactericida dependiente de la concentración, los principales parámetros PK/PD predictores de eficacia son ABC₀₋₂₄/CIM₉₀ y C_{max}/CIM₉₀

FLR Y OTC: Por ser ATMs acción bacteriostática dependiente del tiempo de exposición y con prolongada persistencia, los principales parámetros PK/PD predictores de eficacia son ABC₀₋₂₄/CIM₉₀ y T>CIM

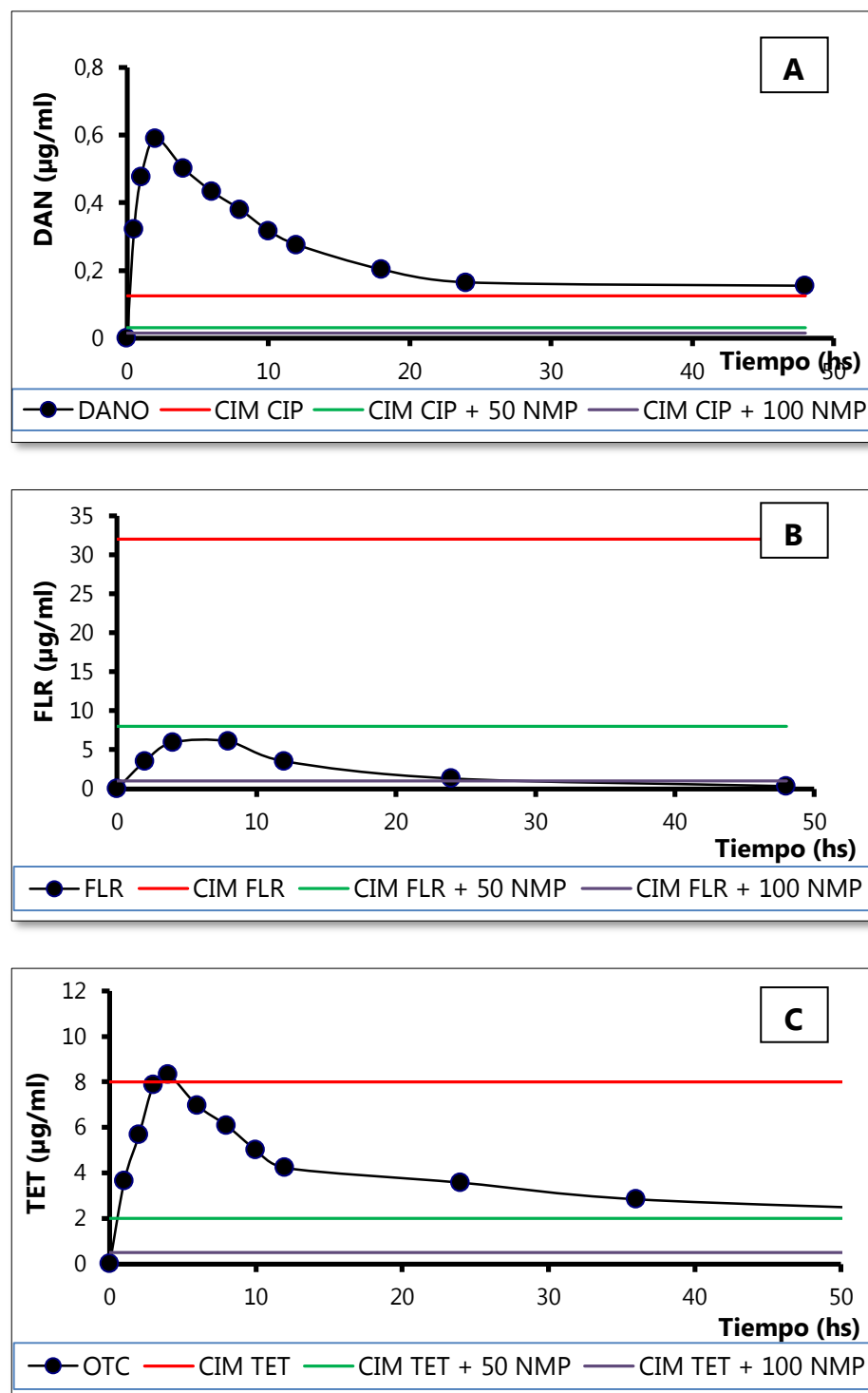


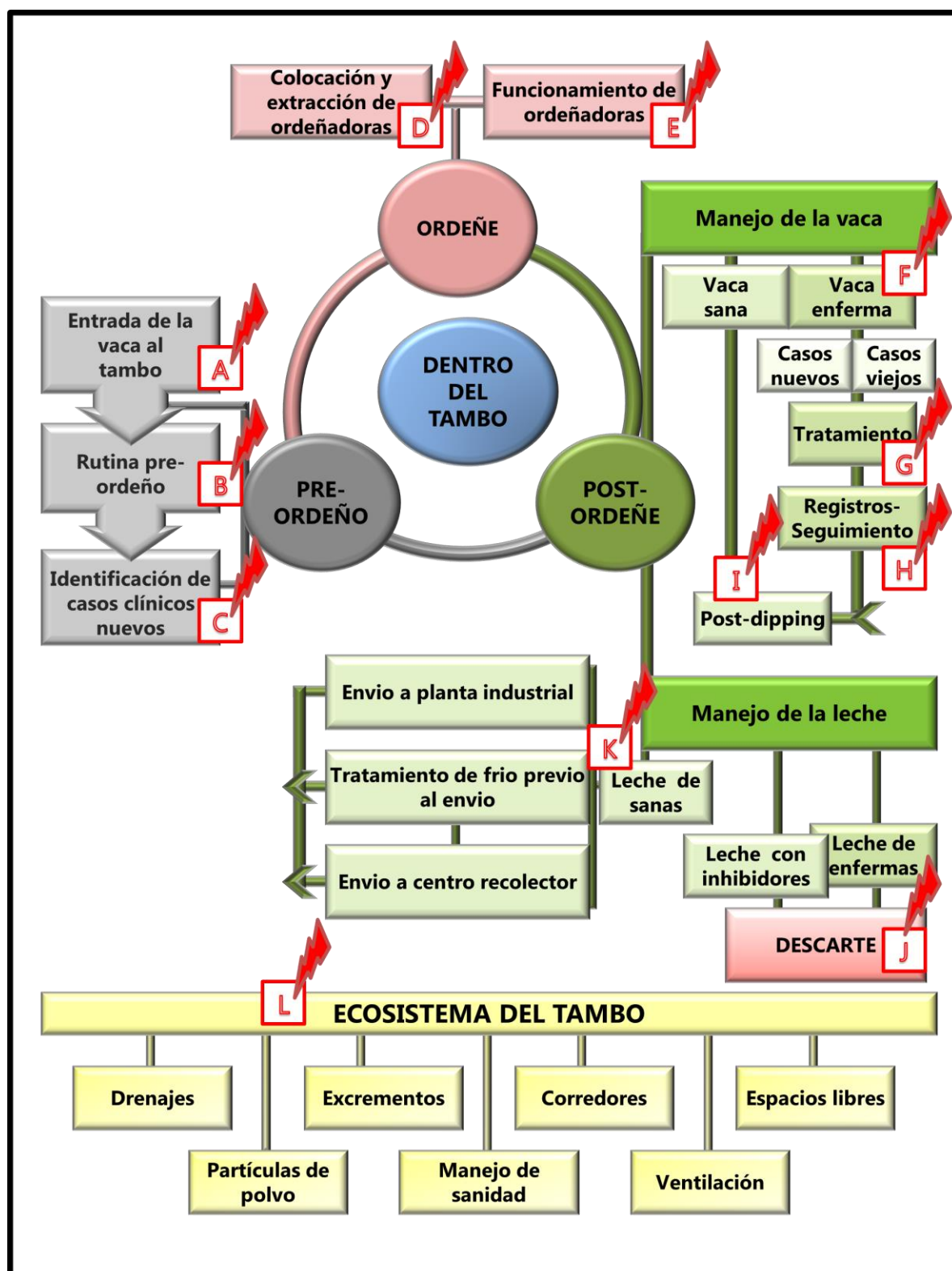
Figura III.48. Integración de los parámetros PK/PD de danofloxacina/ciprofloxacina (A), florfenicol/florfenicol (B) y oxitetraciclina/tetraciclina (C) frente a la cepa AG112, con y sin NMP (50 µg/mL y 100 µg/mL)

DAN: danofloxacina. CIP: ciprofloxacina. FLR: florfenicol. OTC: oxitetraciclina. TET: tetraciclina. PK/PD: farmacocinética/farmacodinámica

III.7. Realización de un análisis de riesgo de transferencia de resistencias entre animales-medio y el hombre

Se elaboró un esquema donde se presentan los puntos críticos para el control de la antibioticorresistencia dentro del tambo propiamente dicho (Figura III.49), y fuera del mismo (Figura III.50). Los puntos marcados en ambos esquemas tienen implicancia en el riesgo de la selección, diseminación y transferencia de resistencia y multirresistencia bacteriana entre los animales, el ambiente y el hombre.

III.7.1. Detección de puntos críticos dentro del tambo



Figuras III.49. Flujo de los puntos críticos para el control de la resistencia a los antibióticos dentro del tambo propiamente dicho

A.- Ingreso de la vaca al tambo. La primer etapa del ordeño comienza con el ingreso de los animales al tambo. Esto se lleva a cabo en horarios determinados -cada 12 u 8 horas-, según se ordeñen 2 o 3 veces al día.

B.- Rutina pre-ordeño. Una buena "rutina de ordeño" involucra una serie de medidas higiénicas y de manejo desde que el animal ingresa hasta que sale de la sala de ordeño. Dichas medidas han sido ampliamente recomendadas por el National Mastitis Council de los EE.UU. (186).

Como cada establecimiento lechero está diseñado en forma diferente, no todas las granjas usan la misma rutina de ordeño. Esta puede ir desde la realización de ningún tipo de maniobra previa a la colocación de las pezoneras, hasta una rutina completa que incluya todos o algunos de los pasos que se enumeran a continuación:

1. *Lavado de los pezones y base inferior de la ubre.*
2. *Eliminación de los primeros chorros de leche de cada cuarto.*
3. *Pre-sellado (pre-dipping).*
4. *Secado de los pezones*

C.- Identificación de nuevos casos clínicos

D.- Colocación y extracción de la ordeñadora

E.- Funcionamiento de la ordeñadora

F.- Manejo de la vaca enferma

G.- Tratamiento de los animales enfermos

H.- Registro y seguimiento

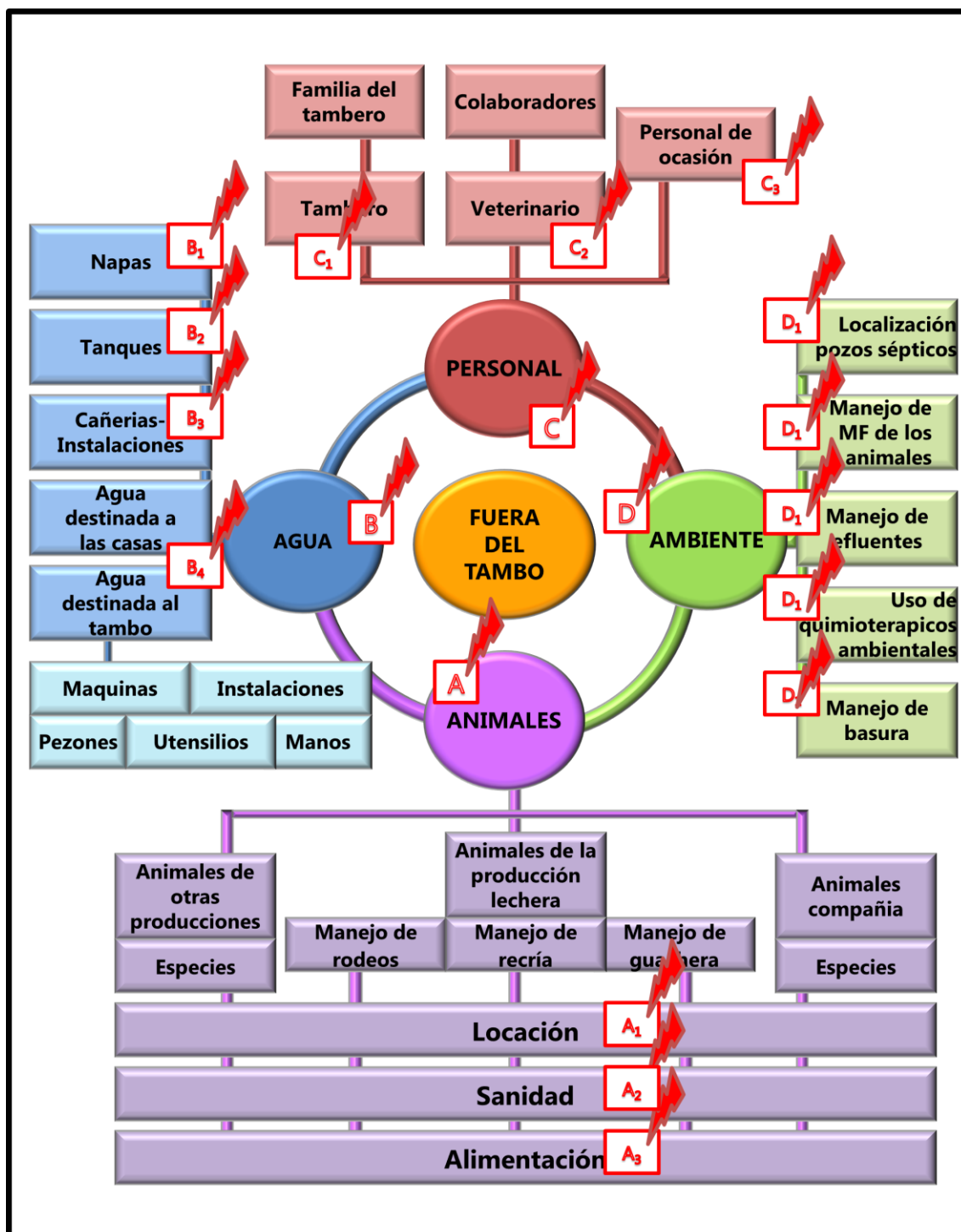
I.- Post-sellado (Post-dipping). Al final del ordeño, el meato o esfínter del pezón (orificio por donde sale la leche) queda abierto y dilatado por unas horas. Esto favorece que las bacterias presentes al finalizar el ordeño, puedan ingresar al pezón y provocar una infección. Por este motivo, se debe aplicar un sellador a todos los pezones luego de la extracción de las ordeñadoras. Esta práctica no cura las vacas enfermás, pero es muy efectiva para prevenir nuevas infecciones, incluso en individuos sanos. Este producto esta constituido por un desinfectante, que mata las bacterias y agentes suavizantes, que humectan y mejoran la piel de los pezones.

J.- Manejo de la leche con inhibidores o contaminantes

K.- Leche de vacas sanas

L.- Ecosistema del tambo. El ecosistema del interior de un tambo consta de numerosos factores de importancia a tener en cuenta como puntos críticos en la transferencia de resistencia y transmisión de contaminantes patógenos. Estos factores son los sistemas de drenajes, la presencia de excrementos y su eliminación, la higiene de los corredores, los espacios libres, la presencia de partículas de polvo, el manejo de la sanidad, y tipo de ventilación, entre otros.

III.7.2. Detección de puntos críticos fuera del tambo



Figuras III.50. Flujograma de los puntos críticos para el control de la antibióticorresistencia fuera del tambo propiamente dicho

A.- Animales. El grupo de animales que cohabitan un establecimiento tambero está conformado no solo por las vacas pertenecientes a la producción central (incluyendo vacas en diferentes etapas reproductiva, distinto estado sanitario, así como los terneros pertenecientes a la guachera), sino también por animales de compañía (gatos, perros, otros) y animales pertenecientes a otras producciones (cerdos, ovejas, caballos, entre otros). Asimismo, también existe contacto con aves y animales silvestres autóctonos. Por ello los puntos importantes a tener en cuenta son:

A₁- Locación

A₂-Sanidad

A₃-Alimentación

B-Agua. El agua es un medio de transporte ideal para muchos microorganismos, por lo cual es importante tener en cuenta los diferentes lugares donde la presencia de agua en el ambiente puede tener relación directa con la resistencia bacteriana. La contaminación del agua, entonces, la convierte en otro de los puntos críticos. Por otra parte, los productos de desecho que contienen residuos de antimicrobianos son también contaminantes de las aguas. Es decir, que es un lugar donde no sólo se pueden diseminar bacterias portadoras de genes de resistencia, sino que también puede ocurrir selección de la misma y posterior diseminación y/o transferencia. Por ello, cada uno de los puntos enumerados a continuación debe ser tenido en cuenta:

B₁-Napas

B₂-Tanques

B₃-Cañerías

B₄-Agua de consumo

C-Personal. El componente humano presente en un establecimiento tambero constituye un riesgo en sí mismo. Pues el hombre puede actuar como generador y disparador de bacterias resistentes así como posible blanco de los microorganismos presentes en los animales y/o en el ambiente. La higiene personal, y particularmente de las manos de los individuos, es uno de los puntos críticos más importantes a tener en cuenta en la cadena de transmisión y diseminación de la resistencia bacteriana. Es fundamental no dejar de mencionar el manejo de medicamentos antimicrobianos por parte del personal, lo cual implica la importancia del conocimiento de los riesgos de su manipulación, su uso y su descarte para minimizar el fenómeno de resistencia.

El componente humano se constituye de una serie de actores que toman contacto con los animales y el medio ambiente en diferente magnitud, pero no por ello menos importante. Estos son:

C₁-Tambero

C₂-Veterinario

C₃-Personal de ocasión

D-Ambiente en general. El control de los puntos críticos asociados a los contaminantes ambientales que se originan en una explotación tambera es fundamental para la protección del medio ambiente, los animales y el hombre. Una cuidadosa aplicación de fertilizantes y un plan eficaz de efluentes minimizaría los impactos fuera de la explotación e incluso aumentaría la productividad y la calidad higiénico sanitaria de la leche. Los factores más importantes a tener en cuenta se resumen a continuación:

D₁-Pozos sépticos

D₂-Manejo de la materia fecal de los animales de producción

D₃-Efluentes

D₄-Uso de quimioterápicos ambientales

D₅-Manejo de la basura

IV. DISCUSIÓN

IV. DISCUSIÓN

IV.1. Selección de explotaciones agropecuarias

Las explotaciones seleccionadas para evaluar la antibióticorresistencia en *Escherichia coli* fueron tambos. Las producciones tamberas padecen una importante presión antimicrobiana, pues las vacas productoras de leche reciben escasos quimioterápicos con los alimentos pero gran cantidad de antimicrobianos (penicilinas, cefalosporinas, macrólidos, sulfamidas) son administrados por infusión intramamaria para el control y tratamiento de la mástitis, enfermedad causada por una variedad de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Tales fármacos, también son rutinariamente administrados al rodeo completo al momento del secado para prevenir la aparición de mástitis en la próxima lactancia. La mástitis sigue siendo la razón más frecuente para el uso de antimicrobianos en los establecimientos lecheros desde hace más de 50 años (10).

Es por lo expuesto, y sumado a que existe muy poca información acerca de la prevalencia de la resistencia en bacterias indicadoras aisladas de animales productores de leche, que consideramos acertado establecer contacto con cuatro explotaciones localizadas en puntos distintos de la provincia de Buenos Aires, para llevar nuestro trabajo a cabo. Luego, los formularios escritos fueron las herramientas que permitieron evaluar cuáles eran los antimicrobianos más utilizados en los animales productores, en los de compañía y en los habitantes que convivían con ellos, además de conocer los hábitos de manejo y trabajo existentes.

IV.2. Aislamiento, identificación y selección de cepas de *Escherichia coli*

Las muestras de materia fecal de los animales de producción y de las mascotas, se obtuvieron únicamente mediante hisopado rectal siguiendo los lineamientos de la OIE (164). Muchos autores utilizaron una técnica de muestreo similar a la nuestra (89, 166, 187, 188). Sin embargo, en otros trabajos la metodología consistió en obtener una muestra voluminosa de heces de cada animal, empleando una bolsa individual y colectando entre 5 y 10 g de materia fecal directamente desde el recto (90, 189, 190).

La decisión de muestrear individualmente a los animales mediante hisopado rectal y conservación en tubos conteniendo un medio de transporte hasta su llegada al laboratorio, se fundamentó en poder obtener un número mayor de muestras por cada establecimiento, que resulte representativo de la totalidad de la producción tambera. Al ser una metodología de trabajo sencilla, rápida y ágil, permitió acortar significativamente los tiempos de muestreo y no alterar las rutinas de trabajo habitual, ni generar estrés innecesario entre los animales y el personal. Otra gran ventaja de

esta técnica fue que nos permitió mantener las muestras en tubos individuales limpios, claramente rotulados y ordenados, sin riesgos de derrames y consecuente contaminación, facilitando la tarea en el laboratorio y asegurando resultados fidedignos.

IV.3. Estudio de susceptibilidad por antibiograma

En la actualidad, las pruebas de susceptibilidad *in vitro* para microorganismos aislados de animales, cuentan con la ventaja de ser realizadas con agentes antimicrobianos de uso frecuente en medicina veterinaria. Esto ha permitido un manejo más racional de los resultados obtenidos y ha desarrollado criterios de interpretación de resultados más precisos.

Como fue mencionado en la sección II.2.4 de "Materiales y Métodos", el test de susceptibilidad utilizado para la evaluación de los perfiles de resistencia en los aislamientos obtenidos, fue por difusión en agar siguiendo los lineamientos de la CLSI, Documento M31-A3 "*Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals*" originalmente descrito por Bauer y col. (1966); y adaptado del documento M100-S19 "*Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing*" para aislamientos de bacterias aeróbicas de origen humano (167, 191).

Para la evaluación de la susceptibilidad de los aislamientos obtenidos a campo se utilizó un disco conteniendo 30 µg de tetraciclina, a diferencia de algunos autores que en su lugar utilizaron discos de oxitetraciclina en representación del grupo (192, 193). Según lo establecido por la CLSI (167), tetraciclina es el antimicrobiano de elección para la evaluación y el análisis de la susceptibilidad *in vitro* de clortetraciclina, doxiciclina, minociclina y oxitetraciclina. Es importante destacar que según esta entidad (167, 173), los microorganismos susceptibles a tetraciclina, son considerados sensibles a la acción de todos los antimicrobianos pertenecientes a dicha familia.

Sin embargo, es incorrecto aplicar este principio cuando se trata de resistencia. Un microorganismo resistente a tetraciclina, será también resistente frente a las tetraciclinas tradicionales de origen natural (tetraciclina, oxitetraciclina y clortetraciclina), pero no necesariamente lo será frente a minociclina, doxiciclina o glicilciclinas. Este fenómeno se debe a que varios de los mecanismos responsables de la resistencia frente a las tetraciclinas tradicionales, no confieren efecto alguno frente a las semisintéticas. Tal como ocurre con los sistemas de eflujo específicos para tetraciclina conocidos como proteínas Tet u Otr (118, 167).

Sin embargo, es importante mencionar que en bacterias Gram-negativas ya se ha identificado un gen denominado *tet(B)* que codifica proteínas transportadoras que afectan a tetraciclina y

minociclina pero no aún a gliciliciclina, sugiriendo que la aparición de resistencia a estos últimos fármacos es solo cuestión de tiempo (120).

Es interesante destacar que la mayor prevalencia de resistencia hallada en las cepas analizadas fue para tetraciclina, representando casi el 50% de la resistencia total. Al comparar nuestros resultados con estudios similares realizados en otros países de regiones geográficas completamente disímiles, el hallazgo de una elevada prevalencia de resistencia frente a este antimicrobiano en cepas de *E. coli* comensales aisladas de materia fecal de ganado bovino sano, resultó ser un fenómeno común, tal como se detalla a continuación.

En dos estudios se obtuvieron valores casi idénticos a los nuestros: en Grecia durante el año 2005, a partir de muestras fecales de bovinos hallaron un 47.06% de resistencia a tetraciclina (194); y en España, se reportó en el año 2009 una prevalencia correspondiente al 48% (91).

En otros países a pesar de seguir siendo la resistencia más frecuentemente observada en aislamientos de *E. coli*, se informaron porcentajes inferiores a los hallados en nuestro estudio. A través del programa de monitoreo CIPARS, en 2007 Canadá padeció una resistencia equivalente al 35.6% frente a tetraciclinas. En Korea en el período comprendido entre abril del 2003 y octubre del 2004, se tomaron muestras de ganado bovino de carne y leche, obteniéndose 30,5% de resistencia (90). En Argentina, durante el período 2010 (195) el valor hallado fue de un 26% para ganado bovino de carne. En Italia, en un estudio que incluyó varios países de la Unión Europea, la prevalencia determinada por Bywater y col., fue de 19.6% (88). Y en Japón, utilizando discos de oxitetraciclina, la resistencia hallada fue del 25.3% (193).

Por otra parte, en Alemania y en Serbia, los porcentajes reportados fueron alarmantes con valores que se encontraban en 66% y 70%, respectivamente para cada uno de los países. Ambos estudios fueron llevados a cabo en establecimientos tamberos (89, 92). En Chile, en un estudio realizado entre los años 2002 y 2003 por San Martín y col., en ganado lechero y de carne utilizando discos de oxitetraciclina para analizar susceptibilidad bacteriana en cepas de *E. coli* indicadoras de resistencia, la prevalencia hallada fue del orden de los 84% para ganado lechero y 10% para ganado de carne (192).

Podríamos afirmar que en las explotaciones tamberas de la provincia de Buenos Aires existe un grave problema de selección de resistencia frente a tetraciclinas. Este hallazgo puede ser explicado por el consumo excesivo que existe en medicina veterinaria. Las tetraciclinas son antimicrobianos relativamente económicos, con amplio espectro de acción, características atractivas para ser

seleccionados en la terapia animal, ya sea en forma terapéutica, profiláctica o bien como promotor del crecimiento en algunas especies animales y en diversos países (196).

En un trabajo publicado por Vieira y col. (2009) se comprobó que existe una relación directa entre el consumo de tetraciclinas en los cerdos y el aislamiento de cepas de *E. coli* resistentes en el contenido intestinal (197).

El consumo anual de tetraciclina a nivel mundial en las distintas explotaciones agropecuarias, es difícil de conocer en algunos sectores; y además no siempre los números informados coinciden entre los diferentes reportes hallados. Sin embargo, algunos países cuentan con redes de vigilancia antimicrobiana correspondientes con su territorio, que permiten conocer y comparar estos datos. Según un informe de la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), en diversos países de la Unión Europea (Francia, Inglaterra, Países Bajos, República Checa) el porcentaje representativo del consumo de tetraciclina en relación al total de antimicrobianos empleados es notablemente elevado, representando entre el 40 y 52% (198). En Dinamarca, en 2006 el consumo fue de 3265 toneladas, es decir, casi el 35% del consumo total de antimicrobianos en ganado bovino (93). En nuestro país no se conoce oficialmente el dato con exactitud, pero es probable que ocurra algo similar.

Por otro lado es bien conocido que la forma más frecuente de resistencia bacteriana frente a tetraciclinas es la adquisición exógena de genes plasmídicos o transposones conjugativos y bacteriófagos con gran capacidad para transferir resistencia en forma horizontal entre bacterias de igual o de diferente especie (118, 120, 123, 199). La resistencia a tetraciclinas además, es increíblemente persistente en la microflora de los animales de producción, aún luego de varios años de haber discontinuado el uso del fármaco. Este fenómeno puede ser atribuido a la persistencia de tetraciclina en el medio ambiente y/o a la evolución de las cepas en las cuales el efecto deletéreo de las tetraciclinas ha sido atenuado (200).

En representación de la familia de antimicrobianos beta-lactámicos, se analizó el perfil de susceptibilidad bacteriana frente a ampicilina, ceftiofur y amoxicilina con ácido clavulánico. A fin de observar la resistencia frente a un beta-lactámico de amplio espectro, una cefalosporina de tercera generación de uso veterinario y un beta-lactámico de amplio espectro con inhibidor de beta-lactamasa, respectivamente.

La prevalencia de cepas resistentes frente a ampicilina fue la segunda más frecuentemente hallada después de tetraciclina, correspondiéndose con un 19 % de la resistencia total hallada en la provincia de Buenos Aires. Los elevados valores de resistencia obtenidos frente a ampicilina, concuerdan con algunos autores, hallándose resultados similares reportados en Korea (12%) (90),

Serbia (22.5%)(89), España (16%) (92) e Italia (14.3%) (88); todos con valores cercanos al mencionado en nuestro trabajo.

Por otra parte, encontramos discrepancia con otros autores de Argentina (4.4%) (195), Japón (8.4%) (193), Canadá (2.7%) (201), y Michigan, EE.UU. (3%) (166), quienes hallaron una resistencia inferior. Estos resultados, sin embargo, a pesar de ser claramente menores a los hallados en nuestro estudio, concuerdan en que ampicilina fue el segundo antimicrobiano con mayor porcentaje de resistencia en cepas de *E. coli* comensales aisladas de explotaciones bovinas.

Es interesante resaltar que en otros sectores del mundo como Pensilvania y Alemania, la resistencia a ampicilina es muy elevada, reportándose valores del 48% y 59%, respectivamente (92, 189), niveles casi tan elevados como los hallados para tetraciclinas.

No debe sorprendernos la manifestación de elevados niveles de resistencia frente a ampicilina, ya que los beta-lactámicos son utilizados con gran frecuencia, no solo en medicina veterinaria, sino también en medicina humana.

El principal mecanismo de resistencia frente a ampicilina en las Enterobacterias es la resistencia de tipo enzimática por beta-lactamasas. La resistencia por beta-lactamasas de origen plasmídico, es un problema creciente a nivel mundial (202).

La adquisición de beta-lactamasas plasmídicas denominadas de amplio espectro o beta-lactamasas clásicas, genera resistencia frente a aminopenicilinas y carboxipenicilinas; y sensibilidad disminuída o intermedia a ureidopenicilinas. Aproximadamente en el 50% de los aislamientos de *E. coli*, TEM-1 es responsable de la resistencia frente a ampicilina (60). También son responsables de la resistencia, las cepas productoras de beta-lactamasas de espectro extendido o BLEE, caracterizadas por ser capaces de inactivar prácticamente la totalidad de las cefalosporinas, a excepción de las cefamicinas, manteniendo la sensibilidad a los inhibidores de beta-lactamasas y a los carbapenemes (203).

Para evaluar la susceptibilidad bacteriana frente a cefalosporinas de tercera generación de uso veterinario, se utilizó un disco de ceftiofur conteniendo 30 µg del antimicrobiano (167). Sin embargo, algunos autores en trabajos realizados en explotaciones bovinas, y en consecuencia, en aislamientos de *E. coli* de origen animal, emplearon cefotaxima (88, 89, 90). Posiblemente hayan elegido este antimicrobiano, siguiendo los lineamientos del documento M100-S19 de la CLSI, para el análisis de susceptibilidad de bacterias aerobias aisladas de muestras de origen humano (173).

No aislamos cepas resistentes frente a ceftiofur, fenómeno que también fue reportado en Japón y en Canadá (193, 201). Ceftiofur, es un antimicrobiano utilizado con frecuencia en vacas de tambos, para el tratamiento y la prevención de diversas patologías, como neumonía, metritis post-parto y pododermatitis necrotizante, debido a que cuenta con la ventaja de no tener tiempo de retirada en leche cuando es administrado por vía parenteral (204, 205). Existen también preparados intramamarios para la terapia de la mástitis (206, 207). En cuanto a la resistencia bacteriana, esta es mediada por plásmidos (bla_{CMY-2}) y la especie bacteriana *E. coli* de la microbiota comensal, es frecuentemente portadora del mismo (208). En consecuencia, sería esperable que existiese un enorme riesgo de transferencia de resistencia frente a este antimicrobiano. Pero contrariamente, muchos autores han comprobado que no existe una relación directa entre el uso de ceftiofur y la selección y diseminación de la resistencia codificada por bla_{CMY-2} (208, 209, 210). Una vez finalizado el esquema terapéutico, las cepas resistentes desaparecen rápidamente.

Chile y EE.UU., hallaron niveles de resistencia frente a ceftiofur de considerable importancia, en el orden del 54% y 19.85%, respectivamente (166, 192). Una posible explicación a este hallazgo, sería que las bacterias que contienen los genes plasmídicos involucrados en la resistencia a la cefalosporina en cuestión, sean seleccionadas al utilizar otros antimicrobianos distintos al ceftiofur como por ejemplo tetraciclinas tal como fue publicado en un trabajo de Doyle y col. (2013); o bien que exista una co-transferencia de determinantes genéticos de la resistencia (209, 211). Un claro ejemplo de co-transferencia, es el hallazgo de un fenotipo de resistencia múltiple (ampicilina-cloranfenicol-estreptomicina-sulfas-tetraciclina) en *Salmonella* Typhimurium DT104, causado por la expresión simultánea de varios casetes genéticos presentes en un mismo integrón de tipo I a nivel cromosomal; al cual se le sumó resistencia a ceftiofur codificada por el gen bla_{CMY} (211).

En cuanto a amoxicilina-ácido clavulánico, en nuestro estudio se utilizó un disco para antibiograma conteniendo 20 μ g de amoxicilina y 10 μ g de ácido clavulánico, es decir en relación 2:1, siguiendo las recomendaciones establecidas por la CLSI (167, 173). Es importante remarcar que las formulaciones utilizadas en medicina veterinaria suelen contener amoxicilina-ácido clavulánico en relación 4:1, mientras que las de uso humano contienen 2:1 de los mismos, es decir, dos veces más ácido clavulánico que las de veterinaria. Es por ello, que se podría suponer que existe un riesgo inminente de selección de resistencia en medicina veterinaria, pues la cantidad de inhibidor de beta-lactamasas presente en los productos podría resultar insuficiente para neutralizar la actividad enzimática bacteriana en el sitio de infección. Sin embargo, los resultados hallados en nuestro estudio muestran que la resistencia hallada frente a amoxicilina-ácido clavulánico fue prácticamente nula, casi

el 100% de los aislamientos resultaron susceptibles; solo se obtuvo una cepa resistente, aislada del establecimiento tambero localizado en Tandil.

Estudios previos realizados en otros países han reportado porcentajes bajos o nulos de resistencia, tales como Korea (90) y Canadá (201). También existe coincidencia en los resultados reportados por Belmar-Liberato y col (2011), en una revisión sobre la situación de los países europeos como Dinamarca, Suecia, Noruega, Finlandia, Francia, Portugal, Italia, entre otros; acerca de la resistencia bacteriana frente a amoxicilina- ácido clavulánico en medicina veterinaria (212).

Un artículo de revisión escrito por Rolinson (1994), expresa que ha ocurrido un incremento en la prevalencia de bacterias patógenas productoras de beta-lactamasas resistentes a ampicilina y amoxicilina durante el período comprendido entre los años 1978 y 1993. Sin embargo, no existe evidencia de ningún incremento en la resistencia bacteriana frente a la combinación de amoxicilina con ácido clavulánico en dicho período (213).

Otro antimicrobiano que tuvo un porcentaje nulo de resistencia fue gentamicina. Estudios internacionales han descripto resultados similares o valores bajos, menores al 2%, en cepas de *E. coli* indicadoras (88, 89, 93, 192, 193). Como una excepción a lo expuesto, en Korea se informó un 7% de resistencia, los autores afirman que los valores hallados son un reflejo de los serios problemas de resistencia bacteriana existentes en la región (90).

Menos del 2% de los aislamientos manifestaron resistencia frente a trimetoprima-sulfametoxazol, porcentaje bajo comparado con el obtenido frente a tetraciclina y ampicilina. Es interesante destacar que en el establecimiento tambero de Tandil, el 100% de las cepas aisladas resultó sensible. Nuestro resultado es levemente superior a los publicados en Canadá (201), Francia (88), EE.UU. (166) y también a otro estudio realizado también en Argentina, pero en animales domésticos (195). Estos autores encontraron resistencia nula en sus aislamientos. En algunos de estos países el uso de esta combinación de antimicrobianos es poco frecuente, lo cual explicaría la elevada sensibilidad reportada. En cambio, en nuestro trabajo a través de las encuestas realizadas a los establecimientos se confirma el uso de trimetoprima-sulfametoxazol en forma terapéutica. Por otra parte, Serbia con el 15% (89), Chile con el 16% (192) e Italia con el 8.5% (88), superan nuestro porcentaje declarado en forma considerable. Mientras que en Japón (193), fue el porcentaje de resistencia más elevado (25.3%), dejando a la tetraciclina en segundo lugar.

El estudio de resistencia a florfenicol, fue realizado utilizando discos conteniendo 30 µg del antimicrobiano. No se hallaron publicaciones que analicen la resistencia en bacterias indicadoras usando discos similares. En su lugar, algunos autores emplearon discos de cloranfenicol,

antimicrobiano actualmente prohibido para su uso en animales de consumo, por sus conocido efecto tóxico a nivel de las células megaloblásticas de la médula ósea, dosis independiente y de aparición mediata (88, 91, 135, 140, 189, 194).

Es importante destacar que un microorganismo resistente a cloranfenicol, puede ser sensible frente a florfenicol. Los mecanismos de resistencia enzimática y aquellos de eflujo, codificados por el gen *cm/A*, que anulan la acción antimicrobiana de cloranfenicol, no afectan la sensibilidad bacteriana frente a florfenicol. Sin embargo, el eflujo activo mediado por bombas codificadas por *flo*, afectan la susceptibilidad de ambos compuestos (214, 215). Es decir, siempre que haya resistencia a florfenicol, existirá resistencia cruzada entre ambos congéneres. Por todo lo expuesto, consideramos incorrecto comparar nuestros resultados con los trabajos mencionados que utilizaron discos de cloranfenicol para el análisis de fenicoles en animales de consumo.

La resistencia hallada para florfenicol fue de 3.6%. En uno de los cuatro tambos analizados no se encontró resistencia alguna frente a este antimicrobiano. En un estudio realizado por Singer y col (2004), obtuvieron un 7.5% de resistencia frente a florfenicol en bovinos de carne en Minnesota, EE.UU. En Pensilvania, en un trabajo realizado por Sawant y col (2006), la prevalencia fue del 5%. Es decir, que los resultados hallados en otros países son similares a los obtenidos en nuestro trabajo.

Un factor importante a destacar es que en la CLSI (167) para el análisis de los antibiogramas o para el estudio de la concentración inhibitoria mínima de florfenicol, no existen puntos de corte aprobados para la especie *E. coli*. De manera que al igual que en muchos otros estudios, los límites establecidos para patógenos respiratorios bovinos (BDR) fueron los que permitieron clasificar a estos microorganismos como susceptibles, intermedios o resistentes (167, 214, 216).

En la evaluación de la susceptibilidad a las fluoroquinolonas se utilizaron discos de ciprofloxacina en lugar de enrofloxacin, a pesar de ser ésta última la quinolona de elección para ser utilizada en medicina veterinaria. Nuestra elección tiene su fundamento en dos puntos principales; en primer lugar, las muestras analizadas no pertenecían únicamente a animales, sino que también algunas fueron tomadas de los pozos sépticos, es decir representando a la población humana del lugar. Y en segundo lugar, sabiendo que existe resistencia cruzada entre ambos antimicrobianos, consideramos oportuna la evaluación de la susceptibilidad a ciprofloxacina como representante de la familia de las quinolonas fluoradas. Muchos de los estudios sobre resistencia realizados a nivel nacional e internacional, coincidieron en la selección de ciprofloxacina como representante del grupo (88, 190, 192, 195). Los puntos de corte tomados como referencia fueron los establecidos por la CLSI (173).

La resistencia que se obtuvo en el análisis de susceptibilidad a ciprofloxacina, fue del orden del 3.6%, coincidiendo con el porcentaje hallado para florfenicol. Los aislamientos con fenotipo resistente pertenecieron a dos de los cuatro tambos analizados, localizados en San Vicente y Trenque Lauquen. El porcentaje hallado es claramente inferior a los obtenidos para otros antimicrobianos como tetraciclina o ampicilina, sin embargo, su implicancia en salud pública es fuertemente importante. Las fluoroquinolonas son antimicrobianos considerados críticamente importantes tanto para medicina humana como veterinaria. En consecuencia, el riesgo de que ocurra resistencia cruzada entre enrofloxacin y ciprofloxacina (antimicrobianos de uso frecuente en medicina veterinaria y en el caso de ciprofloxacina en medicina humana), es un fenómeno grave a nivel mundial.

Algunos países que estudiaron distintos tipos de fluoroquinolonas, manifestaron claramente la ocurrencia del fenómeno de resistencia cruzada, como puede verse en Korea donde se evaluó simultáneamente a ciprofloxacina, enrofloxacin y norfloxacina, y se obtuvo el mismo porcentaje de resistencia (0.6%) para los tres (90). Lo mismo ocurrió en Chile con 54% de resistencia tanto para ciprofloxacina como para enrofloxacin (192).

Resulta alarmante la prevalencia reportada por Chile, considerando la cercanía al territorio Argentino, con un 54% de cepas resistentes en ganado bovino (192). Asimismo, en España (91) y en Grecia (194) el porcentaje hallado fue superior al nuestro, correspondiéndose con un 13% y 6% de la resistencia total, respectivamente.

Algunos países han disminuido el consumo de fluoroquinolonas en el área de la producción animal, debido al creciente número de aislamientos resistentes. Por ejemplo, en EE.UU la enrofloxacin está aprobada sólo para ser utilizada en el tratamiento de la enfermedad respiratoria bovina (10). Es por ello que en diversos países de la Unión Europea (88), en Serbia (89) y en Canadá (201), la resistencia a quinolonas fluoradas actualmente es prácticamente nula.

Los perfiles de resistencia presentaron fenotipos conteniendo desde 1 hasta 5 antimicrobianos al mismo tiempo. Según nuestros resultados, el 68.6% de los aislamientos fue resistente frente a un único antimicrobiano. Y dentro de este valor, tetraciclina representó al 59% del total. Los fenotipos de resistencia a dos antimicrobianos representaron el 19.3%, siendo la combinación tetraciclina-ampicilina la de mayor frecuencia. Un hallazgo interesante es que en nuestro trabajo este perfil se observó en los cuatro tambos, y en muestras de orígenes muy disímiles, por ejemplo, en Tandil las muestras eran de ternero, en San Vicente del pozo séptico y de un ternero, en Luján de vacas en ordeño y de ternero; y finalmente en Trenque Lauquen, además de vacas en producción y terneros, uno de los perros muestreados también presentó el mismo fenotipo de resistencia. Es un perfil de hallazgo frecuente

también en la bibliografía consultada, lo cual no resulta sorprendente luego de exponer los resultados parciales mencionados anteriormente (89, 90, 189). Una posible explicación de este hecho puede ser el manejo inadecuado de los antimicrobianos, así como de la leche de descarte de los animales medicados que en algunos de los establecimientos estudiados, era destinada a consumo de los terneros de guachera, de los animales de compañía e incluso de los habitantes del lugar. Si además sumamos la conocida facilidad con que ocurre la selección y diseminación de resistencia frente a ampicilina y tetraciclina, no es de sorprender el resultado de los hallazgos mencionados. Otro factor que no se puede descartar, es la posible ocurrencia de transferencia horizontal de la resistencia, entre especies animales que cohabitan el mismo establecimiento. Nuestro estudio solo puede hipotetizar acerca de este último punto, pues la existencia de un clon transferido solo sería comprobable a través de un estudio molecular y epidemiológico, lo cual no formaba parte de los objetivos centrales de esta tesis, sino de una etapa posterior.

Hubo un 12% de los aislamientos que manifestó resistencia frente a tres antimicrobianos o más, clasificados dentro del grupo de multirresistentes. De estos últimos el fenotipo más repetido fue el de tetraciclina-ampicilina-trimetoprima/sulfametoxazol-ciprofloxacina. Es interesante destacar que las cepas que presentaron este perfil de resistencia, fueron aisladas de cuatro terneros pertenecientes al establecimiento de Trenque Lauquen. Los animales no habían recibido antimicrobianos en el último período, sin embargo, al igual que fue mencionado en el párrafo anterior, eran alimentados con leche de descarte de las vacas en ordeño, conteniendo residuos de quimioterápicos. Además se encontraban atados a estacas en un sector especial que funcionaba como guachera, ubicados unos muy cerca de los otros. Aquí podríamos inferir que también queda la incógnita acerca de la ocurrencia de una transferencia horizontal de resistencia bacteriana múltiple.

Un hallazgo muy curioso fue el perfil de resistencia presentado por un aislamiento obtenido a partir de una vaca en ordeño del establecimiento de San Vicente. Por antibiograma manifestó resistencia a cuatro antimicrobianos (tetraciclina-ampicilina-trimetoprima/sulfametoxazol-ciprofloxacina), sin embargo, al evaluar la concentración inhibitoria mínima, también demostró resistencia frente a florfenicol (CIM de 16 µg/mL). De manera que el verdadero perfil de resistencia de esta cepa involucra a cinco antimicrobianos simultáneamente.

Un factor importante a destacar fue la constante presencia de tetraciclina y ampicilina en prácticamente todas las combinaciones de resistencia múltiple. Nuestros resultados coinciden con los informados por diversos autores (89, 166, 187, 195).

En cuanto al primero de los antimicrobianos mencionados, se puede sugerir que las cepas de *E. coli* tetraciclina-resistentes podrían tener mayor tendencia a adquirir nuevos mecanismos de resistencia y resultar luego insensibles frente a la acción de otros antimicrobianos, obteniéndose fenotipos de resistencia a múltiples drogas. Una posible explicación de que ocurra este fenómeno, podría ser la conocida capacidad intrínseca que tienen las tetraciclinas para inducir la mutación de ciertos genes o desreprimirlos, como ocurre en *E. coli* sobre la región *marR* cromosómica (217).

En *E. coli*, la expresión de *acrAB* en cepas mutantes con fenotipo MDR, está controlada por el operón *marRAB* o *soxRS*. La expresión constitutiva de *marRAB* produce un fenotipo MDR por medio de la activación de locus genéticos múltiples en respuesta a las proteínas reguladoras del operón (218). Normalmente *marRAB* es reprimido por el represor transcripcional MarR, proteína que produce acción reguladora negativa. Pero puede ser desreprimido por activadores transcripcionales globales como MarA o SoxS, o bien por varios compuestos tales como tetraciclinas, cloranfenicol y salicilatos (72, 156, 218, 219). En conclusión, puede que en estos casos de fenotipos múltiples, la sobreexpresión de bombas de eflujo esté siendo mediada por la activación de un regulón u operón, es decir que sea controlada por un inductor externo.

En cuanto a la presencia repetida de ampicilina, resulta interesante el estudio de la contribución de las beta-lactamasas AmpC con los sistemas de eflujo en la resistencia intrínseca de *E. coli* (220). Esta especie bacteriana en particular, usualmente expresa niveles moleculares basales de enzimas beta-lactamasas clase C no inducibles, conocidas como AmpC. Éstas son de tipo constitutivo e insensibles a la acción de inhibidores de las beta-lactamasas, como el ácido clavulánico (60). Existe evidencia sobre el rol significativo de los sistemas de eflujo activo en combinación con la producción enzimática como cooperador en la expresión de fenotipos resistentes (148, 149, 221). En estos casos particulares, es importante destacar la co-acción entre distintos mecanismos de resistencia, especialmente frente a los compuestos que son pobremente hidrolizados por AmpC y que contienen en forma adicional sustitutos lipofílicos. Cuando se trata de compuestos susceptibles de ser rápidamente hidrolizados, el efecto colaborador del eflujo activo se ve desdibujado (220).

IV.4. Prueba cuantitativa para evaluar la susceptibilidad

IV.4.1. Concentración inhibitoria mínima

Para la realización de las pruebas de susceptibilidad se realizó una modificación en la técnica tradicional, se reemplazó el caldo Mueller Hinton (MH) recomendado por los estándares internacionales (167, 173), y en su lugar se usó caldo LB (VI.3.Anexo C). A continuación se fundamenta y se resalta las ventajas de tal decisión.

Este medio originalmente creado por Giuseppe Bertani en 1951 (222), lleva por nombre verdadero "Caldo Lisogénico" y de sus iniciales en inglés surge la abreviación LB. Hoy en día se usa indistintamente para denominar del mismo modo al medio Luria Bertani, Caldo Lennox o Caldo Luria. Es un medio nutricionalmente rico, empleado desde 1950 en estudios de microbiología molecular de *E. coli*, adecuado para el cultivo de células recombinantes que no crecen correctamente en medio pobres (223). Permite un rápido y adecuado crecimiento de *E. coli* sobre todo en protocolos moleculares.

En nuestro trabajo en particular, permitió el desarrollo de las cepas mutagénicas utilizadas en el control y puesta a punto de la metodología; en particular la cepa con delección total de bombas de eflujo AG100A, de extrema labilidad en medios de rutina. Con el fin de lograr menor variabilidad en los resultados, todas las cepas analizadas fueron estudiadas empleando LB. Conociendo que sigue siendo muy utilizado, pero que en publicaciones actuales existe evidencia que no es recomendable para estudios donde el estado fisiológico y la función metabólica bacteriana sean de importancia (224, 225), las muestras estudiadas fueron testeadas también eventualmente en MH, y el resultado fue la obtención de resultados casi idénticos como puede observarse para florfenicol en el Anexo E, tablas VI.1 y VI.2. En varias publicaciones en las que se realizaron análisis cuantitativos de la susceptibilidad incluyendo cepas mutagénicas, el caldo LB fue el de elección (40, 151, 226, 227).

En la evaluación de la concentración inhibitoria mínima, se analizaron los aislamientos con perfiles de resistencia múltiples, es decir, 10 cepas de *E. coli* MDR; cepas de genotipo conocido AG112, AG100A y AG100; y *E. coli* ATCC 25922. Los antimicrobianos presentes en los fenotipos hallados, fueron testeados en presencia y ausencia del inhibidor de bombas de eflujo NMP. Como algunos microorganismos eran fenotípicamente resistentes a ciertos antimicrobianos pero no a otros, para una mejor comprensión de los resultados se los subclasificó, en MDR-R (MDR con resistencia al antimicrobiano analizado) y MDR-S (MDR con sensibilidad al antimicrobiano analizado).

El rol de la contribución de la sobreexpresión de bombas en la resistencia es difícil de inferir basándonos únicamente en los perfiles de resistencia, y aún no ha sido examinado sistemáticamente

este tipo de análisis (36). Sin embargo, hipotetizamos que ante un perfil de resistencia múltiple donde varios de los antimicrobianos presentes son conocidos sustratos de las bombas, éste puede ser uno de los mecanismo de resistencia actuante. Por ello, en esta etapa de nuestros análisis intentamos utilizar un EPI como screening de evaluación de: (1) la presencia de resistencia mediada por eflujo activo en cepas MDR; y (2) la contribución de la sobreexpresión de bombas como mecanismo putativo para los fenotipos MDR en *E. coli*.

Los inhibidores de bombas de eflujo son fármacos con capacidad de modificar la resistencia mediante bloqueo de dichos sistemas. Varias arylpiperidinas y compuestos diversos con capacidad de actuar en *E. coli* y otras especies bacterianas pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae fueron extensamente estudiados (35, 37, 38, 39).

Uno de estos compuestos es Phe-Arg- β -naphthylamide (PA β N), EPI analizado en diversas especies bacterianas como *P. aeruginosas* (226), *E. coli* (35), *C. jejuni*(157). Ha sido claramente demostrado que PA β N tiene la capacidad de revertir la resistencia en algunas bacterias Gram-negativas. Sin embargo, se demostró que PA β N manifestó actividad antibacteriana intrínseca frente a cepas de *E. coli* que no sobreexpresaban sistemas de eflujo. Es decir que este EPI, tiene efecto sobre estos microorganismos aún en ausencia de la combinación con otros antimicrobianos y se sospecha que su efecto antibacteriano lo ejerce a través de mecanismos adicionales, distintos del bloqueo de las bombas (14, 35, 227).

Es por ello que en nuestro trabajo seleccionamos a 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine como inhibidor de bombas de eflujo para analizar en combinación con los antimicrobianos. Algunos autores describen a este compuesto como moderadamente activo para revertir la multiresistencia por sobreexpresión de bombas RND en *E. coli* (40). Pero como ventaja interesante, está claramente comprobado que es un fármaco que carece de actividad intrínseca antibacteriana. Esto quedó en evidencia al evaluar su acción sobre bacterias deficientes en la expresión de bombas de eflujo, e incluso cuando fue evaluada su actividad intrínseca sin combinarlo con algún antimicrobiano (35, 39, 40). Es de importancia destacar que algunos autores como Bohnert & Kern, en 2005 afirmaron en una de sus publicaciones que consideran que NMP es el compuesto más potente frente a la especie *E. coli*, a pesar que ha sido demostrado que exhibe menor actividad como EPI que PA β N (35).

IV.4.1.1. Ampicilina

De acuerdo a los resultados obtenidos al analizar la CIM para ampicilina, el bloqueo de los sistemas de eflujo por NMP no modificó la susceptibilidad de las cepas analizadas, es decir, no se vio

afectado el resultado por la incorporación creciente del inhibidor. Este fenómeno se observó no solamente en las cepas MDR-RA, sino también en la AG112 con sobreexpresión de bombas de eflujo, en AG100 y en AG100A, lo cual nos hace pensar en que el antimicrobiano no es sustrato de la bomba. Sin embargo, los resultados individuales de las CIMs sin NMP de AG100A y AG112, se contraponen a esta afirmación, pues para lograr la inhibición bacteriana de la cepa con sobreexpresión de bombas fue necesaria una concentración cuatro veces mayor que la usada para inhibir a la cepa con delección de las mismas, lo cual hace pensar que ampicilina es, en cierta forma, afectada por el eflujo activo. De cualquier modo, es evidente que la acción de este mecanismo de resistencia no afecta de forma importante la susceptibilidad bacteriana frente a ampicilina, pues la CIM obtenida al analizar la cepa AG112, fue de 4 µg/mL, es decir, sigue siendo un fenotipo susceptible frente a este antimicrobiano. La CIM de ampicilina frente a las cepas mutagénicas, publicada por diversos autores presenta valores cercanos a los nuestros (72, 177, 178).

Algunos autores afirman que ampicilina es sustrato de las bombas de eflujo tipo RND (72, 148). Esta benzilpenicilina tiene un elevado nivel de penetración bacteriana gracias a la fuerte hidrofobicidad de su forma protonada, alcanzando concentraciones citoplasmáticas con rapidez. La llegada al interior de la célula bacteriana la convierte en un blanco fácil para la captación de las bombas. Li et al., (1994b) demostraron, en cepas mutagénicas de *P. aeruginosa*, la influencia de la presencia de las bombas de eflujo tipo RND en la susceptibilidad de las benzilpenicilinas; al comparar bacterias susceptibles con delección de bombas, versus bacterias resistentes con sobreexpresión de dichos sistemas, las CIMs eran diferentes, sugiriendo que ampicilina era sustraída por eflujo activo (221). Pero al contrario de nuestros resultados los autores mencionados, lograron aumentar la concentración intracelular del antimicrobiano al bloquear el eflujo activo mediante el uso de un inhibidor de bombas conocido como carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) (228).

Por otra parte, resultados similares al obtenido en nuestro trabajo, fueron publicados por Bina y col. (2009) quienes no obtuvieron cambios en la CIM de ampicilina al combinarlo con NMP frente a *Vibrio cholerae* (229).

Está demostrado que el eflujo tiene un papel clave en la cooperación con las enzimas beta-lactamasas, pues permite además que el sistema enzimático no se sature (13, 41, 42, 150, 150). Sin embargo, como mecanismo de resistencia único, los sistemas de eflujo, frente a dicho grupo de antimicrobianos, no generan niveles de resistencia significativos (148, 149, 226, 229).

IV.4.1.2. Gentamicina y trimetoprima-sulfametoxazol

Gentamicina y trimetoprima-sulfametoxazol, no modificaron sus CIMs con la incorporación creciente de NMP. Y en las cepas mutantes con genotipo conocido, la ausencia o la presencia de bombas de eflujo no afectó los resultados de las CIMs, es decir, fueron idénticos para AG100, AG100A y AG112. Este hallazgo no debe sorprendernos, pues, gentamicina es un antimicrobiano con elevada polaridad, lo cual lo convierte en un mal sustrato para los sistemas de eflujo. En cuanto a TMS, algunas publicaciones sustentan el papel de las bombas de eflujo y las porinas de membranas como posibles mecanismos de resistencia bacteriana frente a estos antimicrobianos (230, 231). Bohnert y col. (2005) concuerdan con nuestros resultados, pues no observaron cambio alguno en la CIM de los antimicrobianos mencionados al combinarlos con el inhibidor NMP en cepas mutantes de *E. coli* con sobreexpresión de sistemas de eflujo tipo RND (35). Lo mismo fue publicado por Lomovskaya y col. (2001) quienes manifestaron que gentamicina no se comportó como sustrato de las bombas MexAB-OprM (análogas de AcrAB-TolC, de *E. coli*) en *P. aeruginosa*, manteniendo su CIM invariable al combinarla con PA β N (226).

IV.4.1.3. Florfenicol

Considerando que la sobreexpresión de bombas de eflujo es el único mecanismo de resistencia presente en la cepa AG112, los resultados demostraron que NMP manifiesta un importante sinergismo al combinarse con florfenicol en particular. La reducción de la CIM modificó el perfil de resistencia de la cepa descendiendo la misma de manera tal, que la cepa recuperó la susceptibilidad por completo al combinar el antimicrobiano con la concentración mayor de NMP.

En cuatro de las cinco cepas de campo con fenotipo MDR-FR, la CIM de florfenicol descendió 4 veces o más la CIM al combinarse con 100 μ g/mL de NMP. En una de ellas la acción del antimicrobiano se vio potenciado 16 veces, se logró revertir la resistencia hacia la susceptibilidad al igual que ocurrió con AG112. Curiosamente esta cepa fue la que presentó un fenotipo de resistencia múltiple frente a cinco antimicrobianos al mismo tiempo. Si bien estos resultados son preliminares, pueden tener una proyección sumamente importante, debido a que florfenicol tiene un uso muy extendido en nuestro país en medicina veterinaria, tanto en explotaciones bovinas, porcinas y avícolas. El poder revertir la resistencia a florfenicol frente a microorganismos Gram-negativos de importancia en salud pública, permitiría utilizar en condiciones de total susceptibilidad microbiana una molécula con excelentes características para el tratamiento de enteritis infecciosas relacionadas con *E. coli*

enteropatógena, *Salmonella* y enfermedades respiratorias causadas por *Pasteurella* spp. entre otras (135).

En la bibliografía no se encontraron estudios acerca de la combinación de florfenicol con inhibidores de bombas frente a cepas MDR. En su lugar, el antimicrobiano evaluado fue cloranfenicol. Sin embargo, se sabe que cuando la resistencia a los fenicoles es causada por eflujo activo de bombas sobreexpresadas, existe resistencia cruzada entre ambos antimicrobianos. Es decir, que es posible comparar los resultados. Varios autores coinciden con nuestros hallazgos, tanto en *E. coli* (35, 39), *P. aeruginosa* (151, 226) y otras enterobacterias (40). En estos trabajos, se analizó la combinación de inhibidores de bombas con cloranfenicol y en todos los casos la reducción de la CIM del antimicrobiano fue de 4 veces o más. Estos resultados reafirman el papel de los fenicoles como sustratos de los sistemas de eflujo múltiple.

Un dato interesante para analizar es el efecto de NMP sobre las cepas MDR sensibles a florfenicol y ciprofloxacina. La CIM de florfenicol descendió 8 veces en 4 de las 5 cepas cuando estos aislamientos se combinaron con 100 µg/mL de NMP. Lo mismo ocurrió al analizar ciprofloxacina sobre cepas MDR-SC, es decir, con fenotipo de resistencia múltiple pero sensibles a la acción de esta quinolona. En este último caso no fue un descenso tan acentuado como con florfenicol, pero la CIM disminuyó 2 y 4 veces con la concentración más elevada del inhibidor. En algunos trabajos publicados, se observó un descenso de 4 veces o más la CIM de ciprofloxacina y levofloxacina, en cepas MDR sensibles a fluoroquinolonas aisladas de muestras clínicas de humanos, de las especies *P. aeruginosa* y *A. baumannii* (36, 39, 227). Evidentemente el bloqueo de las bombas presentes modifica la susceptibilidad de los antimicrobianos sustratos de éstas, aún cuando posiblemente no se hallen sobreexpresadas.

IV.4.1.4. Ciprofloxacina

En nuestro estudio la fluoroquinolona analizada fue ciprofloxacina. Existe evidencia de la obtención de modificaciones de las CIMs de fluoroquinolonas en aislamientos clínicos humanos de *P. aeruginosa* (36, 40) y *E. coli* (14, 39) con resultados similares a los nuestros. La principal diferencia radicó en que los aislamientos analizados en dichas publicaciones fueron en su mayoría de origen humano, obtenidos de clínicas y hospitales; y la fluoroquinolona analizada fue primordialmente levofloxacina. Sáenz y col. (2004), estudiaron el efecto del bloqueo de bombas en cepas de *E. coli* de diversos orígenes incluyendo animales, pero el inhibidor analizado fue PAβN (14).

En la cepa AG112, se logró potenciar 4 veces la acción de ciprofloxacina al incorporar 100 µg/mL de NMP. Bohnert y col. (2005) observaron un efecto similar con este mismo inhibidor en cepas mutantes con sobreexpresión de *acrAB* utilizando levofloxacina, norfloxacina y ciprofloxacina (35). En este trabajo se realizó la comparación entre la acción del inhibidor PAβN versus NMP, e indicaron que el primero tuvo un efecto limitado sobre la CIM de las fluoroquinolonas en comparación con el segundo (35).

En las 5 cepas de campo *E. coli* MDR-RC, se alcanzó el mismo resultado expresado para AG112, es decir que la CIM de ciprofloxacina descendió 4 veces con 100µg/mL del inhibidor NMP. En los aislamientos clínicos analizados por Kern y col. (2006) la CIM₅₀ de las cepas MDR resistentes a levofloxacina, fue equivalente a 16 µg/mL, en cambio en nuestro trabajo el valor hallado para este parámetro fue de 128 µg/mL, en las cepas MDR-RC (39). Sin embargo, ellos también lograron potenciar la acción de levofloxacina 4 veces con 100 µg/mL de NMP.

Un dato interesante es que ha sido demostrado en cepas de *P. aeruginosa*, que la utilización de EPIs permite: (1) potenciar la actividad de fluoroquinolonas y otros antimicrobianos, (2) revertir la resistencia adquirida a fluoroquinolonas atribuible no solo a mutaciones relacionadas con eflujo, sino también a aquellas vinculadas con el sitio diana del antimicrobiano, y (3) disminuir notablemente la frecuencia de selección de cepas mutantes con elevados niveles de resistencia frente a fluoroquinolonas (151, 226).

La utilización de fluoroquinolonas en medicina humana y veterinaria ejerce un papel preponderante en la selección de cepas MDR. Se comprobó que estos fenotipos pueden ser seleccionados fácilmente *in vivo* e *in vitro* en una variedad de especies bacterianas, si se exponen sucesivas veces a la acción de las fluoroquinolonas (40). Esta multirresistencia está vinculada a la sobreexpresión de sistemas de eflujo de la familia RND. También fue demostrado que la delección de las bombas de eflujo reduce la frecuencia de emergencia de cepas mutantes resistentes (151, 152).

Cuando los niveles de resistencia a fluoroquinolonas son elevados, es decir con CIMs ≥ 32 µg/mL, existe una combinación de mecanismos de resistencia (220). Ante una primera exposición se genera mutación de los genes que codifican para la diana del antimicrobiano (*gyrA* y *parC*), pero no son suficientes para lograr resistencia de elevado nivel. Una exposición repetida a estos antimicrobianos, selecciona cepas con capacidad de sobreexpresar los sistemas de bombas de eflujo, dando finalmente un fenotipo de resistencia elevada y múltiple (39, 220). Un dato interesante de nuestros hallazgos es que las 5 cepas de campo MDR-RC manifestaron CIMs ≥ 32 µg/mL.

IV.4.1.5. Tetraciclina

La CIM de tetraciclina en la cepa AG112 manifestó un fenotipo de sensibilidad intermedia, es decir 8 µg/mL. Con la incorporación de NMP, se alcanzó un descenso de la CIM de 4 veces con 50 µg/mL y de 16 veces con 100 µg/mL de inhibidor. En este último caso la CIM alcanzada se igualó a la obtenida por la cepa con delección total de bombas, dejando manifiesto que el bloqueo total se logró con la concentración más elevada de NMP.

En las 10 cepas de campo MDR-RT se potenció 4 veces la acción de tetraciclina con la incorporación de 100 µg/mL del bloqueador de bombas. Lamentablemente en ninguno de los casos se obtuvo reversión de la resistencia hacia la susceptibilidad.

La CIM₅₀ para tetraciclina obtenida por Kern y col. (2006) fue de 128 µg/mL, la mitad a la hallada en nuestro trabajo (256 µg/mL). Sin embargo, en ambos casos se manifiesta un elevado nivel de resistencia (39). En todos los trabajos encontrados, tetraciclina se mostró como sustrato de las bombas de eflujo con un descenso marcado de la CIM cuando se combinó con inhibidores de los sistemas de eflujo (14, 39, 40, 151, 226, 227).

IV.4.1.6. Efectos de la combinación de los antimicrobianos sustratos de las bombas con NMP frente a las cepas isogénicas

Ciprofloxacina, tetraciclina y florfenicol demostraron claramente ser sustratos de las bombas. La cepa mutante con sobreexpresión de bombas logró un bloqueo total del eflujo al combinar los antimicrobianos mencionados con 100 µg/mL de NMP.

Puede comprobarse que ocurre bloqueo completo de las bombas de eflujo bacteriano con la incorporación de 100 µg/mL de NMP, al analizar la siguiente razón que incluye a la cepa AG112 con sobreexpresión de bombas de eflujo y a la AG100A, con delección total de las mismas:

$$\frac{CIM_{ATM-AG112}}{CIM_{ATM-AG100A}} \cong \frac{CIM_{ATM-AG112}}{CIM_{ATM-AG112+NMP}} \quad \text{Ecuación IV.1}$$

La razón establece que si dividimos las CIMs de los antimicrobianos obtenidas frente a la cepa AG112 por las CIMs de los mismos frente a la AG100A, obtenemos el mismo resultado que al dividir las CIMs de los antimicrobianos sin NMP frente a AG112 por las CIMs con 100 µg/mL de NMP en la misma cepa. Es decir, que al incorporar dicha concentración de NMP el bloqueo de los sistemas de eflujo iguala las CIMs obtenidas frente a AG112 con aquellas logradas frente a AG100A.

Se generaron descensos notables de la CIMs de 4 veces o más en la cepa AG112 y en la mayoría de las cepas salvajes de *E. coli* con fenotipo MDR, con resistencia a alguno de los tres quimioterápicos mencionados en su perfil. El valor de 4 veces el descenso de la CIM se toma en forma arbitraria como punto de corte para considerar la existencia de un efecto de bloqueo en las bombas. Este concepto se adoptó a partir de trabajos publicados por diversos autores, que lo establecen de la misma manera para considerar que existe acción del inhibidor sobre las bombas (14, 35, 39, 40, 227). En estos estudios, se comprobó que cuando existe un descenso de 4 veces o más de la CIM de fluoroquinolonas y de otros antimicrobianos frente a una misma cepa con fenotipo MDR (ya sea un aislamiento clínico o una mutante de genotipo conocido con sobreexpresión de bombas tipo RND), puede afirmarse que existe un “efecto de reversión MDR”.

IV.4.2. Concentración efectiva mínima de NMP (MEC)

En general, la concentración de NMP que redujo un mínimo de cuatro veces la CIM del antimicrobiano en la mayoría de las muestras MDR de campo analizadas fue de 100 µg/mL. Algo semejante ocurrió frente a la cepa mutagénica AG112, pues a pesar que con 50 µg/mL, las CIMs de florfenicol y tetraciclina se vieron claramente modificadas, para obtener una reducción de 4 veces o más de la CIM de ciprofloxacina, se necesitó incorporar 100 µg/mL de inhibidor. Por ello, consideramos que la MEC de NMP se corresponde con este último valor.

Nuestros resultados coinciden con otros autores que trabajaron con *E. coli* patógeno proveniente de aislamientos clínicos (35, 39, 40), con *A. baumannii* (227) y con *Campylobacter* spp. (155). En todos los casos la mínima concentración de inhibidor capaz de lograr una reducción de 4 veces o más la CIM de los antimicrobianos estudiados fue de 100 µg/mL.

En cuanto a la CIM obtenida para NMP en las cepas mutantes control (400 µg/mL) y en las MDR de campo (800 µg/mL), también existe coincidencia con otros trabajos publicados (39, 227). Es un hallazgo importante, pues un valor tan elevado indica que el inhibidor por sí solo no tiene acción antimicrobiana.

IV.4.3. Interacciones entre los antimicrobianos y el NMP

Los efectos en la actividad combinada de dos antimicrobianos, o como en nuestro caso, las interacciones ocurridas entre un antimicrobiano y un inhibidor de bombas de eflujo, pueden ser clasificados en 4 subtipos: **indiferencia**, cuando la actividad de los dos quimioterápicos no difiere de la actividad del más efectivo por separado; **adición**, cuando la actividad combinada es aproximadamente

la suma de las actividades parciales; **sinergismo** en el caso que la actividad de los dos fármacos juntos sea significativamente mayor que la adición de las actividades parciales; y **antagonismo** si la actividad de la combinación es significativamente menor que la suma de las actividades individuales (170, 170, 170).

En estudios de asociaciones de fármacos antimicrobianos, se establece un Índice de Concentración Inhibitoria Fraccionaria (CIF). Este índice representa la sumatoria de las CIFs de cada fármaco testeado. La CIF está determinada por la división de la CIM de cada uno de ellos cuando se hallan combinados en una determinada proporción con el otro, por la CIM de cada uno sin combinar.

El índice CIF está basado en la teoría de aditividad de Loewe (1953) (232), fundamentada en la hipótesis que establece que un fármaco no es capaz de interactuar consigo mismo y consecuentemente en dicha situación, el efecto esperado será aditivo, correspondiéndose con un valor de CIF igual a 1. De este modo, si el índice CIF es mayor o menor a 1 indica sinergismo o antagonismo respectivamente, debido a que para volver a lograr el efecto del fármaco solo se requeriría aumentar o disminuir la concentración del mismo (170, 233, 234).

La ecuación que representa lo anteriormente expuesto es la siguiente:

$$\frac{(A)}{(CIM)_a} + \frac{(B)}{(CIM)_b} = CIFA + CIBb = \text{Indice CIF} \quad \text{Ecuación IV.2}$$

A partir de los valores de CIF obtenidos, se considera la clase de interacción que ocurre entre ambos fármacos. Algunos autores consideran sinergismo cuando el valor de CIF <1, adición o indiferencia cuando es igual a 1 y antagonismo si es superior a 1 (233, 234, 235). Sin embargo otros autores (236, 237, 238) establecen rangos intermedios de modo que la clasificación es un poco más amplia, siendo sinergismo cuando los valores de CIF son ≤ 0.5 ; sinergismo parcial o adición para CIFs en el rango de > 0.5 y < 1 ; indiferencia o adición si es ≥ 1 y < 2 y antagonismo cuando el valor es $\geq 2-4$. Basándonos en esta última clasificación e implementando la ecuación número IV.2, consideramos para los resultados presentados en nuestro trabajo, verdadero sinergismo a aquellos valores de CIF ≤ 0.5 .

Las posibles ventajas de las interacciones sinérgicas incluyen: (1) incremento de la eficacia terapéutica; (2) decremento del riesgo de toxicidad por disminución de la dosis inicial, con conservación de la eficacia; (3) disminución del riesgo de selección de resistencia bacteriana; y (4) provisión de sinergismo selectivo sobre el huésped (239)

Es evidente que en los resultados expuestos en las tablas III.23 a la III.30 de "Resultados", se observó la ocurrencia del fenómeno de sinergismo sin excepción, cuando se realizó la combinación de los tres antimicrobianos evaluados con 100 µg/mL de NMP.

La incorporación de 50 µg/mL de NMP tuvo excelentes resultados con florfenicol y tetracilina frente a la cepa AG112, con valores del índice CIF casi idénticos a los obtenidos con 100 µg/mL de NMP. En cuanto a las cepas de campo MDR, la mayoría de ellas manifestó en las combinaciones de florfenicol y tetracilina con 50 µg/mL de NMP resultados muy similares a los mencionados para la cepa con sobreexpresión de bombas. Lo cual es un indicador que la incorporación de NMP en el orden de las concentraciones mencionadas, actúa en colaboración con los antimicrobianos sustratos de los sistemas de eflujo, produciendo sinergismo de potenciación ya que con una concentración de antimicrobiano varias veces inferior a su CIM, se logra un efecto antibacteriano mejorado.

IV.5. Concentración bactericida mínima

La determinación de la concentración bactericida se realizó por la técnica de microdilución en caldo siguiendo las recomendaciones de la CLSI (108).

La evaluación de la CBM está sujeta a variables metodológicas por lo que su relevancia clínica es casi imposible de apreciar. En la actualidad no se dispone de técnicas normalizadas a pesar de las revisiones existentes (108). En general, es una metodología de baja reproducibilidad debido a razones técnicas, con influencia de las variables de los métodos de dilución (medios de cultivo, variaciones del medio elegido, iones, pH, inóculo, incubación). Asimismo, en las guías mencionadas, son muy pocos los antimicrobianos presentados en las tablas con los valores de referencia para las cepas ATCC control.

Esta técnica es utilizada en terapéutica para el estudio de antibióticos considerados bactericidas. Sin embargo, en investigación son adecuados para evaluar nuevos antimicrobianos o viejos frente a nuevos patógenos y para determinar la capacidad y poder bactericida; y la presencia de efecto paradójico y tolerancia. En nuestro trabajo en particular, se utilizó para evaluar la acción del NMP sobre la actividad bactericida de los antimicrobianos utilizados.

Si la razón entre la CBM y la CIM es pequeña (≤ 4), el antimicrobiano es considerado bactericida y consecuentemente es posible conseguir el 99.9% de muerte del microorganismo expuesto. Contrariamente, si la relación CBM: CIM es mayor a 4, el antimicrobiano es considerado bacteriostático y no será posible administrar una dosis que asegure el 99.9% de muerte bacteriana (240, 241).

Sin embargo, para muchos quimioterápicos, la diferenciación entre bactericida y bacteriostático no se correlaciona exactamente con lo expuesto en el párrafo anterior. La concentración en el sitio de infección, el patógeno involucrado, entre otras son variables que influyen en el efecto final del antimicrobiano (241).

En nuestro trabajo la CBM de ampicilina obtenida para la cepa *E. coli* ATCC 25922 en caldo LB fue de 8 µg/mL. Este valor es coincidente con lo establecido por la CLSI (108) y con los reportes de Reimer y col. para la cepa de referencia mencionada (242).

En las cepas mutagénicas (AG112 y AG100A), en la wild type (AG100) y en las *E. coli* MDR-SA, la CBM de ampicilina fue igual a la CIM, o una concentración mayor a la misma. La incorporación de inhibidor de bombas de eflujo no modificó en absoluto los resultados de la CBM. Es decir, que la relación CBM:CIM fue de 1 y 2. Ampicilina es un antimicrobiano bactericida por lo cual es esperable que la CBM sea coincidente o cercana a la CIM.

En cuanto a las cepas *E. coli* MDR-RA la CIM fue ≥ 256 µg/mL, por lo cual no hubo pocillos vacíos a partir de los cuales se pueda realizar la prueba complementaria de la CBM.

Con florfenicol en cambio, la CBM fue superior a 256 µg/mL frente a *E. coli* ATCC 25922 en caldo LB. Este es un antimicrobiano bacteriostático, es decir que no resultó sorprendente el hallazgo de una relación CBM:CIM mucho mayor que 4. No existe documentación que permita corroborar nuestro resultado en la cepa de referencia, con un valor estandarizado. Al contrario de lo esperado, es importante destacar, que la CBM se alejó cada vez más del valor de la CIM con el agregado del inhibidor tanto en la cepa ATCC como en AG112. En ésta última la relación aumentó 4 veces con la incorporación de 100 µg/mL de NMP.

En las cepas de *E. coli* MDR-RF, fue posible realizar la evaluación de la CBM solo en aquellas situaciones en las que la CIM fue ≤ 128 µg/mL con o sin NMP, es decir, cuando había pocillos transparentes por delante de la concentración mencionada. En dichos casos, la relación CBM:CIM obtenida estuvo en el rango de 1 a 4 veces no observándose cambios importantes con la incorporación de NMP. Es importante destacar la cercanía entre los valores de las CIMs y las CBMs; pues el antimicrobiano se manifestó a concentraciones elevadas (relación CBM:CIM $\leq 4:1$), casi en forma constante como bactericida, contraponiéndose a su efecto bacteriostático observado a concentraciones inferiores frente a la cepa ATCC de referencia. En un trabajo de Illambas y col. (2013), se describió un hallazgo similar al analizar la farmacodinamia de florfenicol frente a *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida*, pues se obtuvo una relación CBM:CIM de 1.8:1 y 2.4:1 respectivamente; en este estudio, el antimicrobiano se manifestó como dependiente de la

concentración frente a *M. haemolytica* y co-dependiente (del tiempo y de la concentración) frente a *P. multocida* (243). Es decir, que es muy probable que nuestro resultado se deba a las elevadas concentraciones a las que se expusieron las cepas MDR-RF.

En un trabajo publicado por Choi y col. (2011), la CBM hallada para este antimicrobiano frente a cepas de campo de *E. coli* fue de 64 µg/mL, la CIM de 8 µg/mL y consecuentemente, la relación CBM:CIM fue de 8 veces. Considerando que se trató de cepas susceptibles, los resultados no coinciden con nuestros hallazgos pues en nuestras cepas MDR-SF la relación fue en la mayoría de los casos ≥ 16 (236).

En cuanto a las cepas MDR con fenotipo sensible a florfenicol, mostraron gran variabilidad de resultados. En tres de ellas la relación CBM:CIM se redujo con la incorporación de NMP.

Para ciprofloxacina tanto en las cepas control con diferentes niveles de expresión de bombas de eflujo, en la *E. coli* ATCC 25922 y en las cepas *E. coli* MDR-RC no se observaron cambios importantes de la relación CBM:CIM con la creciente incorporación de NMP al antimicrobiano. La CBM en la mayoría de los casos fue igual o entre una y dos veces mayor al valor de la CIM. Este resultado se corresponde con la acción de un antimicrobiano bactericida como son las fluoroquinolonas. Es decir, que a pesar de disminuir la concentración del antimicrobiano, se mantiene el efecto bactericida gracias a la adición de inhibidor.

En cuanto al antimicrobiano tetraciclina, con las cepas mutagénicas (AG100A-AG112), la wild type (AG100), la de referencia *E. coli* ATCC 25922; y con las cepas de campo *E. coli* MDR-RT, no se observaron cambios importantes en la relación CBM:CIM frente a la creciente incorporación de NMP. La CBM fue mucho más elevada que la CIM en todos los casos, resultado esperable siendo que tetraciclina es un antimicrobiano bacteriostático. Según Reimer y col. (1981) (242), el valor de CBM para *E. coli* ATCC 25922 es ≥ 32 µg/mL, es decir que nuestro resultado de 128 µg/mL es aceptable y coincidente con el de estos autores.

IV.6. Curvas de letalidad bacteriana

Para la realización de las curvas de letalidad bacteriana, se utilizó caldo LB, su fundamento fue descrito en el punto VI.4.1 del Anexo C. La técnica se diseñó de manera tal, que por cada cepa analizada pueda ser evaluado el efecto del antimicrobiano solo y con el agregado de NMP a razón de 50 µg/mL y de 100 µg/mL. Por ello, se realizaron 3 baterías de 5 tubos cada una, para cada cepa y para cada antimicrobiano.

La lectura de las placas se realizó contando las colonias (UFC) a ojo desnudo: a cada una de las horas de lectura preestablecida se realizaron diluciones seriadas de cada tubo a fin de evitar que se produzca el efecto "carry over", siguiendo los fundamentos establecidos por la CLSI (108). Con los datos obtenidos se graficó el logaritmo de las UFC en función del tiempo. Se consideró efecto bactericida del antimicrobiano (utilizado solo) cuando se logró una disminución de 3 Log₁₀ (99.9 % de muerte bacteriana) de UFC en el tiempo evaluado. Mientras que para evaluar el efecto sinérgico de la combinación antimicrobiano/NMP, nos basamos en la CLSI que estipula que el efecto bactericida en una combinación sinérgica se manifiesta como una disminución de 2 Log₁₀ de UFC/mL (108).

IV.6.1. Florfenicol

En el caso de florfenicol, al comparar el descenso de las UFC/mL entre las curvas obtenidas con el antimicrobiano solo y las que resultaron de la incorporación de 50 µg/mL y de 100 µg/mL de NMP, no se observaron diferencias importantes. Es decir, que existe una "cinética de muerte" muy semejante entre las curvas pues la velocidad con la que disminuye el recuento bacteriano en los distintos tubos de cada una de las baterías analizadas, es casi idéntica.

Sin embargo, es primordial destacar que a pesar que la cinética de muerte sea similar, las concentraciones antimicrobianas iniciales a las cuales se expuso el inóculo bacteriano en las tres baterías, fueron diferentes. Dichas concentraciones fueron determinadas por los valores previamente obtenidos para las CIMs de florfenicol sin NMP frente a la cepa AG112 (32 µg/mL), con 50 µg/mL de NMP (8 µg/mL) y con 100 µg/mL (2 µg/mL). Esto demuestra claramente cómo la incorporación de NMP en concentraciones crecientes permite que el antimicrobiano mantenga similar eficacia a concentraciones claramente inferiores, demostrando de esta manera un claro efecto sinérgico entre florfenicol y NMP.

Un ejemplo claro de lo anteriormente expuesto puede observarse tras 48 hs de incubación, cuando se expuso el inóculo bacteriano a florfenicol sin inhibidor, a una concentración de 8 veces la CIM (256 µg/mL). En este caso, se logró un efecto bactericida, determinado por un descenso de más de 3 Log₁₀ (-4.34 Log₁₀). El mismo resultado se observó en las baterías que contenían 50 µg/mL y 100 µg/mL de NMP, pues al mismo tiempo mencionado (48 hs), y con un valor de CIMs de 8 veces inferior (equivalente a 64 µg/mL y 16 µg/mL de florfenicol, respectivamente), ocurre un descenso idéntico en el recuento de UFC/mL. En conclusión, con concentraciones del orden de 4 y 16 veces inferiores del antimicrobiano florfenicol, se logró conservar la cinética de mortandad en las bacterias expuestas con

la ayuda del inhibidor de bombas de eflujo a razón de 50 µg/mL y de 100 µg/mL, respectivamente (Figuras III.27 y III.28 en el apartado "Resultados").

En el caso de las cepas de campo analizadas, Vo2-TQ y Vo1-SV, ocurre algo semejante a lo descrito para la cepa AG112, la cinética de muerte se manifiesta de forma similar en las tres baterías de tubos. Es decir, sin NMP, con 50 µg/mL y con 100 µg/mL del inhibidor. Sin embargo, también en este caso las concentraciones a las cuales se expone el inóculo son diferentes en las tres baterías. Es importante recordar que por ser cepas MDR-RF, la CIM de florfenicol sin NMP fue muy elevada (256 µg/mL); y con la incorporación de 50 µg/mL y de 100 µg/mL de NMP, las CIMs fueron de 64 µg/mL en ambos casos.

No obstante, existen diferencias entre ambas cepas: la disminución en el recuento de colonias en la cepa Vo2-TQ fue más rápida y más intensa que para la cepa Vo1-SV. Puede observarse que a las 8 hs de exposición al antimicrobiano sin NMP, en el tubo cuya concentración es la de la CIM (256 µg/mL), se produce un descenso en el recuento bacteriano mayor a 2 Log_{10} , en la Vo2-TQ; mientras que en la segunda cepa mencionada el mismo efecto se manifiesta recién a las 48 hs. Un hecho similar ocurre en el tubo que contiene el doble de concentración, es decir 512 µg/mL de la misma batería (Figuras III.30-33).

Es importante también mencionar el fenómeno de recrecimiento bacteriano. A la concentración de la CIM al evaluar la cepa AG112, las UFC/mL descienden hasta las 8 hs, pero a partir de allí, y claramente observable a las 24 hs, se produjo un pequeño incremento en el número de las mismas. Este hecho ocurre en las 3 baterías, es decir que la incorporación de NMP en esta cepa no afecta la ocurrencia del mismo. El fenómeno de recrecimiento fue descrito por Choi y col. (2011), en un trabajo donde se analizó la curva de muerte bacteriana de *E. coli* frente a florfenicol a la concentración de la CIM; a partir de las 6 hs post-inoculación (236).

Sin embargo, en las cepas de campo, a pesar que se manifestó el recrecimiento bacteriano a las 8 hs post-incubación a la concentración de la CIM en las 3 baterías de tubos, a las 24 hs se observó que revirtió el fenómeno únicamente en la batería que contenía NMP a razón de 100 µg/mL.

Es importante destacar que a pesar de las diferencias halladas, estos resultados se corroboraron al realizar el análisis estadístico de la eficacia total expresada como porcentaje de muerte bacteriana a las distintas concentraciones evaluadas. Al aplicar ANOVA a dichos resultados, no se hallaron diferencias significativas en el porcentaje de eficacia en las curvas con antimicrobiano solo o con NMP (50 µg/mL o 100 µg/mL). Es decir, que como fue mencionado al principio, a pesar de disminuir la

concentración del antimicrobiano (florfenicol), se mantiene la eficacia antimicrobiana inmodificable gracias al sinergismo producido con NMP.

IV.6.2. Ciprofloxacina

Ciprofloxacina es un antimicrobiano bactericida acción concentración dependiente, situación que se confirma al observar las curvas de muerte bacteriana sin el agregado del inhibidor de bombas con las cepas AG112 y AG100 (Figuras III.34 y III.36 de "Resultados"). A pesar que se trata de una cepa muy susceptible (CIM = 0.062 µg/mL); y sabiendo que este antimicrobiano tiene mejor acción a concentraciones superiores a 1 µg/mL (244); se manifestó en la cepa AG112, el rápido descenso en el recuento de las UFC/mL a medida que las concentraciones del antimicrobiano aumentaban (Figura III.34 y III.35 del apartado "Resultados"). Del mismo modo, también se vió claramente que frente a concentraciones bajas del antimicrobiano se produce recrecimiento bacteriano considerable, que se logró revertir a la concentración de la CIM con la incorporación de 100 µg/mL del inhibidor (Figura III.34 (C) y III.35 (A) en "Resultados").

No obstante, al igual que con florfenicol, en las curvas de letalidad de la cepa AG112 con ciprofloxacina, se observó que la cinética de muerte en las 3 baterías de tubos (sin NMP, con 50 µg/mL y con 100 µg/mL del inhibidor) fue muy similar entre sí. En los tres casos, se puede ver un marcado descenso en el recuento bacteriano a las 4 hs de incubación, a la concentración de la CIM. En la batería que contenía ciprofloxacina sin NMP (CIM = 0.0625 µg/mL), y la que tenía el antimicrobiano combinado con 100 µg/mL de NMP (CIM = 0.015 µg/mL), el descenso mencionado superó los 2 Log₁₀; mientras que en la que poseía 50 µg/mL de inhibidor (CIM = 0.031 µg/mL), solo disminuyó 1.29 Log₁₀.

Sin embargo, con AG112, se evidenció que pasadas las 8 hs ocurrió recrecimiento en la batería que no contenía NMP y en la que tenía incorporado 50 µg/mL del mismo. Claramente la combinación de ciprofloxacina con 100 µg/mL del inhibidor evitó que las bacterias recrecieran aún ante la exposición del inóculo a una concentración 4 veces menor del antimicrobiano. En un trabajo de Kumar y col. (2008), donde se evaluó el efecto de ciprofloxacina sobre *S. aureus* a una concentración subinhibitoria equivalente a un cuarto de la CIM con y sin inhibidores de bombas, se obtuvo un efecto bactericida al combinar el antimicrobiano con el inhibidor a las 6 hs post incubación. Sin embargo, coinciden con nuestro trabajo en que ocurrió recrecimiento bacteriano evidenciable a las 24 hs en los tubos que contenían el antimicrobiano solo, mientras que dicho efecto no se observó cuando se incorporó el o los inhibidores (245).

En las cepas de campo MDR-RC (Ter1-TQ y Ter2-TQ), la cinética de las curvas de letalidad es muy semejante entre ellas. En este caso se evidenció la importancia de la concentración del antimicrobiano ciprofloxacina sobre su efecto bactericida concentración dependiente. Las baterías que contenían NMP tenían una concentración 2 y 4 veces inferior de ciprofloxacina (con 50 µg/mL y 100 µg/mL del inhibidor, respectivamente), en comparación con la del antimicrobiano solo. Esto hizo que la cinética de muerte se viese enlentecida a pesar de la incorporación del inhibidor de bombas. Dicho fenómeno quedó de manifiesto en el caso de los tubos que se correspondían con la concentración de la CIM, a las 4 hs post-inoculación, pues ocurrió que en la batería que contenía solo el antimicrobiano sin NMP (CIM=128 µg/mL) el recuento de UFC/mL disminuyó 4.21 Log₁₀; mientras que, en la batería con 50 µg/mL de NMP –cuya CIM era de 64 µg/mL–, el descenso fue de 3.30 Log₁₀ y en la de 100 µg/mL de NMP, 0.82 Log₁₀ (CIM de 32 µg/mL). Es decir, la actividad bactericida es exclusivamente consecuencia del aumento de la concentración del antimicrobiano ciprofloxacina; al incorporar el NMP, se pierde dicho efecto, no resultando posible disminuir el recuento de UFC/mL en la misma magnitud ya que la concentración de ciprofloxacina fue menor en la combinación con el inhibidor.

No obstante las diferencias mencionadas, al igual que ocurrió con florfenicol, en el análisis estadístico de la eficacia total de las cepas estudiadas, no se hallaron diferencias significativas en el porcentaje de eficacia en las curvas con ciprofloxacina sola o con NMP (50 µg/mL o 100 µg/mL) de las cepas de campo. Es decir, que en este caso también, a pesar de disminuir la concentración del antimicrobiano se mantiene su eficacia inmodificable gracias al sinergismo producido por NMP.

IV.6.3. Tetraciclina

Para tetraciclina, en la evaluación de las curvas obtenidas con AG112 ocurrió algo semejante a lo descrito para florfenicol y ciprofloxacina. Es decir, la cinética de muerte es muy semejante, a pesar que la concentración antimicrobiana a la cual se expone el inóculo bacteriano es inferior en el orden de 4 y 16 veces, en las baterías de tubos que contienen 50 µg/mL y 100 µg/mL de NMP, respectivamente comparado con la que no contiene inhibidor.

En ninguna de las 3 baterías de la cepa de referencia, se logró un descenso superior o igual a 2 Log₁₀ ni siquiera en las concentraciones más elevadas de 8 x CIM y 4 x CIM. Este hecho concuerda con las características del antimicrobiano cuyo comportamiento es de tipo bacteriostático y tiempo dependiente (107, 118).

Al evaluar la cepa AG112, se evidenció la ocurrencia de recrecimiento bacteriano a partir de las 4 hs, a la concentración de la CIM, 2 x CIM y 4 x CIM, en las baterías de tubos que no contenían inhibidor

y en la que lo contenía a razón de 50 µg/mL. Sin embargo, con la incorporación de 100 µg/mL de NMP, dicho fenómeno desapareció para dos de las concentraciones mencionadas -2 x CIM y 4 x CIM-. No resultando así con la concentración más baja de tetraciclina -CIM- (figuras III.42 (A) en "Resultados"). Es decir, en este último caso, la concentración a la que fue expuesto el inóculo solo afectó el desarrollo bacteriano hasta las 4 hs post-incubación, luego se manifestó recrecimiento importante en las 3 baterías, independientemente que tuviesen o no incorporado el inhibidor.

En cuanto a las cepas de campo MDR - Ter2-TQ y Ter4-TQ - se observó una rápida caída en el recuento de las UFC/mL ya desde el primer contacto ocurrido entre el inóculo bacteriano y el antimicrobiano que se encontraba a elevadas concentraciones. En estas dos cepas el descenso alcanzó valores de 2 y 3 Log₁₀, es decir que se manifestó efecto bactericida con y sin NMP. Prescott y col. (2002), sostienen que la distinción entre bacteriostático y bactericida no es absoluta, pues la actividad de algunos fármacos depende de la concentración y también del microorganismo participante (10).

Posiblemente en este caso en particular, frente a las cepas MDR de campo, las elevadas concentraciones de antimicrobiano, a las que se expuso el inóculo produjeron como resultado un efecto letal sobre las bacterias expuestas. Pues el hecho de ser MDR resistentes a tetraciclina, con una CIM de 256 µg/mL, hizo que al elevar 8 veces dicho valor las concentraciones del antimicrobiano lleguen hasta 2048 µg/mL en la batería sin inhibidor, y 1024 µg/mL y 512 µg/mL en las baterías que contenían NMP a razón de 50 µg/mL y 100 µg/mL, respectivamente. Con la incorporación del inhibidor y la disminución de la concentración de tetraciclina, las curvas se van aplanando y la cinética de muerte es semejante en las 3 baterías; sobre todo cuando las concentraciones son equivalentes a la CIM y 2 x CIM (Figuras III.44-47 de "Resultados").

Con respecto a la ocurrencia de recrecimiento, con tetraciclina en la cepa AG112, ocurre una reactivación de la multiplicación bacteriana a las 8 hs post-incubación a la concentración de la CIM, 2 x CIM y 4 x CIM, sin NMP y con 50 µg/mL del mismo. Lo mismo también se observó en la curva de muerte bacteriana a la concentración de la CIM, en un estudio realizado en *P. aeruginosa* (246). Sin embargo, a pesar que la concentración de tetraciclina en la batería con 100 µg/mL del inhibidor es mucho menor que en las otras dos, sigue descendiendo el recuento bacteriano después de las 24 hs. Es decir que con este antimicrobiano además de mantenerse intacta la cinética de muerte con la incorporación de NMP, se evita que las bacterias recrezcan.

En las cepas de campo no se observó recrecimiento en ninguna de las baterías, ni siquiera a la concentración de la CIM.

En cuanto a la evaluación de la eficacia total, a pesar de las diferencias mencionadas en los párrafos previos, al igual que ocurrió con florfenicol y ciprofloxacina, el análisis estadístico del porcentaje de eficacia en las curvas de las cepas estudiadas, no arrojaron diferencias significativas entre el uso de tetraciclina sola o con NMP (50 µg/mL o 100 µg/mL). Es decir, que en este caso también, a pesar de disminuir la concentración del antimicrobiano tetraciclina se mantiene su eficacia si se incorpora el inhibidor de bombas.

IV.6.4. Análisis estadístico de las curvas de letalidad bacteriana

Para la evaluación cuantitativa del efecto antibacteriano, con los datos obtenidos a partir de las curvas de muerte bacteriana, se analizó estadísticamente la significancia real que existió al adicionar a las baterías de tubos con antimicrobiano, el inhibidor de bombas a dos concentraciones, 50 µg/mL y 100 µg/mL. Para ello, se decidió tomar como variable a analizar, al área comprendida entre la curva de crecimiento (curvas control –ABCC–) y la curva de muerte (ABC); este parámetro llevó por denominación la sigla ABBC (179, 180, 247).

Basándonos en los conceptos establecidos por Firsov y col. (2001), el ABBC puede ser considerado otra forma de estimar la intensidad del efecto antibacteriano a través de la cuantificación de la distancia comprendida entre la curva de muerte y la de crecimiento normal durante un período de tiempo preestablecido (248). Sin embargo, a dicho valor se lo dividió posteriormente por la CIM correspondiente, a fin de poder comparar el efecto del inhibidor de bombas en combinación con los antimicrobianos a través de un análisis estadístico, desestimando la CIM inicial a la cual se expuso cada microorganismo en las distintas baterías.

Es conveniente repetir, que las concentraciones antimicrobianas iniciales a las cuales se expuso el inóculo bacteriano en las tres baterías, fueron diferentes. En principio, cada cepa analizada fue expuesta a 3 baterías de tubos por cada antimicrobiano: una de ellas sin inhibidor, otra con 50 µg/mL de NMP y la tercera con 100 µg/mL del mismo. Los tubos de cada batería, contenían el antimicrobiano a la concentración de la CIM, 2 x CIM, 4 x CIM, 8 x CIM y uno sin antimicrobiano. La concentración real presente en dichos tubos, fue la correspondiente a la CIM de la cepa analizada frente al antimicrobiano sin NMP, con 50 µg/mL y con 100 µg/mL de inhibidor. Es decir, que la CIM fue diferente en las 3 baterías, pues como ya se expuso previamente la incorporación de inhibidor en la mayoría de los casos produjo un descenso de la CIM del antimicrobiano correspondiente. La CIM sin NMP en general, fue en todos los casos más elevada que la obtenida al incorporar el inhibidor. De

manera tal, que para desestimar esta variable existente en las 3 baterías y poder analizar expresamente la cinética de muerte de las curvas, se decidió dividir el ABBC por la CIM de cada cepa.

La evaluación estadística realizada –ANOVA– dio resultados extremadamente significativos para los 3 antimicrobianos en todas las cepas analizadas, con un valor de $P < 0.05$. Es decir que la adición de NMP fue responsable de la diferencia entre los resultados obtenidos. Por ello, posteriormente se procedió a realizar un Test post-hoc (Tukey-Kramer) para cada caso en particular.

IV.6.4.1. Florfenicol

Se hallaron diferencias significativas al evaluar el efecto de la adición de NMP sobre el parámetro farmacodinámico $ABBC_{24}:CIM$, en la cepa AG112. En consecuencia, podemos afirmar, que las diferencias existentes en la intensidad del efecto antibacteriano se deben al efecto del bloqueo de las bombas de eflujo al utilizar frente a una cepa con particulares características como AG112, que sobreexpresa como único mecanismo de multirresistencia los sistemas de eflujo.

En esta misma cepa de referencia, al realizar el Test de Tukey-Kramer, se observó que las diferencias fueron significativas no solamente al comparar los resultados obtenidos con el antimicrobiano solo con el antimicrobiano en combinación con NMP; sino también, entre los que contenían diferentes concentraciones del inhibidor; es decir, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del mismo. Por ello, es importante destacar que estos resultados confirman que la incorporación de NMP a razón de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, permitió disminuir la concentración de florfenicol sin perder la intensidad de su eficacia antibacteriana.

Por otra parte, al estudiar las cepas de campo MDR-RF (Vo1-SV y Vo2-TQ), la evaluación estadística mediante el Test de Tukey-Kramer, arrojó como resultado que existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos sin inhibidor y con la incorporación del mismo tanto a la concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, como a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Sin embargo, el hecho de incorporar 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del inhibidor, resultó indiferente en este caso. No existieron diferencias significativas entre estas dos últimas variables.

Este último resultado es consecuente con los datos obtenidos al evaluar la CIM de florfenicol con y sin inhibidor. Pues en ambas cepas de campo, cuya CIM sin NMP fue de 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$, tanto la incorporación de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ como de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del inhibidor de bombas, redujo el valor de la CIM 4 veces (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$). No existiendo diferencias observables a pesar de la incorporación de NMP a una concentración superior (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Cabe recordar que la presencia de sistemas MDR tipo AcrAB-TolC en *E. coli*, tras su sobreexpresión, es capaz de producir CIMs del orden de 16-32 µg/mL para cloranfenicol y 32 µg/mL para florfenicol, es decir pueden alcanzarse importantes niveles clínicos de resistencia (140, 143). Sin embargo en nuestras cepas de campo las CIMs resultaron muy superiores a dichos valores, siendo en ambas cepas evaluadas del orden de 256 µg/mL. Es posible que en este caso, el resultado obtenido sea consecuencia de la coexistencia de diferentes mecanismos de resistencia bacteriana distintos del eflujo activo por sobreexpresión de bombas.

En consecuencia, es factible que la expresión conjunta de varios mecanismos de resistencia impida mejorar considerablemente la cinética de muerte de florfenicol en cepas de campo MDR-RF. No obstante, la incorporación del inhibidor permitió una mejora de los resultados tanto en la CIM, como en la curva de letalidad, resultando en una diferencia significativa al comparar el antimicrobiano solo o con NMP.

IV.6.4.2. Ciprofloxacina

Se hallaron diferencias significativas al evaluar el efecto de la adición de NMP sobre el parámetro farmacodinámico $ABBC_{24}$:CIM, en la cepa AG112 frente a ciprofloxacina. En este caso también, se evidenció que las diferencias en los resultados pueden adjudicarse al efecto de bloqueo de las bombas de eflujo por NMP al utilizar ciprofloxacina cuando la multirresistencia es consecuencia de la sobreexpresión de sistemas de eflujo MDR como mecanismo único.

Los resultados obtenidos en la cepa de referencia, AG112, con el Test de Tukey-Kramer, determinaron que existen diferencias significativas en la intensidad de la eficacia antibacteriana de ciprofloxacina sola y con inhibidor de bombas. Lo mismo ocurrió al comparar la adición de NMP a razón de 50 µg/mL y de 100 µg/mL. Es decir, que la incorporación de 100 µg/mL NMP, permitió disminuir la concentración de ciprofloxacina mejorando la intensidad de su eficacia antibacteriana.

En el análisis estadístico a posteriori -Test de Tukey-Kramer- en las cepas de campo MDR-RC (Ter1-TQ y Ter2-TQ), no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos sin inhibidor y con la incorporación de 50 µg/mL del mismo. Sin embargo, entre el antimicrobiano solo y el uso de 100 µg/mL de NMP, si hubo diferencias altamente significativas ($P < 0.001$). Por otra parte, el hecho de incorporar 50 µg/mL o 100 µg/mL de NMP no resultó indiferente en este caso. Pues existieron diferencias significativas entre estas dos últimas variables también.

Es decir, que en el caso de ciprofloxacina la incorporación de 100 µg/mL de NMP no solo permitió disminuir la concentración de antimicrobiano sino que además produce un efecto significativo sobre la intensidad de la eficacia en la cinética de muerte bacteriana aún en cepas de campo.

IV.6.4.3. Tetraciclina

Para tetraciclina, al evaluar el efecto de la adición de NMP sobre el parámetro farmacodinámico ABBC₂₄:CIMen la cepa AG112, se hallaron diferencias significativas con el Test de ANOVA. Es decir, que las diferencias existentes en la intensidad del efecto antibacteriano de tetraciclina se deben al efecto de la combinación con NMP, por el bloqueo de las bombas de eflujo sobreexpresadas como único mecanismo de multirresistencia.

En la evaluación estadística con el Test de Tukey-Kramer, de las curvas de muerte de la cepa AG112 con tetraciclina, los resultados determinaron que existieron diferencias significativas en la intensidad de la eficacia antibacteriana al evaluar tetraciclina sola y con inhibidor de bombas. A su vez, hubo diferencias altamente significativas entre los valores obtenidos con el agregado de 50 µg/mL y con 100 µg/mL de NMP. Consecuentemente, al igual que ocurrió con florfenicol y ciprofloxacina, la incorporación de 100 µg/mL NMP, permitió disminuir la concentración de tetraciclina mejorando la intensidad de su eficacia antibacteriana.

Del mismo modo que para AG112, en el análisis de las cepas de campo MDR-RT (Ter2-TQ y Ter4-TQ), la evaluación estadística mediante el Test de Tukey-Kramer, dió por resultado la existencia de diferencias significativas entre los resultados obtenidos sin inhibidor y con la incorporación del mismo tanto a la concentración de 50 µg/mL, como a 100 µg/mL; así como entre los valores obtenidos en las baterías con 50 µg/mL y 100 µg/mL del inhibidor.

Con este antimicrobiano se demostró que en las cepas de campo la incorporación de NMP a la mayor concentración, fue determinante de las diferencias existentes en los resultados. Para tetraciclinas la incorporación de 100 µg/mL de NMP no solo permite disminuir la concentración de antimicrobiano manteniendo la intensidad de su eficacia, sino que además produce un efecto significativo sobre la cinética de muerte bacteriana aún en cepas de campo multirresistentes.

IV.7. Estudios farmacocinéticos

IV.7.1. Integración PK/PD

A partir de los resultados cinéticos obtenidos en estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo en fluoroquinolonas (181), en florfenicol (183) y en tetraciclinas (182) se seleccionaron los parámetros farmacocinéticos de relevancia para la posterior integración con los datos farmacodinámicos obtenidos frente a las cepas de referencia y a las de campo MDR.

IV.7.1.1. Fenicoles

Para el análisis de los predictores de eficacia de florfenicol, se utilizaron los datos farmacocinéticos obtenidos a partir de un estudio de bioequivalencia publicado por Mestorino y col. (2004).

Florfenicol es un antimicrobiano con un comportamiento bacteriostático frente a la mayoría de las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (aerobias y anaerobias) aisladas en animales domésticos. Sin embargo, para algunos microorganismos, sus CIMs están próximas a sus CBMs, y puede comportarse como bactericidas (139, 141).

En cuanto a los parámetros predictores de eficacia, este antimicrobiano se clasifica como de acción dependiente del tiempo con prolongada persistencia, siendo considerado el mejor parámetro predictor de su eficacia el ABC/CIM₉₀ (135). Sin embargo, no existen en la actualidad estudios que abalen con datos certeros un valor determinado como punto de cohorte que permita establecer una relación óptima entre el ABC y la CIM₉₀ del microorganismo (249, 250). Este hecho puede explicarse por la existencia de gran variabilidad en la susceptibilidad individual de los distintos patógenos (CIMs) frente a florfenicol. De modo que la dosis terapéutica dependerá de la sensibilidad individual de los microorganismos, del sitio de infección y de la respuesta clínica del paciente, necesitándose modificar la dosis en función de dichas variables.

En los resultados obtenidos para la cepa AG112 al realizar la integración PK/PD, los valores de ABC/CIM₉₀ fueron de 3.40 h cuando se utilizó la CIM₉₀ de florfenicol solo, ascendió a 13.62 h con 50 µg/mL de NMP y luego a 108.93 h con la adición de 100 µg/mL del inhibidor. Es decir, se logró mejorar la relación PK/PD en forma importante con la adición del NMP y la consecuente reducción de la concentración de florfenicol.

Por otra parte, en la evaluación del parámetro T>CIM, es importante destacar que con la adición de 100 µg/mL del inhibidor, se logró en esta misma cepa, mantener la concentración del

antimicrobiano por encima de la CIM hasta las 24 hs. Esto se debe a que la CIM de florfenicol se redujo en el orden de 32 veces, gracias a que el bloqueo se realizó en una cepa mutagénica cuyo único mecanismo de resistencia es la sobreexpresión de bombas de eflujo, resultado altamente efectivo.

En cuanto a las cepas de campo MDR-RF, solo en una de ellas (Vo2-SV), cuya CIM₉₀ fue de 16 µg/mL (más baja que en las cuatro restantes), se obtuvo un resultado interesante, semejante al logrado con AG112 frente al mismo antimicrobiano. Es decir, que en la integración PK/PD, los valores de ABC/CIM₉₀ fueron mejorando con la incorporación de NMP. Cuando se utilizó la CIM₉₀ de florfenicol solo el valor de ABC/CIM₉₀ fue de 6.81 h; con 50 µg/mL de NMP se modificó a 54.47 h y con 100 µg/mL se logró una relación igual a 108.93 h. Sospechamos que en esta cepa en particular el mecanismo de resistencia responsable de la resistencia múltiple está vinculado a la sobreexpresión de bombas de eflujo. Como fue mencionado antes, la presencia de sistemas MDR tipo AcrAB-TolC en *E. coli*, tras su sobreexpresión, es capaz de producir CIMs del orden de 16-32 µg/mL para florfenicol (140, 143).

En cuanto a las cuatro cepas MDR-RF restantes, la integración entre los datos farmacocinéticos y dinámicos no permitió obtener buenos resultados debido a que las CIMs de estas cepas fueron muy elevadas, con valores de 256 µg/mL para florfenicol solo. Es decir, que al dividir el ABC por dicho valor, los resultados fueron tan pequeños que no pueden ser empleados como predictores de la eficacia antibacteriana.

IV.7.1.2. Fluoroquinolonas

En el caso particular de las fluoroquinolonas, se utilizaron los datos farmacocinéticos obtenidos en un estudio realizado con danofloxacina publicado por Mestorino y col. (2009) (181). Se integraron el valor de la C_{max} del antimicrobiano, con las CIMs₉₀ de ciprofloxacina obtenidas para las cepas de referencia mutagénicas (AG112, AG100 y AG100A) y las de campo MDR-RC.

Diversos autores han considerado que existe una mejor correlación entre la eficacia terapéutica y el parámetro ABC/CIM₉₀ para las fluoroquinolonas como antimicrobiano cuya eficacia es dependiente de la concentración (107, 111). Sin embargo, cuando existe un riesgo significativo de emergencia de resistencia, o se tiene en cuenta el control del desarrollo de subpoblaciones mutantes, la C_{max}/CIM₉₀ es el de elección (104). Como es sabido, las fluoroquinolonas son antimicrobianos bactericidas dependientes de la concentración (128).

Los valores obtenidos de la integración de ambos parámetros mencionados –C_{max}/CIM₉₀ – con y sin NMP, para AG112 fueron: 8.55 cuando se utilizó la CIM₉₀ de ciprofloxacina sola; 17.1 para la

CIM₉₀ del antimicrobiano con 50 µg/mL del inhibidor; y 35.33 con 100 µg/mL de este último. Es decir, que con la incorporación de 50 µg/mL de NMP se duplicó el valor en la relación C_{max}/CIM₉₀; y se cuadruplicó con 100 µg/mL del mismo.

En consecuencia, es imprescindible remarcar que con la incorporación de NMP a razón de 100 µg/mL, se logra aumentar el valor del parámetro predictor de eficacia más importante para las fluoroquinolonas frente a la resistencia antimicrobiana. Si consideramos que una relación C_{max}/CIM menor de 8-10 aumenta el riesgo de selección de resistencia y de falla terapéutica, con la incorporación de NMP se logra superar ampliamente ese valor, con lo que podría inferirse que se obtiene una relación superior al punto de cohorte de 10-12 veces la CIM₉₀ (31),

Según Craig y col. (1998), la concentración mencionada de una C_{max} 10 a 12 veces superior a la CIM₉₀ se acercaría a la dosis de antimicrobiano tóxica para los individuos que la consuman (104). Sin embargo, nuestros resultados en contraposición a dicha afirmación, fueron alcanzados disminuyendo considerablemente la concentración de ciprofloxacina gracias a la incorporación del inhibidor de bombas NMP.

En este caso particular, existe también una mejora en la relación ABC/CIM₉₀ con la incorporación creciente de NMP en la cepa AG112, de modo que cuando la razón se correspondió con la CIM₉₀ de ciprofloxacina sin inhibidor, la relación PK/PD fue de 156.29 h, aumentando a 312.58 h con 50 µg/mL de NMP y a 646.00 h con 100 µg/mL. Gran cantidad de estudios en modelos animales basados en infecciones causadas por Gram-negativos, han mostrado que un valor de ABC/CIM₉₀ de 100 h o mayor, es necesario para asegurar su supervivencia (104, 251, 252). Este valor de 100 h, si lo trasladamos a concentración del fármaco, equivale aproximadamente a 4 veces la CIM a lo largo de 24 hs de dosificación. El parámetro ABC/CIM₉₀ tiene una gran importancia en el resultado clínico observado con fluoroquinolonas como la ciprofloxacina (252).

Sin embargo, en la evaluación de los parámetros PK/PD para las fluoroquinolonas en las cepas de campo MDR-RC, los resultados no fueron buenos como los de la cepa AG112. Este fenómeno se debe a que los valores de las CIMs₉₀ de las cepas MDR-RC son demasiado elevadas en comparación con las de la cepa AG112; de modo que al dividir la C_{max} y el ABC de danofloxacina por las CIMs, los valores obtenidos son muy pequeños. Es posible que en estas cepas con tan elevados niveles de resistencia frente a ciprofloxacina se necesite además de la presencia del inhibidor, un considerable aumento de la concentración del antimicrobiano.

IV.7.1.3. Tetraciclinas

En el caso de tetraciclina, se utilizaron los datos farmacocinéticos obtenidos de un estudio realizado en oxitetraciclina en bovinos (182).

Considerando que este antimicrobiano es de acción tiempo dependiente con prolongada persistencia, y que el parámetro PK/PD que mejor describe su eficacia es ABC/CIM_{90} ; se integraron el valor obtenido del ABC_{24} de oxitetraciclina, con las CIM_{90} de tetraciclina, obtenidas para las cepas de referencia mutagénicas (AG112, AG100 y AG100A) y las de campo MDR-RT.

Al igual que fue mencionado para florfenicol no existe aún un valor de cohorte establecido como efectivo para la relación ABC/CIM_{90} con las tetraciclinas frente a *E. coli*. En algunos informes recientes sugieren que, estableciendo un período de tiempo de 24 hs, la proporción ABC/CIM_{90} debe ser >25 para que sea indicativa de eficacia (253, 254).

En la evaluación de la relación PK/PD para tetraciclina con la cepa AG112, se obtuvo un valor de 14.79 cuando se utilizó la CIM_{90} del antimicrobiano solo, que ascendió a 59.15 con 50 $\mu\text{g/mL}$ del inhibidor y luego a 236.58 con 100 $\mu\text{g/mL}$ del mismo. En consecuencia, la adición de NMP permitió mejorar la relación ABC/CIM_{90} para tetraciclina en nuestro estudio de manera considerable, sin necesidad de aumentar la frecuencia de dosis ni la concentración del antimicrobiano.

Por otra parte, la adición del inhibidor permitió prolongar el tiempo en que la concentración plasmática de oxitetraciclina se mantiene por encima de la CIM_{90} de tetraciclina frente a AG112, pasando de 1 h cuando se analizó el antimicrobiano solo, a 96 hs con la incorporación de 100 $\mu\text{g/mL}$ de NMP. Es decir, que la relación PK/PD vinculada al parámetro $T > CIM$ también mejoró con la combinación antimicrobiano-NMP.

En cuanto a las cepas MDR-RT, en ningún caso se superó el valor de 25, en la proporción ABC/CIM_{90} . Pero a pesar de ello, ocurre un aumento en el valor de dicho parámetro con la creciente incorporación de NMP. En un trabajo publicado por Snyman y col. (2008), realizaron un estudio cinético en ovejas con oxitetraciclina de larga duración, a razón de 20 mg/kg, igual que el trabajo cinético que utilizamos como referencia para nuestro análisis (254). Lograron un ABC_{24} muy similar al nuestro (109.92 $\mu\text{g.h/mL}$) y lo relacionaron con la CIM_{90} de aislamientos de *E. coli*, cuyo valor fue de 128 $\mu\text{g/mL}$. La relación PK/PD que obtuvieron fue de 0.62, muy cercana al promedio de nuestros resultados que fue de 0.79 ± 0.58 cuando se utilizó la CIM_{90} de los microorganismos frente a tetraciclina sin inhibidor de bombas.

IV.8. Análisis de riesgo de transferencia de resistencias entre animales-medio y el hombre

En un sistema tambero, a diferencia de lo que sucede en un proceso industrial, no resulta sencillo determinar donde se encuentran los puntos críticos y cuáles son los límites críticos dado que trabajamos con animales y no con máquinas. Sin embargo, el diseño de los mismos permite una monitorización mucho más precisa del proceso productivo a efectos de lograr mejorar la calidad higiénico-sanitaria del producto final, haciendo hincapié en este caso particular en la minimización de la selección y diseminación de resistencia bacteriana.

Es de fundamental importancia la toma de decisiones para la aplicación de tratamientos antibióticos en el tambo, la implementación del uso de quimioterápicos como profilácticos para los animales o bien el uso de fármacos en el medio ambiente inmediato. La decisión debe ser tomada de la forma más objetiva y correcta posible, basándose en el uso racional de los quimioterápicos.

Existen Guías para las Buenas Prácticas del Tambo, editadas por FAO/FIL (2012), en las que se hace una extensiva revisión del manejo del tambo en base a buenas prácticas agrícolas (GAP), se trata de un excelente documento que provee las bases para una óptima explotación, contemplando todos los aspectos productivos (255). El objetivo central de estas guías es proporcionar las herramientas necesarias para que los sistemas de producción en las explotaciones lecheras de todo el mundo sean capaces de combinar la rentabilidad con la protección de la salud humana, la salud animal, y el respeto al bienestar animal y al medio ambiente (255).

Para poder lograr el objetivo de producir leche saludable y de calidad, obtenida de animales sanos, utilizando prácticas de gestión que sean sostenibles tanto desde el punto de vista del bienestar animal como desde una perspectiva social, económica y medioambiental; es fundamental que los productores apliquen las buenas prácticas en las determinadas áreas puntuales:

- sanidad animal;
- higiene en el ordeño;
- nutrición (alimentos y agua);
- bienestar animal;
- medioambiente; y
- gestión socioeconómica.

Por todo lo expuesto, y en base a los resultados obtenidos en nuestro trabajo, hemos diseñado una serie de recomendaciones y un sistema de control de puntos críticos para la toma de decisión, seguimiento, monitorización, registro y control de riesgos factibles de seleccionar y transferir

resistencia bacteriana. El mismo consta de una serie de pasos que fueron detallados en los puntos III.7.1 y III.7.2 del apartado "Resultados". Para ello subdividimos la explotación tambera en dos partes importantes: "Detección de puntos críticos dentro del tambo" y "Detección de puntos críticos fuera del tambo".

IV.8.1. Recomendaciones

IV.8.1.1. Detección de puntos críticos dentro del tambo

A.- Ingreso de la vaca al tambo. El orden en que las vacas son ordeñadas juega un rol muy importante en la calidad de la leche y en la transferencia de la resistencia bacteriana. De modo tal, que debe respetarse estrictamente el orden de ingreso a la sala de ordeño, asegurarse que los animales que lo requieran reciban el tratamiento adecuado, y que entre ordeños se realice la consecuente limpieza de los equipos, el suelo y el personal.

Idealmente las vacas sanas (vacas jóvenes o vaquillonas, vacas de segunda lactación o posterior, con bajo recuento de células somáticas y vacas recién paridas) deberían ser ordeñadas en primer lugar. Luego debería ingresar el rodeo de enfermás (vacas con alto conteo de células somáticas o mástitis subclínica; con mástitis clínica o declarada con anterioridad; con mástitis clínica detectada en el momento que pasaron al final; en tratamiento por otras afecciones distintas de la mástitis).

B.- Rutina pre-ordeño. Cada etapa de la rutina pre-ordeño, tiene por objeto reducir considerablemente la contaminación microbiana de la leche, aumentar la producción, acortar el tiempo de ordeño y disminuir la transmisión de organismos patógenos contagiosos y ambientales que pueden causar mástitis (256).

Las buenas prácticas en cada momento de esta rutina, minimizarían la exposición ambiental a residuos de quimioterápicos o bien a la contaminación bacteriana proveniente de la leche de vacas enfermás (patógenos); o de vacas sanas (comensales) contenidas en la materia fecal, potenciales portadores de genes de resistencia transferibles.

Considerando individualmente cada etapa de la rutina pre-ordeño, podemos mencionar los puntos más importantes a considerar:

Lavado de los pezones y base inferior de la ubre. Si los pezones y las partes bajas de la ubre se contaminan mucho con barro o materia fecal, es primordial realizar el enjuague adecuado del área con agua potable, libre de microorganismos. El agua debe ser usada en baja cantidad

para facilitar el secado completo de los pezones. Este procedimiento debe hacerse adecuadamente pues cuanto mayor sea el área humedecida, más dificultoso será lograr el secado completo y correcto de los pezones y las áreas adyacentes de piel. De este modo, se favorecerá al esparcimiento y la contaminación bacteriana y, en el momento de la colocación de las pezoneras la presencia de agua hará que resbalen y succionen el agua residual conteniendo contaminantes.

En lugares secos, con poco barro, y buen control de la higiene ambiental; puede ser una alternativa minimizar las maniobras de lavado previo mencionadas, pues el contacto del agua sobre las partes altas de la piel de la ubre puede arrastrar suciedad hacia pezones limpios y producir contaminación innecesariamente.

El personal juega un rol importante en el lavado, el uso de guantes de goma sería una herramienta aconsejable porque facilita la remoción de los microorganismos, pero esta práctica no es muy aceptada por los ordeñadores.

Eliminación de los primeros chorros de leche de cada cuarto. La mejor manera de realizar el "despunte" es recolectando los primeros chorros de leche sobre una superficie de fondo oscuro (jarro de fondo oscuro), haciendo escurrir la leche en diferentes direcciones sobre el fondo oscuro mediante un movimiento semirrotatorio del jarro; sin embargo, es frecuente observar la extracción de los primeros chorros de leche directamente sobre el piso de la sala de ordeño con el consecuente riesgo de contaminación bacteriana de las vacas, el ambiente, la maquinaria y el personal. Además, la leche de los animales medicados puede contener residuos de quimioterápicos, que en caso de ser antimicrobianos expone el entorno inmediato a concentraciones subinhibitorias del mismo aumentando el riesgo de contaminación. No es menos importante el lavado posterior del tambo y la consecuente contaminación de la bomba esteroclora y de los efluentes.

En cuanto al manejo, esta maniobra incorrecta, no permite observar con claridad las anormalidades de la leche ya que generalmente cae sobre un piso que contiene agua, orina y materia fecal, de modo que no tendría ninguna ventaja práctica sobre la realización correcta del despunte dentro de tarro de fondo oscuro.

Otra práctica frecuente es la extracción de la leche directamente sobre las manos del ordeñador, lo que nunca se debe hacer porque esto ayuda a diseminar los microorganismos de vaca a vaca a través de las manos durante la preparación de las mismas antes del ordeño. Idealmente, el ordeñador debería lavarse y secarse las manos antes de ordeñar y utilizar una

solución desinfectante suave para enjuagarse las manos al pasar de una vaca a otra. Es importante destacar que la práctica del despunte contribuye, además, a estimular el mecanismo que desencadena la bajada de la leche facilitando una ordeña completa.

Pre-sellado. Está comprobado que la utilización de desinfectantes en el pre-sellado y el lavado de la ubre reduce la presencia de bacterias patógenas presentes en la piel (257, 258). Esta maniobra ha sido sugerida como una medida adicional de higiene en aquellos rebaños con una alta incidencia de mástitis clínica por bacterias ambientales, especialmente, coliformes; se ha demostrado que puede reducir aproximadamente en un 50% las infecciones por estos microorganismos y mejorar considerablemente la calidad bacteriológica de la leche en rebaños donde se practica estabulación y no se realiza una buena higiene previa al ordeño (259, 260). Al realizar el pre-sellado, se debe tomar la precaución de aplicar la solución desinfectante a los pezones previamente limpios, permitir un tiempo de contacto mínimo de 20-30 segundos, y secar completamente los pezones con toallas individuales antes de colocar las unidades de ordeño para evitar residuos del germicida en la leche.

Secado de los pezones. Está demostrado que el factor más importante para producir leche de alta calidad higiénica es el secado de los pezones antes del ordeño, ya que la piel mojada aporta muchas más bacterias a la leche que la piel seca (260). Además, el ordeño de pezones mojados aumenta el riesgo de infección intramamaria, especialmente por patógenos ambientales presentes en la piel de la ubre y pezón. Estos microorganismos pueden desplazarse hacia debajo de la ubre con el agua contaminando durante el ordeño la leche, y aumentando el riesgo de infección (261). Por lo tanto, independientemente del método de preparación de la ubre pre-ordeño, es absolutamente necesario que la superficie de los pezones esté completamente seca antes de colocar las unidades de ordeño.

La mejor manera de secar los pezones es utilizando toallas de papel individuales y desechables, en lo posible, una por cada pezón; sin embargo también se puede usar una toalla por vaca si se tiene la precaución de doblar la toalla para usar una superficie limpia al pasar de un pezón a otro. El exceso de agua en la preparación de la ubre dificulta seriamente el adecuado secado de los pezones, sobre todo cuando además de los pezones se moja la piel de la ubre.

Una alternativa a las toallas de papel que puede resultar más económica en rebaños con un gran número de animales es el uso de paños individuales, siempre que éstos se laven y sequen completamente entre los ordeños.

C.- Identificación de nuevos casos clínicos. Ante la identificación de un caso clínico nuevo de mástitis, el animal debería ser enviado al final del ordeño junto con el rodeo hospital. De esta manera, se evitaría que el resto de los animales ingresados se contaminen y aumente el riesgo de infección y diseminación de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos. Intimamente relacionado con el punto A.

D.- Colocación y extracción de la ordeñadora. La colocación de las pezoneras debe ser muy cuidadosa, evitando la entrada de aire dentro del sistema de ordeño. Al inicio del ordeño, en la mayoría de las vacas, la boca de la pezonera debería quedar ubicada sólo a una corta distancia de la base de la ubre; si las pezoneras están muy arriba pueden causar irritación de la mucosa del pezón y predisponer a mástitis.

Las unidades de ordeño deben ser colocadas dentro del minuto de iniciada la preparación de la ubre debido a que este procedimiento desencadena el "reflejo de bajada de la leche" por acción de la oxitocina. Si transcurre mucho tiempo el ordeño será incompleto, aumentando el riesgo de infección intramamaria.

Una vez finalizado el flujo de leche se deben retirar suavemente las pezoneras, pero siempre cortando previamente el vacío. El procedimiento correcto es retirar las pezoneras justo cuando se ha terminado de ordeñar el último cuarto. Uno o dos minutos de sobreordeño con un equipo funcionando correctamente no causa problemas, pero el riesgo de infección es mayor cuando el sobre-ordeño ocurre en equipos defectuosos porque se agrava el efecto del "impacto" (186).

El retiro de las pezoneras sin cortar el vacío es un defecto que se observa con mayor frecuencia en los equipos que se retiran manualmente, pero también puede ocurrir en aquellos equipos dotados de retiradores automáticos de pezoneras por mal funcionamiento del sistema. Si a juicio del ordeñador, un retirador automático se desconecta mucho antes o mucho después de lo que él cree que es correcto, debería ser revisado y ajustado. Siempre es importante tener presente que el retirador automático debe cortar el vacío antes de retirar las unidades de ordeño.

E.- Funcionamiento de la ordeñadora. Debe verificarse que estén bien ajustadas las pezoneras para que no entre aire al sistema de ordeño. Las pezoneras mal alineadas pueden bloquear el flujo de la leche y causar "deslizamiento", con consecuente riesgo de caída de las mismas. Una baja en el nivel de vacío también puede causar deslizamiento, por lo que es importante que exista un riguroso control del medidor de vacío del equipo durante el ordeño (262). Otro factor que favorece el deslizamiento de pezoneras es el ordeño de pezones mojados con lo cual se pierde el normal grado de fricción que debe existir entre la piel del pezón y la superficie interna de la pezonera. Por otra parte, el exceso de vacío es causante de "trepación" de las pezoneras produciendo heridas en la punta del pezón y ordeño incompleto. Todos los factores mencionados favorecen la penetración de las bacterias a la glándula mamaria aumentando el riesgo de infección (263, 264).

El período más crítico para la vaca es al final del ordeño, especialmente en animales de alta producción. Es en ese momento cuando se producen fluctuaciones de vacío dentro de las pezoneras, que generan un rápido movimiento de gotas de leche cargadas de bacterias en dirección reversa hacia la punta del pezón con suficiente fuerza como para introducir a los microorganismos a través del conducto; este mecanismo de infección se conoce como "impacto". La probabilidad que cause una infección es elevada debido a que al final del ordeño, el flujo de salida de leche disminuye y por lo tanto disminuye también la posibilidad de que estos microorganismos sean eliminados (265).

F.- Manejo de la vaca enferma. La presencia de un animal enfermo requiere un manejo racional y cuidadoso. Si se trata de un individuo recientemente identificado existe riesgo de contaminación de instalaciones, maquinaria, personal y vacas, por ello se identifica y se debe ordeñar al final. Si es un animal con mástitis declarada, el manejo dependerá de sus antecedentes clínicos; es decir, si se trata de un animal crónico que ya paso por varios tratamientos, es un animal de descarte. Pero si se trata de un animal con una infección más reciente, entonces se evaluará su evolución y los cambios necesarios en la terapéutica.

Es decir, que cada animal enfermo debe evaluarse individual y criteriosamente por un profesional veterinario a cargo. Constituyen el grupo más crítico en cuanto a riesgos de transferencia y diseminación de microorganismos resistentes, determinantes genéticos de resistencia. Por otra parte no debe olvidarse que la presencia de residuos de quimioterápicos en la leche, son posibles "responsables de la selección de resistencia" en el ambiente inmediato.

G.- Tratamiento de los animales enfermos. Ante la presencia de un individuo enfermo existen varios puntos a considerar, ya que tienen relación directa con la selección y diseminación de la resistencia. En primer lugar se encuentra la correcta identificación del individuo enfermo. Luego la evaluación de la necesidad o no de implementar un tratamiento. Es decir, determinar si efectivamente, se trata de una infección, si es una infección tratable con antimicrobianos, y evaluar, desde el punto de vista económico, el costo del tratamiento, las posibilidades de éxito, versus el costo de no tratar o descartar el animal y el riesgo o no de seleccionar y transferir resistencia bacteriana. Y por último, la calidad del medicamento utilizado.

Si la decisión es tratar, el punto crítico es la selección del quimioterápico adecuado para el cuadro infeccioso. El tratamiento a implementar puede ser de tipo empírico ("a ciegas") o bien basado en análisis de laboratorio (aislamiento, identificación, antibiograma del microorganismo actuante). En este último caso, es factible realizar una elección racional del fármaco a administrar. Si además tenemos resultados de concentración inhibitoria mínima del o los antimicrobianos frente al agente etiológico, mucho mejor, pues podremos diseñar una terapia óptima en base a dosis, intervalo entre dosificaciones y tiempo de tratamiento.

En conclusión, ante la instauración de una terapia con antibióticos se debería elegir el fármaco frente al cual el microorganismo es susceptible, fijar la dosis y la duración de tratamiento en base a las características PK/PD del medicamento y finalmente, cumplir rigurosamente con los períodos de retirada. Indiscutiblemente el uso racional de los antimicrobianos es la herramienta fundamental.

Es fundamental evaluar la calidad del medicamento, esto es: utilizar sólo productos químicos cuya distribución y uso estén autorizados por los organismos reguladores; respetar las indicaciones de los fabricantes; calcular las dosis adecuadas y respetar estrictamente los períodos de descarte establecidos para el formulado en particular. Lo adecuado sería que los antimicrobianos fuesen administrados únicamente bajo prescripción del veterinario. Por último es fundamental ser cuidadoso en el almacenamiento de los productos químicos y por sobretodo eliminarlos de forma responsable. Pues este último punto se vincula con la posible permanencia de residuos antimicrobianos a nivel ambiental en dosis subinhibitorias, potenciales generadoras de resistencia bacteriana.

Es de gran importancia tener en cuenta el personal responsable de la administración de los fármacos. Sin duda la persona más indicada para ello es el veterinario, sin embargo, es sabido que muchas veces debe delegarse dicha responsabilidad a otras personas actuantes en el establecimiento, quienes deben estar debidamente entrenadas. No solamente aquel que los administra sino también, desde el encargado del transporte y almacenamiento, hasta el que lo aplica, el que controla efectos y

resultados, llegando al que dispone de los envases vacíos, todos, deben recibir entrenamiento adecuado. Finalmente, todos los animales tratados deben ser identificados individualmente.

H.- Registro y seguimiento. Mantener registros individuales de cada animal a lo largo de toda su vida. En esos registros constarán todos los medicamentos administrados, día y hora de administración, dosis, intervalos, repeticiones, éxitos o fallos de tratamientos, efectos inesperados o indeseables, períodos de retirada, etc. Los registros deberían ser diseñados por el veterinario de la empresa y se tratarían de planillas "ad hoc", en las que no deberían omitirse ninguno de los datos que hacen al control medicamentoso y de potenciales residuos. Trabajando con planillas adecuadas a los actuales sistemas de trazabilidad, todo quedaría cubierto.

I.- Post-sellado (Post-dipping). Está demostrado que la práctica del sellado post-ordeño, destruye las bacterias que quedan en el pezón, previene y cura las lesiones de la piel del pezón, reduce considerablemente la colonización bacteriana del orificio del pezón, y deja un residuo del germicida en la punta del mismo que lo protege de la contaminación cuando la vaca sale de la sala de ordeño, momento en que el conducto del pezón aún permanece abierto (265).

Inmediatamente después de finalizado el ordeño y retiradas las pezoneras, se deben desinfectar todos los pezones con una solución desinfectante apropiada y de eficacia probada. Existen numerosas evidencias en diferentes países que la desinfección de pezones post-ordeño, es capaz de reducir las neoinfecciones intramamarias causadas por patógenos contagiosos entre 50-90%, constituyendo la medida higiénica individual más importante de un programa de control (259, 261).

Pero existe un factor importante a tener en cuenta, pues se ha demostrado que aunque el sellador resulta ser efectivo para controlar las infecciones por patógenos contagiosos (*S. aureus*, *S. agalactiae* y *Mycoplasma spp*), no ha sido igualmente exitoso para reducir las infecciones por patógenos ambientales, especialmente *E. coli*, *Klebsiella spp* y *S. uberis*. Aparentemente este fenómeno se debe a que la contaminación del pezón con estos microorganismos se produce fundamentalmente en los intervalos inter-ordeño, cuando el producto desinfectante ha perdido su efecto germicida (265). De manera que resulta fundamental no perder de vista la importancia de la transferencia de resistencia horizontal desde bacterias comensales a patógenas y viceversa. Por esta razón, en los últimos años se han realizado numerosas investigaciones bajo condiciones naturales y experimentales de contaminación para proteger la superficie del pezón entre los ordeños, ya sea utilizando una barrera física, aumentando la persistencia de la acción germicida del desinfectante, o

una combinación de ambos, generando una amplia gama de productos conocidos como "selladores de barrera" (259).

J.- Manejo de la leche con inhibidores o contaminantes. La resistencia bacteriana ha sido asociada largamente a la presencia de residuos de antibióticos en alimentos destinados al consumo humano. Sin embargo, no existen trabajos científicos aún que sustenten que las concentraciones residuales de antibióticos presentes en alimentos provenientes de animales tratados, sean realmente capaces de seleccionar bacterias resistentes especialmente cuando esas concentraciones se encuentran por debajo del NMEL (nivel de no efecto microbiológico).

Sin embargo, el riesgo más grande para la salud de los consumidores que implica la utilización de antibióticos en animales no está dado por los residuos, sino por el desarrollo de resistencias en bacterias de los mismos animales. Estas resistencias pueden, por supuesto, dar lugar a fallos terapéuticos en tratamientos veterinarios, y al riesgo de transferencia de bacterias resistentes de los animales al hombre, o de genes portadores de información que codifica resistencia de bacterias de animales a bacterias humanas.

Consecuentemente, la leche de animales en tratamiento o enfermos, no debería ser consumida por personas (consumidores finales, ni personal del tambo), ni ser una alternativa de alimentación para los animales que coexisten con el ganado lechero en el establecimiento. El único destino posible para la leche con residuos de quimioterápicos y/o contaminantes bacterianos debe ser el descarte. Lo cual también es un punto crítico, pues aún no existe tratamiento alguno para inactivar los residuos antimicrobianos presentes en la leche de descarte.

K.- Leche de vacas sanas. La obtención de un producto de calidad es el objetivo central de una explotación tampera, por ello debe asegurarse la refrigeración o la entrega de la leche para su procesado en el tiempo especificado; controlando que el área de almacenamiento de la leche esté limpio y ordenado. También se debe verificar que el equipo de almacenamiento sea el adecuado para el mantenimiento de la leche a la temperatura especificada; que esté bien limpio y, si es necesario, que sea desinfectado después de cada retirada de la leche. Por último asegurarse de que el acceso al tanque de almacenamiento de la leche está libre de obstáculos.

L.- Ecosistema del tambo. El ecosistema del interior de un tambo consta de numerosos factores de importancia a tener en cuenta como puntos críticos en la transferencia de resistencia y transmisión de contaminantes patógenos. Estos factores son los sistemas de drenajes, la presencia de excrementos y

su eliminación, la higiene de los corredores, los espacios libres, la presencia de partículas de polvo, el manejo de la sanidad, y tipo de ventilación, entre otros. Por ello es importante diseñar y construir los edificios e instalaciones de forma que estén libres de obstáculos y peligros; proporcionar espacios amplios y limpios; proteger a los animales de las condiciones meteorológicas adversas y de sus consecuencias; asegurar una ventilación adecuada en los alojamientos para los animales; instalar suelos adecuados en los establos y en las áreas de paso de los animales que eviten caídas; proteger a los animales de incomodidades y daños durante la carga y descarga; y proporcionar condiciones de transporte apropiadas

IV.9.1.2. Detección de puntos críticos fuera del tambo

A.- Animales. Como fue descrito en el apartado III.7.2, de "Resultados", el grupo de animales que cohabitan en un establecimiento tambero está conformado no sólo por el ganado bovino (incluyendo vacas en diferentes etapas reproductiva, distinto estado sanitario, así como los terneros pertenecientes a la guachera), sino también por animales de compañía (gatos, perros, otros) y animales pertenecientes a otras producciones (cerdos, ovejas, caballos, entre otros). Así mismo, también existe contacto con aves y animales silvestres autóctonos.

A₁- Locación. La ubicación de los animales en el establecimiento, el manejo, la rotación y el posible contacto entre ellos, son factores de riesgo importantes para la selección, diseminación y/o transferencia de bacterias portadoras de genes de resistencia bacterina. Es importante conocer si existe contacto directo entre animales de la misma producción enfermos y sanos; o en distintas etapas productivas; así como de especies diferentes, incluyendo a los animales de compañía, los silvestres y los pertenecientes a otros tipos de producción.

A₂-Sanidad. El estado sanitario de los animales es sumamente importante. Es de fundamental importancia formar un rebaño resistente a las enfermedades; reducir el estrés; prevenir la entrada de enfermedades en la explotación; utilizar los productos químicos y los medicamentos veterinarios tal y como son prescritos. De lo contrario el impacto ambiental será nefasto. Hay dos puntos fundamentales responsables de la ocurrencia del fenómeno de resistencia: la posible presencia de bacterias portadoras de genes de resistencia y los residuos de los antimicrobianos utilizados terapéuticamente en los animales con infecciones bacterianas. Nuevamente el factor sanidad no solo involucra a la propia producción tampera, sino también a todos los animales que cohabitan en el mismo establecimiento.

Por otra parte, es relevante llevar un control de los productos químicos utilizados, verificar que estén autorizados por la legislación; utilizarlos de acuerdo a las indicaciones, calcular las dosis cuidadosamente y respetar los períodos de espera establecidos; emplearlos únicamente según prescripción del veterinario; almacenarlos de forma segura y muy importante para el medio ambiente: eliminarlos de forma responsable.

A₃-Alimentación. Los animales pueden pertenecer a una explotación extensiva, semiextensiva o intensiva. En general, las explotaciones tamberas en Argentina suelen ser semiextensivas (266). Es decir, los animales pasan gran parte del tiempo en diferentes potreros, rotando entre las diferentes parcelas. El contacto con la pastura contaminada es un factor de riesgo para el control de la resistencia, para todas las especies animales. De modo que es imprescindible asegurarse de que el alimento proporcionado a los animales productores de leche sea el indicado para este propósito y que no tenga impacto negativo sobre la calidad y salubridad de su leche.

Si el alimento es almacenado, se deben controlar rigurosamente las condiciones de almacenamiento. Es decir, separar los alimentos destinados a especies animales diferentes; evitar la contaminación o deterioro de los alimentos para los animales; rechazar alimentos mohosos o defectuosos. Mantener registros de todos los alimentos y de los ingredientes alimentarios recibidos en la explotación

B- Agua. Una posible estrategia para proteger al agua de la contaminación ambiental es realizar un cuidadoso vallado de los cursos de agua y otras zonas susceptibles a impactos medioambientales. Controles microbiológicos de la calidad del agua de consumo en canillas y tanques de almacenamiento debe realizarse periódicamente pues el agua debe ser totalmente apta para su uso. En muchos países están reguladas las normás relativas a la calidad del agua utilizada en la producción de leche, incluido el uso de agua potable para la limpieza de las superficies que entran en contacto con la leche (255).

C- Personal. La interacción de las personas y el tambo tiene un lugar primordial en el logro de un producto final con calidad higiénico sanitaria de excelencia. En primer lugar, es fundamental el entrenamiento y la capacitación de todo el grupo humano a fin de concientizar acerca de la gravedad y la importancia que tiene el fenómeno de resistencia y multirresistencia a los antimicrobianos para ellos, para los animales, el medioambiente y el consumidor final.

El personal que realiza el ordeño debería usar ropa limpia y apropiada; mantener las manos y los brazos limpios, especialmente durante el ordeño; cubrirse cortes o heridas; y no tener ninguna enfermedad contagiosa transmisible a través de la leche.

Múltiples estudios han comprobado que la manera más eficiente, sencilla y barata de prevenir el contagio de enfermedades infecciosas es el correcto lavado de manos (267, 268, 269). En este sentido, algunas de las causas del deficiente lavado de manos son la escasez de profesionales que lleven a cabo una capacitación adecuada, la falta de conocimiento, la carencia de utensilios necesarios, carencia del hábito, la pereza, la negligencia y la rutina.

Por ello, cada uno en mayor o menor medida (veterinarios, tamberos y personal de ocasión) son directamente responsables de sus acciones y sus consecuencias en la salud pública.

D-Ambiente en general. El manejo de estos residuos es determinante para limitar su efecto negativo sobre el ambiente, la salud humana y la animal. Una cuidadosa aplicación de fertilizantes y un plan eficaz de efluentes minimizarían los impactos fuera de la explotación e incluso aumentaría la productividad y la calidad higiénico-sanitaria de la leche. Los factores más importantes a tener en cuenta se resumen a continuación.

En cuanto a los efluentes en particular, estos están compuestos por una fracción líquida que contiene agua, solución de lavado del equipamiento de ordeño, orina y restos de leche, y una sólida representada por heces, restos de alimentos y tierra.

Las áreas de almacenamiento de residuos tales como estercoleros, lodos y vertidos de la explotación, deben estar situadas adecuadamente, teniendo en cuenta su impacto visual y olfativo y el riesgo que representan para el medio ambiente la contaminación y las plagas. Se deberán inspeccionar regularmente los depósitos de purines y estercoleros para detectar fugas y controlar que no haya daños en las estructuras con el fin de minimizar el riesgo de contaminar el medio ambiente. Asegurarse de que otros desechos como, leche no conforme, animales muertos, envolturas de plástico para ensilaje, abonos y productos químicos agrícolas se eliminan adecuadamente para evitar la contaminación del medio ambiente. Debe ser eliminado cualquier foco potencial de reproducción de moscas y otros parásitos susceptibles de transmitir enfermedades.

El objetivo central será prevenir la contaminación del agua subterránea y superficial; eliminar y evitar zonas de acumulación de materia orgánica, crecimiento de insectos, proliferación de plagas y roedores; y proporcionar un ambiente de trabajo seguro para el operador. Siempre y cuando no se

pierda de foco procurar un mantenimiento y costos operativos bajos, respetando requerimientos legales.

En cuanto al uso de quimioterápicos ambientales, deberían utilizarse equipos diferentes para la manipulación de productos químicos y de alimentos; asegurarse de que los productos químicos se utilizan adecuadamente en las pasturas y cultivos forrajeros, respetando los períodos de espera. Utilizar solamente productos químicos autorizados para el tratamiento de los alimentos para los animales o de los componentes de dichos alimentos y respetar los períodos de espera.

V. CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

Los datos generados en este estudio demostraron que:

La prevalencia de la resistencia en los tambos analizados de las localidades de Tandil, San Vicente, Luján, Trenque Lauquen, fue preponderante frente a tetraciclina y ampicilina.

Todas las combinaciones de resistencia múltiple incluyen en su perfil a tetraciclina. Esto puede sugerir que las cepas de *E. coli* tetraciclina-resistentes podrían tener mayor tendencia a seleccionar resistencia frente a otros antimicrobianos en forma simultánea.

La concentración más elevada de NMP -100 µg/mL- en combinación con los antimicrobianos ciprofloxacina, tetraciclina y florfenicol; generó un descenso notable de las CIMs de 4 veces o más en la cepa AG112 y en casi el 100% de las cepas de campo *E. coli* con fenotipo *MDR*.

Considerando que la sobreexpresión de bombas de eflujo es el único mecanismo de resistencia presente en la cepa AG112, los resultados de la CIM demostraron que NMP manifiesta un importante sinergismo al combinarse con florfenicol en particular. La reducción de la CIM modificó el fenotipo en dicha cepa, descendiendo el valor de la CIM de manera tal, que la cepa recuperó la susceptibilidad por completo al combinar el antimicrobiano con la concentración más elevada de NMP.

En general, la concentración de NMP que redujo un mínimo de cuatro veces la CIM del antimicrobiano en la mayoría de las muestras *MDR* de campo analizadas y en AG112, fue de 100 µg/mL. Por ello, consideramos que la MEC de NMP se corresponde con este último valor.

NMP en el orden de 50 µg/mL y 100 µg/mL, actúa en colaboración con los antimicrobianos florfenicol, tetraciclina y ciprofloxacina, evidenciando la ocurrencia de sinergismo de potenciación ya que con una concentración de antimicrobiano varias veces inferior a su CIM, se logra un efecto antibacteriano mejorado.

En cuanto a la relación CBM/CIM, la adición de NMP a los antimicrobianos evaluados no generó cambios importantes. Hubo en general, cierta tendencia a alejar los valores de las CBMs del de las CIMs.

En general, para los tres antimicrobianos evaluados –florfenicol, ciprofloxacina y tetraciclina-, existe una “cinética de muerte” muy semejante observable en las curvas de muerte. Es decir, tanto para la cepa mutagénica AG112 como para las de campo *MDR*, la velocidad con la que disminuyó el recuento bacteriano en los distintos tubos de cada una de las baterías analizadas (con 50 µg/mL; 100 µg/mL de NMP y sin inhibidor), fue casi idéntico.

En las curvas de muerte bacteriana, la incorporación de NMP en las baterías de tubos con 50 µg/mL y 100 µg/mL de NMP, permitió que el antimicrobiano mantenga similar eficacia a pesar de estar presente a concentraciones claramente inferiores comparado con la batería sin NMP, demostrando de este modo un claro efecto sinérgico entre los antimicrobianos y el inhibidor de bombas.

En cuanto a la relación PK/PD, al evaluar a florfenicol frente a la cepa AG112, se logró mejorar el perfil PK/PD a través del incremento de la relación ABC/CIM₉₀ en forma importante con la adición del NMP y la consecuente reducción de la concentración de florfenicol.

Con ciprofloxacina, para la misma cepa, se logró aumentar el parámetro predictor de eficacia más importante para las fluoroquinolonas con la incorporación de NMP a razón de 100 µg/mL. Si consideramos que una relación C_{max}/CIM menor de 8-10, aumenta el riesgo de selección de resistencia y la falla terapéutica. Con la incorporación de NMP se logró superar ampliamente ese valor, con lo que podría inferirse que se logra una relación superior al punto de cohorte de 10-12 veces la CIM₉₀.

La adición de NMP permitió mejorar la relación ABC/CIM₉₀ para tetraciclina de manera considerable, y se prolongó el tiempo en el que la concentración plasmática de oxitetraciclina se mantiene por encima de la CIM₉₀ de tetraciclina frente a AG112.

La integración entre los datos cinéticos y dinámicos no permitió obtener buenos resultados con las cepas de campo *E. coli* MDR, debido a que las CIMs de estas cepas fueron muy elevados, con valores de 256 µg/mL. Es decir, que al dividir el ABC o la C_{max} por dicho valor, los resultados fueron tan pequeños que no pueden ser empleados como predictores de la eficacia antibacteriana.

Los resultados presentados en este trabajo sientan las bases para diseñar nuevas estrategias para el combate de los microorganismos difíciles de controlar, permitiendo la utilización de antimicrobianos en forma racional, utilizando al máximo sus características terapéuticas y minimizando la emergencia y diseminación de cepas resistentes.

Por todo lo expuesto, consideramos imprescindible continuar con la investigación del inhibidor de bombas NMP, debido a que no existen en la actualidad estudios *in vivo* de ningún tipo. En forma preliminar podríamos decir que los pasos siguientes a esta investigación serían estudios *ex vivo*, que permitan una aproximación farmacocinética-farmacodinámica, estudios *in vivo* para determinar la seguridad de la droga, y establecer la concentración máxima capaz de producir eficacia sin toxicidad en asociación con el antimicrobiano. Y finalmente la corroboración de la eficacia *in vivo* de los nuevos esquemas terapéuticos utilizando modelos de infección con *E.coli*.

Obviamente todos estos estudios de la mano del análisis molecular responsable del fenotipo de resistencia múltiple en las cepas aisladas a campo.

VI. ANEXO

VI. ANEXO**VI.1. ANEXO A****Formato de encuesta****Fecha:****ENCUESTA DEL ESTABLECIMIENTO PRODUCTIVO****DATOS PERSONALES DEL ENCUESTADO:**

NOMBRE/ APELLIDO: EDAD: SEXO:

ESTADO CIVIL:

DIRECCION / LOCALIDAD:

GRUPO FAMILIAR:

DATOS DEL ESTABLECIMIENTO

Nombre del establecimiento	
Dirección	
Hectáreas	
Cargo desempeñado	
Carga horaria semanal	
Lugar de vivienda. Vive allí?	<i>SI / NO</i>
Consumo de leche cruda por grupo familiar	<i>SI / NO</i>
Horas de contacto con los animales	
Participación en las dosificaciones	<i>SI / NO</i>
Frecuencia de participación	
Presencia de mascotas	<i>SI / NO</i>
Atención veterinaria a mascotas	<i>SI / NO</i>
Contacto entre mascotas y animales de producción	<i>SI / NO</i>
Lugar de mascotas	<i>SUELTOS / ATADOS</i>

CARACTERISTICAS DE LA PRODUCCION**Tipo de producción:**

Animales	Número
Vacas en lactancia	
Vacas secas	
Recría 1/ 2/ 3	
Guachera	
Otras especies/categoría	
Otras especies/categoría	

ESTADO SANITARIO DE LOS ANIMALES DE PRODUCCION

Enfermedad infecciosa			
Fecha estimada			
Categoría animal afectada			
Animales tratados (afectados o todas las categorías)			
Pruebas de laboratorio			
Antibiograma			
Tratamiento recibido (principio activo)			
Nombre comercial de la droga			
Forma farmacéutica / concentración			
Via de administración (IM-IMM-SC-PO)			
¿Qué se hace en caso de seguir con la patología?			
Destino de animales afectados (¿aislamiento/sacrificio?)			
Medidas sanitarias más frecuentes			
Tiempo postratamiento esperado para faena o consumo de leche			
Frecuencia/dosis			
Recetado (si/no)			

PLAN DE VACUNACION ACTUAL

Vacuna	Categoría animal	Fecha estimada

SANEAMIENTO AMBIENTAL / AGUA**AMBIENTE**

1. ¿Qué se realiza con los envases de las drogas que se usan en el establecimiento?
2. ¿Qué se realiza con el material sanitario descartable?
3. ¿Son eliminados y/o tratados los restos de los animales muertos en el campo?
4. Si los animales están en corrales:
 - ❖ ¿Con qué frecuencia se limpian los corrales?
 - ❖ ¿Cómo se eliminan las deposiciones? ¿se ubican en algún lugar en especial?
 - ❖ ¿Qué tipo de productos se utilizan para limpieza o tratamiento?
5. ¿Se utilizan las deposiciones como abono u otro/a?
6. ¿Contrata alguna empresa especializada para el tratamiento de residuos?

AGUA

1. ¿Cuáles son las fuentes de agua de limpieza y potable?
2. ¿Cuál es la ubicación de las fuentes de agua / tanques / molinos?
3. ¿Cuál es la ubicación de las salidas de agua potable?
4. ¿Se realizan tratamientos del agua con frecuencia?
5. ¿Se realizan tratamientos de efluentes?
6. ¿Se realizan control de insectos y/o plagas?

Encuesta modelo A

Fecha: 15/05/2008

ENCUESTA DEL ESTABLECIMIENTO PRODUCTIVO

DATOS PERSONALES DEL ENCUESTADO:

NOMBRE/ APELLIDO: XXX

EDAD: 26

SEXO: F

ESTADO CIVIL: Soltera

DIRECCION / LOCALIDAD: Av. Espora

GRUPO FAMILIAR: grande

DATOS DEL ESTABLECIMIENTO

Nombre del establecimiento	XX
Dirección	Escuela Rural Nº 3. San Vicente
Hectáreas	64
Cargo desempeñado	Veterinaria
Carga horaria semanal	Variable
Lugar de vivienda. Vive allí?	SI / NO
Consumo de leche cruda por grupo familiar	SI / NO
Horas de contacto con los animales	8 hs
Participación en las dosificaciones	SI / NO
Frecuencia de participación	Muy frecuente
Presencia de mascotas	SI / NO
Atención veterinaria a mascotas	SI / NO
Contacto entre mascotas y animales de producción	SI / NO
Lugar de mascotas	SUELTOS / ATADOS

CARACTERISTICAS DE LA PRODUCCION

Tipo de producción: COMBINADA (principal actividad: TAMBO CON GUACHERA)

Animales	Número
Vacas en lactancia	62
Vacas secas	15
Recría 1/ 2/ 3	66
Guachera	15
Otras especies/categoría	Toro (1)
Otras especies/categoría	Cerdas reproductoras (20)
Otras especies/categoría	Ovejas (10)
Otras especies/categoría	Gallinas-pavos-gansos-patos

ESTADO SANITARIO DE LOS ANIMALES DE PRODUCCION

Enfermedad infecciosa	Problemás patas (pietin /flemon) aguda	Endometritis Aguda	Neumonias Aguda
Fecha estimada	Periodos de lluvias prolongadas	todo el año	invierno
Categoría animal afectada	vacas en ordeño	post-parto	terneros de guachera, recría 1-2
Animales tratados (afectados o todas las categorías)	afectados	afectados	afectados, y preventivamente los compañeros de lote con florfenicol oral
Pruebas de laboratorio	no	no	no
Antibiograma	no	no	no
Tratamiento recibido (principio activo)	1-tilosina 2- metanal- metanol-cloruro de benzalconio	1-oxitetra. L.A. 2-yodo 3-prostaglandina	1-florfenicol 2-tilosina depende el caso
Nombre comercial de la droga	1-Taiker 200 2-Curapietin	1- Oxitetraciclina L.A. 2- Podocit 3- Prostaglandina	1-Florfarma 30 2-Taiker 200
Forma farmaceutica / concentración	1-inyectable (20 %) 2- suspensión local	1-solución 20% 2-solución 3-solución todas inyectables	1- inyectable (30 %) 2- inyectable (20 %)
Vía de administración (IM-IMM-SC-PO)	1-intramuscular 2- local en zona de inflamación	1-intramuscular 2- intrauterina diluida con agua destilada 3- intramuscular	1-florfenicol inyectable y oral preventivo 7 días 2-taiker inyectable
¿Qué se hace en caso de seguir con la patología?	se cambia de tratamiento, se combina con otras drogas que potencien la acción final	se repite tratamiento hasta que se limpia definitivamente	se cambia el tratamiento pero no es lo habitual
Destino de animales afectados (¿aislamiento/sacrificio?)	aislamiento temporario	no se aísla	aislamiento
Medidas sanitarias más frecuentes	se pasa todo el rodeo por pediluvio con sulfato de cobre	en la retención se corta la placenta al ras de la vulva.	aislamiento, vacunación preventiva
Tiempo postratamiento esperado para faena o consumo de leche	el indicado en el prospecto	el indicado en el prospecto	el indicado en el prospecto
Frecuencia/dosis	cada 24 hs el taiker 0,5 a 1 mL cada 20 kilos.	1-10/15 mL /100 kg. c/ 48 hs 2- 5 mL por cuerno diluido en 50 mL de agua, 1 vez	2 dosis con intervalo de 48 hs. 1mL/15 kg. im.
Recetado (si/no)	si	si	no

Enfermedad infecciosa	Mástitis aguda y crónica	DiarreaAguda	Paratuberculosis
Fecha estimada	cualquier estación aumenta con lluvias prolongadas	terneros de guachera	vaquillonas o vacas
Categoría animal afectada	vacas en lactancia	invierno- verano	
Animales tratados (afectados o todas las categorías)	afectados	afectados	-
Pruebas de laboratorio	si	no	
Antibiograma	no	no	no
Tratamiento recibido (principio activo)	según las mástitis: aguda: cloxacilina-ampicilina/eritromicina	trimetoprima-sulfadimetoxina. penicilina strepto según el caso o dieta de leche	no se realiza tratamiento
Nombre comercial de la droga	másticilina aguda/ememást plus.	sulfaprim. distintas marcas de penicilinas	
Forma farmacéutica / concentración	cloxacilina 200 mg pomo ampicilina 75mg en suspensión/ eritromicina pomo.	inyectables	-----
Vía de administración (IM-IMM-SC-PO)	Intramamaria – parenteral	Intramuscular - oral	-----
¿Qué se hace en caso de seguir con la patología?	Se puede hacer cultivo y antibiograma	Nunca me paso	-----
Destino de animales afectados (¿aislamiento/sacrificio?)	Se los ordeña al final y de no ser así se desinfectan las pezoneras y se ordeñan con guantes para evitar el contagio.	Aislamiento si es infeccioso- No se aísla si es por empacho	Venta para consumo
Medidas sanitarias más frecuentes	Desinfección periódica, sellado de pezones, control de ordeñadora frecuente.	(*) Vacunación preventiva de la madre en el secado y un mes pre parto	Aislamiento, reducción del contagio de terneros a partir de alimentar con leche pasteurizada, destete muy precoz de hembras.
Tiempo postratamiento esperado para faena o consumo de leche	el indicado en el prospecto	el indicado en el prospecto	-----
Frecuencia/dosis	1 pomo cada 12 hs hasta remisión	1-2 mL/10 kg. el sulfaprim 3 a 5 días penicilina cada 24 hs 5 días	-----
¿ Recetado (si/no)	si	si	-----

(*) Se administran 4 litros de calostro en mamadera del banco congelado de los mejores calostros

PLAN DE VACUNACION ACTUAL

Vacuna	Categoría animal	Fecha estimada
Radox (complejo respiratorio)	Terneros de más de 2 meses Recría 1-2	Otoño-invierno
Mancha-gangrena y enterotoxemia	Todo el rodeo incluidos las vacas	Primavera- otoño
Reproductivas Virales y bacterianas:	A los 7 y a los 8 meses de gestación	Antes del servicio 2 dosis vaquillonas
Brucelosis	Hembras de 3 a 8 meses	
Aftosa	Todo el rodeo	Otoño y primavera

SANEAMIENTO AMBIENTAL / AGUA**AMBIENTE.**

1. ¿Qué se realiza con los envases de las drogas que se usan en el establecimiento?
Se juntan en bolsa y se llevan a tachos de recolección de basura municipales.
2. ¿Qué se realiza con el material sanitario descartable?
Se tira dentro de tarros que protejan contra el pinchazo y luego se echa con el resto de los residuos.
3. ¿Son eliminados y/o tratados los restos de los animales muertos en el campo?
Se llevan al cementerio y se queman con periodicidad
4. Si los animales están en corrales:
 - ❖ ¿Con qué frecuencia se limpian los corrales?
Se realiza el tratamiento de la guachera si fuera necesario con cal. Se cambia habitualmente de lugar. No es posible la desinfección de corrales, son de tierra, exceptuando el corral del tambo que se lava con hidrolavadora y cepillo de piso 2 veces al día.
 - ❖ ¿Cómo se eliminan las deposiciones? ¿se ubican en algún lugar en especial?
Estercolera
 - ❖ ¿Qué tipo de productos se utilizan para limpieza o tratamiento?
Ninguno
5. ¿Se utilizan las deposiciones como abono u otro/a?
Si para la huerta familiar
6. ¿Contrata alguna empresa especializada para el tratamiento de residuos?
No

AGUA

1. ¿Cuáles son las fuentes de agua de limpieza y potable?
Pozo de agua con bomba y con molino
2. ¿Cuál es la ubicación de las fuentes de agua / tanques / molinos?
Tanque australiano al lado de la casa del tambero
3. ¿Cuál es la ubicación de las salidas de agua potable?
4. ¿Se realizan tratamientos del agua con frecuencia?
No
5. ¿Se realizan tratamientos de efluentes?
No
6. ¿Se realizan control de insectos y/o plagas?
Solo mosca de los cuernos: en verano con caravanas al rodeo de ordeño, y con pour-on al resto de las categorías.

Encuesta modelo B

Fecha: 16/06/2006

ENCUESTA DEL ESTABLECIMIENTO PRODUCTIVO**DATOS PERSONALES DEL ENCUESTADO:**

NOMBRE/ APELLIDO: XX EDAD: 42 SEXO: M
 ESTADO CIVIL: Casado
 DIRECCION / LOCALIDAD: Tandil

DATOS DEL ESTABLECIMIENTO

Nombre del establecimiento	XX
Dirección	Tandil
Hectáreas	437
Cargo desempeñado	Veterinario
Carga horaria semanal	Variable
Lugar de vivienda. Vive allí?	SI / NO
Consumo de leche cruda por grupo familiar	SI / NO
Horas de contacto con los animales	10 hs
Participación en la medicaciones	SI / NO
Frecuencia de participación	Muy frecuente
Presencia de mascotas	SI / NO
Atención veterinaria a mascotas	SI / NO
Contacto entre mascotas y animales de producción	SI / NO
Lugar de mascotas	SUELTOS / ATADOS

CARACTERISTICAS DE LA PRODUCCION

Tipo de producción: COMBINADA (principal actividad: TAMBO CON GUACHERA)

Animales	Número
Vacas en ordeño	167
Vacas secas	35
Recría 1/ 2/ 3	100
Guachera	20
Otras especies/categoría	1 (toro)
Otras especies/categoría	
Otras especies/categoría	
Otras especies/categoría	

ESTADO SANITARIO DE LOS ANIMALES DE PRODUCCION				
Enfermedad infecciosa	Problemás patas (pietin /flemon) aguda	Endometritis Aguda	Neumonias Aguda	Diarrea Aguda
Fecha estimada	Verano: flemón Invierno: pietín	todo el año	invierno	invierno- verano
Categoría de animales afectados	vacas en ordeño	post-parto	terneros de guachera, recria 1-2	terneros de guachera
Animales tratados (afectados o todas las categorías)	afectados	afectados	afectados	afectados
Pruebas de laboratorio	no	no	no	no
Antibiograma	no	no	no	no
Tratamiento recibido (principio activo)	1-tilosina 2- oxitetraciclina 3-cefalexina	1- cefalexina 2- rifampicina	1-Penic+ Estreptom 2-Tilmicosina (casos graves)	1-trimetoprima-sulfadimetoxina. 2- Oxitetraciclina 3-Estreptocar-bocaftiazol
Nombre comercial de la droga	1. Río de Janeiro 2. Weizur 3. Río de Janeiro	1- Río de Janeiro 2-Fratroximin	1-Cantrimol (Vigo) 1'-Estrepto-pendiven (Bago) 2-Micotil	1-Rio de janeiro 2-Weizur
Forma farmacéutica / concentración	Inyectable al: 1- 20% 2- 20% 3- 18%	1-Inyectable (18%) 2-Aerosol	Inyectables 1- 6.000.000 UI (Biogénesis-Bagó) 1' - 5.000.000 UI (Biogénesis-Bagó) 2- Al 30%	Inyectables
Via de administracion (IM-IMM-SC-PO)	1-IM 2- IM 1 dosis 3-3 días IM	1- IM 2- intrauterina	1-IM 2-SC	1-IM 2-IM 3-IM
¿Qué se hace en caso de seguir con la patología?	Los que no mejoran, tto local	Según el grado en el control repite tto.		
Destino de animales afectados (aislamiento/sacrificio)	Aislamiento a veces, cuando son muchos.	No aislamiento	Guachera separada de vacas	Guachera separada de vacas
Medidas sanitarias más frecuentes	Prevención con queratolíticos, sales de zinc			
Tiempo postratamiento esperado para faena o consumo de leche	1- Tilosina-72hs 2- OTC-72hs 3-Ceftiofur-no tiene	No tiene retiro	El indicado por prospecto	El indicado por prospecto
Frecuencia/dosis	1- 1mL/50kg 2- 1mL/10kg 3- 1mL/25kg	1-3 días 2-1sola vez	1-repite a 72hs 2-1 sola aplicación	1-1 dosis si es LA o 5 días 2-3 días
Recetado (si/no)	si	si	si	si

Enfermedad infecciosa	Onfalitis Aguda	Queratoconjuntivitis Aguda	Mástitis aguda y crónica (detalle de ttos y diagnósticos en hoja aparte)	Paratuberculosis
Fecha estimada	todo el año	primavera/verano	todo el año	todo el año
Categoría animal afectada	terneros	recría 2 y 3	ordeño	vacas y vaquillonas
Animales tratados (afectados o todas las categorías)	Afectados	Afectados	Detalle en hoja aparte	
Pruebas de laboratorio	no	no	Si en algunos casos	
Antibiograma	no		Antibiograma: solo en <i>S. aureus</i> aisl: Streptococcus sp / <i>S. aureus</i>	
Tratamiento recibido (principio activo)	OTC	1. GEN 2.OTC	1 .EPM/AZT/DANO(sept-dic/04) 2. AMC (may-05) 3. AMC (rutina) 4. Cloxacilina(rutina)	
Nombre comercial de la droga	Weizur	1. Gentavet (Lab. Galmedic) 2.Weizur	1. Exp/Exp/Advocin (Pfizer) 2. Diclosan (Rossenbusch) 3. Diclomást (Tecnofarm) 4. Weizur o Rossenbusch	
Forma farmaceutica / concentración	inyectable	1.gel/colirio con violeta de genciana 2. inyectable	1.inyectables(las 3) 2inyectable y local / 3.4.local	
Via de administracion (IM-IMM-SC-PO)	IM	1-Local 2-Intrapalpebral	1. IM 2. IMM + IM 3.4. IMM	
¿Qué se hace en caso de seguir con la patologia?			Lactancia: quedan con las otras y la leche se colecta separada. Secado: a otro potrero.	
Destino de animales afectados (aislamiento/sacrificio)			detalle en hoja aparte	
Medidas sanitarias más frecuentes			La leche de descarte de las vacas lactancia tratadas, se destina a guachera.	
Tiempo postratamiento esperado para faena o consumo de leche	onfalitis aguda	queratoconjuntivitis aguda	Mástitis aguda y cronica (detalle de ttos y diagnósticos en hoja aparte)	
Frecuencia/dosis	1. 1 dosis	1.varias 2. 1 sola vez	detalle en hoja aparte	
¿ Bajo receta profesional	si	si	si	

TRATAMIENTOS IMPLEMENTADOS PARA LA MÁSTITIS

2004

✓ RUTINA:

Secado con cloxacilina (Weizur) pomos IMM tratamiento de rutina.*Lactancia* casos clínicos tratados con cloxacilina IMM (Weizur).

✓ TRABAJO EXPERIMENTAL ANTERIOR EN EL CAMPO:

Septiembre: vacas en lactancia: Aislamiento y tto con macrólidos (espiramicina -EPM- y azitromicina -AZT-) y fluoroquinolonas (danofloxacina -DANO- (Advocin.- Pfizer)*Diciembre: Lactancia:* aislamiento y tratamiento con macrólidos, danofloxacina y amoxicilina con ácido clavulánico -AMC- (DiclosanA.Rosenbusch), 3 pomos IMM

2005

✓ RUTINA:

Lactancia: Amoxicilina con ácido clavulánico. Pomos IMM (Diclomást/Tecnofarm).*Secado:* Cloxacilina pomos IMM (Rosenbusch/ Weizur).

✓ TRABAJO EXPERIMENTAL ANTERIOR EN EL CAMPO:

Marzo: aislamiento.*Mayo:* tratamiento. *Lactancia:* amoxicilina con clavulánico (DiclosanA Rossenbusch)*Octubre:* idem mayo.

2006

✓ RUTINA:

Amoxicilina con ácido clavulánico. Pomos IMM (Diclomást. Tecnofarm). Cloxacilina pomos IMM (Rosenbusch/ Weizur).

✓ TRABAJO EXPERIMENTAL ANTERIOR EN EL CAMPO:

Mayo: Secado: Cloxacilina pomos IMM (Rosenbusch).

PLAN DE VACUNACION ACTUAL

Vacuna	Categoría animal	Fecha estimada
Radox (complejo respiratorio)	Terneros de más de 2 meses Recría 1-2	Otoño-invierno
Mancha-gangrena y enterotoxemia	Todo el rodeo incluidos las vacas	Primavera- otoño
Reproductivas Virales y bacterianas:	A los 7 y a los 8 meses de gestación	Antes del servicio 2 dosis vaquillonas
Brucelosis	Hembras de 3 a 8 meses	
Queratoconjuntivitis IVR- Moraxella	Todo el rodeo	Otoño y primavera

SANEAMIENTO AMBIENTAL / AGUA**AMBIENTE.**

1. ¿Qué se realiza con los envases de las drogas que se usan en el establecimiento?
La mayoría se tiran en recipientes para residuos comunes, éstos se llevan a la cava y luego son incinerados. A veces los de vidrio se los llevan con la basura.
2. ¿Qué se realiza con el material sanitario descartable?
Tachos de basura. Incineración. Fosa estercolera
3. ¿Son eliminados y/o tratados los restos de los animales muertos en el campo?
Cal o quemado
4. Si los animales están en corrales: No están en corrales
 - ❖ ¿Con qué frecuencia se limpian los corrales?
 - ❖ ¿Cómo se eliminan las deposiciones? ¿se ubican en algún lugar en especial?
Solo se lava con agua el tambo luego de cada rutina de ordeño.
 - ❖ ¿Qué tipo de productos se utilizan para limpieza o tratamiento?
Ninguno
5. ¿Se utilizan las deposiciones como abono u otro/a?
No
6. ¿Contrata alguna empresa especializada para el tratamiento de residuos?
Algunas veces

AGUA

1. ¿Cuáles son las fuentes de agua de limpieza y potable?
Un solo pozo, perforación según la napa. Un molino sin funcionar. Tanque.
2. ¿Cuál es la ubicación de las fuentes de agua / tanques / molinos?
Tanque cercano a la casa. Arroyo al lateral de la casa.
3. ¿Cuál es la ubicación de las salidas de agua potable?
4. ¿Se realizan tratamientos del agua con frecuencia?
No
5. ¿Se realizan tratamientos de efluentes?
No
6. ¿Se realizan control de insectos y/o plagas?
Mosca de los cuernos/ mosca doméstica. Clorpirifos. Control de murciélagos.

VI.2. ANEXO B

VI.2.1. Planilla de trabajo para la realización de la CIM desde 256 µg/mL hasta 0.0078 µg/mL. Placa 1

PLACA 1		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ATB	A	256 µg/mL	128 µg/mL	64 µg/mL	32 µg/mL	16 µg/mL	8 µg/mL	4 µg/mL	2 µg/mL	1 µg/mL	0.5 µg/mL		
	B	4 µg/mL	2 µg/mL	1 µg/mL	0.5 µg/mL	0.25 µg/mL	0.125 µg/mL	0.062µg/mL	0.031µg/mL	0.015µg/mL	0.007µg/mL		
ATB + 6,25ug NMP	C	256 µg/mL	128 µg/mL	64 µg/mL	32 µg/mL	16 µg/mL	8 µg/mL	4 µg/mL	2 µg/mL	1 µg/mL	0.5 µg/mL		
	D	4 µg/mL	2 µg/mL	1 µg/mL	0.5 µg/mL	0.25 µg/mL	0.125 µg/mL	0.062µg/mL	0.031µg/mL	0.015µg/mL	0.007µg/mL		
ATB + 12,5 ug NMP	E	256 µg/mL	128 µg/mL	64 µg/mL	32 µg/mL	16 µg/mL	8 µg/mL	4 µg/mL	2 µg/mL	1 µg/mL	0.5 µg/mL		
	F	4 µg/mL	2 µg/mL	1 µg/mL	0.5 µg/mL	0.25 µg/mL	0.125 µg/mL	0.062µg/mL	0.031µg/mL	0.015 µg/mL	0.007µg/mL		
ATB + 25ug NMP	G	256 µg/mL	128 µg/mL	64 µg/mL	32 µg/mL	16 µg/mL	8 µg/mL	4 µg/mL	2 µg/mL	1 µg/mL	0.5 µg/mL		
	H	4 µg/mL	2 µg/mL	1 µg/mL	0.5 µg/mL	0.25 µg/mL	0.125 µg/mL	0.062µg/mL	0.031µg/mL	0.015µg/mL	0.007µg/mL		

VI.2.2. Planilla de trabajo para la realización de la CIM desde 256 µg/mL hasta 0.0078 µg/mL. Placa 2

PLACA 2		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ATB	A	256 µg/mL	128 µg/mL	64 µg/mL	32 µg/mL	16 µg/mL	8 µg/mL	4 µg/mL	2 µg/mL	1 µg/mL	0.5 µg/mL		
	B	4 µg/mL	2 µg/mL	1 µg/mL	0.5 µg/mL	0.25 µg/mL	0.125 µg/mL	0.062µg/mL	0.031µg/mL	0.015µg/mL	0.007µg/mL		
ATB + 50 ug NMP	C	256 µg/mL	128 µg/mL	64 µg/mL	32 µg/mL	16 µg/mL	8 µg/mL	4 µg/mL	2 µg/mL	1 µg/mL	0.5 µg/mL		
	D	4 µg/mL	2 µg/mL	1 µg/mL	0.5 µg/mL	0.25 µg/mL	0.125 µg/mL	0.062µg/mL	0.031µg/mL	0.015µg/mL	0.007µg/mL		
ATB + 100 ug NMP	E	256 µg/mL	128 µg/mL	64 µg/mL	32 µg/mL	16 µg/mL	8 µg/mL	4 µg/mL	2 µg/mL	1 µg/mL	0.5 µg/mL		
	F	4 µg/mL	2 µg/mL	1 µg/mL	0.5 µg/mL	0.25 µg/mL	0.125 µg/mL	0.062µg/mL	0.031µg/mL	0.015µg/mL	0.007µg/mL		
NMP	G	800 µg/mL	400 µg/mL	200 µg/mL	100 µg/mL	50 µg/mL	25 µg/mL	12.5 µg/mL	6.25 µg/mL	3.12 µg/mL	1.56 µg/mL		
	H	800 µg/mL	400 µg/mL	200 µg/mL	100 µg/mL	50 µg/mL	25 µg/mL	12.5 µg/mL	6.25 µg/mL	3.12 µg/mL	1.56 µg/mL		

VI.2.3. Planilla de trabajo para la realización de la CIM desde 0.25 µg/mL hasta 0.0078 µg/mL. Placa 1

PLACA 1		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ATB	A	0.25 µg/mL	0.125µg/mL	0.062µg/mL	0.031µg/mL	0.015µg/mL	0.007µg/mL	0.003µg/mL	0.0019µg/mL	0.0009µg/mL	0.0004µg/mL		
	B	0.25 µg/mL	0.125µg/mL	0.062µg/mL	0.031µg/mL	0.015µg/mL	0.007µg/mL	0.003µg/mL	0.0019µg/mL	0.0009µg/mL	0.0004µg/mL		
ATB + 6,25µg NMP	C	0.25 µg/mL	0.125µg/mL	0.062µg/mL	0.031µg/mL	0.015µg/mL	0.007µg/mL	0.003µg/mL	0.0019µg/mL	0.0009µg/mL	0.0004µg/mL		
	D	0.25 µg/mL	0.125µg/mL	0.062µg/mL	0.031µg/mL	0.015µg/mL	0.007µg/mL	0.003µg/mL	0.0019µg/mL	0.0009µg/mL	0.0004µg/mL		
ATB + 12,5 µg NMP	E	0.25 µg/mL	0.125µg/mL	0.062µg/mL	0.031µg/mL	0.015µg/mL	0.007µg/mL	0.003µg/mL	0.0019µg/mL	0.0009µg/mL	0.0004µg/mL		
	F	0.25 µg/mL	0.125µg/mL	0.062µg/mL	0.031µg/mL	0.015µg/mL	0.007µg/mL	0.003µg/mL	0.0019µg/mL	0.0009µg/mL	0.0004µg/mL		
ATB + 25µg NMP	G	0.25 µg/mL	0.125µg/mL	0.062µg/mL	0.031µg/mL	0.015µg/mL	0.007µg/mL	0.003µg/mL	0.0019µg/mL	0.0009µg/mL	0.0004µg/mL		
	H	0.25 µg/mL	0.125µg/mL	0.062µg/mL	0.031µg/mL	0.015µg/mL	0.007µg/mL	0.003µg/mL	0.0019µg/mL	0.0009µg/mL	0.0004µg/mL		

VI.2.4. Planilla de trabajo para la realización de la CIM desde 0.25 µg/mL hasta 0.0078 µg/mL. Placa 1

PLACA 2		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ATB	A	0.25 µg/mL	0.12µg/mL	0.062µg/mL	0.031µg/mL	0.015µg/mL	0.007µg/mL	0.003µg/mL	0.0019µg/mL	0.0009µg/mL	0.0004µg/mL		
	B	0.25 µg/mL	0.12µg/mL	0.062µg/mL	0.031µg/mL	0.015µg/mL	0.007µg/mL	0.003µg/mL	0.0019µg/mL	0.0009µg/mL	0.0004µg/mL		
ATB + 50 ug NMP	C	0.25 µg/mL	0.12µg/mL	0.062µg/mL	0.031µg/mL	0.015µg/mL	0.007µg/mL	0.003µg/mL	0.0019µg/mL	0.0009µg/mL	0.0004µg/mL		
	D	0.25 µg/mL	0.12µg/mL	0.062µg/mL	0.031µg/mL	0.015µg/mL	0.007µg/mL	0.003µg/mL	0.0019µg/mL	0.0009µg/mL	0.0004µg/mL		
ATB + 100 ug NMP	E	0.25 µg/mL	0.12µg/mL	0.062µg/mL	0.031µg/mL	0.015µg/mL	0.007µg/mL	0.003µg/mL	0.0019µg/mL	0.0009µg/mL	0.0004µg/mL		
	F	0.25 µg/mL	0.12µg/mL	0.062µg/mL	0.031µg/mL	0.015µg/mL	0.007µg/mL	0.003µg/mL	0.0019µg/mL	0.0009µg/mL	0.0004µg/mL		
NMP	G	800 µg/mL	400 µg/mL	200 µg/mL	100 µg/mL	50 µg/mL	25 µg/mL	12.5 µg/mL	6.25 µg/mL	3.12 µg/mL	1.56 µg/mL		
	H	800 µg/mL	400 µg/mL	200 µg/mL	100 µg/mL	50 µg/mL	25 µg/mL	12.5 µg/mL	6.25 µg/mL	3.12 µg/mL	1.56 µg/mL		

VI.3. ANEXO C

VI.3.1 Preparación de medios y reactivos

VI.3.1.1. Medios de cultivo para aislamiento y mantenimiento de *Escherichia coli*

Agar eosina y azul de metileno (EMB)(270)

Medio selectivo utilizado para el aislamiento y diferenciación de bacilos entéricos Gram-negativos que permite distinguir las bacterias fermentadoras, no fermentadoras y fermentadoras tardías de la lactosa. No es confirmatorio y solo sirve de orientación.

Diferentes enterobacterias pueden ser distinguidas de acuerdo con su capacidad de fermentar los componentes lactosa y sacarosa presentes en el medio, por el aspecto y el color de sus colonias. Los colorantes empleados, eosina y el azul de metileno, inhiben notablemente el desarrollo de gérmenes Gram-positivos.

Las muestras se siembran en placas por estrías, se incuban a 35-37°C por 24hs. Los coliformes que utilizan la lactosa y/o sacarosa como *E. coli* producen colonias de color azul a negro con centros oscuros y brillo metálico.

Composición del medio en gramos por litro:

Peptona	10
Lactosa	10
Fosfato dipotásico	2
Eosina	0.4
Azul de metileno	0.065
Agar	15

Caldo Mac Conkey (271)

Medio de cultivo líquido, selectivo, utilizado para la investigación presuntiva de microorganismos coliformes en aguas y otros materiales de importancia sanitaria. Contiene peptona como fuente de aminoácidos, lactosa como hidrato de carbono fermentable, bilis de buey que estimula el crecimiento de bacterias coliformes e inhibe a gran parte de la flora Gram-positiva, y púrpura de bromocresol que es el indicador de pH.

Los coliformes fermentan la lactosa con producción de ácido y gas. Al acidificarse el medio produce un viraje del indicador de pH del color púrpura al amarillo.

Composición del medio en gramos por litro

Peptona	20
Lactosa	10
Sales biliares	5
Púrpura de bromocresol	0.01

Caldo tripticasa soya

Medio líquido adecuado para el desarrollo de microorganismos exigentes. La tripteína y la peptona de soya aportan nutrientes ricos en péptidos, aminoácidos libres, bases púricas y pirimídicas, minerales y vitaminas. La peptona de soya aporta carbohidratos que estimulan el crecimiento de muchos microorganismos. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico. El fosfato dipotásico otorga capacidad buffer y la glucosa es la fuente de energía.

Composición del medio en gramos por litro

Bacto triptona	15
Peptona de soya	5
Cloruro de sodio	5

Caldo Lactosa-Bilis 2%-Verde Brillante (LB-VB)

Medio líquido que se utiliza y está recomendado para el recuento de coliformes totales y fecales. Contiene peptona que aporta los nutrientes necesarios para el adecuado desarrollo bacteriano; bilis y colorante verde brillante que son los agentes selectivos inhibidores de bacterias distintas de las coliformes, y lactosa como hidrato de carbono fermentable.

La fermentación de la lactosa con producción de ácido y gas es una propiedad del grupo coliforme.

Procedimiento

Para la **prueba confirmatoria** de presencia de coliformes fecales, se transfiere una ansada a un tubo con caldo LB-VB a partir de cada tubo positivo en el test presuntivo de coliformes totales (NMP) o de otro medio donde halla colonias presentes y que se presume sean coliformes, se incuba a 45 +/- 0.5 °C durante 24 hs.

Composición del medio en gramos por litro

Bilis de buey deshidratada	20
Lactosa	10
Peptona	10
Verde brillante	0.0133
pH final	7.2

Medio de cultivo para mantenimiento de cepas isogénicas de Escherichia coli: Caldo Luria-Bertani (LB) (178, 224, 272, 273)

Se utilizó caldo LB, medio nutricionalmente rico empleado desde 1950 en estudios de microbiología molecular de *E. coli* adecuado para el cultivo de células recombinantes que no crecen correctamente en medio pobres. Permite un rápido y adecuado crecimiento de *E. coli* sobre todo en protocolos moleculares.

Este medio de cultivo contiene triptona, extracto de levadura y cloruro de sodio; el mismo fue preparado en forma artesanal. *E.coli* crece más rápidamente porque el medio le provee aminoácidos, precursores de nucleótidos, vitaminas y otros metabolitos que debería sintetizar por sí mismo.

Composición del medio en gramos por litro

Triptona	10
Extracto de levadura	5
Cloruro de sodio	10
pH	7

VI.3.1.2. Pruebas bioquímicas para la identificación de *E. coli***Tinción de Gram(169, 274)**

Esta tinción diferencial fue propuesta por el médico danés Christian Gram (1884). Es la tinción diferencial más utilizada de forma rutinaria y prácticamente la primera prueba a la que se someten las muestras de cualquier origen antes de su estudio. Proporciona una información esencial, además de la forma, tamaño y agrupación celular, permite evidenciar como es el tipo y composición de la pared que presentan las bacterias. La tinción de Gram divide a las bacterias con pared del Dominio Bacteria en

dos grandes grupos: bacterias con pared de tipo Gram-positiva y bacterias con pared de tipo Gram-negativa.

La diferente estructura y organización de la pared celular en estos dos tipos de microorganismos hace que ambos grupos respondan de manera distinta, así mientras las bacterias Gram-positivas mantienen y conservan el complejo cristal violeta-iodo, las Gram-negativas se decoloran rápidamente con la aplicación del alcohol, admitiendo el colorante de contraste que proporciona un color entre rosa y rojo que contrasta con el intenso color violeta.

En bacterias Gram-positivas la gruesa capa de péptidoglucano con abundantes entrecruzamientos parece contribuir a la retención del colorante fundamental, cristal violeta, mientras que en bacterias Gram-negativas la delgada capa de péptidoglucano junto con la abundancia de lípidos en la membrana externa de la pared celular incrementan la porosidad y por ello, contribuyen a la pérdida del colorante fundamental después de la decoloración con alcohol.

Procedimiento

Se coloca sobre un portaobjetos una gota de agua y una pequeña alícuota de un cultivo bacteriano con el ansa de siembra estéril. A continuación se realiza el frotis, formando una película homogénea sobre el portaobjetos con el ansa de siembra. Se deja secar. Luego, se fija la preparación pasando el portaobjetos a través de la llama de un mechero. Se cubre con unas gotas de cristal violeta y se deja reposar durante 1 minuto. Pasado ese tiempo, se lava el exceso de colorante con agua. Se añade el mordiente lugol, solución de yodo-ioduro potásico, durante 1 minuto y luego, se lava el exceso de mordiente con agua. Por último, se lava la preparación con alcohol, durante 30 segundos (el tiempo de decoloración es clave para un resultado correcto). Se lava inmediatamente con abundante agua y se procede a cubrir con el colorante de contraste, safranina, durante 1 minuto. Se lava el exceso de colorante con agua y se deja secar al aire. Una vez concluido todo el proceso, se añade una gota de aceite de inmersión y se observa en el microscopio con objetivo de inmersión (100 x).

Medio de motilidad con indol y sulfuro (SIM)

Medio semisólido (0.4% de agar o menos) destinado a verificar movilidad, producción de indol y de sulfuro de hidrógeno en un mismo tubo de diferentes miembros de la familia Enterobacteriaceae. Contiene triptófano, aminoácido constituyente de la tripteína, que puede ser oxidada por algunas bacterias para formar indol por medio de enzimas triptofanasas. El indol producido se combina con el aldehído del reactivo de Kovac's o de Erlich, para originar un compuesto de color rojo. Las cepas móviles pueden apreciarse en este medio, por la turbidez que producen alrededor de la punción de

siembra, mientras que aquellas cepas productoras de sulfhídrico se distinguen por la formación de un precipitado negro de sulfuro de hierro a partir del tiosulfato, siempre que el medio se mantenga a un pH mayor a 7.2.

Composición del medio en gramos por litro

Peptona de caseína	20
Peptona de carne	6.6
Citrato de amonio y hierro	0.2
Tiosulfato de sodio	0.2
Agar	3

El medio semisólido es fraccionado en "columna".

Composición del reactivo de Kovacs

Alcohol amílico o iso-amílico puro	150 mL
p-dimetilamino benzaldehído	10 g
HCl concentrado	50 mL

Procedimiento

Se inocula por punción (siembra en profundidad) en el centro del tubo y luego en superficie con el cultivo a investigar. Se incuba a 37 °C durante 24-48 horas. Y por último se incorporan unas gotas del reactivo de Kovac's sobre la superficie del medio y se agita.

Lectura

E. coli es positiva a la formación de indol, determinado por la aparición de un color rojo al colocar el reactivo de Kovac's. La movilidad se observa porque los organismos migran del lugar de la siembra y difunden en el medio provocando turbidez. *E. coli* presenta movilidad variable y no produce SH₂, es decir no se observa ennegrecimiento de la zona de crecimiento.

Existen algunas cepas de *E. coli* que producen una reacción atípica en esta prueba dando indol negativo al momento del revelado con el reactivo de Kovac's.

Prueba del rojo de metilo (RM)

Prueba bioquímica cualitativa que se utiliza para comprobar la capacidad de un organismo de producir y mantener estables los productos terminales ácidos de la fermentación de la glucosa,

venciendo la capacidad amortiguadora del sistema. Se emplea un indicador de pH, rojo de metilo, para determinar la concentración de iones hidrógeno producto de la fermentación de la glucosa.

Procedimiento

Se inoculan 3 mL de caldo RM / VP en un tubo de vidrio con una ansada del cultivo activo a investigar y se incuba a 37°C por 48hs.

Todos los miembros de la familia Enterobacteriaceae, son por definición fermentadores de la glucosa. Luego de 18-24 horas de incubación, la fermentación resultante da origen a productos secundarios ácidos. Es por ello, que en la fase inicial de la prueba, todas las enterobacterias darán una reacción positiva. Sin embargo, después de 48 horas, los organismos RM negativos, continúan metabolizando los productos iniciales de la fermentación por decarboxilación, produciendo acetilmetil carbinol (acetoína) neutro, dando un pH final mayor o igual a 6. *E. coli* da una reacción RM positivo.

Prueba de Voges Proskauer (VP)

Prueba bioquímica cualitativa que determina la capacidad de algunos microorganismos de producir acetilmetilcarbinol (acetoína), a partir de la fermentación de la glucosa. En presencia de oxígeno atmosférico y de hidróxido de potasio al 40 %, la acetoína se convierte en diacetilo, el alfa naftol actúa como catalizador para revelar un complejo de color rojo, formado por diacetilo y creatina proveniente del catabolismo de las peptonas.

Procedimiento

Se inocula un tubo con 2 mL de caldo RM / VP con una ansada del cultivo activo del microorganismo problema. Se incuba a 37 °C durante 48 horas. Para su revelado se agrega 0.6 mL de alfa naftol 5 % y luego de agitar suavemente, se le incorporan 0.2 mL de KOH 40 %. Se procede luego a agitar cuidadosamente para exponer el medio al oxígeno, se deja reposar y finalmente se efectúa la lectura a los 15-30 minutos.

Para esta prueba *E. coli* da un resultado negativo pues no hay viraje al color rojo luego del agregado de los reactivos mencionados.

Prueba de la utilización de citrato (270, 275)

Esta prueba se utiliza para identificar microorganismos, especialmente enterobacterias, que pueden desarrollarse empleando como única fuente de carbono para el metabolismo al citrato produciendo alcalinidad.

Se emplea el medio agar citrato de Simmons que además de citrato, contiene también sales de amonio inorgánicas como única fuente de nitrógeno. Las sales de amonio se desdoblan en amoníaco con la consiguiente alcalinidad. El desdoblamiento del citrato da progresivamente, oxalacetato y piruvato. Este último, en presencia de un medio alcalino, da origen a ácidos orgánicos que, al ser utilizados como fuente de carbono, producen carbonatos y bicarbonatos alcalinos. El medio entonces vira al azul y esto es indicativo de la producción de citrato permeasa.

El indicador de pH usado es el azul de bromotimol, el cual en medio alcalino toma un color azul de Prusia, indicando una prueba positiva. El medio no inoculado es de color verde.

Composición del medio en gramos por litro

Fosfato diácido de amônio	1
Fosfato dipotásico	1
Cloruro de sodio	5
Sulfato de magnesio	0.2
Agar	15
Azul de bromotimol	0.08
Citrato de sodio	5
pH	6.9

Procedimiento

Se inocula el medio con el cultivo a investigar en forma de estría y por punción. Luego, se incuba a 37 °C durante 24-48 horas.

Lectura

E. coli es negativo a esta prueba, el medio conserva el color verde original y hay ausencia de desarrollo bacteriano.

Medio agar hierro tres azucares (TSI)(275)

Es un medio especial que permite determinar la capacidad de un microorganismo de fermentar los hidratos de carbono presentes (glucosa, lactosa y sacarosa) en el medio de crecimiento básico con producción o no de gas, y la producción o no de ácido sulfhídrico.

Composición del medio en gramos por litro

Peptona	15
Extracto de levadura	3
Extracto de carne	3
Cloruro de sodio	5
Lactosa	10
Sacarosa	10
Glucosa	1
Sulfato amónico ferroso	0.2
Tiosulfato de sodio	0.2
Rojo de fenol	0.025
Agar	13
pH	7.3

Procedimiento

El medio se hierve y luego se fracciona (5 mL/tubo) en tubos individuales con tapón flojo para ser esterilizados. Una vez fuera del autoclave, se dejan secar en forma inclinada a fin de lograr formar "picos de flauta" de 2.5 cm aproximadamente, y de esta manera obtener 2 cámaras de reacción: 1)fondo o profundidad: anaerobiosis y 2) pico: aerobiosis.

Se inocula la superficie del pico de flauta por estría y el fondo por punción, con el cultivo a investigar. Luego se incuba a 37 °C y se efectúa la lectura de los resultados luego de 18-24 horas.

Interpretación de resultados

1. La fermentación de azúcares provoca acidificación del medio con el consiguiente viraje del indicador (rojo de fenol) a amarillo. Las reacciones observables para *E. coli* son ácido (amarillo) en la zona del pico de flauta (glucosa fermentada), ácido (amarillo) en el fondo (lactosa y/o sacarosa fermentadas).
2. La producción de gas durante la fermentación de los azúcares se evidencia por la aparición de burbujas o fragmentación del medio. En el caso de *E. coli* la producción de gas es variable.
3. La formación de ácido sulfhídrico se detecta por ennegrecimiento del medio debido a la producción de sulfuro ferroso (previamente hubo producción de ácido). *E. coli*, negativo.

VI.3.1.3. Estándar de turbidez 0.5 McFarland (167, 173)

Para estandarizar la densidad del inóculo se usa una suspensión de sulfato de bario como estándar de turbidez (0.5 de la escala de Mc Farland).

Para prepararlo se procede de la siguiente manera:

- (1) Se prepara una solución stock 0.048M de Cl_2Ba (1.175% P/V $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).
- (2) Se prepara una solución stock 0.18 M de H_2SO_4 (1% V/V).
- (3) Se agregan 0.5 mL de BaCl_2 0.048M (1.175% P/V $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a 99.5 mL de H_2SO_4 0.18 M (1% V/V). Mientras se agrega el BaCl_2 debe mantenerse la suspensión en agitación continua.
- (4) Debe verificarse la densidad correcta del estándar usando un espectrofotómetro con un paso de luz de 1 cm. El estándar 0.5 de Mc Farland debe presentar una absorbancia de 0.08 - 0.13 a 625 nm.
- (5) Luego se distribuyen 4 - 6 mL de la suspensión obtenida dentro de tubos similares a los que se van a usar para preparar los inóculos.
- (6) Los estándares deben mantenerse herméticamente cerrados a temperatura ambiente y al abrigo de la luz.
- (7) Antes de su uso, los estándares deben ser agitados vigorosamente en agitador mecánico (vortex) para lograr una turbidez homogénea.
- (8) Periódicamente debe verificarse el estado del estándar y de observarse partículas grandes reemplazarlo. Las suspensiones de partículas de látex deben ser mezcladas por inversión suave y no por agitación mecánica.
- (9) Los estándares de SO_4Ba deben ser verificados por medio de la medición de la densidad mensualmente.

VI.4. ANEXO D

VI.4.2. Técnicas

VI.4.2.1. Agotamiento por estrías (270, 276)

Método de siembra con medio de cultivo sólido contenido en una placa de Petri cuyo objetivo es obtener a partir de un elevado número de bacterias, un número reducido de ellas distribuidos individualmente sobre la superficie de la placa. Cada una de estas unidades formadoras de colonias (UFC) aisladas pertenecerá a una sola clase de microorganismos.

Procedimiento

Se procede a esterilizar el ansa y enfriarla en las proximidades del mechero. Se toma el inóculo y se transfiere a un área pequeña de la superficie de la placa próxima al borde. Luego, se extiende el inóculo sembrado formando estrías muy juntas sobre la superficie de una porción pequeña de la placa. Se flamea el ansa, se enfría y posteriormente, se roza una vez con el ansa las estrías sembradas la primera vez y se realiza la misma secuencia sobre una porción virgen de la placa, es decir, quedará una segunda tanda de estrías que no toque la primera. Se flamea y enfría nuevamente el ansa, se repite la operación descrita en el punto anterior pero rozando al empezar la segunda tanda de estrías. Para terminar, se flamea el ansa, se cierra la placa y se lleva a incubar (Figura VI.1.).

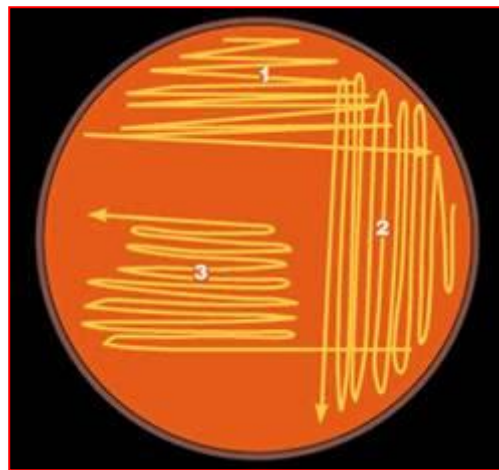


Figura VI.1. Esquema de la siembra en estrías en tres cuadrantes.

VI.4.2.2. Número más probable de coliformes (277)

Número más probable (NMP) es una técnica que permite realizar la estimación de la concentración de un determinado microorganismo en una muestra, en una batería seriada de diluciones. Es utilizado cuando se trata de bajas concentraciones de organismos, del orden de 100 UFC/g, especialmente utilizado en el análisis microbiológico de leche y agua. Únicamente los organismos vivos son factibles de ser evaluados por la técnica del NMP. El fundamento de este método es diluir la muestra estudiada a un grado tal que el inóculo presente que contenga células bacterianas viables, crezca solo en algunos de los tubos que conforman la batería. El número de tubos con crecimiento bacteriano a cada dilución, puede implicar una estimación del original, es decir, de la concentración bacteriana no diluida presente en la muestra.

Procedimiento

Ensayo presuntivo

Se preparan 3 series de 9 tubos conteniendo caldo Mac Conkey o Lauril Sulfato, provistos de campanitas de Durham en su interior. Los 3 primeros tubos de cada serie, contienen 10 mL de caldo *dobles concentración* en cada tubo y en los 6 restantes 10 mL de caldo *simple concentración*.

Se inoculan cada uno de los 3 primeros tubos de cada serie con 10 mL de muestra, los 3 tubos siguientes con 1 mL de la muestra y cada uno de los 3 últimos tubos con 0.1 mL de la muestra.

Se mezclan bien con agitador de tubos e incuban a 35-37 °C durante 48 horas. Al término de la incubación, los tubos positivos se usarán para el ensayo confirmatorio. En caldo de Mac Conkey los tubos positivos presentarán acidez (el medio vira al amarillo) y gas; en caldo Lauril Sulfato, turbidez y gas.

Ensayo confirmatorio

De cada uno de los tubos positivos se transfiere, con ansa de 3 mm, una gota a tubos de ensayo conteniendo 10 mL de Caldo Lactosa-Bilis 2%-Verde Brillante provistos de campanita de Durham.

Se incuban a 35-37 °C durante 24 horas. Serán positivos, aquellos tubos que presenten turbidez y contengan más de un tercio de la campanita de Durham con gas. Con el número clave que dan los tubos positivos consultar la tabla de NMP y expresar el resultado como NMP de coliformes totales por 100 mL.

Cultivo por enriquecimiento:

En un frasco de 500 mL de capacidad con 100 mL de caldo EC doble concentración (también puede emplearse caldo Mac Conkey o caldo lauril sulfato doble concentración), agregar 100 mL de la muestra medida con probeta estéril. Incubar a 35 °C durante 24 horas.

A partir del caldo EC se procede al aislamiento por agotamiento en superficie de una placa de Petri con Agar EMB. Incubar a 35 °C durante 24 horas. Al término de la incubación 5 colonias presuntivas de *E. coli* se confirman siguiendo la misma metodología indicada para el método de filtración.

VI.5. ANEXO E

VI.5.3.Tablas

VI.5.3.1. Concentración Inhibitoria Mínima

Tabla VI.1. Comparación de los resultados de la CIM de florfenicol obtenidos utilizando cada Mueller Hinton y Luria Bertani frente a las cepas de campo MDR-RF

NMP ($\mu\text{g/mL}$)	CIM de Florfenicol ($\mu\text{g/mL}$)					
	CEPA Ter1-TQ		CEPA Ter2-TQ		CEPA Ter3-TQ	
	Caldo MH	Caldo LB	Caldo MH	Caldo LB	Caldo MH	Caldo LB
0	8	8	8	8	8	8
6.25	8	8	8	8	8	8
12.5	8	8	4	4	4	8
25	4-8	8	2-4	2-4	4	8
50	1-2	1-2	1-2	1-2	1-2	2
100	1	1	0.5-1	0.5-1	0.5-1	0.5-1
800	400	800	800	800	400	800

Tabla VI.2. Comparación de los resultados de la CIM de florfenicol obtenidos utilizando caldo Mueller Hinton y Luria Bertani frente a las cepas de referencia

NMP ($\mu\text{g/mL}$)	CIM de Florfenicol ($\mu\text{g/mL}$)							
	AG100		AG100A		AG102		ATCC 25922	
	Caldo MH	Caldo LB	Caldo MH	Caldo LB	Caldo MH	Caldo LB	Caldo MH	Caldo LB
0	8	8	1	1	32	32	8	8
6.25	8	8	1	1	32	32	8	4
12.5	4	4	1	1	16	16	4	4
25	4	2	1	1	16	16	4	2
50	1	2	1	1	16	4	2	1
100	1	2	1	1	1	1	2	1
800	800	400	400	400	400	400	800	400

VI.5.3.2. Cálculo de la CIM₅₀ y la CIM₉₀ de ampicilina en la prueba de susceptibilidad cuantitativa

Tabla VI.3. Cepas de *E. coli* MDR-RA (n = 8) inhibidas por ampicilina con y sin NMP

Concentración AMP	Cepas <i>E. coli</i> MDR-RA inhibidas (N=8)				Concentración AMP+NMP (6.25 µg/mL)	Cepas <i>E. coli</i> MDR-RA inhibidas (N=8)				Concentración AMP+NMP (12.5 µg/mL)	Cepas <i>E. coli</i> MDR-RA inhibidas (N=8)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado		N°	%	N° Acumulado	% Acumulado		N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
16 µg/mL	0	0	0	0	16 µg/mL	0	0	0	0	16 µg/mL	0	0	0	0
32 µg/mL	0	0	0	0	32 µg/mL	0	0	0	0	32 µg/mL	0	0	0	0
64 µg/mL	0	0	0	0	64 µg/mL	0	0	0	0	64 µg/mL	0	0	0	0
128 µg/mL	0	0	0	0	128 µg/mL	0	0	0	0	128 µg/mL	0	0	0	0
256 µg/mL	0	0	0	0	256 µg/mL	0	0	0	0	256 µg/mL	0	0	0	0
>256 µg/mL	8	100	8	100	>256 µg/mL	8	100	8	100	>256 µg/mL	8	100	8	100

Concentración AMP+NMP (25 µg/mL)	Cepas <i>E. coli</i> MDR-RA inhibidas (N=8)				Concentración AMP+NMP (50 µg/mL)	Cepas <i>E. coli</i> MDR-RA inhibidas (N=8)				Concentración AMP+NMP (100 µg/mL)	Cepas <i>E. coli</i> MDR-RA inhibidas (N=8)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado		N°	%	N° Acumulado	% Acumulado		N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
16 µg/mL	0	0	0	0	16 µg/mL	0	0	0	0	16 µg/mL	0	0	0	20
32 µg/mL	0	0	0	0	32 µg/mL	0	0	0	0	32 µg/mL	0	0	0	20
64 µg/mL	0	0	0	0	64 µg/mL	0	0	0	0	64 µg/mL	0	0	0	20
128 µg/mL	0	0	0	0	128 µg/mL	0	0	0	0	128 µg/mL	0	0	0	20
256 µg/mL	0	0	0	0	256 µg/mL	0	0	0	0	256 µg/mL	0	0	0	20
>256 µg/mL	8	100	8	100	>256 µg/mL	8	100	8	100	>256 µg/mL	8	100	8	100

Tabla VI.4. Cepas de *E. coli* MDR-SA (n = 2) inhibidas por ampicilinacon y sin NMP

Concentración AMP	Cepas <i>E. coli</i> MDR-SA inhibidas (N=2)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
1 µg/mL	0	0	0	0
2 µg/mL	0	0	0	0
4 µg/mL	1	50	1	50
8 µg/mL	1	50	2	100

Concentración AMP+NMP (6.25 µg/mL)	Cepas <i>E. coli</i> MDR-SA inhibidas (N=2)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
1 µg/mL	0	0	0	0
2 µg/mL	0	0	0	0
4 µg/mL	1	50	1	50
8 µg/mL	1	50	2	100

Concentración AMP+NMP (12.5 µg/mL)	Cepas <i>E. coli</i> MDR-SA inhibidas (N=2)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
1 µg/mL	0	0	0	0
2 µg/mL	0	0	0	0
4 µg/mL	1	50	1	50
8 µg/mL	1	50	2	100

Concentración AMP+NMP (25 µg/mL)	Cepas <i>E. coli</i> MDR-SA inhibidas (N=2)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
1 µg/mL	0	0	0	0
2 µg/mL	0	0	0	0
4 µg/mL	2	100	2	100
8 µg/mL	0	0	2	100

Concentración AMP+NMP (50 µg/mL)	Cepas <i>E. coli</i> MDR-SA inhibidas (N=2)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
1 µg/mL	0	0	0	0
2 µg/mL	0	0	0	0
4 µg/mL	2	100	2	100
8 µg/mL	0	0	2	100

Concentración AMP+NMP (100 µg/mL)	Cepas <i>E. coli</i> MDR-SA inhibidas (N=2)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
1 µg/mL	0	0	0	0
2 µg/mL	0	0	0	0
4 µg/mL	2	100	2	100
8 µg/mL	0	0	2	100

VI.5.3.3. Cálculo de la CIM₅₀ y la CIM₉₀ de florfenicol en la prueba de susceptibilidad cuantitativa

Tabla VI.5. Cepas de *E. coli* MDR-RF (n = 5) inhibidas por florfenicol con y sin NMP

Concentración FLR	Cepas <i>E. coli</i> MDR-RF inhibidas (N=5)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
16 µg/mL	1	20	1	20
32 µg/mL	0	0	1	20
64 µg/mL	0	0	1	20
128 µg/mL	0	0	1	20
256 µg/mL	4	80	5	100

Concentración FLR+NMP (6.25 µg/mL)	Cepas <i>E. coli</i> MDR-RF inhibidas (N=5)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
16 µg/mL	1	20	1	20
32 µg/mL	0	0	1	20
64 µg/mL	0	0	1	20
128 µg/mL	1	20	2	40
256 µg/mL	3	60	5	100

Concentración FLR+NMP (12.5 µg/mL)	Cepas <i>E. coli</i> MDR-RF inhibidas (N=5)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
16 µg/mL	1	20	1	20
32 µg/mL	0	0	1	20
64 µg/mL	0	0	1	20
128 µg/mL	3	60	4	80
256 µg/mL	1	20	5	100

Concentración FLR+NMP (25 µg/mL)	Cepas <i>E. coli</i> MDR-RF inhibidas (N=5)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
8 µg/mL	1	20	1	20
16 µg/mL	0	0	0	0
32 µg/mL	0	0	1	20
64 µg/mL	0	0	1	20
128 µg/mL	3	60	4	80
256 µg/mL	1	20	5	100

Concentración FLR+NMP (50 µg/mL)	Cepas <i>E. coli</i> MDR-RF inhibidas (N=5)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
2 µg/mL	1	20	1	20
16 µg/mL	0	0	1	20
32 µg/mL	0	0	1	20
64 µg/mL	3	60	4	80
128 µg/mL	1	20	5	100
256 µg/mL	0	0	5	100

Concentración FLR+NMP (100 µg/mL)	Cepas <i>E. coli</i> MDR-RF inhibidas (N=5)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
1 µg/mL	1	20	1	20
16 µg/mL	0	0	1	20
32 µg/mL	0	0	1	20
64 µg/mL	3	60	4	80
128 µg/mL	1	20	5	100
256 µg/mL	0	0	5	100

Tabla VI.6. Cepas de *E. coli* MDR-SF (n = 5) inhibidas por florfenicol con y sin NMP

Concentración FLR	Cepas <i>E. coli</i> MDR-SF inhibidas (N=5)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
0.5 µg/mL	0	0	0	0
1 µg/mL	0	0	0	0
2 µg/mL	0	0	0	0
4 µg/mL	0	0	0	0
8 µg/mL	5	100	5	100

Concentración FLR+NMP (6.25 µg/mL)	Cepas <i>E. coli</i> MDR-SF inhibidas (N=5)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
0.5 µg/mL	0	0	0	0
1 µg/mL	0	0	0	0
2 µg/mL	0	0	0	0
4 µg/mL	0	0	0	0
8 µg/mL	5	100	5	100

Concentración FLR+NMP (12.5 µg/mL)	Cepas <i>E. coli</i> MDR-SF inhibidas (N=5)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
0.5 µg/mL	0	0	0	0
1 µg/mL	0	0	0	0
2 µg/mL	0	0	0	0
4 µg/mL	1	20	1	20
8 µg/mL	4	80	5	100

Concentración FLR+NMP (25 µg/mL)	Cepas <i>E. coli</i> MDR-SF inhibidas (N=5)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
0.5 µg/mL	0	0	0	0
1 µg/mL	0	0	0	0
2 µg/mL	0	0	0	0
4 µg/mL	4	80	4	80
8 µg/mL	1	20	5	100

Concentración FLR+NMP (50 µg/mL)	Cepas <i>E. coli</i> MDR-SF inhibidas (N=5)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
0.5 µg/mL	0	0	0	0
1 µg/mL	0	0	0	0
2 µg/mL	4	80	4	80
4 µg/mL	1	20	5	100
8 µg/mL	0	0	5	100

Concentración FLR+NMP (100 µg/mL)	Cepas <i>E. coli</i> MDR-SF inhibidas (N=5)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
0.5 µg/mL	0	0	0	0
1 µg/mL	4	80	4	80
2 µg/mL	1	20	5	100
4 µg/mL	0	0	5	100
8 µg/mL	0	0	5	100

VI.5.3.4. Cálculo de la CIM₅₀ y la CIM₉₀ de ciprofloxacina en la prueba de susceptibilidad cuantitativa

Tabla VI.7. Cepas de *E. coli* MDR-RC (n = 5) inhibidas por ciprofloxacina con y sin NMP

Concentración CIP	Cepas <i>E. coli</i> MDR-RC (N=5)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
2 µg/mL	0	0	0	0
4 µg/mL	0	0	0	0
8 µg/mL	0	0	0	0
16 µg/mL	0	0	0	0
32 µg/mL	1	20	1	20
64 µg/mL	0	0	1	20
128 µg/mL	4	80	5	100
256 µg/mL	0	0	5	100

Concentración CIP+NMP (6.25 µg/mL)	Cepas <i>E. coli</i> MDR-RC (N=5)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
2 µg/mL	0	0	0	0
4 µg/mL	0	0	0	0
8 µg/mL	0	0	0	0
16 µg/mL	0	0	0	0
32 µg/mL	1	20	1	20
64 µg/mL	0	0	1	20
128 µg/mL	4	80	5	100
256 µg/mL	0	0	5	100

Concentración CIP+NMP (12.5 µg/mL)	Cepas <i>E. coli</i> MDR-RC (N=5)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
2 µg/mL	0	0	0	0
4 µg/mL	0	0	0	0
8 µg/mL	0	0	0	0
16 µg/mL	0	0	0	0
32 µg/mL	1	20	1	20
64 µg/mL	0	0	1	20
128 µg/mL	4	80	5	100
256 µg/mL	0	0	5	100

Concentración CIP+NMP (25 µg/mL)	Cepas <i>E. coli</i> MDR-RC (N=5)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
2 µg/mL	0	0	0	0
4 µg/mL	0	0	0	0
8 µg/mL	0	0	0	0
16 µg/mL	1	20	1	20
32 µg/mL	0	0	1	20
64 µg/mL	4	80	5	100
128 µg/mL	0	0	5	100
256 µg/mL	0	0	5	100

Concentración CIP+NMP (50 µg/mL)	Cepas <i>E. coli</i> MDR-RC (N=5)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
2 µg/mL	0	0	0	0
4 µg/mL	0	0	0	0
8 µg/mL	1	20	1	20
16 µg/mL	0	0	1	20
32 µg/mL	0	0	1	20
64 µg/mL	4	80	5	100
128 µg/mL	0	0	5	100
256 µg/mL	0	0	5	100

Concentración CIP+NMP (100 µg/mL)	Cepas <i>E. coli</i> MDR-RC (N=5)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
2 µg/mL	0	0	0	0
4 µg/mL	0	0	0	0
8 µg/mL	1	20	1	20
16 µg/mL	0	0	1	20
32 µg/mL	4	80	5	100
64 µg/mL	0	0	5	100
128 µg/mL	0	0	5	100
256 µg/mL	0	0	5	100

Tabla VI.8. Cepas de *E. coli* MDR-SC (n = 5) inhibidas por ciprofloxacina con y sin NMP

Concentración CIP	Cepas <i>E. coli</i> MDR-SC (N=5)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
0.007813 µg/mL	1	20	1	20
0.015625 µg/mL	3	60	4	80
0.03125 µg/mL	1	20	5	100
0.0625 µg/mL	0	0	5	100
0.125 µg/mL	0	0	5	100
0.25 µg/mL	0	0	5	100
0.5 µg/mL	0	0	5	100
1 µg/mL	0	0	5	100

Concentración CIP+NMP (6.25 µg/mL)	Cepas <i>E. coli</i> MDR-SC (N=5)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
0.007813 µg/mL	1	20	1	20
0.015625 µg/mL	3	60	4	80
0.03125 µg/mL	1	20	5	100
0.0625 µg/mL	0	0	5	100
0.125 µg/mL	0	0	5	100
0.25 µg/mL	0	0	5	100
0.5 µg/mL	0	0	5	100
1 µg/mL	0	0	5	100

Concentración CIP+NMP (12.5 µg/mL)	Cepas <i>E. coli</i> MDR-SC (N=5)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
0.007813 µg/mL	1	20	1	20
0.015625 µg/mL	3	60	4	80
0.03125 µg/mL	1	20	5	100
0.0625 µg/mL	0	0	5	100
0.125 µg/mL	0	0	5	100
0.25 µg/mL	0	0	5	100
0.5 µg/mL	0	0	5	100
1 µg/mL	0	0	5	100

Concentración CIP+NMP (25 µg/mL)	Cepas <i>E. coli</i> MDR-SC (N=5)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
0.007813 µg/mL	2	40	2	40
0.015625 µg/mL	2	40	4	80
0.03125 µg/mL	1	20	5	100
0.0625 µg/mL	0	0	5	100
0.125 µg/mL	0	0	5	100
0.25 µg/mL	0	0	5	100
0.5 µg/mL	0	0	5	100
1 µg/mL	0	0	5	100

Concentración CIP+NMP (50 µg/mL)	Cepas <i>E. coli</i> MDR-SC (N=5)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
0.007813 µg/mL	3	60	3	60
0.015625 µg/mL	1	20	4	80
0.03125 µg/mL	1	20	5	100
0.0625 µg/mL	0	0	5	100
0.125 µg/mL	0	0	5	100
0.25 µg/mL	0	0	5	100
0.5 µg/mL	0	0	5	100
1 µg/mL	0	0	5	100

Concentración CIP+NMP (100 µg/mL)	Cepas <i>E. coli</i> MDR-SC (N=5)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
0.007813 µg/mL	4	80	4	80
0.015625 µg/mL	0	0	4	80
0.03125 µg/mL	1	20	5	100
0.0625 µg/mL	0	0	5	100
0.125 µg/mL	0	0	5	100
0.25 µg/mL	0	0	5	100
0.5 µg/mL	0	0	5	100
1 µg/mL	0	0	5	100

Tabla VI.8. Cepas de *E. coli* MDR-SC (n = 5) inhibidas por ciprofloxacina con y sin NMP

Concentración CIP	Cepas <i>E. coli</i> MDR-SC (N=5)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
0.007813 µg/mL	1	20	1	20
0.015625 µg/mL	3	60	4	80
0.03125 µg/mL	1	20	5	100
0.0625 µg/mL	0	0	5	100
0.125 µg/mL	0	0	5	100
0.25 µg/mL	0	0	5	100
0.5 µg/mL	0	0	5	100
1 µg/mL	0	0	5	100

Concentración CIP+NMP (6.25 µg/mL)	Cepas <i>E. coli</i> MDR-SC (N=5)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
0.007813 µg/mL	1	20	1	20
0.015625 µg/mL	3	60	4	80
0.03125 µg/mL	1	20	5	100
0.0625 µg/mL	0	0	5	100
0.125 µg/mL	0	0	5	100
0.25 µg/mL	0	0	5	100
0.5 µg/mL	0	0	5	100
1 µg/mL	0	0	5	100

Concentración CIP+NMP (12.5 µg/mL)	Cepas <i>E. coli</i> MDR-SC (N=5)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
0.007813 µg/mL	1	20	1	20
0.015625 µg/mL	3	60	4	80
0.03125 µg/mL	1	20	5	100
0.0625 µg/mL	0	0	5	100
0.125 µg/mL	0	0	5	100
0.25 µg/mL	0	0	5	100
0.5 µg/mL	0	0	5	100
1 µg/mL	0	0	5	100

Concentración CIP+NMP (25 µg/mL)	Cepas <i>E. coli</i> MDR-SC (N=5)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
0.007813 µg/mL	2	40	2	40
0.015625 µg/mL	2	40	4	80
0.03125 µg/mL	1	20	5	100
0.0625 µg/mL	0	0	5	100
0.125 µg/mL	0	0	5	100
0.25 µg/mL	0	0	5	100
0.5 µg/mL	0	0	5	100
1 µg/mL	0	0	5	100

Concentración CIP+NMP (50 µg/mL)	Cepas <i>E. coli</i> MDR-SC (N=5)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
0.007813 µg/mL	3	60	3	60
0.015625 µg/mL	1	20	4	80
0.03125 µg/mL	1	20	5	100
0.0625 µg/mL	0	0	5	100
0.125 µg/mL	0	0	5	100
0.25 µg/mL	0	0	5	100
0.5 µg/mL	0	0	5	100
1 µg/mL	0	0	5	100

Concentración CIP+NMP (100 µg/mL)	Cepas <i>E. coli</i> MDR-SC (N=5)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
0.007813 µg/mL	4	80	4	80
0.015625 µg/mL	0	0	4	80
0.03125 µg/mL	1	20	5	100
0.0625 µg/mL	0	0	5	100
0.125 µg/mL	0	0	5	100
0.25 µg/mL	0	0	5	100
0.5 µg/mL	0	0	5	100
1 µg/mL	0	0	5	100

VI.5.3.5. Cálculo de la CIM₅₀ y la CIM₉₀ de tetraciclina en la prueba de susceptibilidad cuantitativa

Tabla VI.9. Cepas de *E. coli* MDR-RT (n = 10) inhibidas por tetraciclina con y sin NMP

Concentración TET	Cepas <i>E. coli</i> aisladas inhibidas (N=10)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
1 µg/mL	0	0	0	0
2 µg/mL	0	0	0	0
4 µg/mL	0	0	0	0
8 µg/mL	0	0	0	0
16 µg/mL	0	0	0	0
32 µg/mL	0	0	0	0
64 µg/mL	2	20	2	20
128 µg/mL	1	10	3	30
256 µg/mL	7	70	10	100

Concentración TET+NMP (6.25 µg/mL)	Cepas <i>E. coli</i> aisladas inhibidas(N=10)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
1 µg/mL	0	0	0	0
2 µg/mL	0	0	0	0
4 µg/mL	0	0	0	0
8 µg/mL	0	0	0	0
16 µg/mL	0	0	0	0
32 µg/mL	0	0	0	0
64 µg/mL	2	20	2	20
128 µg/mL	2	20	4	40
256 µg/mL	6	60	10	100

Concentración TET+NMP (12.5 µg/mL)	Cepas <i>E. coli</i> aisladas inhibidas (N=10)			
	N°	%	N° Acumulado	%Acumulado
1 µg/mL	0	0	0	0
2 µg/mL	0	0	0	0
4 µg/mL	0	0	0	0
8 µg/mL	0	0	0	0
16 µg/mL	0	0	0	0
32 µg/mL	0	0	0	0
64 µg/mL	2	20	2	20
128 µg/mL	4	40	6	60
256 µg/mL	4	40	10	100

Concentración TET+NMP (25 µg/mL)	Cepas <i>E. coli</i> aisladas inhibidas (N=10)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
1 µg/mL	0	0	0	0
2 µg/mL	0	0	0	0
4 µg/mL	0	0	0	0
8 µg/mL	0	0	0	0
16 µg/mL	0	0	0	0
32 µg/mL	2	20	2	20
64 µg/mL	1	10	3	30
128 µg/mL	6	60	9	90
256 µg/mL	1	10	10	100

Concentración TET+NMP (50 µg/mL)	Cepas <i>E. coli</i> aisladas inhibidas (N=10)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
1 µg/mL	0	0	0	0
2 µg/mL	0	0	0	0
4 µg/mL	0	0	0	0
8 µg/mL	0	0	0	0
16 µg/mL	2	20	2	20
32 µg/mL	0	0	2	20
64 µg/mL	4	40	6	60
128 µg/mL	4	40	10	100
256 µg/mL	0	0	10	100

Concentración TET+NMP (100 µg/mL)	Cepas <i>E. coli</i> aisladas inhibidas (N=10)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
1 µg/mL	0	0	0	0
2 µg/mL	0	0	0	0
4 µg/mL	0	0	0	0
8 µg/mL	0	0	0	0
16 µg/mL	2	20	2	20
32 µg/mL	2	20	4	40
64 µg/mL	6	60	10	100
128 µg/mL	0	0	10	100
256 µg/mL	0	0	10	100

VI.5.3.6. Cálculo de la CIM₅₀ y la CIM₉₀ de trimetoprima-sulfometoxazol en la prueba de susceptibilidad cuantitativa

Tabla VI.10. Cepas de *E. coli* MDR –RTMS (n = 5) inhibidas por trimetoprima-sulfometoxazol con y sin NMP

Concentración TMS	Cepas <i>E. coli</i> MDR-RCTMS (N=5)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
80 µg/mL (4/76)	0	0	0	0
160 µg/mL (8/152)	0	0	0	0
320 µg/mL (16/304)	0	0	0	0
640 µg/mL (32/608)	0	0	0	0
1280 µg/mL(> 64/1216)	0	0	5	100

Concentración TMS+NMP (6.25 µg/mL)	Cepas <i>E. coli</i> MDR- RCTMS (N=5)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
80 µg/mL (4/76)	0	0	0	0
160 µg/mL (8/152)	0	0	0	0
320 µg/mL (16/304)	0	0	0	0
640 µg/mL (32/608)	0	0	0	0
1280 µg/mL(> 64/1216)	5	50	5	100

Concentración TMS + NMP (12.5 µg/mL)	Cepas <i>E. coli</i> MDR- RCTMS (N=5)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
80 µg/mL (4/76)	0	0	0	0
160 µg/mL (8/152)	0	0	0	0
320 µg/mL (16/304)	0	0	0	0
640 µg/mL (32/608)	0	0	0	0
1280 µg/mL(> 64/1216)	0	0	5	100

Concentración TMS+NMP (25 µg/mL)	Cepas <i>E. coli</i> MDR- RCTMS (N=5)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
80 µg/mL (4/76)	0	0	0	0
160 µg/mL (8/152)	0	0	0	0
320 µg/mL (16/304)	0	0	0	0
640 µg/mL (32/608)	0	0	0	0
1280 µg/mL(> 64/1216)	5	50	5	100

Concentración TMS + NMP (50 µg/mL)	Cepas <i>E. coli</i> MDR- RCTMS (N=5)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
80 µg/mL (4/76)	0	0	0	0
160 µg/mL (8/152)	0	0	0	0
320 µg/mL (16/304)	0	0	0	0
640 µg/mL (32/608)	0	0	0	0
1280 µg/mL(> 64/1216)	0	0	5	100

Concentración TMS+NMP (100 µg/mL)	Cepas <i>E. coli</i> MDR- RCTMS (N=5)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
80 µg/mL (4/76)	0	0	0	0
160 µg/mL (8/152)	0	0	0	0
320 µg/mL (16/304)	0	0	0	0
640 µg/mL (32/608)	0	0	0	0
1280 µg/mL(> 64/1216)	5	50	5	100

Tabla VI.11. Cepas de *E. coli* MDR –STMS (n = 5) inhibidas por trimetoprima-sulfometoxazol con y sin NMP

Concentración TMS	Cepas <i>E. coli</i> MDR-SCTMS (N=5)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
1.25 µg/mL (<0.125/2.37)	0	0	0	0
2.5 µg/mL (0.125/2.37)	0	0	0	0
5 µg/mL (0.25/4.75)	0	0	0	0
10 µg/mL (0.5/9.5)	5	50	5	100
20 µg/mL (1/19)	0	0	5	100
40 µg/mL(2/38)	0	0	5	100

Concentración TMS + NMP (12.5 µg/mL)	Cepas <i>E. coli</i> MDR- SCTMS (N=5)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
1.25 µg/mL (<0.125/2.37)	0	0	0	0
2.5 µg/mL (0.125/2.37)	0	0	0	0
5 µg/mL (0.25/4.75)	0	0	0	0
10 µg/mL (0.5/9.5)	5	50	5	100
20 µg/mL (1/19)	0	0	5	100
40 µg/mL(2/38)	0	0	5	100

Concentración TMS + NMP (50 µg/mL)	Cepas <i>E. coli</i> MDR- SCTMS (N=5)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
1.25 µg/mL (<0.125/2.37)	4	40	4	80
2.5 µg/mL (0.125/2.37)	0	0	4	80
5 µg/mL (0.25/4.75)	1	10	5	100
10 µg/mL (0.5/9.5)	0	0	5	100
20 µg/mL (1/19)	0	0	5	100
40 µg/mL(2/38)	0	0	5	100

Concentración TMS+ NMP (6.25 µg/mL)	Cepas <i>E. coli</i> MDR- SCTMS (N=5)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
1.25 µg/mL (<0.125/2.37)	0	0	0	0
2.5 µg/mL (0.125/2.37)	0	0	0	0
5 µg/mL (0.25/4.75)	0	0	0	0
10 µg/mL (0.5/9.5)	5	50	5	100
20 µg/mL (1/19)	0	0	5	100
40 µg/mL(2/38)	0	0	5	100

Concentración TMS+ NMP (25 µg/mL)	Cepas <i>E. coli</i> MDR- SCTMS (N=5)			
	N°	%	N° Acumulado	%Acumulado
1.25 µg/mL (<0.125/2.37)	0	0	0	0
2.5 µg/mL (0.125/2.37)	0	0	0	0
5 µg/mL (0.25/4.75)	4	40	4	80
10 µg/mL (0.5/9.5)	1	10	5	100
20 µg/mL (1/19)	0	0	5	100
40 µg/mL(2/38)	0	0	5	100

Concentración TMS+ NMP (100 µg/mL)	Cepas <i>E. coli</i> MDR- SCTMS (N=5)			
	N°	%	N° Acumulado	% Acumulado
1.25 µg/mL (<0.125/2.37)	5	50	5	100
2.5 µg/mL (0.125/2.37)	0	0	5	100
5 µg/mL (0.25/4.75)	0	0	5	100
10 µg/mL (0.5/9.5)	0	0	5	100
20 µg/mL (1/19)	0	0	5	100
40 µg/mL(2/38)	0	0	5	100

VI.5.3.7. Curvas de letalidad

VI.5.3.7.1. Florfenicol

Cepa control AG112

Tabla VI.12. Letalidad de la cepa control AG112 expresada en Log UFC/mL, frente a florfenicol, a las concentraciones de la CIM, 2, 4, y 8 veces la CIM, A) sin NMP; B) con 50 µg/mL de NMP y C) con 100 µg/mL de NMP

A	LOG₁₀ UFC/mL				
HORA	8XCIM (256 µg/mL)	4XCIM (128 µg/mL)	2XCIM (64 µg/mL)	CIM (32 µg/mL)	CONTROL
0	5.05	5.25	4.93	5.07	5.34
2	4.94	4.99	5.07	5.55	6.14
4	4.93	4.93	4.78	4.88	7.65
8	4.72	4.71	4.94	4.99	10.36
24	3.74	3.85	4.90	5.30	11.98
48	1.00	3.24	3.75	3.18	12.39

B	LOG₁₀ UFC/mL				
HORA	8XCIM (64 µg/mL)	4XCIM (32 µg/mL)	2XCIM (16 µg/mL)	CIM (8 µg/mL)	CONTROL
0	4.81	5.04	5.20	5.16	5.34
2	5.01	5.16	5.03	5.09	6.14
4	4.81	4.87	5.00	4.92	7.65
8	4.69	4.72	4.85	4.93	10.36
24	3.40	3.74	4.48	5.30	11.98
48	1.00	2.60	3.24	4.15	12.39

C	LOG₁₀ UFC/mL				
HORA	8XCIM (16 µg/mL)	4XCIM (8 µg/mL)	2XCIM (4 µg/mL)	CIM (2 µg/mL)	CONTROL
0	4.65	5.02	4.63	5.17	5.34
2	5.08	5.07	5.20	4.95	6.14
4	5.04	4.61	5.01	5.04	7.65
8	4.92	4.93	5.11	4.99	10.36
24	3.70	4.52	5.01	5.18	11.98
48	1.00	3.66	4.14	4.08	12.39

Tabla VI.13. Efecto del uso de NMP a 50 µg/mL y 100 µg/mL en la CLB de la cepa AG112 cuando la concentración de florfenicol es igual a: A) CIM; B) 2 x CIM; C) 4 x CIM y D) 8 x CIM

A	LOG ₁₀ UFC/mL			
	FLR s/ NMP CIM (32 µg/mL)	FLR c/50 NMP CIM (8 µg/mL)	FLR c/100 NMP CIM (2 µg/mL)	CONTROL
0	5.07	5.16	5.17	5.34
2	5.55	5.09	4.95	6.14
4	4.88	4.92	5.04	7.65
8	4.99	4.93	4.99	10.36
24	5.30	5.30	5.18	11.98
48	3.18	4.15	4.08	12.39

B	LOG ₁₀ UFC/mL			
	FLR s/ NMP 2XCIM (64 µg/mL)	FLR c/50 NMP 2XCIM (16 µg/mL)	FLR c/100 NMP 2XCIM (4 µg/mL)	CONTROL
0	4.93	5.20	4.63	5.34
2	5.07	5.03	5.20	6.14
4	4.78	5.00	5.01	7.65
8	4.94	4.85	5.11	10.36
24	4.90	4.48	5.01	11.98
48	3.75	3.24	4.14	12.39

C	LOG ₁₀ UFC/mL			
	FLR s/ NMP 4XCIM (128 µg/mL)	FLR c/50 NMP 4XCIM (32 µg/mL)	FLR c/100 NMP 4XCIM (8 µg/mL)	CONTROL
0	5.25	5.04	5.02	5.34
2	4.99	5.16	5.07	6.14
4	4.93	4.87	4.61	7.65
8	4.71	4.72	4.93	10.36
24	3.85	3.74	4.52	11.98
48	3.24	2.60	3.66	12.39

D	LOG ₁₀ UFC/mL			
	FLR s/ NMP 8XCIM (256 µg/mL)	FLR c/50 NMP 8XCIM (64 µg/mL)	FLR c/100 NMP 8XCIM (16 µg/mL)	CONTROL
0	5.05	4.81	4.65	5.34
2	4.94	5.01	5.08	6.14
4	4.93	4.81	5.04	7.65
8	4.72	4.69	4.92	10.36
24	3.74	3.40	3.70	11.98
48	1.00	1.00	1.00	12.39

Cepa AG100**Tabla VI.14.** Letalidad de la cepa control AG100 frente a florfenicol a las concentraciones de la CIM, 2, 4, y 8 veces la CIM sin NMP

HORA	LOG ₁₀ UFC/mL				CONTROL
	8XCIM (64 µg/mL)	4XCIM (32 µg/mL)	2XCIM (16 µg/mL)	CIM (8 µg/mL)	
0	4.93	5.06	4.73	4.94	5.39
2	4.02	4.01	3.82	4.05	5.44
4	4.11	4.20	4.31	4.51	7.66
8	4.29	4.32	4.40	4.25	9.80
24	3.77	4.11	4.23	4.70	9.32
48	3.23	3.75	4.01	4.26	10.27

Cepa Vo1-SV**Tabla VI.15.** Letalidad de la cepa Vo1-SV en Log UFC/mL, frente a florfenicol, a las concentraciones de la CIM, 2, 4, y 8 veces la CIM; A) sin NMP; B) con 50 µg/mL de NMP y C) con 100 µg/mL de NMP

A	LOG₁₀ UFC/mL				
HORA	8XCIM (2048 µg/mL)	4XCIM (1024 µg/mL)	2XCIM (512 µg/mL)	CIM (256 µg/mL)	CONTROL
0	4.34	5.33	5.32	5.31	5.45
2	5.40	4.99	5.20	5.34	7.09
4	1.00	4.58	5.30	4.65	11.18
8	1.00	1.00	5.01	5.08	12.51
24	1.00	1.00	4.63	7.19	12.98
48	1.00	1.00	1.00	3.28	9.34

B	LOG₁₀ UFC/mL				
HORA	8XCIM (512 µg/mL)	4XCIM (256 µg/mL)	2XCIM (128 µg/mL)	CIM (64 µg/mL)	CONTROL
0	4.94	5.28	5.04	5.02	5.39
2	5.14	5.19	5.08	4.89	5.44
4	5.49	5.23	4.91	4.91	7.66
8	4.90	4.97	4.66	5.15	9.80
24	3.83	4.20	3.75	5.66	9.32
48	1.00	1.00	1.00	4.59	10.27

C	LOG₁₀ UFC/mL				
HORA	8XCIM (512 µg/mL)	4XCIM (256 µg/mL)	2XCIM (128 µg/mL)	CIM (64 µg/mL)	CONTROL
0	5.06	5.12	5.07	5.01	5.39
2	5.86	5.25	5.33	5.58	5.44
4	4.98	4.97	4.70	4.40	7.66
8	5.02	5.00	4.99	4.99	9.80
24	3.28	3.93	4.10	4.19	9.32
48	1.00	1.00	1.00	4.71	10.27

Tabla VI.16. Comparación del efecto del uso de NMP a 50 µg/mL y 100 µg/mL en la CLB de la cepa Vo1-SV cuando la concentración de florfenicol es igual a: A) la CIM; B) 2 x CIM; C) 4 x CIM y D) 8 x CIM

A		LOG₁₀ UFC/mL		
HORA	FLR s/ NMP	FLR c/50 NMP	FLR c/100 NMP	CONTROL
	CIM (256 µg/mL)	CIM (64 µg/mL)	CIM (64 µg/mL)	
0	5.31	5.02	5.01	5.45
2	5.34	4.89	5.58	7.09
4	4.65	4.91	4.40	11.18
8	5.08	5.15	4.99	12.51
24	7.19	5.66	4.19	12.98
48	3.28	4.59	4.71	9.34

B		LOG₁₀ UFC/mL		
HORA	FLR s/ NMP	FLR c/50 NMP	FLR c/100 NMP	CONTROL
	2XCIM (512 µg/mL)	2XCIM (128 µg/mL)	2XCIM (128 µg/mL)	
0	5.32	5.32	5.07	5.45
2	5.20	5.20	5.33	7.09
4	5.30	5.30	4.70	11.18
8	5.01	5.01	4.99	12.51
24	4.63	4.63	4.10	12.98
48	1.00	1.00	1.00	9.34

C		LOG₁₀ UFC/mL		
HORA	FLR s/ NMP	FLR c/50 NMP	FLR c/100 NMP	CONTROL
	4XCIM (1024 µg/mL)	4XCIM (256 µg/mL)	4XCIM (256 µg/mL)	
0	5.33	5.28	5.12	5.45
2	4.99	5.19	5.25	7.09
4	4.58	5.23	4.97	11.18
8	1.00	4.97	5.00	12.51
24	1.00	4.20	3.93	12.98
48	1.00	1.00	1.00	9.34

D		LOG₁₀ UFC/mL		
HORA	FLR s/ NMP	FLR c/50 NMP	FLR c/100 NMP	CONTROL
	8XCIM (2048 µg/mL)	8XCIM (512 µg/mL)	8XCIM (512 µg/mL)	
0	4.34	4.94	5.06	5.45
2	5.40	5.14	5.86	7.09
4	1.00	5.49	4.98	11.18
8	1.00	4.90	5.02	12.51
24	1.00	3.83	3.28	12.98
48	1.00	1.00	1.00	9.34

Cepa Vo2-TQ

Tabla VI.17. Letalidad de la cepa Vo2-TQ en Log UFC/mL, frente a florfenicol, a las concentraciones de la CIM, 2, 4, y 8 veces la CIM; A) sin NMP; B) con 50 µg/mL de NMP y C) con 100 µg/mL de NMP

A	LOG₁₀ UFC/mL				
HORA	8XCIM (2048 µg/mL)	4XCIM (1024 µg/mL)	2XCIM (512 µg/mL)	CIM (256 µg/mL)	CONTROL
0	2.78	5.18	5.29	5.23	5.24
2	1.00	5.60	5.07	4.75	6.93
4	1.00	4.58	4.58	3.30	11.18
8	1.00	1.00	2.48	2.70	11.42
24	1.00	1.00	1.00	2.00	9.04
48	1.00	1.00	1.00	1.00	9.38

B	LOG₁₀ UFC/mL				
HORA	8XCIM (512 µg/mL)	4XCIM (256 µg/mL)	2XCIM (128 µg/mL)	CIM (64 µg/mL)	CONTROL
0	4.84	4.82	5.18	4.94	5.29
2	3.63	3.62	3.73	3.90	7.77
4	3.20	3.10	3.34	3.99	9.29
8	2.60	2.00	3.27	3.87	9.72
24	1.00	1.00	1.00	1.00	11.86
48	1.00	1.00	1.00	1.00	13.69

C	LOG₁₀ UFC/mL				
HORA	8XCIM (512 µg/mL)	4XCIM (256 µg/mL)	2XCIM (128 µg/mL)	CIM (64 µg/mL)	CONTROL
0	5.01	5.04	5.01	4.97	5.29
2	3.88	3.48	4.32	4.06	7.77
4	2.90	3.30	3.04	4.18	9.29
8	2.30	2.74	2.90	3.27	9.72
24	1.00	1.00	1.00	1.00	11.86
48	1.00	1.00	1.00	1.00	13.69

Tabla VI.18. Comparación del efecto del uso de NMP a 50 µg/mL y 10µg/mL en la CLB de la cepa Vo2-TQ cuando la concentración de florfenicol es igual a: A) la CIM; B) 2 x CIM; C) 4 x CIM y D) 8 x CIM

A	LOG ₁₀ UFC/mL			
	FLR s/ NMP CIM (256 µg/mL)	FLR c/50 NMP CIM (64 µg/mL)	FLR c/100 NMP CIM (64 µg/mL)	CONTROL
0	5.23	4.94	4.97	5.29
2	4.75	3.90	4.06	7.77
4	3.30	3.99	4.18	9.29
8	2.70	3.87	3.27	9.72
24	2.00	1.00	1.00	11.86
48	1.00	1.00	1.00	13.69

B	LOG ₁₀ UFC/mL			
	FLR s/ NMP 2XCIM (512 µg/mL)	FLR c/50 NMP 2XCIM (128 µg/mL)	FLR c/100 NMP 2XCIM (128 µg/mL)	CONTROL
0	5.29	5.18	5.01	5.29
2	5.07	3.73	4.32	7.77
4	4.58	3.34	3.04	9.29
8	2.48	3.27	2.90	9.72
24	1.00	1.00	1.00	11.86
48	1.00	1.00	1.00	13.69

C	LOG ₁₀ UFC/mL			
	FLR s/ NMP 4XCIM (1024 µg/mL)	FLR c/50 NMP 4XCIM (256 µg/mL)	FLR c/100 NMP 4XCIM (256 µg/mL)	CONTROL
0	5.18	4.82	5.04	5.29
2	5.60	3.62	3.48	7.77
4	4.58	3.10	3.30	9.29
8	1.00	2.00	2.74	9.72
24	1.00	1.00	1.00	11.86
48	1.00	1.00	1.00	13.69

D	LOG ₁₀ UFC/mL			
	FLR s/ NMP 8XCIM (2048 µg/mL)	FLR c/50 NMP 8XCIM (512 µg/mL)	FLR c/100 NMP 8XCIM (512 µg/mL)	CONTROL
0	2.78	4.84	5.01	5.29
2	1.00	3.63	3.88	7.77
4	1.00	3.20	2.90	9.29
8	1.00	2.60	2.30	9.72
24	1.00	1.00	1.00	11.86
48	1.00	1.00	1.00	13.69

VI.5.3.7.2. Ciprofloxacina

*Cepa control AG112***Tabla VI.19.** Letalidad de la cepa AG112 en Log UFC/mL, frente a ciprofloxacina, a las concentraciones de la CIM, 2, 4, y 8 veces la CIM, A) sin NMP; B) con 50 µg/mL de NMP y C) con 100 µg/mL de NMP

A	LOG₁₀ UFC/mL				
HORA	8XCIM (0.50 µg/mL)	4XCIM (0.25 µg/mL)	2XCIM (0.12 µg/mL)	CIM (0.06 µg/mL)	CONTROL
0	4.78	4.88	4.82	4.74	5.02
2	1.00	1.00	3.00	3.74	5.06
4	1.00	1.00	2.00	2.60	6.89
8	1.00	1.00	1.00	2.00	13.27
24	1.00	1.00	1.00	3.85	13.50
48	1.00	1.00	1.00	5.05	12.08

B	LOG₁₀ UFC/mL				
HORA	8XCIM (0.25 µg/mL)	4XCIM (0.12 µg/mL)	2XCIM (0.06 µg/mL)	CIM (0.03 µg/mL)	CONTROL
0	4.42	4.69	4.97	5.04	5.02
2	1.00	2.30	3.34	4.46	5.06
4	1.00	1.00	1.00	3.97	6.89
8	1.00	1.00	2.00	3.74	13.27
24	1.00	1.00	3.32	7.45	13.50
48	1.00	1.00	6.61	8.11	12.08

C	LOG₁₀ UFC/mL				
HORA	8XCIM (0.12 µg/mL)	4XCIM (0.06 µg/mL)	2XCIM (0.03 µg/mL)	CIM (0.01 µg/mL)	CONTROL
0	4.46	4.80	4.75	4.90	5.02
2	1.00	2.30	3.34	3.85	5.06
4	1.00	1.00	1.00	2.30	6.89
8	1.00	1.00	1.00	1.00	13.27
24	1.00	1.00	1.00	1.00	13.50
48	1.00	1.00	1.00	1.00	12.08

Tabla VI.20. Comparación del efecto del uso de NMP a 50 µg/mL y 100 µg/mL en la CLB de la cepa AG112 cuando la concentración de ciprofloxacina es igual a: A) la CIM; B) 2 x CIM; C) 4 x CIM y D) 8 x CIM

A	LOG ₁₀ UFC/mL			
	CIP s/ NMP	CIP c/50 NMP	CIP c/100 NMP	CONTROL
HORA	CIM (0.06 µg/mL)	CIM (0.03 µg/mL)	CIM (0.01 µg/mL)	
0	4.74	5.04	4.90	5.02
2	3.74	4.46	3.85	5.06
4	2.60	3.97	2.30	6.89
8	2.00	3.74	1.00	13.27
24	3.85	7.45	1.00	13.50
48	5.05	8.11	1.00	12.08

B	LOG ₁₀ UFC/mL			
	CIP s/ NMP	CIP c/50 NMP	CIP c/100 NMP	CONTROL
HORA	2XCIM (0.12 µg/mL)	2XCIM (0.06 µg/mL)	2XCIM (0.03 µg/mL)	
0	4.82	4.97	4.75	5.02
2	3.00	3.34	3.34	5.06
4	2.00	1.00	1.00	6.89
8	1.00	2.00	1.00	13.27
24	1.00	3.32	1.00	13.50
48	1.00	6.61	1.00	12.08

C	LOG ₁₀ UFC/mL			
	CIP s/ NMP	CIP c/50 NMP	CIP c/100 NMP	CONTROL
HORA	4XCIM (0.25 µg/mL)	4XCIM (0.12 µg/mL)	4XCIM (0.06 µg/mL)	
0	4.88	4.69	4.80	5.02
2	1.00	2.30	2.30	5.06
4	1.00	1.00	1.00	6.89
8	1.00	1.00	1.00	13.27
24	1.00	1.00	1.00	13.50
48	1.00	1.00	1.00	12.08

D	LOG ₁₀ UFC/mL			
	CIP s/ NMP	CIP c/50 NMP	CIP c/100 NMP	CONTROL
HORA	8XCIM (0.50 µg/mL)	8XCIM (0.25 µg/mL)	8XCIM (0.12 µg/mL)	
0	4.78	4.42	4.46	5.02
2	1.00	1.00	1.00	5.06
4	1.00	1.00	1.00	6.89
8	1.00	1.00	1.00	13.27
24	1.00	1.00	1.00	13.50
48	1.00	1.00	1.00	12.08

Cepa AG100**Tabla VI.21.** Letalidad de la cepa control AG100 frente a ciprofloxacina a las concentraciones de la CIM, 2, 4, y 8 veces la CIM sin NMP

HORA	LOG ₁₀ UFC/mL				CONTROL
	8XCIM (0.12 µg/mL)	4XCIM (0.06 µg/mL)	2XCIM (0.03 µg/mL)	CIM (0.01 µg/mL)	
0	4.09	4.98	5.14	5.19	5.39
2	1.00	1.00	3.26	4.50	5.44
4	1.00	1.00	3.93	4.91	7.66
8	1.00	1.00	3.92	7.61	9.80
24	1.00	1.00	7.93	8.05	9.32
48	1.00	1.00	7.97	7.90	10.13

Cepa Ter1-TQ

Tabla VI.22. Letalidad de la cepa Ter1-TQ en Log UFC/mL, frente a ciprofloxacina, a las concentraciones de la CIM, 2, 4, y 8 veces la CIM, A) sin NMP; B) con 50 µg/mL de NMP y C) con 100 µg/mL de NMP

A	LOG₁₀ UFC/mL				
HORA	8XCIM (1024 µg/mL)	4XCIM (512 µg/mL)	2XCIM (256 µg/mL)	CIM (128 µg/mL)	CONTROL
0	5.34	5.36	5.17	5.26	5.18
2	4.57	4.49	4.01	3.82	6.73
4	3.69	3.62	4.21	1.00	9.10
8	2.93	2.30	2.48	3.36	10.91
24	1.00	1.00	5.10	10.14	13.99
48	1.00	1.00	6.48	7.75	11.19

B	LOG₁₀ UFC/mL				
HORA	8XCIM (512 µg/mL)	4XCIM (256 µg/mL)	2XCIM (128 µg/mL)	CIM (64 µg/mL)	CONTROL
0	5.32	5.28	5.28	5.23	5.18
2	4.52	4.40	4.16	4.53	6.71
4	3.98	3.37	3.04	3.96	9.52
8	3.28	3.36	2.74	3.19	11.06
24	1.00	1.00	2.30	5.34	11.98
48	1.00	1.00	4.64	8.49	9.69

C	LOG₁₀ UFC/mL				
HORA	8XCIM (256 µg/mL)	4XCIM (128 µg/mL)	2XCIM (64 µg/mL)	CIM (32 µg/mL)	CONTROL
0	5.21	5.26	5.28	5.20	5.18
2	4.56	4.24	5.07	4.97	6.71
4	3.76	3.23	3.3	5.25	9.52
8	3.00	2.48	2.6	6.73	11.06
24	1.00	1.00	4.68	7.64	11.98
48	1.00	1.00	6.98	7.64	9.69

Tabla VI.23. Comparación del efecto del uso de NMP a 50 µg/mL y 100 µg/mL en la CLB de la cepa Ter1-TQ cuando la concentración de ciprofloxacina es igual a: A) la CIM; B) 2 x CIM; C) 4 x CIM y D) 8 x CIM

A	LOG ₁₀ UFC/mL			
	CIP s/ NMP CIM (128 µg/mL)	CIP c/50 NMP CIM (64 µg/mL)	CIP c/100 NMP CIM (32 µg/mL)	CONTROL
0	5.26	5.23	5.20	5.18
2	3.82	4.53	4.97	6.71
4	1.00	3.96	5.25	9.52
8	3.36	3.19	6.73	11.06
24	10.14	5.34	7.64	11.98
48	7.75	8.49	7.64	9.69

B	LOG ₁₀ UFC/mL			
	CIP s/ NMP 2XCIM (256 µg/mL)	CIP c/50 NMP 2XCIM (128 µg/mL)	CIP c/100 NMP 2XCIM (64 µg/mL)	CONTROL
0	5.17	5.28	5.28	5.18
2	4.01	4.16	5.07	6.71
4	4.21	3.04	3.30	9.52
8	2.48	2.74	2.60	11.06
24	5.10	2.30	4.68	11.98
48	6.48	4.64	6.98	9.69

C	LOG ₁₀ UFC/mL			
	CIP s/ NMP 4XCIM (512 µg/mL)	CIP c/50 NMP 4XCIM (256 µg/mL)	CIP c/100 NMP 4XCIM (128 µg/mL)	CONTROL
0	5.36	5.28	5.26	5.18
2	4.49	4.40	4.24	6.71
4	3.62	3.37	3.23	9.52
8	2.30	3.36	2.48	11.06
24	1.00	1.00	1.00	11.98
48	1.00	1.00	1.00	9.69

D	LOG ₁₀ UFC/mL			
	CIP s/ NMP 8XCIM (1024 µg/mL)	CIP c/50 NMP 8XCIM (512 µg/mL)	CIP c/100 NMP 8XCIM (256 µg/mL)	CONTROL
0	5.34	5.32	5.21	5.18
2	4.57	4.52	4.56	6.71
4	3.69	3.98	3.76	9.52
8	2.93	3.28	3.00	11.06
24	1.00	1.00	1.00	11.98
48	1.00	1.00	1.00	9.69

Cepa Ter2-TQ

Tabla VI.24. Letalidad de la cepa Ter1-TQ en Log UFC/mL, frente a ciprofloxacina, a las concentraciones de la CIM, 2, 4, y 8 veces la CIM, A) sin NMP; B) con 50 µg/mL de NMP y C) con 100 µg/mL de NMP

A	LOG₁₀ UFC/mL				
HORA	8XCIM (1024 µg/mL)	4XCIM (512 µg/mL)	2XCIM (256 µg/mL)	CIM (128 µg/mL)	CONTROL
0	4.98	5.04	5.05	5.21	5.21
2	4.02	4.28	4.11	3.94	6.85
4	3.88	3.63	3.60	1.00	9.16
8	2.95	2.85	2.74	3.65	11.94
24	1.00	1.00	2.00	8.59	13.90
48	1.00	1.00	1.00	7.48	10.77

B	LOG₁₀ UFC/mL				
HORA	8XCIM (512 µg/mL)	4XCIM (256 µg/mL)	2XCIM (128 µg/mL)	CIM (64 µg/mL)	CONTROL
0	5.20	5.25	5.26	5.14	5.21
2	4.46	4.26	4.14	3.94	6.85
4	3.81	3.30	3.22	2.48	9.16
8	2.85	2.90	1.00	2.00	11.94
24	1.00	1.00	3.49	4.89	13.90
48	1.00	1.00	5.32	8.00	10.77

C	LOG₁₀ UFC/mL				
HORA	8XCIM (256 µg/mL)	4XCIM (128 µg/mL)	2XCIM (64 µg/mL)	CIM (32 µg/mL)	CONTROL
0	5.22	5.13	5.32	5.22	5.21
2	4.56	4.50	4.37	5.13	6.85
4	4.06	3.29	2.98	5.10	9.16
8	3.00	2.30	2.00	4.48	11.94
24	1.00	1.00	4.81	7.75	13.90
48	1.00	1.00	6.92	7.60	10.77

Tabla VI.25. Efecto del uso de NMP a 50 µg/mL y 100 µg/mL en la CLB de la cepa Ter2-TQ cuando la concentración de ciprofloxacina es igual a: A) la CIM; B) 2 x CIM; C) 4 x CIM y D) 8 x CIM

A	LOG ₁₀ UFC/mL			
	CIP s/ NMP	CIP c/50 NMP	CIP c/100 NMP	CONTROL
HORA	CIM (128 µg/mL)	CIM (64 µg/mL)	CIM (32 µg/mL)	
0	5.21	5.14	5.22	5.21
2	3.94	3.94	5.13	6.85
4	1.00	2.48	5.10	9.16
8	3.65	2.00	4.48	11.94
24	8.59	4.89	7.75	13.90
48	7.48	8.00	7.60	10.77

B	LOG ₁₀ UFC/mL			
	CIP s/ NMP	CIP c/50 NMP	CIP c/100 NMP	CONTROL
HORA	2XCIM (256 µg/mL)	2XCIM (128 µg/mL)	2XCIM (64 µg/mL)	
0	5.05	5.26	5.32	5.21
2	4.11	4.14	4.37	6.85
4	3.60	3.22	2.98	9.16
8	2.74	1.00	2.00	11.94
24	2.00	3.49	4.81	13.90
48	1.00	5.32	6.92	10.77

C	LOG ₁₀ UFC/mL			
	CIP s/ NMP	CIP c/50 NMP	CIP c/100 NMP	CONTROL
HORA	4XCIM (512 µg/mL)	4XCIM (256 µg/mL)	4XCIM (128 µg/mL)	
0	5.04	5.25	5.13	5.21
2	4.28	4.26	4.50	6.85
4	3.63	3.30	3.29	9.16
8	2.85	2.90	2.30	11.94
24	1.00	1.00	1.00	13.90
48	1.00	1.00	1.00	10.77

D	LOG ₁₀ UFC/mL			
	CIP s/ NMP	CIP c/50 NMP	CIP c/100 NMP	CONTROL
HORA	8XCIM (1024 µg/mL)	8XCIM (512 µg/mL)	8XCIM (256 µg/mL)	
0	4.98	5.20	5.22	5.21
2	4.02	4.46	4.56	6.85
4	3.88	3.81	4.06	9.16
8	2.95	2.85	3.00	11.94
24	1.00	1.00	1.00	13.90
48	1.00	1.00	1.00	10.77

VI.5.3.7.3. Tetraciclina

*Cepa control AG112***Tabla VI.26.** Letalidad de la cepa AG112 en Log UFC/mL, frente a tetraciclina, a las concentraciones de la CIM, 2, 4, y 8 veces la CIM, A) sin NMP; B) con 50 µg/mL de NMP y C) con 100 µg/mL de NMP

A	LOG₁₀ UFC/mL				
HORA	8XCIM (64 µg/mL)	4XCIM (32 µg/mL)	2XCIM (16 µg/mL)	CIM (8 µg/mL)	CONTROL
0	5.33	5.43	5.24	5.30	5.15
2	5.18	5.14	5.22	5.05	6.46
4	5.18	4.96	5.21	4.49	8.40
8	5.24	5.32	5.50	5.48	11.82
24	4.88	5.00	4.45	4.07	9.28
48	4.17	3.56	3.77	7.39	9.48

B	LOG₁₀ UFC/mL				
HORA	8XCIM (16 µg/mL)	4XCIM (8 µg/mL)	2XCIM (4 µg/mL)	CIM (2 µg/mL)	CONTROL
0	5.30	5.38	5.19	5.24	5.15
2	5.32	5.23	5.15	4.98	6.46
4	5.02	5.30	4.93	4.48	8.40
8	5.32	5.37	5.40	5.18	11.82
24	5.00	4.74	4.30	6.16	9.28
48	4.67	5.03	4.01	8.41	9.48

C	LOG₁₀ UFC/mL				
HORA	8XCIM (4 µg/mL)	4XCIM (2 µg/mL)	2XCIM (1 µg/mL)	CIM (0.5 µg/mL)	CONTROL
0	5.15	5.31	5.07	5.32	5.15
2	5.16	4.94	5.18	5.03	6.46
4	4.86	4.85	4.63	4.19	8.40
8	5.00	4.79	4.61	4.39	11.82
24	3.86	3.92	3.59	7.09	9.28
48	3.20	3.59	5.42	7.39	9.48

Tabla VI.27. Comparación del efecto del uso de NMP a 50 µg/mL y 100 µg/mL en la CLB de la cepa AG112 cuando la concentración de tetraciclina es igual a: A) la CIM; B) 2 x CIM; C) 4 x CIM y D) 8 x CIM

A	LOG₁₀ UFC/mL			
HORA	TET s/ NMP	TET c/50 NMP	TET c/100 NMP	CONTROL
	CIM (8 µg/mL)	CIM (2 µg/mL)	CIM (0.5 µg/mL)	
0	5.30	5.24	5.32	5.15
2	5.05	4.98	5.03	6.46
4	4.49	4.48	4.19	8.40
8	5.48	5.18	4.39	11.82
24	4.07	6.16	7.09	9.28
48	7.39	8.41	7.39	9.48

B	LOG₁₀ UFC/mL			
HORA	TET s/ NMP	TET c/50 NMP	TET c/100 NMP	CONTROL
	2XCIM (16 µg/mL)	2XCIM (4 µg/mL)	2XCIM (1 µg/mL)	
0	5.24	5.19	5.07	5.15
2	5.22	5.15	5.18	6.46
4	5.21	4.93	4.63	8.40
8	5.50	5.40	4.61	11.82
24	4.45	4.30	3.59	9.28
48	3.77	4.01	5.42	9.48

C	LOG₁₀ UFC/mL			
HORA	TET s/ NMP	TET c/50 NMP	TET c/100 NMP	CONTROL
	4XCIM (32 µg/mL)	4XCIM (8 µg/mL)	4XCIM (2 µg/mL)	
0	5.43	5.38	5.31	5.15
2	5.14	5.23	4.94	6.46
4	4.96	5.30	4.85	8.40
8	5.32	5.37	4.79	11.82
24	5.00	4.74	3.92	9.28
48	3.56	5.03	3.59	9.48

D	LOG₁₀ UFC/mL			
HORA	TET s/ NMP	TET c/50 NMP	TET c/100 NMP	CONTROL
	8XCIM (64 µg/mL)	8XCIM (16 µg/mL)	8XCIM (4 µg/mL)	
0	5.33	5.30	5.15	5.15
2	5.18	5.32	5.16	6.46
4	5.18	5.02	4.86	8.40
8	5.24	5.32	5.00	11.82
24	4.88	5.00	3.86	9.28
48	1.00	4.67	3.20	9.48

Cepa AG100

Tabla VI.28. Letalidad de la cepa control AG100 frente a tetraciclina a las concentraciones de la CIM, 2, 4, y 8 veces la CIM sin NMP

HORA	LOG ₁₀ UFC/mL				
	8XCIM (8 µg/mL)	4XCIM (4 µg/mL)	2XCIM (2 µg/mL)	CIM (1 µg/mL)	CONTROL
0	4.66	4.83	5.06	5.23	5.65
2	4.32	4.42	4.02	4.18	5.49
4	4.08	4.29	4.00	4.11	7.66
8	4.11	4.02	4.04	4.33	9.67
24	4.02	2.60	4.33	4.82	9.14
48	4.52	1.00	2.48	7.65	10.22

Cepa Ter2-TQ**Tabla VI.29.** Letalidad de la cepa Ter2-TQ en Log UFC/mL, frente a tetraciclina, a las concentraciones de la CIM, 2, 4, y 8 veces la CIM, A) sin NMP; B) con 50 µg/mL de NMP y C) con 100 µg/mL de NMP

A	LOG₁₀ UFC/mL				
HORA	8XCIM (2048 µg/mL)	4XCIM (1024 µg/mL)	2XCIM (512 µg/mL)	CIM (256 µg/mL)	CONTROL
0	2.70	3.39	3.76	4.77	5.37
2	1.00	1.00	2.90	3.88	6.67
4	1.00	1.00	2.00	3.00	9.12
8	1.00	1.00	1.00	2.30	10.46
24	1.00	1.00	1.00	1.00	9.18
48	1.00	1.00	1.00	1.00	9.85

B	LOG₁₀ UFC/mL				
HORA	8XCIM (1024 µg/mL)	4XCIM (512 µg/mL)	2XCIM (256 µg/mL)	CIM (128 µg/mL)	CONTROL
0	4.38	4.58	4.93	4.81	5.28
2	1.00	2.85	3.38	3.28	6.81
4	1.00	1.00	1.00	2.70	9.01
8	1.00	1.00	1.00	2.48	9.43
24	1.00	1.00	1.00	1.00	8.91
48	1.00	1.00	1.00	1.00	8.76

C	LOG₁₀ UFC/mL				
HORA	8XCIM (512 µg/mL)	4XCIM (256 µg/mL)	2XCIM (128 µg/mL)	CIM (64 µg/mL)	CONTROL
0	4.34	4.57	4.94	5.04	5.28
2	2.00	3.22	3.65	3.72	6.81
4	1.00	2.88	3.18	2.90	9.01
8	1.00	1.00	2.93	3.72	9.43
24	1.00	1.00	1.00	2.00	8.91
48	1.00	1.00	1.00	1.00	8.76

Tabla VI.30. Comparación del efecto del uso de NMP a 50 µg/mL y 100 µg/mL en la CLB de la cepa Ter2-TQ cuando la concentración de tetraciclina es igual a: A) la CIM; B) 2 x CIM; C) 4 x CIM y D) 8 x CIM

A	LOG ₁₀ UFC/mL			
	TET s/ NMP CIM (256 µg/mL)	TET c/50 NMP CIM (128 µg/mL)	TET c/100 NMP CIM (64 µg/mL)	CONTROL
0	4.77	4.81	5.04	5.28
2	3.88	3.28	3.72	6.81
4	3.00	2.70	2.90	9.01
8	2.30	2.48	3.72	9.43
24	1.00	1.00	2.00	8.91
48	1.00	1.00	1.00	8.76

B	LOG ₁₀ UFC/mL			
	TET s/ NMP 2XCIM (512 µg/mL)	TET c/50 NMP 2XCIM (256 µg/mL)	TET c/100 NMP 2XCIM (128 µg/mL)	CONTROL
0	3.76	4.93	4.94	5.28
2	2.90	3.38	3.65	6.81
4	2.00	1.00	3.18	9.01
8	1.00	1.00	2.93	9.43
24	1.00	1.00	1.00	8.91
48	1.00	1.00	1.00	8.76

C	LOG ₁₀ UFC/mL			
	TET s/ NMP 4XCIM (1024 µg/mL)	TET c/50 NMP 4XCIM (512 µg/mL)	TET c/100 NMP 4XCIM (256 µg/mL)	CONTROL
0	3.39	4.58	4.57	5.28
2	1.00	2.85	3.22	6.81
4	1.00	1.00	2.88	9.01
8	1.00	1.00	1.00	9.43
24	1.00	1.00	1.00	8.91
48	1.00	1.00	1.00	8.76

D	LOG ₁₀ UFC/mL			
	TET s/ NMP 8XCIM (2048 µg/mL)	TET c/50 NMP 8XCIM (1024 µg/mL)	TET c/100 NMP 8XCIM (512 µg/mL)	CONTROL
0	2.70	4.38	5.32	5.28
2	1.00	1.00	5.03	6.81
4	1.00	1.00	4.19	9.01
8	1.00	1.00	4.39	9.43
24	1.00	1.00	7.09	8.91
48	1.00	1.00	7.39	8.76

Cepa Ter4-TQ**Tabla VI.31.** Letalidad de la cepa Ter4-TQ en Log UFC/mL, frente a tetraciclina, a las concentraciones de la CIM, 2, 4, y 8 veces la CIM, A) sin NMP; B) con 50 µg/mL de NMP y C) con 100 µg/mL de NMP

A	LOG₁₀ UFC/mL				
HORA	8XCIM (2048 µg/mL)	4XCIM (1024 µg/mL)	2XCIM (512 µg/mL)	CIM (256 µg/mL)	CONTROL
0	3.16	4.14	4.36	5.04	5.11
2	2.00	2.00	2.48	3.20	7.39
4	1.00	1.00	2.48	3.18	8.74
8	1.00	1.00	1.00	3.15	9.46
24	1.00	1.00	1.00	1.00	8.84
48	1.00	1.00	1.00	1.00	8.87

B	LOG₁₀ UFC/mL				
HORA	8XCIM (1024 µg/mL)	4XCIM (512 µg/mL)	2XCIM (256 µg/mL)	CIM (128 µg/mL)	CONTROL
0	3.61	3.75	4.06	4.83	5.11
2	1.00	2.78	3.65	3.65	7.39
4	1.00	2.00	2.95	3.36	8.74
8	1.00	1.00	1.00	2.00	9.46
24	1.00	1.00	1.00	1.00	8.84
48	1.00	1.00	1.00	1.00	8.87

C	LOG₁₀ UFC/mL				
HORA	8XCIM (512 µg/mL)	4XCIM (256 µg/mL)	2XCIM (128 µg/mL)	CIM (64 µg/mL)	CONTROL
0	3.95	4.51	4.37	4.89	5.11
2	3.00	3.36	3.80	3.79	7.39
4	2.30	2.70	3.13	3.45	8.74
8	1.00	2.00	2.78	3.62	9.46
24	1.00	1.00	1.00	2.00	8.84
48	1.00	1.00	1.00	2.00	8.87

Tabla VI.32. Comparación del efecto del uso de NMP a 50 µg/mL y 100 µg/mL en la CLB de la cepa Ter4-TQ cuando la concentración de tetraciclina es igual a: A) la CIM; B) 2 x CIM; C) 4 x CIM y D) 8 x CIM

A	LOG ₁₀ UFC/mL			
	TET s/ NMP CIM (256 µg/mL)	TET c/50 NMP CIM (128 µg/mL)	TET c/100 NMP CIM (64 µg/mL)	CONTROL
0	5.04	4.83	4.89	5.11
2	3.20	3.65	3.79	7.39
4	3.18	3.36	3.45	8.74
8	3.15	2.00	3.62	9.46
24	1.00	1.00	2.00	8.84
48	1.00	1.00	2.00	8.87

B	LOG ₁₀ UFC/mL			
	TET s/ NMP 2XCIM (512 µg/mL)	TET c/50 NMP 2XCIM (256 µg/mL)	TET c/100 NMP 2XCIM (128 µg/mL)	CONTROL
0	4.36	4.06	4.37	5.11
2	2.48	3.65	3.80	7.39
4	2.48	2.95	3.13	8.74
8	1.00	1.00	2.78	9.46
24	1.00	1.00	1.00	8.84
48	1.00	1.00	1.00	8.87

C	LOG ₁₀ UFC/mL			
	TET s/ NMP 4XCIM (1024 µg/mL)	TET c/50 NMP 4XCIM (512 µg/mL)	TET c/100 NMP 4XCIM (256 µg/mL)	CONTROL
0	4.14	3.75	4.51	5.11
2	2.00	2.78	3.36	7.39
4	1.00	2.00	2.70	8.74
8	1.00	1.00	2.00	9.46
24	1.00	1.00	1.00	8.84
48	1.00	1.00	1.00	8.87

D	LOG ₁₀ UFC/mL			
	TET s/ NMP 8XCIM (2048 µg/mL)	TET c/50 NMP 8XCIM (1024 µg/mL)	TET c/100 NMP 8XCIM (512 µg/mL)	CONTROL
0	3.16	3.61	3.95	5.11
2	2.00	1.00	3.00	7.39
4	1.00	1.00	2.30	8.74
8	1.00	1.00	1.00	9.46
24	1.00	1.00	1.00	8.84
48	1.00	1.00	1.00	8.87

VI.5.3.8. Parámetros farmacodinámicos ABCC, ABC, ABBC, ABBC:CIM y porcentaje de eficacia

VI.5.3.8.1. Florfenicol

Tabla VI.33. Parámetros PD de florfenicol frente a la cepa AG112

ATB/NMP	8xCIM (µg/mL)	ABC ₂₄ (UFC.h/mL)	ABC ₄₈ (UFC.h/mL)	ABBC _{24-FLR} (UFC.h/mL)	ABBC _{48-FLR} (UFC.h/mL)	ABBC ₂₄ :CIM (UFC.h/ µg)	ABBC ₄₈ :CIM (UFC.h/ µg)	%Eficacia total del ATB c/ o s/ NMP a 24 y 48h	
FLR	256	111.9	168.7	133.4	368.9	4.2	11.5	54.4	68.6
FLR+ 50NMP	64	108.3	161.1	137.0	376.6	17.1	47.1	55.8	70.0
FLR+ 100NMP	16	113.7	170.1	131.6	367.6	65.8	183.8	53.6	68.4

ATB/NMP	4xCIM (µg/mL)	ABC ₂₄ (UFC.h/mL)	ABC ₄₈ (UFC.h/mL)	ABBC _{24-FLR} (UFC.h/mL)	ABBC _{48-FLR} (UFC.h/mL)	ABBC ₂₄ :CIM (UFC.h/ µg)	ABBC ₄₈ :CIM (UFC.h/ µg)	%Eficacia total del ATB c/ o s/ NMP a 24 y 48h	
FLR	128	113.1	198.2	132.2	339.5	4.1	10.6	53.9	63.1
FLR+ 50NMP	32	112.2	188.3	133.1	349.4	16.6	43.7	54.3	65.0
FLR+ 100NMP	8	119.4	217.5	125.9	320.1	63.0	160.1	51.3	59.5

ATB/NMP	2xCIM (µg/mL)	ABC ₂₄ (UFC.h/mL)	ABC ₄₈ (UFC.h/mL)	ABBC _{24-FLR} (UFC.h/mL)	ABBC _{48-FLR} (UFC.h/mL)	ABBC ₂₄ :CIM (UFC.h/ µg)	ABBC ₄₈ :CIM (UFC.h/ µg)	%Eficacia total del ATB c/ o s/ NMP a 24 y 48h	
FLR	64	123.1	226.9	122.3	310.8	3.8	9.7	49.8	57.8
FLR+ 50NMP	16	119.7	212.3	125.6	325.4	15.7	40.7	51.2	60.5
FLR+ 100NMP	4	126.1	235.9	119.2	301.8	59.6	150.9	48.6	56.1

ATB/NMP	CIM (µg/mL)	ABC ₂₄ (UFC.h/mL)	ABC ₄₈ (UFC.h/mL)	ABBC _{24-FLR} (UFC.h/mL)	ABBC _{48-FLR} (UFC.h/mL)	ABBC ₂₄ :CIM (UFC.h/ µg)	ABBC ₄₈ :CIM (UFC.h/ µg)	%Eficacia total del ATB c/ o s/ NMP a 24 y 48h	
FLR	32	128.3	230.0	117.0	307.7	3.7	9.6	47.7	57.2
FLR+ 50NMP	8	126.8	240.2	118.5	297.5	14.8	37.2	48.3	55.3
FLR+ 100NMP	2	126.5	237.6	118.8	300.1	59.4	150.1	48.4	55.8

CONTROL	
ABCC ₂₄	ABCC ₄₈
245.3	537.7

Tabla VI.34. Parámetros PD de florfenicol frente a la cepa Vo1-SV

ATB/NMP	8xCIM (µg/mL)	ABC ₂₄ (UFC.h/mL)	ABC ₄₈ (UFC.h/mL)	ABBC _{24-FLR} (UFC.h/mL)	ABBC _{48-FLR} (UFC.h/mL)	ABBC ₂₄ :CIM (UFC.h/ µg)	ABBC ₄₈ :CIM (UFC.h/ µg)	%Eficacia total del ATB c/ o s/ NMPa 24 y 48h	
FLR	2048	40.9	64.9	246.5	490.4	0.9	1.9	85.8	88.3
FLR+ 50NMP	512	116.5	174.4	170.9	380.8	2.7	5.9	59.5	68.6
FLR+ 100NMP	512	113.6	164.9	173.8	390.3	2.7	6.1	60.5	70.3

ATB/NMP	4xCIM (µg/mL)	ABC ₂₄ (UFC.h/mL)	ABC ₄₈ (UFC.h/mL)	ABBC _{24-FLR} (UFC.h/mL)	ABBC _{48-FLR} (UFC.h/mL)	ABBC ₂₄ :CIM (UFC.h/ µg)	ABBC ₄₈ :CIM (UFC.h/ µg)	%Eficacia total del ATB c/ o s/ NMPa 24 y 48h	
FLR	1024	52.3	76.3	235.1	478.9	0.9	1.9	81.8	86.2
FLR+ 50NMP	256	120.0	182.5	167.4	372.8	2.6	5.8	58.2	67.1
FLR+ 100NMP	256	117.2	176.3	170.2	378.9	2.6	5.9	59.2	68.2

ATB/NMP	2xCIM (µg/mL)	ABC ₂₄ (UFC.h/mL)	ABC ₄₈ (UFC.h/mL)	ABBC _{24-FLR} (UFC.h/mL)	ABBC _{48-FLR} (UFC.h/mL)	ABBC ₂₄ :CIM (UFC.h/ µg)	ABBC ₄₈ :CIM (UFC.h/ µg)	%Eficacia total del ATB c/ o s/ NMPa 24 y 48h	
FLR	512	124.0	191.5	163.4	363.7	0.6	1.4	56.8	65.5
FLR+ 50NMP	128	111.6	168.5	175.8	386.7	2.7	6.0	61.1	69.6
FLR+ 100NMP	128	117.7	178.8	169.7	376.4	2.6	5.9	59.0	67.8

ATB/NMP	CIM (µg/mL)	ABC ₂₄ (UFC.h/mL)	ABC ₄₈ (UFC.h/mL)	ABBC _{24-FLR} (UFC.h/mL)	ABBC _{48-FLR} (UFC.h/mL)	ABBC ₂₄ :CIM (UFC.h/ µg)	ABBC ₄₈ :CIM (UFC.h/ µg)	%Eficacia total del ATB c/ o s/ NMPa 24 y 48h	
FLR	256	143.5	269.1	144.0	286.1	0.6	1.1	50.1	51.5
FLR+ 50NMP	64	131.3	254.4	156.1	300.8	2.4	4.7	54.3	54.2
FLR+ 100NMP	64	117.8	224.6	169.5	330.6	2.6	5.2	59.0	59.5

CONTROL	
AUBC ₂₄	AUBC ₄₈
287.4	555.2

Tabla VI.35. Parámetros PD de florfenicol frente a la cepa Vo2-TQ

ATB/NMP	8xCIM (µg/mL)	ABC ₂₄ (UFC.h/mL)	ABC ₄₈ (UFC.h/mL)	ABBC _{24-FLR} (UFC.h/mL)	ABBC _{48-FLR} (UFC.h/mL)	ABBC _{24:CIM} (UFC.h/ µg)	ABBC _{48:CIM} (UFC.h/ µg)	%Eficacia total del ATB c/ o s/ NMPa 24 y 48h	
FLR	2048	29.7	53.7	216.2	498.9	0.8	1.9	87.9	90.3
FLR+ 50NMP	512	60.0	84.0	186.0	468.6	2.9	7.3	75.6	84.8
FLR+ 100NMP	512	56.8	80.8	189.2	471.8	2.9	7.4	76.9	85.4

ATB/NMP	4xCIM (µg/mL)	ABC ₂₄ (UFC.h/mL)	ABC ₄₈ (UFC.h/mL)	ABBC _{24-FLR} (UFC.h/mL)	ABBC _{48-FLR} (UFC.h/mL)	ABBC _{24:CIM} (UFC.h/ µg)	ABBC _{48:CIM} (UFC.h/ µg)	%Eficacia total del ATB c/ o s/ NMPa 24 y 48h	
FLR	1024	53.3	77.3	192.7	475.4	0.7	1.8	78.3	86.0
FLR+ 50NMP	256	53.5	77.5	192.5	475.1	3.0	7.4	78.2	86.0
FLR+ 100NMP	256	61.7	85.7	184.3	467.0	2.9	7.3	74.9	85.0

ATB/NMP	2xCIM (µg/mL)	ABC ₂₄ (UFC.h/mL)	ABC ₄₈ (UFC.h/mL)	ABBC _{24-FLR} (UFC.h/mL)	ABBC _{48-FLR} (UFC.h/mL)	ABBC _{24:CIM} (UFC.h/ µg)	ABBC _{48:CIM} (UFC.h/ µg)	%Eficacia total del ATB c/ o s/ NMPa 24 y 48h	
FLR	512	67.1	91.1	178.8	461.4	0.7	1.8	72.7	83.5
FLR+ 50NMP	128	67.9	91.9	178.0	460.7	2.8	7.2	72.4	83.4
FLR+ 100NMP	128	64.3	88.3	181.6	464.3	2.8	7.2	73.8	84.0

ATB/NMP	CIM (µg/mL)	ABC ₂₄ (UFC.h/mL)	ABC ₄₈ (UFC.h/mL)	ABBC _{24-FLR} (UFC.h/mL)	ABBC _{48-FLR} (UFC.h/mL)	ABBC _{24:CIM} (UFC.h/ µg)	ABBC _{48:CIM} (UFC.h/ µg)	%Eficacia total del ATB c/ o s/ NMPa 24 y 48h	
FLR	256	72.8	108.8	173.2	443.8	0.7	1.7	70.4	80.3
FLR+ 50NMP	64	76.2	100.2	169.8	452.5	2.6	7.1	69.0	81.9
FLR+ 100NMP	64	71.0	95.0	174.9	457.6	2.7	7.1	71.1	82.8

CONTROL	
AUBC ₂₄	AUBC ₄₈
246.0	552.6

VI.5.3.8.2. Ciprofloxacina

Tabla VI.36. Parámetros PD de ciprofloxacina frente a la cepa AG112

ATB/NMP	8xCIM (µg/mL)	ABC ₂₄ (UFC.h/mL)	ABC ₄₈ (UFC.h/mL)	ABBC _{24-CIP} (UFC.h/mL)	ABBC _{48-CIP} (UFC.h/mL)	ABBC _{24-CIP} :CIM (UFC.h/ µg)	ABBC _{48-CIP} :CIM (UFC.h/ µg)	%Eficacia total del ATB c/ o s/ NMPa 24 y 48h	
CIP	0.5	31.3	55.3	250.7	533.6	4010.7	8538.0	88.9	90.6
CIP+50NMP	0.25	30.7	54.7	251.3	534.2	8053.7	17123.0	89.1	90.7
CIP+100NMP	0.125	30.8	54.8	251.2	534.2	16747.9	35611.9	89.1	90.7

ATB/NMP	4xCIM (µg/mL)	ABC ₂₄ (UFC.h/mL)	ABC ₄₈ (UFC.h/mL)	ABBC _{24-CIP} (UFC.h/mL)	ABBC _{48-CIP} (UFC.h/mL)	ABBC _{24-CIP} : CIM (UFC.h/ µg)	ABBC _{48-CIP} :CIM (UFC.h/ µg)	%Eficacia total del ATB c/ o s/ NMPa 24 y 48h	
CIP	0.312	31.5	55.5	250.5	533.5	4008.0	8535.4	88.8	90.6
CIP+50NMP	0.125	34.0	58.0	248.0	531.0	7949.3	17018.5	87.9	90.1
CIP+100NMP	0.062	34.2	58.2	247.8	530.8	16522.7	35386.7	87.9	90.1

ATB/NMP	2xCIM (µg/mL)	ABC ₂₄ (UFC.h/mL)	ABC ₄₈ (UFC.h/mL)	ABBC _{24-CIP} (UFC.h/mL)	ABBC _{48-CIP} (UFC.h/mL)	ABBC _{24-CIP} : CIM (UFC.h/ µg)	ABBC _{48-CIP} :CIM (UFC.h/ µg)	%Eficacia total del ATB c/ o s/ NMPa 24 y 48h	
CIP	0.125	38.9	62.9	243.1	526.1	3890.5	8417.8	86.2	89.3
CIP+50NMP	0.062	65.2	184.4	216.8	404.5	6948.2	12965.3	76.9	68.7
CIP+100NMP	0.031	36.3	60.3	245.7	528.6	16377.7	35241.7	87.1	89.7

ATB/NMP	CIM (µg/mL)	ABC ₂₄ (UFC.h/mL)	ABC ₄₈ (UFC.h/mL)	ABBC _{24-CIP} (UFC.h/mL)	ABBC _{48-CIP} (UFC.h/mL)	ABBC _{24-CIP} : CIM (UFC.h/ µg)	ABBC _{48-CIP} :CIM (UFC.h/ µg)	%Eficacia total del ATB c/ o s/ NMPa 24 y 48h	
CIP	0.125	74.9	181.8	207.1	407.2	3313.5	6515.4	73.4	69.1
CIP+50NMP	0.031	127.4	314.1	154.7	274.9	4956.9	8811.1	54.8	46.7
CIP+100NMP	0.015	41.8	65.8	240.3	523.2	16017.0	34881.0	85.2	88.8

CONTROL	
AUBC ₂₄	AUBC ₄₈
282.0	589.0

Tabla VI.37. Parámetros PD de ciprofloxacina frente a la cepa Ter1-TQ

ATB/NMP	8xCIM (µg/mL)	ABC ₂₄ (UFC.h/mL)	ABC ₄₈ (UFC.h/mL)	ABBC _{24-CIP} (UFC.h/mL)	ABBC _{48-CIP} (UFC.h/mL)	ABBC _{24-CIP:CIM} (UFC.h/ µg)	ABBC _{48-CIP:CIM} (UFC.h/ µg)	%Eficacia total del ATB c/ o s/ NMPa 24 y 48h	
TET	1024	67.9	91.9	191.8	427.9	1.5	3.3	73.8	82.3
TET+50NMP	512	72.2	96.2	187.5	423.6	2.9	6.6	72.2	81.5
TET+100NMP	256	68.6	92.6	191.1	427.2	6.0	13.3	73.6	82.2

ATB/NMP	4xCIM (µg/mL)	ABC ₂₄ (UFC.h/mL)	ABC ₄₈ (UFC.h/mL)	ABBC _{24-CIP} (UFC.h/mL)	ABBC _{48-CIP} (UFC.h/mL)	ABBC _{24-CIP:CIM} (UFC.h/ µg)	ABBC _{48-CIP:CIM} (UFC.h/ µg)	%Eficacia total del ATB c/ o s/ NMPa 24 y 48h	
TET	512	61.2	85.2	198.5	434.6	1.5	3.4	76.4	83.6
TET+50NMP	256	70.8	94.8	188.9	425.0	2.9	6.6	72.7	81.8
TET+100NMP	128	61.1	85.1	198.6	434.7	6.2	13.6	76.5	83.6

ATB/NMP	2xCIM (µg/mL)	ABC ₂₄ (UFC.h/mL)	ABC ₄₈ (UFC.h/mL)	ABBC _{24-CIP} (UFC.h/mL)	ABBC _{48-CIP} (UFC.h/mL)	ABBC _{24-CIP:CIM} (UFC.h/ µg)	ABBC _{48-CIP:CIM} (UFC.h/ µg)	%Eficacia total del ATB c/ o s/ NMPa 24 y 48h	
TET	256	96.0	235.0	163.7	284.8	1.3	2.2	63.0	54.8
TET+50NMP	128	73.3	156.6	186.4	363.1	2.9	5.7	71.8	69.9
TET+100NMP	64	93.5	233.4	166.2	286.3	5.2	8.9	63.9	55.1

ATB/NMP	CIM (µg/mL)	ABC ₂₄ (UFC.h/mL)	ABC ₄₈ (UFC.h/mL)	ABBC _{24-CIP} (UFC.h/mL)	ABBC _{48-CIP} (UFC.h/mL)	ABBC _{24-CIP:CIM} (UFC.h/ µg)	ABBC _{48-CIP:CIM} (UFC.h/ µg)	%Eficacia total del ATB c/ o s/ NMPa 24 y 48h	
TET	128	134.6	349.4	125.1	170.4	1.0	1.3	48.7	32.8
TET+50NMP	64	105.5	271.4	154.2	248.4	2.4	3.9	59.4	47.8
TET+100NMP	32	164.5	347.8	95.2	171.9	3.0	5.4	36.7	33.1

CONTROL	
AUBC ₂₄	AUBC ₄₈
259.7	519.8

Tabla VI.38. Parámetros PD de ciprofloxacina frente a la cepa Ter2-TQ

ATB/NMP	8xCIM (µg/mL)	ABC ₂₄ (UFC.h/mL)	ABC ₄₈ (UFC.h/mL)	ABBC _{24-CIP} (UFC.h/mL)	ABBC _{48-CIP} (UFC.h/mL)	ABBC _{24-CIP:CIM} (UFC.h/ µg)	ABBC _{48-CIP:CIM} (UFC.h/ µg)	%Eficacia total del ATB c/ o s/ NMPa 24 y 48h	
TET	1024	66.9	90.9	158.8	363.9	1.2	2.8	70.30	80.0
TET+50NMP	512	66.9	90.9	158.8	363.9	2.5	5.7	70.3	80.0
TET+100NMP	256	69.6	93.6	156.2	361.3	4.9	11.3	69.2	79.4

ATB/NMP	4xCIM (µg/mL)	ABC ₂₄ (UFC.h/mL)	ABC ₄₈ (UFC.h/mL)	ABBC _{24-CIP} (UFC.h/mL)	ABBC _{48-CIP} (UFC.h/mL)	ABBC _{24-CIP:CIM} (UFC.h/ µg)	ABBC _{48-CIP:CIM} (UFC.h/ µg)	%Eficacia total del ATB c/ o s/ NMPa 24 y 48h	
TET	512	65.7	89.7	160.0	365.1	1.2	2.8	70.9	80.3
TET+50NMP	256	65.6	89.6	160.2	365.3	2.5	5.7	70.9	80.3
TET+100NMP	128	59.8	83.8	166.0	371.1	5.2	11.6	73.5	81.6

ATB/NMP	2xCIM (µg/mL)	ABC ₂₄ (UFC.h/mL)	ABC ₄₈ (UFC.h/mL)	ABBC _{24-CIP} (UFC.h/mL)	ABBC _{48-CIP} (UFC.h/mL)	ABBC _{24-CIP:CIM} (UFC.h/ µg)	ABBC _{48-CIP:CIM} (UFC.h/ µg)	%Eficacia total del ATB c/ o s/ NMPa 24 y 48h	
TET	256	72.2	108.2	153.6	346.7	1.2	2.7	68.0	76.2
TET+50NMP	128	65.6	171.4	160.2	283.5	2.5	4.4	70.9	62.3
TET+100NMP	64	86.0	226.7	139.8	228.2	4.4	7.1	61.9	50.2

ATB/NMP	CIM (µg/mL)	ABC ₂₄ (UFC.h/mL)	ABC ₄₈ (UFC.h/mL)	ABBC _{24-CIP} (UFC.h/mL)	ABBC _{48-CIP} (UFC.h/mL)	ABBC _{24-CIP:CIM} (UFC.h/ µg)	ABBC _{48-CIP:CIM} (UFC.h/ µg)	%Eficacia total del ATB c/ o s/ NMPa 24 y 48h	
TET	128	125.4	318.2	100.4	136.7	0.8	1.0	44.5	30.0
TET+50NMP	64	83.9	238.6	141.9	216.2	2.2	3.4	62.8	47.5
TET+100NMP	32	142.5	326.8	83.2	128.0	2.6	4.0	36.9	28.1

CONTROL	
AUBC ₂₄	AUBC ₄₈
225.8	454.9

VI.5.3.8.3. Tetraciclina

Tabla VI.39. Parámetros PD de tetraciclina frente a la cepa AG112

ATB/NMP	8xCIM (µg/mL)	ABC ₂₄ (UFC.h/mL)	ABC ₄₈ (UFC.h/mL)	ABBC _{24-TET} (UFC.h/mL)	ABBC _{48-TET} (UFC.h/mL)	ABBC _{24-TET} :CIM (UFC.h/ µg)	ABBC _{48-TET} :CIM (UFC.h/ µg)	%Eficacia total del ATB c/ o s/ NMPa 24 y 48h	
TET	64	127.9	236.5	112.9	229.4	14.1	28.7	47.9	56.0
TET+50NMP	16	129.4	245.5	111.4	220.4	55.7	110.2	47.2	54.3
TET+100NMP	4	116.2	201.0	124.6	264.9	249.2	529.9	52.6	62.6

ATB/NMP	4xCIM (µg/mL)	ABC ₂₄ (UFC.h/mL)	ABC ₄₈ (UFC.h/mL)	ABBC _{24-TET} (UFC.h/mL)	ABBC _{48-TET} (UFC.h/mL)	ABBC _{24-TET} :CIM (UFC.h/ µg)	ABBC _{48-TET} :CIM (UFC.h/ µg)	%Eficacia total del ATB c/ o s/ NMPa 24 y 48h	
TET	32	129.1	231.8	111.7	234.1	14.0	29.3	47.4	56.9
TET+50NMP	8	128.7	246.0	112.1	219.9	56.0	109.9	47.5	54.2
TET+100NMP	2	114.2	204.3	126.6	261.6	253.2	523.2	53.4	62.0

ATB/NMP	2xCIM (µg/mL)	ABC ₂₄ (UFC.h/mL)	ABC ₄₈ (UFC.h/mL)	ABBC _{24-TET} (UFC.h/mL)	ABBC _{48-TET} (UFC.h/mL)	ABBC _{24-TET} :CIM (UFC.h/ µg)	ABBC _{48-TET} :CIM (UFC.h/ µg)	%Eficacia total del ATB c/ o s/ NMPa 24 y 48h	
TET	16	127.0	225.6	113.8	240.3	14.2	30.0	48.2	58.0
TET+50NMP	4	123.9	223.6	116.9	242.4	58.4	121.2	49.5	58.4
TET+100NMP	1	109.3	217.4	131.5	248.5	263.0	497.0	55.4	59.6

ATB/NMP	CIM (µg/mL)	ABC ₂₄ (UFC.h/mL)	ABC ₄₈ (UFC.h/mL)	ABBC _{24-TET} (UFC.h/mL)	ABBC _{48-TET} (UFC.h/mL)	ABBC _{24-TET} :CIM (UFC.h/ µg)	ABBC _{48-TET} :CIM (UFC.h/ µg)	%Eficacia total del ATB c/ o s/ NMPa 24 y 48h	
TET	8	121.5	259.0	119.3	206.9	14.9	25.9	50.5	51.8
TET+50NMP	2	134.6	309.5	106.2	156.5	53.1	78.2	45.1	42.4
TET+100NMP	0.5	133.2	307.0	107.6	158.9	215.2	317.8	45.7	42.9

CONTROL	
AUBC ₂₄	AUBC ₄₈
240.8	465.9

Tabla VI.40. Parámetros PD de tetraciclina frente a la cepa Ter2-TQ

ATB/NMP	8xCIM (µg/mL)	ABC ₂₄ (UFC.h/mL)	ABC ₄₈ (UFC.h/mL)	ABBC ₂₄ -TET (UFC.h/mL)	ABBC ₄₈ -TET (UFC.h/mL)	ABBC ₂₄ :CIM (UFC.h/ µg)	ABBC ₄₈ :CIM (UFC.h/ µg)	%Eficacia total del ATB c/ o s/ NMPa 24 y 48h	
TET	2048	27.8	51.8	189.8	377.8	0.7	1.5	87.2	87.9
TET+50NMP	1024	30.7	54.7	187.0	375.0	1.5	2.9	85.9	87.3
TET+100NMP	512	32.8	56.8	184.9	373.0	2.9	5.8	84.9	86.8

ATB/NMP	4xCIM (µg/mL)	ABC ₂₄ (UFC.h/mL)	ABC ₄₈ (UFC.h/mL)	ABBC ₂₄ -FLR (UFC.h/mL)	ABBC ₄₈ -FLR (UFC.h/mL)	ABBC ₂₄ :CIM (UFC.h/ µg)	ABBC ₄₈ :CIM (UFC.h/ µg)	%Eficacia total del ATB c/ o s/ NMPa 24 y 48h	
TET	1024	29.0	53.0	188.6	376.6	0.7	1.5	86.7	87.7
TET+50NMP	512	35.0	59.0	182.7	370.7	1.4	2.9	83.9	86.3
TET+100NMP	256	41.6	65.6	176.0	364.0	2.7	5.7	80.9	84.7

ATB/NMP	2xCIM (µg/mL)	ABC ₂₄ (UFC.h/mL)	ABC ₄₈ (UFC.h/mL)	ABBC ₂₄ -FLR (UFC.h/mL)	ABBC ₄₈ -FLR (UFC.h/mL)	ABBC ₂₄ :CIM (UFC.h/ µg)	ABBC ₄₈ :CIM (UFC.h/ µg)	%Eficacia total del ATB c/ o s/ NMPa 24 y 48h	
TET	512	36.9	60.9	180.8	368.8	0.7	1.4	83.0	85.8
TET+50NMP	256	36.7	60.7	180.9	368.9	1.4	2.9	83.1	85.9
TET+100NMP	128	63.6	87.6	154.0	342.0	2.4	5.3	70.8	79.6

ATB/NMP	CIM (µg/mL)	ABC ₂₄ (UFC.h/mL)	ABC ₄₈ (UFC.h/mL)	ABBC ₂₄ -FLR (UFC.h/mL)	ABBC ₄₈ -FLR (UFC.h/mL)	ABBC ₂₄ :CIM (UFC.h/ µg)	ABBC ₄₈ :CIM (UFC.h/ µg)	%Eficacia total del ATB c/ o s/ NMPa 24 y 48h	
TET	256	56.9	81.0	160.7	348.7	0.6	1.4	73.8	81.2
TET+50NMP	128	56.5	80.5	161.1	349.1	1.2	2.7	74.0	81.2
TET+100NMP	64	79.0	115.0	138.7	314.7	2.2	4.9	63.7	73.2

CONTROL	
AUBC ₂₄	AUBC ₄₈
217.6	429.7

Tabla VI.41. Parámetros PD de tetraciclina frente a la cepa Ter4-TQ

ATB/NMP	8xCIM (µg/mL)	ABC ₂₄ (UFC.h/mL)	ABC ₄₈ (UFC.h/mL)	ABBC _{24-TET} (UFC.h/mL)	ABBC _{48-TET} (UFC.h/mL)	ABBC _{24-TET} :CIM (UFC.h/ µg)	ABBC _{48-TET} :CIM (UFC.h/ µg)	%Eficacia total del ATB c/ o s/ NMPa 24 y 48h	
TET	2048	30.8	54.8	186.8	375.4	0.7	1.5	85.8	87.3
TET+50NMP	1024	29.4	53.4	188.2	376.8	1.5	2.9	86.5	87.6
TET+100NMP	512	38.3	62.3	179.2	367.8	2.8	5.7	82.4	85.5

ATB/NMP	4xCIM (µg/mL)	ABC ₂₄ (UFC.h/mL)	ABC ₄₈ (UFC.h/mL)	ABBC _{24-FLR} (UFC.h/mL)	ABBC _{48-FLR} (UFC.h/mL)	ABBC _{24-TET} :CIM (UFC.h/ µg)	ABBC _{48-TET} :CIM (UFC.h/ µg)	%Eficacia total del ATB c/ o s/ NMPa 24 y 48h	
TET	1024	32.4	56.4	185.1	373.7	0.7	1.4	85.1	86.9
TET+50NMP	512	36.6	60.6	181.0	369.6	1.4	2.9	83.2	85.9
TET+100NMP	256	51.4	75.4	166.1	354.7	2.6	5.5	76.4	82.5

ATB/NMP	2xCIM (µg/mL)	ABC ₂₄ (UFC.h/mL)	ABC ₄₈ (UFC.h/mL)	ABBC _{24-FLR} (UFC.h/mL)	ABBC _{48-FLR} (UFC.h/mL)	ABBC _{24-TET} :CIM (UFC.h/ µg)	ABBC _{48-TET} :CIM (UFC.h/ µg)	%Eficacia total del ATB c/ o s/ NMPa 24 y 48h	
TET	512	38.5	62.5	179.1	367.7	0.7	1.4	82.3	85.5
TET+50NMP	256	42.0	66.0	175.6	364.2	1.4	2.8	80.7	84.7
TET+100NMP	128	61.3	85.3	156.2	344.8	2.4	5.4	71.8	80.2

ATB/NMP	CIM (µg/mL)	ABC ₂₄ (UFC.h/mL)	ABC ₄₈ (UFC.h/mL)	ABBC _{24-FLR} (UFC.h/mL)	ABBC _{48-FLR} (UFC.h/mL)	ABBC _{24-TET} :CIM (UFC.h/ µg)	ABBC _{48-TET} :CIM (UFC.h/ µg)	%Eficacia total del ATB c/ o s/ NMPa 24 y 48h	
TET	256	65.0	89.0	152.5	341.1	0.6	1.3	70.1	79.3
TET+50NMP	128	54.6	78.6	162.9	351.5	1.3	2.7	74.9	81.7
TET+100NMP	64	79.6	127.6	137.9	302.5	2.1	4.7	63.4	70.3

CONTROL	
AUBC ₂₄	AUBC ₄₈
217.5	430.1

VI.5.3.9. Análisis estadístico de las curvas de muerte bacteriana

VI.5.3.9.1. Florfenicol

Tabla VI.42. Valores de probabilidad determinados aplicando el Test de Tukey-Kramer para la comparación estadística de los parámetros farmacodinámico ($ABBC_{0-24}:CIM$) de florfenicol con y sin NMP frente a la cepa AG112

Comparación	Media de las diferencias	q	Valor de P
$ABBC_{FLR}:CIM$ vs $ABBC_{FLR+50 NMP}:CIM$	-12.126	16.430	P<0.001
$ABBC_{FLR}:CIM$ vs $ABBC_{FLR+100 NMP}:CIM$	-57.996	78.579	P<0.001
$ABBC_{FLR+50 NMP}:CIM$ vs $ABBC_{FLR+100 NMP}:CIM$	-45.869	62.149	P<0.001

Si el valor de q es mayor a 4.339, entonces P es menor a 0.05

Tabla VI.43. Valores de probabilidad determinados aplicando el Test de Tukey-Kramer para la comparación estadística de los parámetros farmacodinámicos ($ABBC_{0-24}:CIM$) de florfenicol con y sin NMP frente a la cepa Vo1-SV

Comparación	Media de las diferencias	q	Valor de P
$ABBC_{FLR}:CIM$ vs $ABBC_{FLR+50 NMP}:CIM$	-1.847	26.552	P<0.001
$ABBC_{FLR}:CIM$ vs $ABBC_{FLR+100 NMP}:CIM$	-1.898	27.290	P<0.001
$ABBC_{FLR+50 NMP}:CIM$ vs $ABBC_{FLR+100 NMP}:CIM$	-0.05137	0.7384	P>0.05 (NS)

Si el valor de q es mayor a 3.949, entonces P es menor a 0.05.

Tabla VI.44. Valores de probabilidad determinados aplicando el Test de Tukey-Kramer para la comparación estadística de los parámetros farmacodinámicos ($ABBC_{0-24}:CIM$) de florfenicol con y sin NMP frente a la cepa Vo2-TQ

Comparación	Media de las diferencias	q	Valor de P
$ABBC_{FLR}:CIM$ vs $ABBC_{FLR+50 NMP}:CIM$	-2.094	37.314	P<0.001
$ABBC_{FLR}:CIM$ vs $ABBC_{FLR+100 NMP}:CIM$	-2.109	37.577	P<0.001
$ABBC_{FLR+50 NMP}:CIM$ vs $ABBC_{FLR+100 NMP}:CIM$	-0.01473	0.2625	P>0.05 (NS)

Si el valor de q es mayor a 3.949, entonces P es menor a 0.05.

VI.5.3.9.2. Ciprofloxacina

Tabla V.45. Valores de probabilidad determinados aplicando el Test de Tukey-Kramer para la comparación estadística de los parámetros farmacodinámicos ($ABBC_{0-24}:CIM$) de ciprofloxacina con y sin NMP frente a la cepa AG112

Comparación	Media de las diferencias	q	Valor de P
$ABBC_{CIP}:CIM$ vs $ABBC_{CIP+50 NMP}:CIM$	-3171.4	7.297	P<0.01
$ABBC_{CIP}:CIM$ vs $ABBC_{CIP+100 NMP}:CIM$	-12611	29.014	P<0.001
$ABBC_{CIP+50 NMP}:CIM$ vs $ABBC_{CIP+100 NMP}:CIM$	-9439.3	21.717	P<0.001

Si el valor de q es mayor a 3.949, entonces P es menor a 0.05.

Tabla VI.46. Valores de probabilidad determinados aplicando el Test de Tukey-Kramer para la comparación estadística de los parámetros farmacodinámicos ($ABBC_{0-24}:CIM$) de ciprofloxacina con y sin NMP frente a la cepa Ter1-TQ

Comparación	Media de las diferencias	q	Valor de P
$ABBC_{CIP}:CIM$ vs $ABBC_{CIP+50 NMP}:CIM$	-1.475	3.365	P>0.05 (NS)
$ABBC_{CIP}:CIM$ vs $ABBC_{CIP+100 NMP}:CIM$	-3.761	8.582	P<0.001
$ABBC_{CIP+50 NMP}:CIM$ vs $ABBC_{CIP+100 NMP}:CIM$	-2.286	5.217	P<0.05

Si el valor de q es mayor a 3.949, entonces P es menor a 0.05.

Tabla VI.47. Valores de probabilidad determinados aplicando el Test de Tukey-Kramer para la comparación estadística de los parámetros farmacodinámicos ($ABBC_{0-24}:CIM$) de ciprofloxacina con y sin NMP frente a la cepa Ter2TQ

Comparación	Media de las diferencias	q	Valor de P
$ABBC_{CIP}:CIM$ vs $ABBC_{CIP+50 NMP}:CIM$	-1.307	3.818	P>0.05 (NS)
$ABBC_{CIP}:CIM$ vs $ABBC_{CIP+100 NMP}:CIM$	-3.141	9.173	P<0.001
$ABBC_{CIP+50 NMP}:CIM$ vs $ABBC_{CIP+100 NMP}:CIM$	1.833	5.355	P<0.05

Si el valor de q es mayor a 3.949, entonces P es menor a 0.05.

VI.5.3.9.3. Tetraciclina

Tabla VI.48. Valores de probabilidad determinados aplicando el Test de Tukey-Kramer para la comparación estadística de los parámetros farmacodinámicos ($ABBC_{0-24}:CIM$) de tetraciclina con y sin NMP frente a la cepa AG112

Comparación	Media de las diferencias	q	Valor de P
$ABBC_{TET}:CIM$ vs $ABBC_{TET+50 NMP}:CIM$	-41.510	6.869	P<0.01
$ABBC_{TET}:CIM$ vs $ABBC_{TET+100 NMP}:CIM$	-230.87	38.203	P<0.001
$ABBC_{TET+50 NMP}:CIM$ vs $ABBC_{TET+100 NMP}:CIM$	-189.36	31.334	P<0.001

Si el valor de q es mayor a 3.949, entonces P es menor a 0.05.

Tabla VI.49. Valores de probabilidad determinados aplicando el Test de Tukey-Kramer para la comparación estadística de los parámetros farmacodinámicos ($ABBC_{0-24}:CIM$) de tetraciclina con y sin NMP frente a la cepa Ter2-TQ

Comparación	Media de las diferencias	q	Valor de P
$ABBC_{TET}:CIM$ vs $ABBC_{TET+50 NMP}:CIM$	-0.6869	6.920	P<0.01
$ABBC_{TET}:CIM$ vs $ABBC_{TET+100 NMP}:CIM$	-1.850	18.639	P<0.001
$ABBC_{TET+50 NMP}:CIM$ vs $ABBC_{TET+100 NMP}:CIM$	-1.163	11.719	P<0.001

Si el valor de q es mayor a 3.949, entonces P es menor a 0.05.

Tabla VI.50. Valores de probabilidad determinados aplicando el Test de Tukey-Kramer para la comparación estadística de los parámetros farmacodinámicos ($ABBC_{0-24}:CIM$) de tetraciclina con y sin NMP frente a la cepa Ter4-TQ

Comparación	Media de las diferencias	q	Valor de P
$ABBC_{TET}:CIM$ vs $ABBC_{TET+50 NMP}:CIM$	-0.6950	8.277	P<0.001
$ABBC_{TET}:CIM$ vs $ABBC_{TET+100 NMP}:CIM$	-1.811	21.569	P<0.001
$ABBC_{TET+50 NMP}:CIM$ vs $ABBC_{TET+100 NMP}:CIM$	-1.116	13.292	P<0.001

Si el valor de q es mayor a 3.949, entonces P es menor a 0.05.

VI.5.3.10. Estudio farmacocinético

VI.5.3.10.1. Validación

Tabla VI.51. Validación de las técnicas farmacocinéticas utilizadas para la integración de los parámetros PK/PD

ATM	r	µg/mL	Intradía		Interdía (3 ds)		LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
			Exactitud (%) n=6	Precisión (%) n=6	Exactitud (%) n=6	Precisión (%) n=6		
DANO	0.9994 (0.01-0.5 µg/mL)	0.012	103.76	3.64	98.15	1.63	0.005	0.01
		0.25	100.79	1.48	98.72	2.6		
	0.9970 (0.3-3 µg/mL)	0.4	106.34	1.19	103.42	2.19		
		0.35	107.87	1.12	96.4	2.47		
		1	109.18	7.22	106.29	2.93		
		2.65	91.9	1.14	98.97	1.13		
OTC	0.9957 (0.05-10 µg/mL)	0.05	100	12.65	103.33	9.82	0.013	0.05
		0.25	89.33	13.18	92.89	5.03		
		5	88.37	12.43	87.46	6.37		
		10	87.53	13.46	90.31	5.23		
FLR	0.9979 (0.062 a 10 µg/mL)	0.05	105.86	14.67	104.78	8.4	0.025	0.05
		0.125	94.765	6.28	92.49	7.15		
		0.25	87.515	4.94	93.15	4.71		
		0.5	114.035	16.45	113.45	7.73		
		1	107.135	2.69	110.64	0.48		
		5	89.57	5.53	86.07	4.95		
		10	89.25	1.45	92.03	1.36		

ATM: antimicrobiano. DANO: danofloxacina. OTC: oxitetraciclina. FLR: florfenicol. r: coeficiente de regresión. LOD: límite máximo de detección. LOQ: límite máximo de cuantificación

VI.5.3.10.2. Ensayos

Tabla VI.52. Concentraciones individuales y promedio \pm DS de florfenicol en plasma expresado en $\mu\text{g/mL}$ tras la administración de Nuflor (Shering-Plough) a seis terneros

TIEMPO (ds)	ANIMALES (n=6)						MEDIA	DS
	7	8	9	10	11	12		
0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	3.373	4.152	4.926	4.519	2.656	1.657	3.55	1.23
4	5.584	7.425	6.199	5.003	4.339	7.058	5.93	1.19
8	5.292	6.137	4.678	7.997	6.1	6.068	6.05	1.12
12	SM	4.776	2.751	2.864	3.7	SM	3.52	0.94
24	0.645	0.84	0.597	1.656	0.92	3.221	1.31	1.01
48	0.221	0.228	0.299	0.734	0.226	0.248	0.33	0.2
72	ND	ND	ND	ND	ND	ND		

Tabla VI.53. Concentraciones individuales y promedio \pm DS de danofloxacin en plasma expresadas en $\mu\text{g/mL}$ tras la administración de Advocin®180 (Pfizer Nuflor) a 21 terneros

TIEMPO (hs)	ANIMALES (n=21)																					MEDIA	DS			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21					
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
0.5	0.33	0.21	0.37	0.32	0.23	0.26	0.47	0.27	0.47		0.61	0.24	0.21	0.38	0.39	0.20	0.35	0.38	0.30	0.24	0.24	0.32	0.11			
1	0.53	0.27	0.59	0.44	0.41	0.36	0.50	0.33	0.70	0.80	0.74	0.25	0.58	0.52	0.52	0.30	0.40	0.54	0.54	0.31	0.44	0.48	0.16			
2				0.69	0.67		0.58	0.53	0.62	0.92	0.87	0.41	0.71	0.53	0.47	0.32	0.51	0.75	0.47	0.42	0.55	0.59	0.16			
4							0.52	0.48	0.53	0.62	0.72	0.51	0.53	0.52	0.45	0.40	0.43	0.60	0.41	0.40	0.40	0.50	0.09			
6													0.39	0.66	0.45	0.50	0.39	0.43	0.37	0.39	0.45	0.40	0.42	0.35	0.43	0.08
8													0.35	0.57	0.39	0.50	0.31	0.37	0.35	0.32	0.33	0.33	0.41	0.33	0.38	0.08
10														0.32	0.29	0.35	0.28	0.33	0.32	0.26	0.40	0.31	0.32	0.04		
12														0.31	0.22	0.34	0.24	0.22	0.28	0.26	0.39	0.23	0.28	0.06		
18																	0.17	0.17	0.21	0.21	0.30	0.16	0.20	0.05		
24																	0.15	0.17	0.15	0.16	0.21	0.15	0.17	0.02		
48																				0.15	0.16	0.16	0.01			

Tabla VI.54. Concentraciones individuales y promedio \pm DS de oxitetraciclina en plasma expresadas en $\mu\text{g/mL}$ tras la administración de Terramicina L.A (Pfizer) a 12 bovinos

TIEMPO (hs)	ANIMALES (n=12)												MEDIA	DS	
	1	3	6	8	10	11	12	15	17	22	23	24			
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0.21	SM	0.86	4	SM	SM	5.42	6	4.77	2.72	6.23	2.6	3.65	2.19	
2	4.25	6.45	5.53	4.21	6.79	8.83	6.56	6.86	5.63	2.97	6.94	3.04	5.67	1.76	
3	10.7	7.17	9.9	5.93	7.93	12.43	9.24	6.78	8.81	5.17	7.13	3.18	7.87	2.54	
4	14.56	7.02	10.96	6.46	6.77	16.46	8.86	5.38	7.95	4.83	6.37	4.07	8.31	3.85	
6	13.56	6.2	9.27	5.07	5.72	7.81	8.54	4.99	7.77	4.32	6.01	4.13	6.95	2.67	
8	12.66	4.58	8.48	3.9	5.62	7.63	6.49	4.29	5.95	3.81	5.46	4.1	6.08	2.55	
10	11.12	3.99	4.57	3.07	5.55	SM	6.44	3.7	4.95	3.29	4.36	3.94	5	2.26	
12	10.29	3.06	4.01	2.81	4.63	SM	3.67	3.22	3.76	3.22	4.27	3.51	4.22	2.08	
24	9.7	2.8	3.64	2.13	4.12	2.85	3.13	3.09	3.38	1.67	2.97	3.32	3.57	2.03	
36	6.73	2.67	3.57	1.77	3.03	2.74	2.43	2.42	2.6	1.34	1.94	2.84	2.84	1.36	
60	4.2	2.71	2.33	2.42	2.09	2.73	1.35	2	2.21	1.17	1.44	2.22	2.24	0.8	
72	2.38	0.94	1.39	1.34	1.92	SM	0.94	1.67	2.34	1.67	0.55	1.74	1.53	0.58	
96	0.88	0.82	0.77	0.71	0.56	0.69	SM	1.39	0.51	0.73	0.87	0.59	0.77	0.24	
120	0.46	0.51	0.34	0.42	0.42	ND	0.39	0.64	0.43	0.57	0.42	0.28	0.44	0.1	

VII. REFERENCIAS

- (1) **Casal M, Causse M, Solis F, Rodríguez F, Casall M.** Investigación de las resistencias a antimicrobianos en *Enterococcus faecalis*. Rev Esp Quimioter 2009;22(3):117-9.
- (2) **Piffano Costa Pelegrino F, Martins Teixeira L, Siqueira Carvalho M, Aranha Nouer S, Pinto de Oliveira M, Mello Sampaio J, et al.** Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. J Clin Microbiol 2002;40(7):2420-4.
- (3) **Urvashi S, Dutta R.** Antimicrobial resistance pattern of *Shigella* species over five years at a tertiary-care Teaching Hospital in North India. J Health Popul Nutr 2011;29(3):292-5.
- (4) **Zhanel G, DeCorby M, Adam H, Mulvey M, McCracken M, Lagacé-Wiens P, et al.** Prevalence of antimicrobial resistance pathogens in canadian hospitals: Results of the Canadian Ward Surveillance study (CANWARD 2008). Antimicrob Agents Chemother 2010;54(11):4684-93.
- (5) **Errecalde JO.** Uso de antimicrobianos en animales de consumo. Incidencia del desarrollo de resistencias en salud pública. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación. FAO; 2004.
- (6) **Mestorino N.** Uso de antimicrobianos en grandes animales y en alimentos agropecuarios y su implicancia en humanos. En: Documento final "La multirresistencia: un problema a abordar en forma interdisciplinaria e interinstitucional", Taller Post-Congreso SADI-INE. 2011.
- (7) **Miller M, Flynn W.** Regulation of antibiotic use in animals. In: Prescott JF, Baggot JD, Walker RD, editors. Antimicrobial therapy in veterinary medicine. 3 ed. Iowa State University: 2000. p. 760-73.
- (8) **Vissek W.** The mode of growth promotion by antibiotics. J Anim Sci 1978;46:1447-69.
- (9) **Araoz L.** Trazabilidad de la carne bovina. In: FAO SCORpALyEC, editor. Proyecto de cooperación técnica FAO/TCP/ 2910. Países del Mercosur ampliado "Apoyo a la Integración del Sector Agropecuario del Cono Sur para Contribuir a las Políticas de Seguridad Alimentaria". Santiago, Chile: FAORLC; 2004.
- (10) **Prescott JF, Baggot JD, Walter RD.** Terapéutica antimicrobiana en medicina veterinaria. Tercera Edición ed. Buenos Aires: Editorial Intermédica; 2002.
- (11) **Moreno MA, Domínguez L, Teshager T, Herrero IA, Porrero M.** Antibiotic resistance monitoring: the Spanish programme. Int J Antimicrob Ag 14[4], 285-290. 1-5-2000. Abstract.

- (12) **Nikolich M., Hong G, Shoemaker N, Salyers A.** Evidence for natural horizontal transfer of tetQ between bacteria that normally colonize humans and bacteria that normally colonize livestock. *Appl Environ Microbiol* 1994;60:3255-326.
- (13) **Nikaido H.** Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 1996;178(20):5853-9.
- (14) **Sáenz Y, Ruiz J, Zarazaga M, Teixidó M, Torres C, Vila J.** Effect of the efflux pump inhibitor Phe-Arg- β -naphthylamide on the MIC values of the quinolones, tetracycline and chloramphenicol, in *Escherichia coli* isolates of different origin. *J Antimicrob Chemother* 2004 Mar 1;53(3):544-5.
- (15) **Yu E, Aires J, Nikaido H.** AcrB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*: composite substrate-binding cavity of exceptional flexibility generates its extremely wide substrate specificity. *J Bacteriol* 2003;185(5657):5664.
- (16) **Levy S.** CITATION: Antibiotic resistance: an ecological imbalance. In: Chadwick D, Goode J, editors. Antibiotic resistance: origins, evolution, selection and spread (Ciba Foundation Symposium 207). West Sussex, England: Wiley, Chichester: 1997. p. 1-14.
- (17) **The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products.** Antibiotic resistance in the European Union associated with therapeutic use of veterinary medicines. EMEA/CVMP/342/99. London, UK; 1999.
- (18) **Siegel D, Huber W, Enloe F.** Continuous non-therapeutic use of antibacterial drugs in feed and drug resistance of the gram-negative enteric flora of food-producing animals. *Agents and Chemother* 1974;6:697-701.
- (19) **Marshall B, Ochieng D, Levy S.** Commensals: underappreciated reservoir of antibiotic resistance. *Microbe* 2009;4(5):231-8.
- (20) **Houndt T, Ochman H.** Long-Term shifts in patterns of antibiotic resistance in enteric bacteria. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:5406-9.
- (21) **Huston C, Evans R, Bailey R, Best T, Huston J.** Ecology of antimicrobial resistance of enteric *E. coli* and *Salmonella* in beef cattle treated with antibiotics. Annual report 2002 of the North Mississippi Research & Extension Center. Mississippi Agriculture and Forestry Experiment Station Information Bulletin 2002;398:204-9.
- (22) **van den Bogaard AE, Stobberingh EE.** Epidemiology of resistance to antibiotics: Links between animals and humans. *Int J Antimicrob Ag* 14[4], 327-335. 1-5-2000. Abstract
- (23) **van den Bogaard A, London N, Driessen C, Stobberingh E.** Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *J Antimicrob Chemother* 2001;47:763-71.

- (24) **Oppegaard H, Steinum T, Wasteson Y.** Horizontal transfer of a multidrug resistance plasmid between coliform bacteria of human and bovine origin in a farm environment. *Appl Environ Microbiol* 2001;7:3732-4.
- (25) **Van Bambeke F, Balzi E, Tulkens PM.** Antimicrobial efflux pump. *Biochem Pharmacol* 2000;60:457-70.
- (26) **Webber MA, Piddock LJV.** The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* 2003 Jan 1;51(1):9-11.
- (27) **Mesaro N, Van Bambeke F, Glupczynski Y, Vanhoof R, Tulkens P.** L'Efflux des antibiotiques: Un mécanisme ubiquitaire conduisant à la résistance. Etat de la question et implications microbiologiques et cliniques. *Louvain Med* 2005;124(8):308-20.
- (28) **Levy S.** Multidrug resistance - A sign of times. *N Engl J Med* 1998;338:1376-8.
- (29) **Drlica K.** The mutant selection window and antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother* 2003 Jul 1;52(1):11-7.
- (30) **Jacobs MR.** Optimisation of antimicrobial therapy using pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters. *Clin Microbiol Infect* 2001;7(11):589-96.
- (31) **Wise R.** Maximizing efficacy and reducing the emergence of resistance. *J Antimicrob Chemother* 2003 May 1;51(suppl 1):37-42.
- (32) **Lomovskaya O, Watkins W.** Inhibition of efflux pumps as a novel approach to combat drug resistance in bacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2001;3(2):225-36.
- (33) **Hendricks O, Butterworth T, Kristiansen J.** The in-vitro antimicrobial effect of non-antibiotics and putative inhibitors of efflux pumps on *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents* 2003;22:262-4.
- (34) **Chevalier J, Bredin J, Mahamoud A, Mallea M, Barbe J, Pages JM.** Inhibitors of antibiotic efflux in resistant *Enterobacter aerogenes* and *Klebsiella pneumoniae* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2004 Mar 1;48(3):1043-6.
- (35) **Bohnert JA, Kern WV.** Selected arylpiperazines are capable of reversing multidrug resistance in *Escherichia coli* overexpressing RND efflux pumps. *Antimicrob Agents Chemother* 2005 Feb 1;49(2):849-52.
- (36) **Kriengkauykiat J, Porter E, Lomovskaya O, Wong-Beringer A.** Use of an efflux pump inhibitor to determine the prevalence of efflux pump-mediated fluoroquinolone resistance and multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005 Feb 1;49(2):565-70.

- (37) **Bean DC, Wareham DW.** Paradoxical effect of 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine on resistance to tetracyclines in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2009 Feb 1;63(2):349-52.
- (38) **Coban AY.** Effect of efflux pump inhibitor 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine to MIC values of ciprofloxacin in ciprofloxacin resistant gram-negative bacteria. *Mikrobiyol Bul* 2009;43(3):457-61.
- (39) **Kern WV, Steinke P, Schumacher A, Schuster S, Baum Hv, Bohnert JA.** Effect of 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine, a novel putative efflux pump inhibitor, on antimicrobial drug susceptibility in clinical isolates of *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 2006 Feb;57(2):339-43.
- (40) **Schumacher A, Steinke P, Bohnert JA, Akova M, Jonas D, Kern WV.** Effect of 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine, a novel putative efflux pump inhibitor, on antimicrobial drug susceptibility in clinical isolates of Enterobacteriaceae other than *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 2006 Feb;57(2):344-8.
- (41) **Van Bambeke F, Glupczynski Y, Plésiat P, Pechere JC, Tulkens PM.** Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. *J Antimicrob Chemother* 2003 May 1;51(5):1055-65.
- (42) **Van Bambeke F.** Inhibitors of bacterial efflux pumps as adjuvants in antibacterial therapy and diagnostic tools for detection of resistance by efflux. *Frontiers in Anti-Infective Drug Discovery* 2010;1:138-75.
- (43) **Mark L.** Modulation of antibiotic efflux in bacteria. *Curr Med Chem- Anti-Infective Agents* 2002;1:35-54.
- (44) **Lomovskaya O, Hostian K.** Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic- A vision for applied use. *Biochem Pharmacol* 2006;71(7):910-8.
- (45) **CLSI.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; nineteenth informational supplement. CLSI document M100-S19. Wayne, Pennsylvania, USA: Clinical Laboratory Standard Institute; 2009.
- (46) **Szybalski W, Bryson V.** Genetic studies on microbial cross resistance to toxic agents. 1. Cross resistance of *Escherichia coli* to 15 antibiotics. *J Bacteriol* 1952;64:489-99.
- (47) **Prescott JF.** Resistencia a fármacos antimicrobianos y su epidemiología. In: Prescott JF, Baggot JD, Walker RD, editors. *Terapéutica antimicrobiana*. Tercera Edición ed. Buenos Aires: Editorial Intermédica; 2002. p. 22-40.
- (48) **Cantón R, Ruiz-Garbajosa P.** Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes. *Curr Opin Pharmacol* 2011 Oct;11(5):477-85.

- (49) **Tenover FC.** Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Med* 2006 Jun;119(6, Supplement 1):S3-S10.
- (50) **Martinez JL, Baquero F.** Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2000 Jul 1;44(7):1771-7.
- (51) **Dzidic S, Suskovic J, Kos B.** Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. *Food Technol Biotechnol* 2008;46(1):11-21.
- (52) **Marchetti ML, Errecalde J, Mestorino N.** Resistencia bacteriana a los antimicrobianos ocasionada por bombas de eflujo. Impacto en la multirresistencia. *Analecta Vet* 2011;31(2):40-53.
- (53) **Joklik WK, Zinsser H.** *Microbiología. Médica Panamericana*; 1994.
- (54) **Wright G.** Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. *Adv Drug Delivery Rev* 2005 Jul 29;57(10):1451-70.
- (55) **Zapun A, Contreras-Martel C, Vernet T.** Penicillin-binding proteins and betalactam resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2008;32(2):361-85.
- (56) **Odonkor S, Addo K.** Bacteria resistance to antibiotics: Recent trends and challenges. *Int J Biol Med Res* 2011;2(4):1204-10.
- (57) **Mingeot-Leclercq MP, Glupczynski Y, Tulkens PM.** Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1999 Apr 1;43(4):727-37.
- (58) **Allignet J, el Solh N.** Diversity among the gram-positive acetyltransferases inactivating streptogramin A and structurally related compounds and characterization of a new staphylococcal determinant, vatB. *Antimicrob Agents Chemother* 1995 Sep 1;39(9):2027-36.
- (59) **Giedraitiene A, Vitkauskiene R, Naginiene R, Pavilonis A.** Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina (Kaunas)* 2011;47(3):137-46.
- (60) **Livermore DM.** Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995 Oct 1;8(4):557-84.
- (61) **Stefan S, Elisabeth C.** Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Vet Res* 2001 May;32(3-4):201-25.
- (62) **Velazquez.** *Farmacología básica y clínica. Editorial Medica Panamericana Sa de*; 2009.
- (63) **Scatamburlo Moreira MA, Chartone de Souza E, Alencar de Moraes c.** Multidrug efflux systems in Gram-negative bacteria. *Braz J Microbiol* 2004;35:19-28.

- (64) **Thanassi D, Cheng L, Nikaido H.** Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. J Bacteriol 1997;179:2512-8.
- (65) **Lynch S.** Efflux systems in bacterial pathogens: An opportunity for therapeutic intervention? An industry view. Biochem Pharmacol 2006 Mar 30;71(7):949-56.
- (66) **Poole K.** Efflux-mediated antimicrobial resistance. J Antimicrob Chemother 2005 Jul;56(1):20-51.
- (67) **Paulsen I, Brown M, Skurray R.** Proton-dependent multidrug efflux systems. FEMS Microbiol Rev 1996;60:575-608.
- (68) **van Veen HW, Konings WN.** The ABC family of multidrug transporters in microorganisms. Biochim Biophys Acta (BBA) - Bioenergetics 1998 Jun 10;1365(1-2):31-6.
- (69) **Aeschlimann JR.** The role of multidrug efflux pumps in the antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria. Insights from the Society of Infectious Diseases Pharmacists. Pharmacother 2003;23(7):916-24.
- (70) **Nikaido H.** Structure and mechanism of RND-type multidrug efflux pumps. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol 2011;77:1-60.
- (71) **Saier MH, Paulsen IT, Sliwinski MK, Pao SS, Skurray RA, Nikaido H.** Evolutionary origins of multidrug and drug-specific efflux pumps in bacteria. The FASEB Journal 1998 Mar 1;12(3):265-74.
- (72) **Okusu H, Ma D, Nikaido H.** AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants. J Bacteriol 1996 Jan 1;178(1):306-8.
- (73) **Yamaha H, Kurose-Hamada S, Fukuda Y, Mitsuyama J, Takahata M, Minami S, et al.** Quinolone susceptibility of norA-disruptes *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 1997;41:2308-9.
- (74) **Courvalin P.** Transfer of antibiotic resistance genes between gram-positive and gram-negative bacteria. Antimicrob Agents Chemother 1994;38:1447-51.
- (75) **Sorum H, Sunde M.** Resistance to antibiotics in the normal flora of animals. Vet Res 2001 May;32(3-4):227-41.
- (76) **Martínez J.** Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. Science 2008 Jul 18;321(5887):365-7.
- (77) **Finegold S, Sutter V, Maticen G.** Normal indigenous intestinal flora. In: Hentges D, editor. Human intestinal microflora in health and disease. New York: Academic Press; 1983.

- (78) **Barza M, Travers K.** Excess infections due to antimicrobial resistance: the "attributable fraction". *Clin Infect Dis* 2002;34:126-30.
- (79) **Alekshun MN, Levy SB.** Commensals upon us. *Biochemical Pharmacology* 2006 Mar 30;71(7):893-900.
- (80) **Levy S.** Emergence of antibiotic-resistance bacteria in the intestinal flora of farm inhabitants. *J Infect Dis* 1978;137:689-90.
- (81) **Brooks G, Butel J, Morse S.** *Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*. 18a ed. México: 2005.
- (82) **Brooks G, Butel J, Morse S.** Bacilos entéricos gramnegativos (*Enterobacteriaceae*). *Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*, 17ª edición. Mexico, D.F.: 2002. p. 269-83.
- (83) **Davis BD, Eisen HN, Ginsberg HS, Dulbecco R.** *Tratado de Microbiología*. 4 ed. Másson; 1996.
- (84) **Blake DP, Hillman K, Fenlon DR, Low JC.** Transfer of antibiotic resistance between commensal and pathogenic members of the *Enterobacteriaceae* under ileal conditions. *Journal of Applied Microbiology* 2003;95(3):428-36.
- (85) **Lewis K, Salyers A, Taber H, Wax R.** *Bacterial resistance to antimicrobials*. New York: 2002.
- (86) **Van Bambeke F, Glupczynski Y, Plésiat P, Pechere JC, Tulkens PM.** Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. *J Antimicrob Chemother* 2003 May 1;51(5):1055-65.
- (87) **San Martín B, Campos L, Bravo V, Adasne M, Borie C.** Evaluation of antimicrobial resistance using indicator bacteria isolated from pigs and poultry in Chile. *International Journal Applied Research in Veterinary Medicine* 2005;3(2):171-8.
- (88) **Bywater R, Deluyker H, Deroover E, de Jong A, Marion H, McConville M, et al.** A European survey of antimicrobial susceptibility among zoonotic and commensal bacteria isolated from food-producing animals. *J Antimicrob Chemother* 2004 Oct;54(4):744-54.
- (89) **Knezevic P, Petrovic O.** Antibiotic resistance of commensal *Escherichia coli* of food-producing animals from three Vojvodinian farms, Serbia. *Int J Antimicrob Agents* 2008 Apr;31(4):360-3.
- (90) **Lim SK, Lee HS, Nam HM, Cho YS, Kim JM, Song SW, et al.** Antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* strains isolated from fecal samples of cattle and pigs in Korea during 2003-2004. *Int J Food Microbiol* 2007 May 10;116(2):283-6.

- (91) **European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control.** The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in the European Union in 2009. European Food Safety Authority Journal 2011;9(7):2154.
- (92) **European Centre for Disease Prevention and Control.** Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2010. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). 2011.
- (93) **DANMAP 2010.** Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark. 2011. Report No.: 14.
- (94) **NORM/NORM-VET 2010.** Usage of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in Norway. 2011.
- (95) **EARSS 2008.** EARSS Annual Report 2008. On-going surveillance of *S. Pneumoniae*, *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*. 2009.
- (96) **SVARM 2010.** Swedish veterinary antimicrobial resistance monitoring. 2011.
- (97) **Durlach R, del castillo M.** Epidemiología y control de infecciones en el hospital. Primera ed. Buenos Aires, Argentina: 2006.
- (98) **Acar J, Moulin G.** Antimicrobial resistance at farm level. Revue scientifique et technique (Int Off Epiz) 2006;25(2):775-92.
- (99) **Mestorino N.** Uso racional de antimicrobianos en animales de compañía. 2003.
- (100) **Organización Mundial de la Salud (OMS).** Uso racional de los medicamentos por prescriptores y pacientes. CONSEJO EJECUTIVO EB115/40. 115ª reunión. Punto 4.14 del orden del día provisional. 2004.
- (101) **Errecalde J.** Bioequivalencia, ensayos de fármacos "*in vitro*" e "*in vivo*". Boletín del Centro de Estudios del Desarrollo de la Industria Químico-Farmacéutica Argentina 1988;29:5-10.
- (102) **Errecalde J.** Documento sobre productos genéricos. Boletín técnico Pfizer Sanidad Animal 1994;176:1-6.
- (103) **Errecalde J.** Documento sobre productos genéricos. Boletín técnico Pfizer Sanidad Animal 1995;180:1-5.
- (104) **Craig W.** Pharmacokinetic-pharmacodynamic parameters: rationale for antibiotic use in mice and men. Clin Infect Dis 1998;26:1-12.

- (105) **McKellar QA, Sanchez Bruni SF, Jones DG.** Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships of antimicrobial drugs used in veterinary medicine. *J Vet Pharmacol Ther* 2004;27(6):503-14.
- (106) **Beltrán B.** Farmacocinética y farmacodinamia de antimicrobianos: Utilidad práctica. *Rev Chilena Infectol* 2004;21:39-44.
- (107) **Craig WA.** The role of pharmacodynamics in effective treatment of community-acquired pathogens. *Proceedings Symposium at the 39th Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America* 2002;2:126-34.
- (108) **NCCLS.** Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents M26-A; Approved Guideline. Wayne, Pennsylvania, USA: 1999.
- (109) **Odenholt-Tornqvist Y, Lowdin E, Cars O.** Postantibiotic sub-MIC effects of vancomycin, roxithromycin, sparfloxacin and amikacin. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36(9):1852-8.
- (110) **Andes D.** Animal model pharmacokinetics and pharmacodynamics: a critical review *Int J Antimicrob Ag* 2002;261-7.
- (111) **Craig WA.** Does the Dose Matter? *Clin Infect Dis* 2001 Sep 15;33(Supplement 3):S233-S237.
- (112) **Burgess DS.** Pharmacodynamic Principles of Antimicrobial Therapy in the Prevention of Resistance*. *Chest* 1999 Mar 1;115(suppl 1):19S-23S.
- (113) **Santos Filho L, Kuti JL, Nicolau DP.** Employing pharmacokinetic and pharmacodynamic principles to optimize antimicrobial treatment in the face of emerging resistance. *Braz J Microbiol* 2007;38:183-93.
- (114) **Drlica K, Zhao X.** Mutant Selection Window Hypothesis Updated. *Clin Infect Dis* 2007 Mar 1;44(5):681-8.
- (115) **Sanchez Díaz P.** Sistemas MDR y resistencia a los antimicrobianos. *Rev Esp Quimioter* 2003;16(2):172-87.
- (116) **Li XZ, Nikaido H.** Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria: An Update. *Drugs NIHPA Author Manuscript* 2009;69(12).
- (117) **Nikaido H, Takatsuka Y.** Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. *BBA-Proteins Proteom* 2009 May;1794(5):769-81.
- (118) **Chopra I, Roberts M.** Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *MicrobiolMol Biol R* 2001 Jun 1;65(2):232-60.

- (119) **García Alvarez L, Oteo JA.** Efectos no antimicrobianos de las tetraciclinas. *Rev Esp Quimioter* 2010;23(1):4-11.
- (120) **Michalova E, Novotna P, Schelegelova J.** Tetracyclines en veterinary medicine and bacterial resistance to them. *Vet MedCzech* 2004;49(3):79-100.
- (121) **Bergoglio J, Bergoglio RM.** Antibióticos. 5 ed. Editorial Médica Panamericana; 1993.
- (122) **Mestorino N, Landoni F, Errecalde J.** Tetraciclinas: Aspectos farmacológicos. *Therios* 1989;62:118.
- (123) **Chopra I, Hawkey PM, Hinton M.** Tetracyclines, molecular and clinical aspects. *J Antimicrob Chemother* 1992 Mar 1;29(3):245-77.
- (124) **Fluit AC, Visser MR, Schmitz FJ.** Molecular Detection of Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev* 2001 Oct 1;14(4):836-71.
- (125) **Salyers AA, Speer BS, Shoemaker NB.** New perspectives in tetracycline resistance. *Mol Microbiol* 1990;4(1):151-6.
- (126) **Roberts M.** Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiol Rev* 1996;19(1):1-24.
- (127) **Leyva S, Leyva E.** Fluoroquinolonas. Mecanismos de acción y resistencia, estructura, síntesis y reacciones fisicoquímicas importantes para propiedades medicinales. *Bol Soc Quim Mex* 2008;2(1):1-13.
- (128) **Otero J, Mestorino N, Errecalde J.** Enrofloxacin: Una fluoroquinolona de uso exclusivo en Medicina Veterinaria. Parte I: química, mecanismos de acción, actividad antimicrobiana y resistencia bacteriana. *Analecta Vet* 2001;21:31-41.
- (129) **Otero J, Mestorino N, Errecalde J.** Enrofloxacin una fluoroquinolona de uso exclusivo en veterinaria Parte II: Farmacocinética y toxicidad. *Analecta Vet* 2001;21(1):42-9.
- (130) **Jacoby GA.** Mechanisms of Resistance to Quinolones. *Clin Infect Dis* 2005 Jul 15;41(Supplement 2):S120-S126.
- (131) **Ruiz J.** Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J Antimicrob Chemother* 2003 May 1;51(5):1109-17.
- (132) **Luzzaro F.** Fluoroquinolones and Gram-negative bacteria: Antimicrobial activity and mechanisms of resistance. *Infez Med* 2008;16(2):5-11.
- (133) **Poole K.** Efflux mediated resistance to fluoroquinolones in Gram negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44(9):2233-41.

- (134) **Mestorino N, Errecalde J.** Cloranfenicol-Tianfenicol: Aspectos farmacológicos. *Med Vet* 1990;71:178-84.
- (135) **Mestorino N, Pesoa J, Turic E, Errecalde J.** Florfenicol: Aspectos farmacológicos. *Vet Arg* 1999;16(152):127-39.
- (136) **Park BK, Lim JH, Kim MS, Hwang YH, Yun HI.** Pharmacokinetics of florfenicol and its metabolite, florfenicol amine, in dogs. *ResVet Sci* 2008 Feb;84(1):85-9.
- (137) **GoodmanG, Goodman LS, Gilman A, Brunton LL, Pinto JRB, Lazo JS, et al.** Las bases farmacológicas de la terapéutica. McGraw-Hill; 2007.
- (138) **Shukla P, Bansode F, Singh R.** Chloramphenicol toxicity: A review. *J Med Med Sci* 2011;2(13):1313-6.
- (139) **Paape, M.J., Miller RH.** Effects of florfenicol, thiamphenicol and chloramphenicol on phagocytosis, chemiluminescence and morphology of bovine polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *J Dairy Sci* 1990;73:1744-34.
- (140) **Schwartz S, Kehrenberg C, Doublet B, Cloeckaert A.** Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol Rev* 2004;28:519-42.
- (141) **Syriopoulou VP, Harding AL, Goldman DA, Smith AL.** *In vitro* antibacterial activity of fluorinated analogs of chloramphenicol and thiamphenicol. *Antimicrob Agents Chemother* 1981;19:294-7.
- (142) **Braibant M, Chevalier J, Chalus-Dancla E, Pages J, Cloeckaert A.** Structural and functional study of the phenicol-specific efflux pump FloR belonging to the Mayor Facilitator Superfamily. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49(7):2965-71.
- (143) **McMurry LM, George AM, Levy SB.** Active efflux of chloramphenicol in susceptible *Escherichia coli* strains and in Multiple-Antibiotic-Resistant (Mar) mutants. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38(3):542-6.
- (144) **HardmanJ, Goodman Gilman A, Limbird E.** Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 9 ed. United States of America: 1995.
- (145) **Marín M, Gudiol F.** Antibióticos betalactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003;21(1):42-55.
- (146) **Suárez C, Gudiol F.** Antibióticos betalactámicos. *Microbiología Clínica* 2009;27(2):116-29.
- (147) **Mohanty S, Singhal R, Sood S, Dhawan B, Das B, Kapil A.** Comparative *in vitro* activity of beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combinations against Gram negative bacteria. *Indian J Med Res* 2005;122:425-8.

- (148) **Li XZ, Zhang L, Srikumar R, Poole K.** beta -lactamase inhibitors are substrates for the multidrug efflux pumps of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998 Feb 1;42(2):399-403.
- (149) **Nakae T, Nakajima A, Ono T, Saito K, Yoneyama H.** Resistance to beta -lactam antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* due to interplay between the mexab-oprm efflux pump and beta -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 1999 May 1;43(5):1301-3.
- (150) **Másuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T.** Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000 Dec 1;44(12):3322-7.
- (151) **Lomovskaya O, Lee A, Hoshino K, Ishida H, Mistry A, Warren MS, et al.** Use of a genetic approach to evaluate the consequences of inhibition of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999 Jun 1;43(6):1340-6.
- (152) **Oethinger M, Kern W, Jellen-Ritter A, McMurry L, Levy S.** Ineffectiveness of topoisomerase mutations in mediating clinically significant fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* in the absence of the AcrAB efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44(1):10-3.
- (153) **Pages J, aral L.** Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: Challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* 2009;1794:826-33.
- (154) **Zechini B, Versace I.** Inhibitors of multidrug resistance efflux systems in bacteria. *Recent Pat Anti-Infect Drug Discov* 2009;4:37-50.
- (155) **Hannula M, Hanninen ML.** Effect of putative efflux pump inhibitors and inducers on the antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J Med Microbiol* 2008 Jul 1;57(7):851-5.
- (156) **Randall L, Ridley A, Cooles S, Sharma A, Pumbwe L, Newell D, et al.** Prevalence of multiple antibiotic resistance in 443 *Campylobacter* spp. isolated from humans and animals. *J Antimicrob Chemother* 2003;52:507-10.
- (157) **Lin J, Martinez A.** Effect of efflux pump inhibitors on bile resistance and in vivo colonization of *Campylobacter jejuni*. *J Antimicrob Chemother* 2006;58:966-72.
- (158) **Hasdemir U, Chevalier J, Nordmann P.** Detection and prevalence of active drug efflux mechanism in various multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from Turkey. *J Clin Microbiol* 2004;42:2701-6.
- (159) **Thorrold C, Letsoalo M, Dusé A, Marais E.** Efflux pump activity in fluoroquinolone and tetracycline resistant *Salmonella* and *E. coli* implicated in reduced susceptibility to household antimicrobial cleaning agents. *Int J Food Microbiol* 2007;113:315-20.

- (160) **Elkins CA, Nikaido H.** Substrate specificity of the RND-type multidrug efflux pumps AcrB and AcrD of *Escherichia coli* determined predominately by two large periplasmic loops. J Bacteriol 2002 Dec 1;184(23):6490-8.
- (161) **Oliveros Rodríguez H.** Diseños de estudios clínicos y epidemiológicos. ACORL 2008;36:145-54.
- (162) **Levin KA.** Study design III: Cross-sectional studies. Evid Based Dent 2006;7(1):24-5.
- (163) **Aurazo de Zumaeta M.** Manual para analisis básicos de calidad del agua de bebida. Lima, Perú: 2004.
- (164) **OIE.** Collection and shipment of diagnostic specimens. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 6th edition.Paris, France: Office International des Epizooties; 2008.
- (165) **OIE.** Collection and shipment of diagnostic specimens. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 5th edition.Paris, France: Office International des Epizooties; 2004.
- (166) **Sayah R, Kaneene J, Johnson Y, Miller R.** Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic- and wild-animal fecal samples, human septage, and surface water. Appl Environ Microbiol 2005;71:1394-404.
- (167) **CLSI.** Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard-third edition.CLSI document M31-A3. Wayne, Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
- (168) **Galas M, Ceriana P.** Determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos por método de difusión. Manual de procedimientos y control calidad. 2001.
- (169) **Bergey D, Holt J.** Bergey's manual of determinative bacteriology. 9 ed. Baltimore, USA: 1994.
- (170) **Garcia Rodriguez JA, Cantón R, Garcial Sanches JE, Gomez Lus ML, Martinez Martinez L, Rodriguez Avial C, et al.** Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad de los antimicrobianos. In: Picaso JJ, editor. Procedimientos en microbiología clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. SEIMC. 1 ed ed. España: 2000.
- (171) **NCCLS.** Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard-second edition.NCCLS document M31-A2. Wayne, Pennsylvania, USA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 2002.

- (172) **CLSI.** Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that growth aerobically; approved standard-seventh edition. CLSI document M7-A/. Wayne, Pennsylvania, USA: 2006.
- (173) **CLSI.** Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that growth aerobically; approved standard-eight edition. CLSI document M7-A8/. Wayne, Pennsylvania, USA: 2009.
- (174) **Cohen SP, Hächler H, Levy SB.** Genetic and functional analysis of the multiple antibiotic resistance (*mar*) locus in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1993 Mar 1;175(5):1484-92.
- (175) **George AM, Levy SB.** Amplifiable resistance to tetracycline, chloramphenicol, and other antibiotics in *Escherichia coli*: involvement of a non-plasmid-determined efflux of tetracycline. *J Bacteriol* 1983 Aug 1;155(2):531-40.
- (176) **Paixao L, Rodrigues L, Couto I, Martins M, Fernandes P, Carvalho C, et al.** Florometric determination of ethidium bromide efflux kinetics in *Escherichia coli*. *J Biol Eng* 2009;3(18).
- (177) **Nicoloff H, Perreten V, McMurry L, Levy S.** Role for tandem duplication and *lon* protease in AcrAB-TolC- dependent Multiple Antibiotic Resistance (*Mar*) in an *Escherichia coli* mutant without mutations in *marRAB* or *acrRAB*. *J Bacteriol* 2006 Jun 15;188(12):4413-23.
- (178) **Nicoloff H, Perreten V, Levy SB.** Increased Genome Instability in *Escherichia coli lon* Mutants: Relation to Emergence of Multiple-Antibiotic-Resistant (*Mar*) Mutants Caused by Insertion Sequence Elements and Large Tandem Genomic Amplifications. *Antimicrob Agents Chemother* 2007 Apr 1;51(4):1293-303.
- (179) **Firsov A, Chernykh V, Navashin S.** Quantitative analysis of antimicrobial effect kinetics in an in vitro dynamic model. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34(7):1312-7.
- (180) **Firsov A, Zinner S.** Use of modeling techniques to aid in antibiotic selection. *Curr Infec Dis Rep* 2001 Feb 1;3(1):35-43.
- (181) **Mestorino N, Marchetti L, Turic E, Pessoa J, Errecalde J.** Concentrations of danofloxacin 18% solution in plasma, milk and tissues after subcutaneous injection in dairy cows. *Anal Chim Acta* 2009;637:33-9.
- (182) **Mestorino N, Marchetti L, Daniele M, Errecalde J.** Modelización farmacocinética/farmacodinámica de un nuevo formulado a base de oxitetraciclina en bovinos. 2007. Proceeding XVII Jornadas Argentinas y XII Jornadas Latinoamericanas de Fármaco-Toxicología Veterinaria. FCV. Universidad nacional de la Pampa. General Pico, La Pampa

- (183) **Mestorino N, Daniele M, Lamberti J, Errecalde J.** Bioequivalencia de dos formulaciones a base de florfenicol. 2004. Proceeding XIX Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Buenos Aires, Argentina.
- (184) **Snyder L, Kirkland J, Glajch J.** Practical HPLC method development. 2nd Edition, New York, John Wiley & Sons, Inc. 1997.
- (185) **Baggot JD.** Principios de farmacología clínica veterinaria. Acibia, Editorial, S.A.; 1986.
- (186) **Bramley AJ.** Machine milking and lactation. Insight Books; 1992.
- (187) **Chikwendu C, Nwabueze R, Anyanwu B.** Antibiotic resistance profile of *Escherichia coli* from clinically healthy pigs and their commercial farm environments. Afr J Microbiol Res 2008;2:012-7.
- (188) **Anderson MA, Whitlock JE, Harwood VJ.** Diversity and distribution of *Escherichia coli* genotypes and antibiotic resistance phenotypes in feces of humans, cattle, and horses. Appl Environ Microbiol 2006 Nov;72(11):6914-22.
- (189) **Sawant A, Hegde N, Straley B, Donaldson S, Love B, Knabel S, et al.** Antimicrobial-resistant enteric bacteria from dairy cattle. Appl Environ Microbiol 2007 Jan;73(1):156-63.
- (190) **Teshager T, Herrero I, Porrero M, Garde J, Moreno M.** Surveillance of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* strains isolated from pigs at Spanish slaughterhouses. Int J Antimicrob Agents 2000;15:137-42.
- (191) **Bauer A, Kirby M, Sherris J, Turck M.** Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. Am J Clin Pathol 1996;45:493-6.
- (192) **San Martín B, Bravo V, Borie C.** Evaluación de la resistencia antimicrobiana en ganado bovino en Chile, utilizando *E. coli* como bacteria indicadora. Arch Med Vet 2005;37:117-23.
- (193) **Kijima-Tanaka M, Ishihara K, Morioka A, Kojima A, Ohzono T, Ogikubo K, et al.** A national surveillance of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from food-producing animals in Japan. J Antimicrob Chemother 2003 Feb 1;51(2):447-51.
- (194) **Minas A, Petridou E, Bourtzi-Chatzopoulou E, Papaioannou A, Krikelis V, Georgatza K, et al.** Antibiotic resistance in indicator bacteria isolated from cattle and swine in Greece. 2007;6(3):317-22. J Anim Vet Adv
- (195) **Pantozzi F, Moredo F, Vigo G, Giacoboni G.** Resistencia a los antimicrobianos en bacterias indicadoras y zoonóticas aisladas de animales domésticos en Argentina. Rev Arg Microbiol 2010;42:49-52.

- (196) **Torres C, Zarazaga M.** Antibióticos como promotores del crecimiento en animales: ¿Vamos por el buen camino? *Gaceta Sanitaria* 2002;16:109-12.
- (197) **Vieira A, Houe H, Wegener H, Lo Fo Wong D, Emborg H.** Association between tetracycline consumption and tetracycline resistance in *Escherichia coli* from healthy Danish slaughter pigs. *Foodborne Pathog Dis* 2009;6(1):99-109.
- (198) **European Medicines Agency.** Trends in the sales of veterinary antimicrobial agents in nine European countries (2005-2009). (EMA/238630/2011). 2011.
- (199) **Eliopoulos GM, Eliopoulos GM, Roberts MC.** Tetracycline Therapy: Update. *Clin Infect Dis* 2003 Feb 15;36(4):462-7.
- (200) **Johnson R, Adams J.** The ecology and evolution of tetracycline resistance. *Tree* 1992;7(9):295-8.
- (201) **Government of Canada.** Canadian integrated program for antimicrobial resistance surveillance (CIPAR) 2007. Guelph, ON: Public Health Agency of Canada. 2010.
- (202) **Navarro F, Miró E, Mirelis B.** Lectura interpretativa del antibiograma de enterobacterias. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002;20:225-34.
- (203) **Babic M, Hujer A, Bonomo R.** What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug Resistance Updates* 2006;9:142-56.
- (204) **Brown SA, Chester ST, Speedy AK, Hubbard VL, Callahan JK, Hamlow PJ, et al.** Comparison of plasma pharmacokinetics and bioequivalence of ceftiofur sodium in cattle after a single intramuscular or subcutaneous injection. *J Vet Pharmacol Ther* 2000;23(5):273-80.
- (205) **Mestorino N, Errecalde J.** Determinación de las concentraciones lácteas de ceftiofur tras su administración intramuscular en vacas en lactancia. *Revista del Colegio de Veterinarios de la Provincia de Buenos Aires* 33, 39-43. 2005. Magazine Article
- (206) **Oliver SP, Gillespie BE, Headrick SJ, Moorehead H, Lunn P, Dowlen HH, et al.** Efficacy of extended ceftiofur intramammary therapy for treatment of subclinical mastitis in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2004 Aug;87(8):2393-400.
- (207) **Smith G, Gehring R, Riviera J, Yealts J, Baynes R.** Elimination kinetics of ceftiofur hydrochloride after intramammary administration in lactating dairy cows. *J Am Vet Med Assoc* 2004;224(11):1827-30.
- (208) **Singer R, Patterson S, Wallace R.** Effects of therapeutic ceftiofur administration to dairy cattle on *Escherichia coli* dynamics in the intestinal tract. *Appl Environ Microbiol* 2008;74(22):6956-62.

- (209) **Daniels JB, Call DR, Hancock D, Sischo WM, Baker K, Besser TE.** Role of ceftiofur in selection and dissemination of bla_{CMY-2}-mediated cephalosporin resistance in *Salmonella enterica* and commensal *Escherichia coli* isolates from cattle. *Appl Environ Microbiol* 2009 Jun 1;75(11):3648-55.
- (210) **Tragesser L, Wittum T, Funk J, Winokur P, Rajala-Schultz P.** Association between ceftiofur use and isolation of *Escherichia coli* with reduced susceptibility to ceftriaxone from fecal samples of dairy cows. *American Journal of Veterinary Research* 2006 Oct 1;67(10):1696-700.
- (211) **Doyle M, Loneragan G, Scott H, Singer R.** Antimicrobial resistance: challenges and perspectives. *Compr Rev Food Sci F2013 Mar 1;12(2):234-48.*
- (212) **Belmar-Liberato R, Gonzalez-Canga A, Tamame-Martin P, Escribano-Salazar M.** Amoxicillin and amoxicillin-clavulanic acid resistance in veterinary medicine - the situation in Europe: a review. *Vet Med* 2011;56(10):473-85.
- (213) **Rolinson G.** A review of the microbiology of amoxycillin/clavulanic acid over the 15 year period 1978-1993. *J Chemother* 1994;6(5):283-318.
- (214) **White D, Hudson C, Maurer J, Ayers S, Zhao S, Lee M, et al.** Characterization of chloramphenicol and florfenicol resistance in *Escherichia coli* associated with bovine diarrhea. *J Clin Microbiol* 2000;38(12):4593-8.
- (215) **Lang KS, Anderson JM, Schwarz S, Williamson L, Handelsman J, Singer RS.** Novel florfenicol and chloramphenicol resistance gene discovered in alaskan soil by using functional metagenomics. *Appl Environ Microbiol* 2010 Aug 1;76(15):5321-6.
- (216) **Bischoff K, White D, McDermott P, Zhao S, Gaines S, Maurer J, et al.** Characterization of chloramphenicol resistance in beta-hemolytic *Escherichia coli* associated with diarrhea in neonatal swine. *J Clin Microbiol* 2002 Feb 1;40(2):389-94.
- (217) **Ma D, Alberti M, Lynch C, Nikaido H, Hearst J.** The local repressor AcrR plays a modulating role in the regulation of *acrAB* genes of *Escherichia coli* by global stress signals. *Molecular Microbiology* 1996;19(1):101-12.
- (218) **Putman M, van Veen H, Konings W.** Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000;64:672-93.
- (219) **Piddock L.** Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. *Clin Microbiol Rev* 2006 Apr 1;19(2):382-402.
- (220) **Mazzariol A, Cornaglia G, Nikaido H.** Contributions of the AmpC beta -Lactamase and the AcrAB multidrug efflux system in intrinsic resistance of *Escherichia coli* K-12 to beta -lactams. *Antimicrob Agents Chemother* 2000 May 1;44(5):1387-90.

- (221) **Li XZ, Ma D, Livermore DM, Nikaido H.** Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: active efflux as a contributing factor to beta-lactam resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38(8):1742-52.
- (222) **Bertani G.** Studies on lysogenesis. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1951;62:293-300.
- (223) **Luria S, Burrous J.** Hybridization between *Escherichia coli* and Shigella. *J Bacteriol* 1957;74:461-76.
- (224) **Sezonov G, Joseleau-Petit D, D'Ari R.** *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *J Bacteriol* 2007 Dec 1;189(23):8746-9.
- (225) **Nikaido E.** The limitations of LB medium. Small things considered. *The Microbe Blog ASM* 2009.
- (226) **Lomovskaya O, Warren MS, Lee A, Galazzo J, Fronko R, Lee M, et al.** Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2001 Jan 1;45(1):105-16.
- (227) **Pannek S, Higgins PG, Steinke P, Jonas D, Akova M, Bohnert JA, et al.** Multidrug efflux inhibition in *Acinetobacter baumannii*: comparison between 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenyl-arginine- β -naphthylamide. *J Antimicrob Chemother* 2006 May;57(5):970-4.
- (228) **Li XZ, Livermore DM, Nikaido H.** Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to tetracycline, chloramphenicol, and norfloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38(8):1732-41.
- (229) **Bina XR, Philippart JA, Bina JE.** Effect of the efflux inhibitors 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenyl-arginine- β -naphthylamide on antimicrobial susceptibility and virulence factor production in *Vibrio cholerae*. *J Antimicrob Chemother* 2009 Jan 1;63(1):103-8.
- (230) **Eliopoulos GM, Huovinen P.** Resistance to Trimethoprim-Sulfamethoxazole. *Clin Infect Dis* 2001 Jun 1;32(11):1608-14.
- (231) **Köhler T, Kok M, Michea-Hamzehpour M, Plesiat P, Gotoh N, Nishino T, et al.** Multidrug efflux in intrinsic resistance to trimethoprim and sulfamethoxazole in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996 Oct 1;40(10):2288-90.
- (232) **Loewe S.** The problem of synergism and antagonism of combined drugs. *Arzneim-Forsch* 1953;3:285-90.

- (233) **Meletiadis J, Pournaras S, Roilides E, Walsh TJ.** Defining fractional inhibitory concentration index cutoffs for additive interactions based on self-drug additive combinations, Monte Carlo simulation analysis, and in vitro-in vivo correlation data for antifungal drug combinations against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010 Feb 1;54(2).
- (234) **Berenbaum M.** A method for testing for synergy with any number of agents. *J Infect Dis* 1978;137(2):122-30.
- (235) **Te Dorsthorst D, Verweij P, Meis J, Punt N, Mouton J.** Comparison of Fractional Inhibitory Concentration Index with response surface modeling for characterization of in vitro interaction of antifungals against itraconazole-susceptible and -resistant *Aspergillus fumigatus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2002 Mar 1;46(3):702-7.
- (236) **Choi M, Lee E, Lee S, Reza M, Lee J, Gebru E, et al.** The *in vitro* antibacterial activity of florfenicol in combination with amoxicillin or cefuroxime against pathogenic bacteria of animal origin. *Pak Vet J* 2011;31(2):141-4.
- (237) **Bharadwaj R, Vidya A, Dewan B, Pal A.** An in vitro study to evaluate the synergistic activity of norfloxacin and metronidazole. *Indian J Pharmacol* 2003;35:220-6.
- (238) **Hernández M, Martínez Mota I, Couto Ramos M, Zuazo Silva J.** Evaluación de la eficacia in vitro e in vivo del tratamiento antimicrobiano combinado por el tablero de damas. *Rev Cubana Farm* 2009;43(2):1-12.
- (239) **Chou T.** Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev* 2006 Sep 1;58(3):621-81.
- (240) **Levison M.** Pharmacodynamics of antimicrobial drugs. *Infect Dis Clin N Am* 2004;18:451-65.
- (241) **Dowling PM.** Rational antimicrobial therapy. *Can Vet J* 1996 Apr;37(4):246-9.
- (242) **Reimer LG, Stratton CW, Reller LB.** Minimum inhibitory and bactericidal concentrations of 44 antimicrobial agents against three standard control strains in broth with and without human serum. *Antimicrob Agents Chemother* 1981 Jun 1;19(6):1050-5.
- (243) **Illambas J, Potter T, Sidhu P, Rycroft A, Cheng Z, Lees P.** Pharmacodynamics of florfenicol for calf pneumonia pathogens. *Vet Rec* 2013;172(13):340.
- (244) **Haritova A, Russenova N.** *In vitro* antibacterial effect of enrofloxacin determined by time killing curves analysis. *Bulgarian J VetMed* 2010;13(4):218-26.
- (245) **Kumar A, Khan I, Koul S, Koul J, Taneja S, Ali I, et al.** Novel structural analogues of piperine as inhibitors of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 2008 Jun 1;61(6):1270-6.

- (246) **Melake N, Mahmoud H, Al-Semary M.** Bactericidal activity of various antibiotics versus tetracycline-loaded chitosan microspheres against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Afr J Microbiol Res 2012;6(25):5387-98.
- (247) **Firsov A, Savarino D, Ruble M, Gilbert D, Manzano B, Medeiros A, et al.** Predictors of effect of ampicillin-sulbactam against TEM-1 beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in an in vitro dynamic model: enzyme activity versus MIC. Antimicrob Agents Chemother 1996;40(3):734-8.
- (248) **Firsov A, Lubenko I, Portnoy Y, Zinner S, Vostrov S.** Relationships of the area under the curve/MIC ratio to different integral endpoints of the antimicrobial effect: Gemifloxacin pharmacodynamics in an *in vitro* dynamic model. Antimicrob Agents Chemother 2001;45(3):927-31.
- (249) **Abd El-Aty A, Goudah A, Abo El-Sooud K, El-Zorba H, Shimoda M, Zhou H.** Pharmacokinetics and bioavailability of florfenicol following intravenous, intramuscular and oral administrations in rabbits. Vet Res Comm 2004;28:515-24.
- (250) **Gutiérrez L, Vargas D, Ocampo L, Sumano H, Martinez R, Tapia G.** Plasma concentrations resulting from florfenicol preparations given to pigs in their drinking water. J Anim Sci 2011 Sep 1;89(9):2926-31.
- (251) **Craig W.** Choosing an antibiotic on the basis of pharmacodynamics. Ear Nose Throat J 1998;77:7-11.
- (252) **Forrest D, Nix D, Ballow C, Goss T, Birmingham M, Schentag J.** Pharmacodynamics of intravenous ciprofloxacin in seriously ill patients. Antimicrob Agents Chemother 1993;37(5):1073-81.
- (253) **Agwuh K, MacGowan A.** Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycylicyclines. J Antimicrob Chemother 2006 Aug 1;58(2):256-65.
- (254) **Snyman M, Naidoo V, de Bruin C, Swan G.** Is the current dose of a conventional oxytetracycline formulation adequate for the management of infections in sheep? J S Afr vet Ass 2008;79(4):171-4.
- (255) **FAO.** Guía de buenas prácticas en explotaciones lecheras. 8 ed. 2012.
- (256) **Kruze J.** La rutina de ordeño y su rol en los programas de control de mastitis bovina. Archivos de medicina veterinaria 1998;30:7-16.
- (257) **Mottram T.** Requirements for teat inspection and cleaning in automatic milking systems. Comput Electron Agric 1997;17(1):63-77.
- (258) **Gleeson D, O'Brien B, Flynn J, O'Callaghan E, Galli F.** La rutina de ordeño y su rol en los programas de control de mastitis bovina. Irish J Agr Res 2009;62(7):461-7.

- (259) **Pankey J, Wildman E, Drechsler P, Hogan J.** Field trial evaluation of premilking teat disinfection. *J Dairy Sci* 1987;70(4):867-72.
- (260) **Galton D.** Effects of premilking udder preparation on bacterial population, sediment, and iodine residue in milk. *J Dairy Sci* 1984;67(11):2580-9.
- (261) **Saran A.** Disinfection in the dairy parlour. *Rev sci tech Off int Epiz* 1995;14(1):207-24.
- (262) **O'Shean J, O'Callaghan E, Meaney W.** Relationship between machine milking and the incidence of mastitis in dairy cows. *Irish J Agr Res* 1979;18(3):225-35.
- (263) **Spencer S.** Recent research and developments in machine milking- A review. *J Dairy Sci* 1989;72:1907-17.
- (264) **Mahle D, Galton D, Adkinson R.** Effects of vacuum and pulsation ratio on udder health. *J Dairy Sci* 1981;65:1252-7.
- (265) **Bramley A.** Evidence of penetration of the bovine teat duct by *Escherichia coli* in the interval between milkings. *J Dairy Res* 1981;48(3):379-86.
- (266) **Taverna M.** Documento Base. Programa Nacional Leches. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). 2010.
- (267) **Ruiz R, Urzainqui Z.** Eficacia del lavado de manos con solución de base alcohólica versus el lavado de manos estándar con jabón antiséptico: ensayo clínico controlado y aleatorizado. *Enfermería Global* 2005;5:1-5.
- (268) **Redway K, Fawdar S.** A comparative study of three different hand drying methods: paper towel, warm air dryer, jet air dryer. School of Biosciences, University of Westminster, London Recuperado de www.europeantissue.com 2008.
- (269) **Mathai E, Allegranzi B, Kilpatrick C, Pittet D.** Prevention and control of health care-associated infections through improved hand hygiene. *Indian J Med Microbiol* 2010;28:100-6.
- (270) **Stanchi NO, Martino PE, Gentilini E, Reinoso EH, Echeverría MG, Leardini NA, et al.** *Microbiología Veterinaria*. 1ra ed. 2007.
- (271) **MacConkey A.** Lactose-fermenting bacteria in faeces. *J Hyg (Lond)* 1905;5(3):333-79.
- (272) **Jones S, Burgos J, Lutnesky M, Sena J, Kumar S, Jones L, et al.** Dairy farm age and resistance to antimicrobial agents in *Escherichia coli* isolated from dairy topsoil. *Curr Microbiol* 2011 Apr 1;62(4):1139-46.

- (273) **Ankarloo J, Wikman S, Nicholls IA.** *Escherichia coli* mar and acrAB mutants display no tolerance to simple alcohols. Int J Mol Sci 2010;11(4):1403-12.
- (274) **Tortora GJ, Funke BR, Case CL.** Introducción a la microbiología. 9° ed. Editorial Medica Panamericana Sa de; 2007.
- (275) **Delaat A.** Microbiología. Primera edición ed. D.F., México: 1976.
- (276) **Madigan M, Martinko J, Parker J.** Brock Biología de los Microorganismos. Décima ed. 2004.
- (277) **FDA.** Bacteriological analytical manual. 8th ed. AOAC International. Gaithersburg, USA: 2002.